

**PEEK MALZEMENİN OSTEOJENİK AKTİVİTESİNİN
ARTIRILMASINDA ÇEŞİTLİ YÜZEY
MODİFİKASYONLARININ ROLÜ**

**THE ROLE OF DIFFERENT SURFACE MODIFICATIONS
FOR INCREASING THE OSTEOGENIC ACTIVITY OF
PEEK MATERIAL**

TUĞÇE GÜLTAN

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

TUĞÇE GÜLTAN' ın hazırladığı “**PEEK Malzemenin Osteojenik Aktivitesinin Artırılmasında Çeşitli Yüzey Modifikasyonlarının Rolü**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafında **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zümriye AKSU
Başkan



Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman



Prof. Dr. Şeniz ÖZALP YAMAN
Üye



Yrd. Doç. Dr. Hakan KAYI
Üye



Yrd. Doç. Dr. Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Birimiz üçümüz, üçümüz birimiz için...

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.

08/01/2017

Tuğçe GÜLTAN

ÖZET

PEEK MALZEMENİN OSTEOJENİK AKTİVİTESİNİN ARTIRILMASINDA ÇEŞİTLİ YÜZEY MODİFİKASYONLARININ ROLÜ

TUĞÇE GÜLTAN

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Ocak 2017, 105 sayfa

Bu çalışma 2210-C TÜBİTAK Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı Desteği ile hazırlanmıştır. Sunulan tez çalışması kapsamında çeşitli yüzey modifikasyonları kullanılarak Polietereterketon (PEEK) malzemenin biyo inert doğasının giderilmesi ve osteojenik aktivitesinin artırılması amaçlanmıştır. Mekanik ve fiziksel yöntemlerle modifiye edilen PEEK örnekler üzerine osteojenik aktiviteyi sağlamak için bor katkılı nano hidroksiapatit (B-nHAp), mikrodalga destekli yöntemle kaplanmış ve malzemenin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, PEEK yüzeylerin osteojenik aktiviteleri *in-vitro* hücre kültürü çalışmalarıyla incelenmiştir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında kesim sonrası 800 numara zımpara kağıdıyla kirliliklerinden arındırılan PEEK yüzeyler kumlama ile mekanik ve NaOH dağlama ile fizikokimyasal olarak modifiye edilmiştir. Modifikasyon sonrası B-PEEK (Boş PEEK), K-PEEK (Kumlanmış PEEK), N-PEEK (NaOH dağlanmış PEEK) ve K,N-PEEK (Kumlanmış ve NaOH dağlanmış PEEK) şeklinde adlandırılan örnek gruplarının yüzey özellikleri profilometre ve su temas açısı ölçümleriyle incelenmiştir. Pürüzlülük değerleri

sırasıyla B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örnekler için 982.7 ± 23.3 , 5051.0 ± 27.3 , 2884.0 ± 3.4 ve 4404.0 ± 21.2 nm olarak bulunmuştur. Yüzeylerin su temas açısı değerleri de aynı sırayla 62.8 ± 2.9 , 90.8 ± 3.3 , 71.0 ± 9.6 ve $108.6\pm 1.7^\circ$ olarak ölçülmüştür. Kumlamanın yüzeyde en fazla pürüzlülük oluşturduğu, ve buna bağlı olarak yüzeyin hidrofobitesini artırdığı, ancak en yüksek hidrofobitesinin hem mekanik hem de fiziksel modifikasyon yapılmış örneklerde olduğu görülmüştür.

Çalışmanın ikinci aşamasında, yukarıda listelenen örnekler üzerine biyomimetik yöntem kullanılarak bor katkılı 10 kat derişik yapay vücut sıvısı (10xSBF)-benzeri çözeltiden osseointegrasyonu destekleyecek bor-nanohidroksiapatit (B-nHAp), mikrodalga desteğiyle kaplanmış ve örneklerin azalan su temas açısı değerleri (sırasıyla; 24.4 ± 5.9 , 29.5 ± 5.5 , 22.8 ± 5.7 ve $25.8\pm 5.6^\circ$) artan hidrofilitiyi işaret etmiştir.

PEEK'in modifikasyonu sonucu elde edilen örneklerle yapılan hücre kültürü çalışmalarında MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılmış ve hücrelerin canlılığı PrestoBlue® analizi, morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Konfokal Mikroskop analizleri, osteojenik aktiviteleri ise Alkalen Fosfataz (ALP) aktivitesi ve kollajen miktarı ölçümü yanı sıra Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time- Polymerase Chain Reaction-RT-PCR) analizleriyle incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sonucu pürüzlendirme işlemlerinin osteojenik aktivitede artışı sağladığı, ancak B-nHAp kaplamanın yüzeyde MC3T3-E1 hücrelerinin tutunma, çoğalma ve farklılaşma kapasitelerini kaplanmamış örneklerle karşılaştırıldığında anlamlı oranda artırdığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak gerek mekanik gerekse fiziksel yöntemler kullanılarak modifiye edilen PEEK yüzeylerde biyoaktivite artışı sağlanmış, ancak osteojenik aktivitenin artırılmasında en etkin yöntemin B-nHAp kaplamalar ile sağlandığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: PEEK, implant, biyoaktivite, osseointegrasyon, mikrodalga, hidroksiapatit.

ABSTRACT

THE ROLE OF DIFFERENT SURFACE MODIFICATIONS FOR INCREASING THE OSTEOGENIC ACTIVITY OF PEEK MATERIAL

TUĞÇE GÜLTAN

Master of Science, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

January 2017, 105 pages

This study was prepared with a support of TÜBİTAK 2210-C Primary Subject National Scholarship Program for MSc Students. The aim of the present study is to eliminate the bioinert nature of Polyetheretherketone (PEEK) material and to increase its osteogenic activity by using various surface modifications. In order to provide osteogenic activity on mechanically and/or physically modified PEEK samples, boron doped nano-hydroxyapatite (B-nHAp) was coated by microwave-assisted method and material characterization studies were carried out. After that, osteogenic activities of PEEK material surfaces were investigated by *in-vitro* cell culture studies.

In the first step of the study, the PEEK surfaces were polished with 800-grid sandpaper after cutting. Then, surfaces were mechanically modified by sandblasting and physically modified by NaOH etching. After modification, sample groups were labeled as B-PEEK (Bare PEEK), S-PEEK (Sand-blasted PEEK), N-PEEK (NaOH etched PEEK) and S, N-PEEK (Sand-blasted and NaOH etched PEEK) and the surface properties of the samples were investigated via profilometer and water contact angle measurements. Roughness

values were found to be 982.7 ± 23.3 , 5051.0 ± 27.3 , 2884.0 ± 3.4 , and 4404.0 ± 21.2 nm for B-PEEK, S-PEEK, N-PEEK and S, N-PEEK samples, respectively. The water contact angle values of the surfaces were also measured as 62.8 ± 2.9 , 90.8 ± 3.3 , 71.0 ± 9.6 and $108.6 \pm 1.7^\circ$ in the same order. It was found that the sandblasting caused the greatest roughness on the surface and thus it was increased the hydrophobicity of the surfaces, but the highest hydrophobicity was seen in both mechanically and physically modified samples.

In the second part of the study, boron-nanohydroxyapatite (B-nHAp) was used to coat the surface of the listed samples above with a boron doped 10 times concentrated simulated body fluid (10xSBF)-like solution by using microwave-assisted biomimetic method to support osseointegration and the reduced water contact angle values of the samples (24.4 ± 5.9 , 29.5 ± 5.5 , 22.8 ± 5.7 , and $25.8 \pm 5.6^\circ$, respectively), indicated that increased hydrophilicity.

The MC3T3-E1 preosteoblastic cell line was used for cell culture studies of modified PEEK samples. PrestoBlue® analysis for cell viability studies, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Microscopy analyses for morphological observations, measurements of Alkaline Phosphatase (ALP) activity and collagen amount and Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analyses were used to investigate the osteogenic activities of cells cultured on PEEK samples. Cell culture results demonstrated that mechanical or physical modifications provide an increase in osteogenic activity, but the B-nHAp coating significantly increased the adhesion, proliferation and differentiation capacities of MC3T3-E1 cells on the surface compared to uncoated specimens.

As a result, it was determined that the bioactivity was increased on the PEEK surfaces modified mechanically or physically, but the most effective method for increasing osteogenic activity was provided with B-nHAp coatings.

Key words: PEEK, implant, bioactivity, osseointegration, microwave, and hydroxyapatite.

TEŞEKKÜR

Öğrenciliğimin ilk günlerinden beri örnek aldığım, hayatımın en güzel döneminin temellerini atarken de, bugün de üzerimden elini hiç çekmeyen ve çekmemesini umduğum, bilgi ve deneyimiyle yolumu aydınlatan, salt akademik danışmanlığın ötesinde her zaman her şeyimi paylaşabildiğim bir ailenin kurucusu olan çok kıymetli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na desteği, sağladığı imkanlar, kazandırdığı deneyimler, eşsiz sohbetleri ve bana inandığı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımında ve üzerimde emeği büyük olan, ben daha kafamdakileri cümleye dökemiyorken tüm sorularımı yanıtlayan, sorgulama yeteneği, çözüm odaklılığı ve hızlı hızlı konuşmalarına hayran olduğum **Yrd. Doç. Dr. Merve Çapkın Yurtsever**'e yüksek sabrı, öğrettikleri, ablalığı ve içten tavrı için teşekkürlerimi sunarım.

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu programı kapsamında tez çalışmalarımına maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı**'na teşekkürlerimi sunarım.

Dostlukları ve yaşadığımız güzel anları kelimelere asla sığdıramayacağımı bildiğim, her derdimi dinleyen, beni sakinleştiren ve zor zamanlarımızı birlikte atlatabilmeyi öğreten can içim **Şeymatoş**'uma, bıcır bıcır halleriyle modern sabahlarımızı güzelleştiren **Ebruş**'uma, uyanık tutmak için elinden geleni yapsa da istisnasız uyuyakaldığım her koltuk köşesinden beni yatağıma çekeleyen, beraber çalışmaktan her zaman zevk duyacağımı ve eğleneceğimi bildiğim **Pampador Dalim Elvano**'ma ve biz çalışırken yaptığı güzel yemeklerle her daim destekçimiz olan **Aykut**'a, okulda olduğunu bildiğim her gün koşa koşa yanına gitmek istediğim **Ayliš**'ime, kızlarıyla beraber hayatıma rakı beyazı katan gönüllerin biricik kimya mühendisi **Görkiş**'ime ve **Buğriş**'e, 10 m² yurt odamı cennet yapan ve benimle her türlü çılgınlığa tamam diyen **Özge**'me, her zaman sırtımı sonsuz güvenle dayayabildiğim **İku**'ma ve bizim yüzümüzden fahri kimya mühendisi olduğu yetmiyormuş gibi benimle yüksek lisans da yapmak zorunda kalan **Ceren**'ime, en mi güzel ev arkadaşım asla yalnız yürümeyeceğimi öğreten LivBird'üm, Obi Wan'ım **Burçik**'ime ,

Kahve kokuları ve içtenlikleriyle hatırlayacağım arkadaşlarım **Bedriye Topal**'a, **Aysu Arslan**'a, **Derya Kalelioğlu**'na, **Meryem Sümeyye Akdemir**'e, **İnci Şıxaliyeva**'ya, **Gülseren Irmak**'a, **Dr. Tuğrul Tolga Demirtaş**'a, gybet zamanlarımız kadar akademik konulardaki sohbetleriyle de ufkumu açan **Atakan Tevlek**'e,

Beraber çalıştıkça mutlu olduğum, mutlu olduğça daha çok çalışmak istediğim, deneyimlerini her zaman paylaşmaya açık sevgili laboratuvar arkadaşlarım **Yrd. Doç. Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş**'e, **Yrd. Doç. Dr. Murat Şimşek**'e, **Dr. Anıl Sera Çakmak**'a, **Dr. Soner Çakmak**'a, **Arş. Gör. Damla Çetin Altındal**'a, **Ekin Özge Tunçay**'a, **Gökçe Kaynak Bayrak**'a, **Meltem Gamze Öztürk**'e, **Arş. Gör. Demet Çakır**'a, **Arş. Gör. Ülkü Bozoğlu**'na ve **Farzin Sana**'ya,

Her zaman yanımda olan ve bana göre hiç büyüyecek küçük kardeşim **Gökhan Gültan**'a, bu yola çıktığımdan beri bana olan inançları hiç eksilmeyen, meleşimin bana en güzel emaneti canım annem **Dilek Uçar** ve babam **Necip Gültan**'a, **Hayatımdan hiç eksik olmamaları dileğiyle sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.**

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER	v
ÇİZELGELER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sert Doku İmplantları	3
2.2. Geleneksel İmplant Malzemeleri	4
2.2.1. Metalik implantlar	5
2.2.2. Seramik implantlar	6
2.2.3. Polimerik implantlar	6
2.2.4. Kompozit implantlar	7
2.3. Polietereterketon (PEEK)	8
2.3.1. PEEK'in genel özellikleri	8
2.3.2. İmplant malzemesi olarak PEEK	9
2.3.3. PEEK'ten üretilen implantlarda karşılaşılan sorunlar.....	10
2.3.3.1. Kemik oluşumu ve osseointegrasyonun sağlanamaması	11
2.3.4. PEEK implantların biyoaktifleştirilmesi	14
2.3.4.1. PEEK kompozitleri	14
HAp/PEEK kompozitleri	15
CFR/PEEK kompozitleri	17
Diğer PEEK kompozitleri	17
2.3.4.2. PEEK malzeme yüzey modifikasyonları	18
Fiziksel modifikasyonlar	18
Kimyasal modifikasyonlar	19
Yüzey kaplamaları	21
Kimyasal/fiziksel uygulamalar ve yüzey kaplamalarının etkileştirilmesi	23
2.3.5. Hidroksiapatit kaplama yöntemleri	24

2.3.5.1. Biyomimetik yöntem kullanılarak mikrodalga destekli hidroksiapatit kaplama	26
2.3.5.2. İyon katkılı hidroksiapatitler	27
2.3.5.3. Bor katkılı hidroksiapatit	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	29
3.1. Kullanılan Malzemeler	29
3.2. PEEK İmplant Malzemelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	30
3.2.1. PEEK malzemenin kesimi, pürüzsüzlendirilmesi ve modifikasyon öncesi temizlenmesi	30
3.2.2. PEEK malzemenin mekanik olarak modifikasyonu	31
3.2.3. PEEK malzemenin fiziksel modifikasyonu	31
3.2.4. Mekanik ve/veya fiziksel modifikasyonu yapılmış PEEK malzemelerin yüzey karakterizasyonu	32
3.2.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	32
3.2.4.2. Enerji dağılımlı X-ışını mikroanalizörü (EDX) analizi	32
3.2.4.3. Yüzey pürüzlülüğünün tayini	32
3.2.4.4. Su temas açısı (WCA) ölçümü	32
3.2.4.5. Toplam reflektansı azaltılmış- Fourier dönüşüm kızılötesi spektrofotometresi (ATR-FTIR) analizi	33
3.2.4.6. Biyoaktivite testi	33
Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	34
X ışını kırınımı (XRD) analizi	34
3.3. Mikrodalga Destekli Hidroksiapatit ve Bor Katkılı Hidroksiapatit Kaplamalar ve Karakterizasyonu	34
3.3.1. Mikrodalga destekli hidroksiapatit kaplama	34
3.3.2. Mikrodalga destekli bor katkılı hidroksiapatit kaplama.....	35
3.3.3. Mikrodalga destekli hidroksiapatit ve/veya bor katkılı hidroksiapatit kaplı PEEK yüzeylerin karakterizasyonu	37
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	37
3.4.1. PEEK malzemenin sterilizasyonu ve yüzeylere hücre ekimi	37
3.4.2. PrestoBlue® analizi	38
3.4.3. SEM analizi	38
3.4.4. Alkalin fosfataz (ALP) analizi	39
3.4.5. Toplam DNA miktarının belirlenmesi	39

3.4.6. Kollajen analizi	40
3.4.7. Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi	41
3.4.8. Immunofloresan boyama ve canlı/ölü hücre görüntüleme	42
3.4.9. İstatistiksel analiz	42
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI	43
4.1. PEEK implant malzemelerinin hazırlanması ve karakterizasyonu	43
4.1.1. PEEK malzemenin kesimi, pürüzsüzlendirilmesi ve modifikasyon öncesi temizlenmesi	43
4.1.2. PEEK malzemenin mekanik olarak modifikasyonu	45
4.1.3. PEEK malzemenin fiziksel modifikasyonu	45
4.1.4. Mekanik ve/veya fiziksel modifikasyonu yapılmış PEEK malzemelerin yüzey karakterizasyonu	46
4.1.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	47
4.1.4.2. Enerji dağılımlı X-ışını mikroanalizörü (EDX) analizi	48
4.1.4.3. Yüzey pürüzlülüğünün tayini	49
4.1.4.4. Su temas açısı (WCA) ölçümü	50
4.1.4.5. Toplam reflektansı azaltılmış- Fourier dönüşüm kızılötesi spektrofotometresi (ATR-FTIR) analizi	51
4.1.4.6. Biyoaktivite testi	53
Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	53
X ışını kırınımı (XRD) analizi	54
4.2. Biyomimetik yöntem kullanılarak mikrodalga destekli hidroksiapatit ve bor katkılı hidroksiapatit kaplamalar ve karakterizasyonu	54
4.2.1. Mikrodalga destekli hidroksiapatit kaplama	55
4.2.2. Mikrodalga destekli bor katkılı hidroksiapatit kaplama	55
4.2.3. Mikrodalga destekli hidroksiapatit ve/veya bor katkılı hidroksiapatit kaplı PEEK yüzeylerin karakterizasyonu	56
4.2.3.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	56
4.2.3.2. Enerji dağılımlı X-ışını mikroanalizörü (EDX) analizi	58
4.2.3.3. Su temas açısı (WCA) analizi	59
4.2.3.4. Toplam reflektansı azaltılmış- Fourier dönüşüm kızılötesi spektrofotometresi (ATR-FTIR) analizi	60
4.3. Hücre Kültürü Sonuçları.....	61

4.3.1. PEEK malzemenin sterilizasyonu ve yüzeylere hücre ekimi	62
4.3.2. PrestoBlue® analizi	62
4.3.3. SEM analizi	67
4.3.4. Alkale fosfataz (ALP) aktivite analizi	71
4.3.5. Toplam DNA miktarının belirlenmesi	73
4.3.6. Kollajen analizi	74
4.3.7. Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi	76
4.3.7. Immunofloresan boyama ve canlı/ölü hücre görüntüleme	85
5. GENEL SONUÇLAR	89
6. KAYNAKLAR	92
EK-1. ALP aktivitesi kalibrasyon grafiği	102
EK-2. Kollajen analizi kalibrasyon grafiği	103
ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. İmplant malzemelerinin vücuttaki kullanım bölgeleri, [14, 15]'ten değiştirilerek	4
Şekil 2.2. (a) PEEK'in kimyasal yapısı [26] ve (b) lomber bölgesi için vücut içi füzyon kafesi, (c) orta yüz bölgesi kırık implantı, (d) servikal omur bölgesi için vücut içi füzyon kafesi PEEK implant malzemeler [27]	8
Şekil 2.3. Kemiğin yapısı ve kemik ile implant malzemelerin mekanik dayanımının karşılaştırılması, [6, 29]'dan değiştirilerek	9
Şekil 2.4. Hücre–malzeme etkileşiminde belirleyici faktörler, [43]'ten değiştirilerek	12
Şekil 2.5. Biyomalzeme–hücre etkileşiminde biyosinyal yolağı, [43]'ten değiştirilerek ..	13
Şekil 2.6. PEEK'in biyoaktifleştirilmesi için kullanılan yöntemler, [5]'ten değiştirilerek	14
Şekil 2.7. PEEK ve seramik malzeme ile kompozit maddelerin eldesi [26, 45]'ten değiştirilerek	15
Şekil 2.8. Saf hidroksiapatitin kristalin yapısı; $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, [110]'dan değiştirilerek	25
Şekil 2.9. Termodinamik ve kinetik kontrollü HAp kristalizasyon yolağı, [115]'ten değiştirilerek	26
Şekil 4.1. (a) Firmadan tedarik edilen PEEK silindir, (b) kesim sonrası zımparalama yönü, ve (c) PEEK örneklerin modifikasyon öncesi görüntüleri	44
Şekil 4.2. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklerin yüzey modifikasyonu sonrası farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları soldan sağa sırasıyla 100 μm , 20 μm ve 10 μm 'yi temsil etmektedir	47
Şekil 4.3. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklere ait EDX spektrumları ..	48
Şekil 4.4. B-PEEK örneğe ait ATR-FTIR spektrumu	51
Şekil 4.5. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklere ait ATR-FTIR spektrumlarının karşılaştırılması	52
Şekil 4.6. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklerin SBF çözeltisine daldırıldıktan 7 ve 28 gün sonraki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları büyük fotoğraf ve sağ üst köşedeki fotoğraf için sırasıyla 100 μm ve 10 μm 'yi temsil etmektedir. Oklar yüzey üzerine çökelmiş HAp partikülleri göstermektedir	53

Şekil 4.7. Biyoaktivite testinin (solda) 7. ve (sağda) 28. gününde toplanan (yukarıdan aşağı) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklere ait XRD spektrumları	54
Şekil 4.8. B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp örneklerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları yukarıdan aşağıya sırasıyla 100 µm, 20 µm ve 2 µm'yi temsil etmektedir. Oklar kesim sonrası zımparalama ile malzeme yüzeyinde oluşan pürüzlülükleri, yıldızlar ise B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kaplanan HAp partikülleri temsil etmektedir	56
Şekil 4.9. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp, N-PEEK/B-nHAp ve K,N-PEEK/B-nHAp örneklerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları soldan sağa sırasıyla 100 µm, 10 µm ve 2 µm'yi temsil etmektedir. Oklar kesim sonrası zımparalama ile malzeme yüzeyinde oluşan pürüzlülükler ve NaOH dağlama sonrası yüzeyde oluşan kanalları, yıldızlar ise B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kaplanan B-nHAp partikülleri temsil etmektedir	57
Şekil 4.10. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp, N-PEEK/B-nHAp ve K,N-PEEK/B-nHAp örneklere ait EDX spektrumları	58
Şekil 4.11. B-PEEK/nHAp örneklerin ATR-FTIR spektrumu	60
Şekil 4.12. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp, N-PEEK/B-nHAp ve K,N-PEEK /B-nHAp örneklerin ATR-FTIR spektrumları	62
Şekil 4.13. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin PrestoBlue® analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=5, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05; aynı grubun bir önceki güne göre farklı günlerdeki değerleri arasında ♦♦p < 0.01)	63
Şekil 4.14. Şekil 4.14. B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin PrestoBlue® analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=5, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001)	64
Şekil 4.15. Şekil 4.15. B-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin PrestoBlue® analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=5, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)	66
Şekil 4.16. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeyler üzerinde hücrelerin hücre kültürünün (yukarıdan aşağıya sırasıyla) 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerindeki SEM görüntüleri, ölçek çubukları büyük fotoğraf ve sağ üst köşedeki fotoğraf için sırasıyla 20 µm ve 2 µm'yi	

göstermektedir. Oklar küçük büyütmelerde örnek üzerinde yaklaşılacak noktaları ve hücreleri temsil etmektedir	68
Şekil 4.17. B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin hücre kültürünün 28. günündeki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları büyük fotoğraf ve sağ üst köşedeki fotoğraf için sırasıyla 20 µm ve 2 µm'yi göstermektedir. Oklar küçük büyütmelerde örnek üzerinde yaklaşılacak noktaları ve hücreleri temsil etmektedir	69
Şekil 4.18. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin hücre kültürünün (yukarıdan aşağıya sırasıyla) 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerindeki SEM görüntüleri, ölçek çubukları büyük fotoğraf ve sağ üst köşedeki fotoğraf için sırasıyla 20 µm ve 2 µm'yi göstermektedir. Oklar küçük büyütmelerde örnek üzerinde yaklaşılacak noktaları ve hücreleri, yıldızlar ise kaplama sonrası modifikasyon topografisinin gözlemlendiği bölümleri temsil etmektedir	70
Şekil 4.19. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin ALP analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05)	72
Şekil 4.20. B-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin ALP analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)	73
Şekil 4.21. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin kollajen analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05)	74
Şekil 4.22. B-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin kollajen analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, ****p < 0.0001)	75
Şekil 4.23. (üstte) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağıl OCN gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01)	77
Şekil 4.24. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 21 ve 28. günlerdeki bağıl OCN gen ifadelerinin karşılaştırılması. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı	

günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05)	78
Şekil 4.25. (üstte) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağıl ALPL gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01)	79
Şekil 4.26. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 21 ve 28. günlerdeki bağıl ALPL gen ifadelerinin karşılaştırılması. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001)	80
Şekil 4.27. (üstte) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağıl Colla1 gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01)	82
Şekil 4.28. (üstte) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağıl RUNX2 gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, (üstte) aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01)	83
Şekil 4.29. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağıl OPN gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05)	84
Şekil 4.30. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeyler üzerinde hücrelerin kültürün 1. saatindeki immunofloresan boyama konfokal mikroskop görüntüleri, ölçek çubukları 20 µm'yi göstermektedir	85
Şekil 4.31. B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin kültürün 1. saatindeki immunofloresan boyama konfokal mikroskop görüntüleri, ölçek çubukları 20 µm'yi göstermektedir	86
Şekil 4.32. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin kültürün 1. saatindeki immunofloresan boyama konfokal mikroskop görüntüleri, ölçek çubukları 20 µm'yi göstermektedir	87
Şekil 4.33. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin kültürün 28. günündeki (üstte) canlı-ölü hücre boyama, (altta) immunofloresan boyama konfokal mikroskop görüntüleri , ölçek çubukları yukarıdan aşağıya sırasıyla 20 µm ve 40 µm'yi göstermektedir	88

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Biyomalzemelerin vücuttaki kullanım yerleri ve genel özellikleri, [15]'ten değiştirilerek	7
Çizelge 2.2. HAp kaplama yöntemlerinin karşılaştırması	25
Çizelge 3.1. Biyoaktivite testinde kullanılan Kokubo'nun SBF reçetesi, [130]' dan değiştirilerek	33
Çizelge 3.2. 1,000 mL 10xSBF-benzeri çözelti bileşenleri ve miktarları [131]	35
Çizelge 3.3. 1,000 mL bor katkılı 10xSBF çözelti bileşenleri ve miktarları [133]	36
Çizelge 3.4. Modifiye edilmiş PEEK malzemelerin hazırlanması	37
Çizelge 3.5. Kalibrasyon grafiği için gerekli DNA miktarları (20-1000 ng)	40
Çizelge 3.6. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri	41
Çizelge 4.1. Mekanik ve fiziksel olarak modifiye edilmiş PEEK malzemelerin pertometre analiz sonuçları	49
Çizelge 4.2. Mekanik ve fiziksel olarak modifiye edilmiş PEEK malzemelerin su temas açısı analizi sonuçları	50
Çizelge 4.3. PEEK polimerine ait karakteristik FTIR pikleri [3, 93, 103]	52
Çizelge 4.4. nHAp ve B-nHAp üretim yöntemlerinin karşılaştırılması, [133]'den değiştirilerek	55
Çizelge 4.5. nHAp ve B-nHAp içeriklerinin karşılaştırılması, [133]'den değiştirilerek	56
Çizelge 4.6. nHAp ve B-nHAp kaplı PEEK malzemelerin su temas açısı ölçüm sonuçları	59
Çizelge 4.7. HAp'a ait karakteristik FTIR pikleri [5, 78, 93]	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
μ	mikro
m	mili
n	nano

Kısaltmalar

Al_2O_3	Alüminyum oksit
ALP	Alkalen fosfataz
ALPL	Alkalen fosfataz bağıl gen ifadesi
ATR-FTIR	Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotmetresi – <i>Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
Au	Altın
B-PEEK	Boş PEEK
B-PEEK/B-nHAp	Bor katkılı nano-Hidroksiapatit kaplanmış Boş PEEK
B-PEEK/nHAp	nano-Hidroksiapatit kaplanmış Boş PEEK
BO	Büyüme ortamı
C	Karbon
C-AM	Calcein Acetoxymethyl
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Kalsiyum klorür dihidrat
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit – <i>complementary DNA</i>
CO_2	Karbon dioksit
Col1a1	Tip I Kollajen
DMAB	4-(Dimetilamino)benzaldehit
EDX	Enerji Dağılımlı X-ışını – <i>Energy Dispersive X-Ray</i>
Eth-I	Etidyum Homodimer I

F-aktin	Filamentous - actin
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
H ₃ BO ₃	Borik asit
KCl	Potasyum klorür
KFO	Kemik farklılaşma ortamı
K-PEEK	Kumlanmış PEEK
K-PEEK/B-nHAp	Bor katkılı nano-Hidroksiapatit kaplanmış Kumlanmış PEEK
K ₃ N-PEEK	Kumlanmış ve NaOH dağlanmış PEEK
K ₃ N-PEEK/B-nHAp	Bor katkılı nano-Hidroksiapatit kaplanmış kumlanmış ve NaOH dağlanmış PEEK
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	Potasyum hidrojen fosfat trihidrat
MgCl ₂ .6H ₂ O	Magnezyum klorür heksahidrat
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum hidrojen karbonat
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sodyum hidrojen fosfat monohidrat
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat
N-PEEK	NaOH dağlanmış PEEK
N-PEEK/B-nHAp	Bor katkılı nano-Hidroksiapatit kaplanmış NaOH dağlanmış PEEK
NaOH	Sodyum hidroksit
O	Oksijen
OCN	Osteokalsin
OPN	Osteopontin
Pd	Paladyum
PEEK	Polietereterketon
PEEK-OPTIMA	Tıbbi kullanıma uygun PEEK
PI	Propidyum iyodür – <i>Propidyum Iodide</i>
RNA	Ribonülkeik asit
rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu – <i>Real time polymerase chain reaction</i>
RUNX2	Runt bağlantılı transkripsiyon faktörü – 2

SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Si	Silisyum
v/v	Hacimce karışım
XRD	X ışını kırınımı – <i>X Ray Diffraction</i>
WCA	Su Temas Açısı – <i>Water Contact Angle</i>
w/v	Kütle-hacim karışımı
10XSBF	10 kat derişik yapay vücut sıvısı – <i>10 times concentrated simulated body fluid</i>

1. GİRİŞ

Dünya genelinde artan yaş ortalamaları nedeniyle, insan vücudunun büyük bir kısmını oluşturan kemik doku üzerinde yapılacak ortopedik, spinal, dental, kraniyal onarımlar ile çene ve yüz kemiklerinin onarımını ilgilendiren bilimsel çalışmaların sayısında önemli bir artış söz konusudur. Eklem iltihabı, kireçlenme, tümör oluşumu ve yapısal bozukluklara neden olabilecek travmalar gibi iskelet sisteminde oluşan hasarlar durumunda hasarın büyüklüğüne bağlı olarak farklı tedavi yaklaşımları ortaya çıkmaktadır. Küçük hasarlarda dokunun yeniden yapılanması (rejenerasyonu) endojen mekanizmalarla gerçekleşirken, büyük hasarlarda yeni kemik dokuya gereksinim duyulmaktadır. Disiplinlerarası bir dal olan “Kemik Doku Mühendisliği” yaklaşımı tarafından geliştirilen otogreft, allogreft ve kemik doku yerine geçebilecek yapay kemik greftleri kayıp kemik dokusunun onarımını sağlarken, onarımı mümkün olmayan büyüklüklerdeki hasarlar için hastalıklı veya kayıp kemik ile yer değiştirilmesi amacıyla üretilen implant malzemelerinin kullanımı gündemdeki tedavi yaklaşımlarıdır [1].

Kemik implantı üretiminde kullanılan biyomalzemeler incelendiğinde birden fazla malzeme grubunun tercih edildiği, ancak her malzeme grubunun sahip olduğu bazı dezavantajlar nedeniyle mükemmel bir malzeme için, sentez ve üretimi hedefleyen literatür çalışmalarının önemli olduğu görülmektedir. Yüksek bir ivmeyle ilerleme kaydedilen biyomalzeme biliminde, polietereterketon (PEEK), omurga füzyonu veya eklem implantı olarak son yıllarda sıklıkla kullanılan bir polimerdir [2]. Yüksek biyoyumluluğu ve toksik özellik göstermemesinin yanı sıra elastik modülünün kortikal kemiğe diğer metalik implantlardan daha yakın olması, tekrarlanabilir sterilizasyonu, ışık geçirgenlik (radiolucent) özelliği ile Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration-*FDA*) tarafından onaylanmış olması, PEEK’in bu alanda kullanımını artıran önemli avantajlarından [3]. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan diğer polimerlere oranla mekanik dayanımı oldukça yüksek olan PEEK, canlı doku ile etkileşimde implantın kemikle bütünleşmemesi gibi önemli bir dezavantaja sahiptir. Bu dezavantajın klinik aşamada yaratacağı sorunların engellenmesi amacıyla PEEK malzemenin yüzeyinde çeşitli modifikasyonların yapılması gerekli olmaktadır. PEEK’in biyoinert doğasının giderilmesinde en çok tercih edilen yaklaşımlar malzeme yüzeyinin pürüzlendirilerek hücrenin tutunma eğiliminin artırılması ve osseointegrasyonu artırmaya yönelik çeşitli yüzey kaplamaları geliştirilmesidir [4-6].

Osseointegrasyonun artırılmasında en çok kullanılan yüzey kaplama malzemelerinden biri biyoaktif bir biyoseramik olan hidroksiapatit (HAp)'tir. Seramiklere özgü zayıf mekanik özellikleri nedeniyle, kemik ve diş implantları gibi sert doku implantlarında genellikle doku ile implant arasında ara yüzey oluşturularak doku-implant bütünlüğünün korunması ve bölgesel hasarların kapatılmasında HAp, dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır. Hidroksiapatit kaplı yüzeylerle yapılan çalışmalarda kemik rejenerasyonu, hücre tutunması, büyümesi ve farklılaşmasının desteklendiği kanıtlanmıştır [7, 8].

HAp eldesi için kullanılan birden fazla üretim yöntemi bulunmakta ve bu yöntemler arasında doğal kemik yapısına en yakın HAp eldesi 'biyomimetik yöntem' ile sağlanmaktadır. Biyomimetik bir yaklaşımla üretilen HAp'in yığın ve mekanik özellikleri ile biyoaktif davranışını geliştirmek amacıyla bor katkılı HAp (B-HAp) gibi iyon katkılı hidroksiapatitler de üretilmekte ve kemik oluşumunu desteklediğini belirten çalışmalar yapılmaktadır [9, 10].

Sunulan tez çalışması kapsamında halen implant malzemesi olarak kullanılan ve yüksek mühendislik ürünü bir polimer olan PEEK'in biyoinert doğası nedeniyle karşılaşılan sorunların giderilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan literatür araştırmasının ışığında PEEK malzemenin biyoaktif özellik kazanmasını sağlamak için farklı yöntemler incelenerek etkin bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır.

Öncelikle, PEEK malzemesinin biyoaktivitesi, fiziksel ve kimyasal modifikasyonlarla değiştirilen yüzey pürüzlülüğü ile artırılmaya çalışılmıştır. Bunun yanı sıra, bor katkılı 10 kat derişik yapay vücut sıvısı (10xSBF) benzeri çözelti kullanılarak mikrodalga destekli biyomimetik yöntemle biyoaktif bir yüzey elde edilmesi amaçlanmıştır. Biyoaktivitesi artırılan malzemelerin, MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen 28 günlük *in-vitro* hücre kültürü çalışmaları ile osteojenik potansiyeli araştırılmış ve klinik çalışmalarda kullanılmak üzere uygun cevapların alındığı yaklaşım belirlenmiştir.

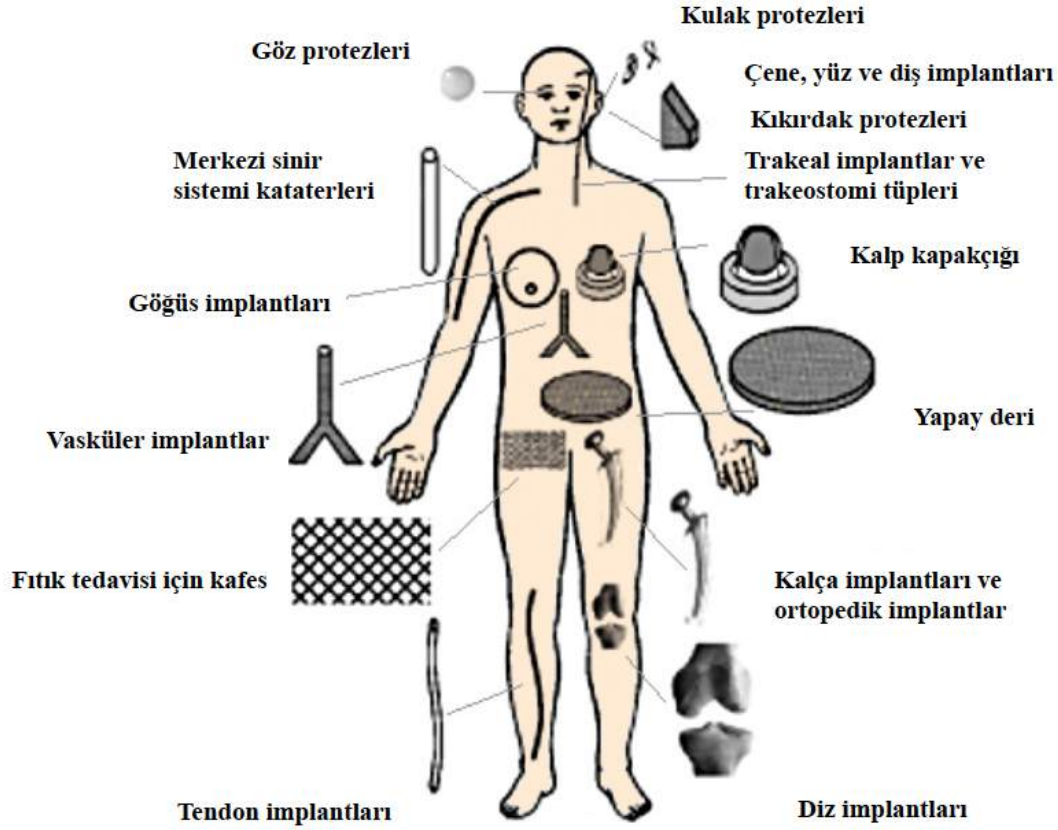
Biyoaktif hale getirilmiş PEEK polimeri ile üretilen implant malzemelerin, implante edilen bölgede hücrelerle etkileşiminin iyileştirilmesi, metalik ve kompozit implant malzemeleri ile çalışılırken karşılaşılan sorunların üstesinden gelebilmesi, implantasyon sonrası tomografik yöntemlerle görüntülenebilmesi ve doku oluşumunu iyileştirmesi gibi avantajları sayesinde hastaların da hayatlarını kolaylaştırması beklenmektedir. Araştırılacak yüzey modifikasyon yöntemleri ile PEEK implant malzemesinin biyoinert özelliğinin üstesinden gelinmesini hedef alan çalışmadan çıkacak sonuçların ilerleyen çalışmalara öncülük etmesi beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışmasını şekillendiren literatür bilgileri özetlenmiştir. İlk bölümde sert doku implantları ve geleneksel implant malzemeleri hakkında kısa bir bilgilendirme yapılmıştır. İkinci bölümde, tez kapsamında kullanılan polietereketon (PEEK) polimerinin özellikleri ve PEEK'in implant malzemesi olarak kullanımında yaşanan sorunlar ilgili alanda kullanılan diğer biyomalzemelerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bunun yanında, PEEK implantın biyoaktivitesini artırmak amacıyla yapılan fiziksel ve kimyasal modifikasyonlar ile yüzey kaplamalarına yer verilmiştir. Son olarak, yüzey kaplamalarında kullanılacak olan hidroksiapatitin (HAp) üretim yöntemleri ve iyon katkılı HAp'ler hakkındaki literatür bilgisi özetlenmiştir.

2.1. Sert Doku İmplantları

2000 yılında yapılan araştırma sonuçlarına göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl tedavi masrafları yaklaşık 10 milyar Dolar tutan, 280,000 kalça kırığı, 700,000 vertebral kırık (omur kırığı) ve 250,000 el bileği kırığı vakası görülmektedir. İstatistiksel olarak bu vakaların %5'inde geç iyileşme, %20'sinde ise vücudun kendini yenileyebilme kapasitesini aşan düzeylerde kırılma olduğu saptanmıştır [11]. Travma sonrası oluşan bu kırık vakalarının yanı sıra yaşlılık ve obezite gibi hastalıklara bağlı olarak iskelet sisteminin vücut ağırlığını taşıyamaması, omur kemiklerinde yaşanan aşırı baskıya bağlı bel ağrıları bireylerin yaşam kalitesini düşürmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 500,000 otolog kemik nakil operasyonu yapılmakta ve bu operasyonların yarısında omurga füzyonu cerrahisi gerçekleştirilmektedir [12]. İstatistiksel veriler göz önünde bulundurulduğunda, omurga cerrahisi de kemik doku mühendisliği açısından önemli bir uygulamayı oluşturmaktadır. İki kemik arasındaki onarımın mümkün olmadığı doku kayıplarında uygulanan bir diğer tedavi yöntemi ise eklem protezlerinin kullanılmasıdır. İmplant operasyonlarının acıyı ve engellilik durumunu ortadan kaldırma, aktif çalışma hayatına dönüşü sağlamak gibi amaçları düşünüldüğünde, genellikle diz ve kalça eklemlerinde yaygın uygulanması söz konusudur. Bu tür implantların uygulamalarında malzeme nedeniyle yaşanan enfeksiyon, biyolojik çevrenin tam olarak taklit edilememesi ve buna bağlı malzeme reddi gibi sorunlar önemli olup, yapılan araştırmalarla bu sorunların çözülmesi hedeflenmektedir [13]. Şekil 2.1'de implant malzemelerinin vücuttaki kullanım yerleri gösterilmiştir.



Şekil 2.1. İmplant malzemelerinin vücuttaki kullanım bölgeleri, [14, 15]'ten değiştirilerek.

Klinikte kullanılan ortopedik, spinal, dental ve kraniyal implantlar ‘**sert doku implantları**’ başlığı altında toplanmaktadır ve bu alanda yaygın olarak kullanılan malzemeler metaller, seramikler, polimerler veya en az iki malzeme grubunun bir arada kullanıldığı kompozitlerden oluşmaktadır.

2.2. Geleneksel İmplant Malzemeleri

Kullanılan malzeme türünden bağımsız olarak implant malzemelerinin olmazsa olmaz bazı özellikleri bulunmaktadır. Uygulama alanına göre maruz kalacağı çeşitli fizyolojik ve mekanik etkilere dayanım, tasarım, işlenebilme ve implantasyon sonrası manipülasyon kolaylığı gibi birçok özelliğe ek olarak malzemenin implantasyon sonrası başarısızlığa uğramaması için en temel özellik **biyoyumluluktur**.

Biyoyumluluk kavramı, bir biyomalzemenin implantasyon sonrası çevresindeki dokuyla toksik reaksiyona girmemesi, zamana bağlı mekanik, kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişim olmaması ile eğer bozunabilen bir malzemeysen bozunma sonucu oluşturacağı ürünlerin zararlı sistemik etki ve/veya bölgesel toksik etkilere neden olmaması olarak özetlenebilmektedir [16].

Sert dokuda kullanılmak üzere geliştirilen implant malzemelerinin **mekanik özellikleri** de üzerinde durulması gereken bir diğer önemli konudur. Diş implantları ya da kalça protezleri gibi yük taşıyan uygulamalar için seçilecek biyomalzemelerin türü; sertlik, elastisite, uzama, çekme veya basma mukavemeti gibi mekanik özellikler göz önünde bulundurularak belirlenir. İmplantasyon bölgesindeki dokuya spesifik mekanik özelliklere sahip malzeme seçimi başarılı bir müdahale için son derece önemlidir.

Mekanik özelliklere ek olarak kullanılacak olan biyomalzemenin korozyon, aşınma ve yorulma mukavemetinin yüksek olması gerekmektedir. Örneğin; düşük korozyon mukavemetine sahip malzemeler, implantasyon sonrası vücut içi sıvılarıyla reaksiyonu sonucu çevre dokulara toksik etki yaratabilmekte ya da sistemik zarar verebilmektedirler [15].

İmplant malzemesinin **üretim kolaylığı** da önemli bir seçim kriteridir. İmplant malzeme üretiminin maddi gereklilikleri düşünüldüğünde, farklı üretim metotları ile işlenebilme, işleme koşullarına uyum ve sürekliliğin yanı sıra optimal maliyetle tedarik edilecek hammadde kalitesi, malzeme seçimini doğrudan etkileyen unsurları oluşturmaktadır. İmplantasyon için kullanılacak malzemenin güvenli ve tekrarlanabilir bir biçimde sterillenebilir oluşu da dikkat edilmesi gereken bir özelliktir [17].

Osseointegrasyon ise bütün bu özelliklere sahip bir implant malzemesinin başarılı olması için üzerinde durulması gereken bir diğer önemli konudur. Kavramsal olarak osseointegrasyon veya osteointegrasyon, implant malzemesi ile kemik doku ara yüzündeki birleşme sırasında kemik dışındaki dokuların oluşmaması durumudur. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak implant malzemelerinin yeterli osseointegrasyona sahip olması biyoaktivitesi ile de ilişkilendirilmektedir. Bunun yanı sıra kullanılan malzemenin yüzey kimyası ve pürüzlülüğü gibi topografik özellikleri de implantın osseointegrasyonunu etkileyen diğer parametrelerdir [18].

2.2.1. Metalik implantlar

Altın (Au), tantal (Ta), paslanmaz çelik (SS), nikel-titanyum alaşımları (NiTi), titanyum (Ti) alaşımları ve kobalt-krom (Co-Cr) gibi metalik implantlar, uzun yıllar boyunca yüksek mekanik ve sürtünme dayanımları, toksik olmama gibi özellikleri nedeniyle kalça protezleri ve dental implantlar gibi kalıcı protez uygulamalarının yanı sıra plakalar, pinler, vidalar ve silindir formları ile kemik kırıklarını düzeltebilmek adına geçici implant uygulamalarında kullanılmışlardır [19, 20]. İlgili literatür incelendiğinde, metalik implantların yüksek dayanım gibi bazı özelliklerinin uzun dönemde dezavantaja dönüştüğü

görülmektedir. Yüksek dayanımları ve elastik modül değerinin insan kemik doku elastik modülünden uzak oluşu, metalik implantları doku mühendisliğinin temelinde yer alan biyolojik çevreyi en iyi şekilde taklit etme ilkesine uymaktan alıkoymaktadır. Bu uyumsuzluk, implant bölgesinde gerilim perdeleme etkisi (stress shielding effect) yaratarak komşu dokunun adsorpsiyonuna ve implant kaybıyla son bulacak başarısız bir operasyona neden olabilmektedir [21, 22]. Ayrıca, metallerin opak oluşları, bilgisayar destekli tomografi (CT) görüntülerinde yapay ya da yabancı bir doku gibi görünmelerine neden olmakta ve hastanın implantasyon sonrası manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yöntemiyle takip edilebilmesine kısıtlamalar getirmektedir. Bunun yanı sıra, metallerin uzun süre *in-vivo* ortamda bulunması alerjik doku reaksiyonlarını tetikleyebilmekte ve kemik erimesini başlatabilmektedir [5, 23].

2.2.2. Seramik implantlar

Metalik implant malzemelerinin dezavantajlarından ötürü malzeme bilimciler, alüminyum oksit (Al_2O_3) ve magnezyum oksit (MgO) gibi biyoinert seramik olan metalik oksitler, hidroksiapatit (HAp), trikalsiyum fosfat (TCP), oktakalsiyum fosfat (OCP) gibi kalsiyum fosfatlar ve biyocam gibi biyoaktif cam seramiklere yönelmişlerdir. Seramik implant malzemeleri genellikle sert dokunun onarımı, yenilenmesi ve büyümesinde kullanılmaktadırlar. Toksik olmama, uygun korozyon direnci, yüksek biyoyoumluluk ve biyoaktivite gibi avantajlarına rağmen biyoaktif seramiklerin düşük kopma dayanımı ve esnekliği, yüksek elastik modülü ve kırılma özelliği yükü dayanım gerektiren uygulamalarda (ortopedik, spinal, kraniyal uygulamalar gibi) kullanımına engel teşkil etmektedir [24].

2.2.3. Polimerik implantlar

Metalik implantlarda karşılaşılan olumsuz sonuçları ortadan kaldırmak için yeni malzeme arayışına gidilmesi, ultra yüksek molekül ağırlıklı poli(etilen) (UHMWPE), poli(metilmetakrilat) (PMMA), poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve bunların farklı bileşimlerindeki kopolimerleri, poli(tetrafloroetilen) (PTFE) ve poli(hidroksibütirat) (PHB) gibi polimerlerin biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur. Fakat, polimer malzeme grubunun çok az bir kısmı kemik implant malzemesi olarak kullanılabilir. Çünkü polimerler, ortopedik uygulamalarda aranan mekanik gereksinimleri karşılayamayacak kadar mukavemeti düşük ve esnek malzemelerdir. Bunun yanı sıra, polimerler bünyesine su alarak şişebilir, vücut

içinde çözünerek istenmeyen ürünler oluşturabilir veya *in-vitro* ve *in-vivo* uygulamalar için gerekli sterilizasyon süreçlerinden etkilenebilirler [22].

2.2.4. Kompozit implantlar

Kompozit malzemeler iki veya daha çok malzemenin bir arada kullanılması ile elde edilmektedirler. Malzemelerin tek başlarına kullanıldıklarında karşılaşılan dezavantajlarını yok etmek ve iyi özelliklerini bir arada kullanabilmek amacıyla üretilen, doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan kompozit biyomalzemelerin büyük bir kısmını polimer-seramik kompozit malzemeler oluşturmaktadır [16].

Çizelge 2.1. Biyomalzemelerin vücuttaki kullanım yerleri ve genel özellikleri, [15]'ten değiştirilerek.

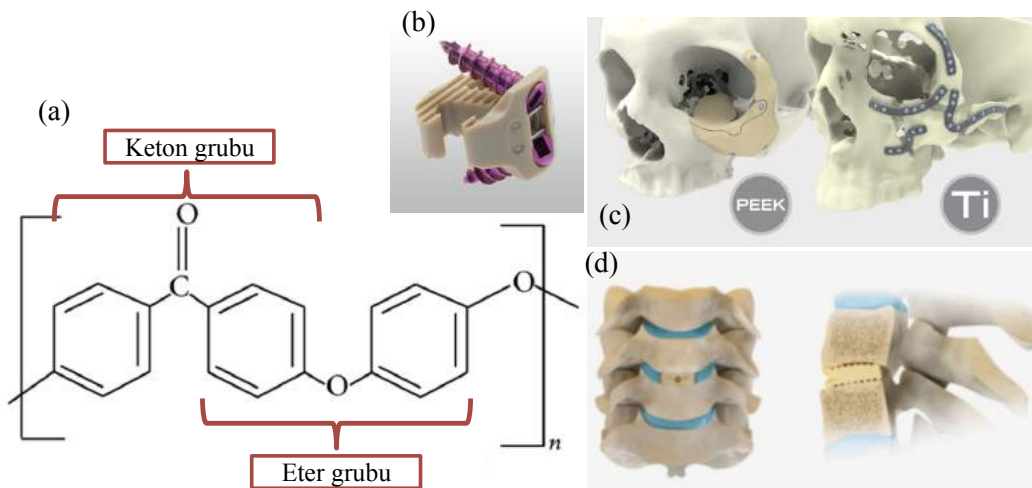
Malzeme Türü	Avantajlar	Dezavantajlar	Kullanım Alanı
Metaller (Ti ve alaşımları, Co-Cr alaşımları, Au, Ag, paslanmaz çelik, vb.)	<ul style="list-style-type: none"> • Kuvvetli • Sert • Sünek 	<ul style="list-style-type: none"> • Korozyona uğrayabilir • Yoğun • İşlenmesi zor 	<ul style="list-style-type: none"> • Eklem protezleri • Dental implantlar • Kalp pilleri • Dikiş telleri • Kemik plakaları ve vidaları
Seramikler (Alümina zirkonya, hidroksiapatit ve benzeri kalsiyum fosfatlar ile karbon fiberler gibi biyocamlar, vb.)	<ul style="list-style-type: none"> • Yüksek biyouyumluluk • Korozyon ve aşınma direnci yüksek 	<ul style="list-style-type: none"> • Kırılgan, • Esnek değil • İşlenmesi zor • Düşük mekanik dayanım 	<ul style="list-style-type: none"> • Dental implantlar • Ortopedik implantlar
Polimerler (nylon, silikon kaçucuk, polimerler, vb.)	<ul style="list-style-type: none"> • Esnek • Kolay şekillendirilebilir • Üretimi kolay 	<ul style="list-style-type: none"> • Düşük mekanik dayanım • Zamana bağlı deformasyona açık • Bozunabilir 	<ul style="list-style-type: none"> • Yumuşak dokular • Kan damarları • Kalça soketleri • Burun • Kulak • Dikiş ipliği
Kompozitler (karbon-karbon, fiber güçlendirilmiş kemik çimentosu)	<ul style="list-style-type: none"> • Mekanik dayanımı yüksek • Talep doğrultusunda üretilebilir 	<ul style="list-style-type: none"> • İşlenmesi zor 	<ul style="list-style-type: none"> • Dental reçine • Kemik çimentosu

Malzeme gruplarının genel olarak avantaj ve dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda, implantasyonun gerçekleştirileceği bölgeye mekanik ve biyolojik özellikleri en uygun malzeme seçiminin önemi vurgulanmaktadır. Çizelge 2.1'de malzeme gruplarının vücuttaki kullanım yerleri, avantajları ve dezavantajları özetlenmiştir.

2.3. Poli(etereterketon) – PEEK

2.3.1. Poli(etereterketon)'un genel özellikleri

IUPAC adlandırması poli(oksi-1,4-fenilenoksi-1,4-fenilenkarbonil-1,4-fenilen) olan PEEK, termoplastik ve yarı kristalin bir polimerdir [25]. Poli(etereterketon) (PEEK), 1980'li yıllarda endüstriyel uygulamalar için ticarileştirilen, aromatik ana zincirinde içsel bağlantılı keton ve eter fonksiyonel grupları bulunduran ve poli(arileterketon) (PAEK) olarak adlandırılan yüksek sıcaklık termoplastik polimer ailesindedir. Ortopedik ve spinal implant malzemesi olarak kullanılan iki önemli PAEK polimeri bulunmaktadır: Bunlar, poli (etereterketon) (PEEK) ve poli (arileterketoneterketonketon) (PEKEKK)'dur. Şekil 2.2'de PEEK'in kimyasal yapısı ve PEEK'ten üretilen uygulamaya yönelik şekillendirilmiş bazı implant malzemelerine yer verilmiştir.



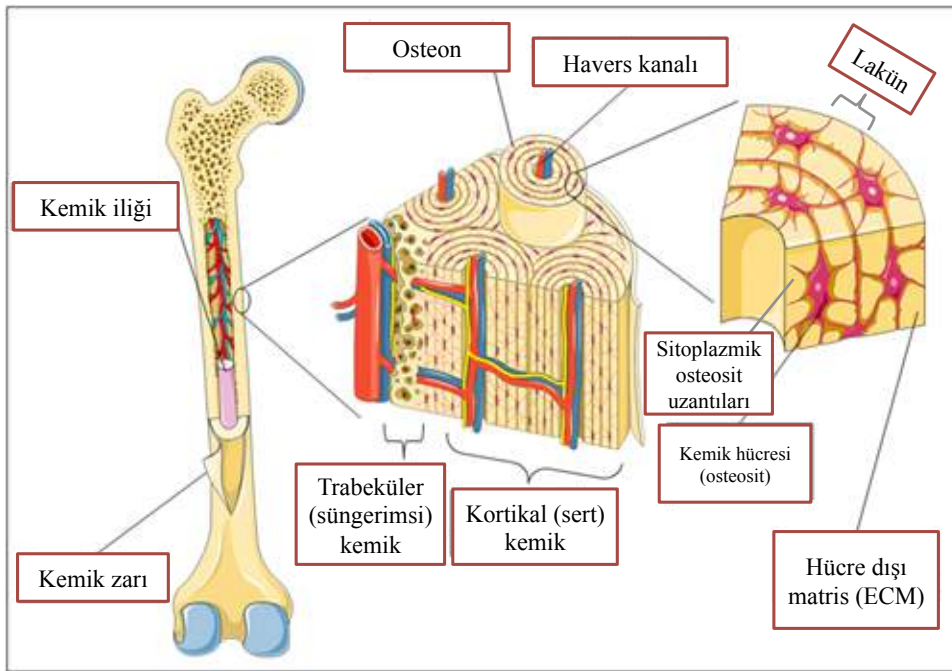
Şekil 2.2. (a) PEEK'in kimyasal yapısı [26] ve (b) lumbar bölgesi için vücut içi füzyon kafesi, (c) orta yüz bölgesi kırık implantı, (d) servikal omur bölgesi için vücut içi füzyon kafesi PEEK implant malzemeleri [27].

Kimyasal yapılarındaki poliaromatik keton halkaları, bu malzemelere birçok metale kıyasla yüksek sıcaklık değerlerinde (>300°C) termal kararlılık, kimyasallara ve ışımaya karşı dayanıklılık, cam ve karbon fiber gibi yapısal güçlendiricilere uyum ve birim kütle başına yüksek sertlik gibi özellikler kattığından hava aracı, türbin bıçakları gibi farklı endüstriyel alanlarda kullanımına olanak sağlamıştır [2]. PAEK polimerlerinin kimyasal sentezi iki farklı yöntemle gerçekleştirilmekte olup bu yöntemlerden ilki aromatik eter moleküllerinin keton gruplarına bağlanması reaksiyonu ve Friedel Craft açılasyonundan oluşmaktadır. İkinci yöntem ise aromatik keton halkalarını eter bağlarıyla bağlama

işleminin izlendiği nükleofilik yer değiştirme reaksiyonudur. ICI tarafından 1977 yılında patentlenen nükleofilik yöntem ile üretilen PEEK, polimerizasyonu tamamlandıktan sonra kimyasal olarak inert hale gelmekte ve oda sıcaklığında %98'lik sülfürik asit (H_2SO_4) harici geleneksel çözücülerde çözünmemektedir [28].

2.3.2. İmplant malzemesi olarak PEEK

Poliaromatik polimerlerin biyomalzeme olarak kullanılması fikri, sertlik derecesi kemiğe daha yakın izoelastik kalça implantları ve kırık fiksasyon plakaları arayışı ile 1980'lerde ortaya çıkmıştır. Şekil 2.3'te bir kemik, makro yapısından mikro yapısına doğru betimlenmiştir. Kortikal kemik, içerisinde osteositleri, osteonları ve Havers kanallarını bulundurarak kemiğin trabeküler kısmına kadar olan büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu nedenle kemik implantı olarak seçilecek malzemenin mekanik özellikleri kemiğin kortikal kısmıyla uyumlu olmalıdır. Şekil 2.3.'teki çizelgede kortikal kemik ile titanyum, PEEK ve karbon fiberlerle güçlendirilmiş PEEK kompozit implant malzemelere ait elastik modül ve çekme dayanım değerleri karşılaştırılmıştır. İlgili literatür incelendiğinde PEEK'in elastik modül ve çekme dayanımı değerleri ile kortikal kemiğe en yakın özellikleri taşıdığı görülmektedir (Şekil 2.3) [6].



Mekanik özellik	Kortikal kemik	Titanyum implant	PEEK implant	Karbon- PEEK kompoziti
Elastik modülüs (GPa)	16-23	116	4	>2000
Çekme Dayanımı (MPa)	80-150	897-1034	93	135

Şekil 2.3. Kemiğin yapısı ve kemik ile implant malzemelerin mekanik dayanımının karşılaştırılması, [6, 29]'dan değiştirilerek.

1990’larda araştırmacılar, çeşitli PAEK polimerleri ve polistiren (PS), poli(bütilentereftalat) (PBT) gibi yüksek performans mühendislik polimerlerinin biyoyumlulukları ve *in-vivo* kararlılıkları üzerine çalışmalar yürütmüşlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu, PEEK ve kompozitlerinin biyoyumluluğu ISO 10993-10 sensitizasyon testi, gen toksisite testleri gibi birçok standarda göre araştırılmış ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından medikal uygulamalarda kullanımı onaylanmıştır [30-33]. Bütün bu gelişmeler ışığında 1990’lı yılların sonunda PEEK, özellikle ortopedik implantlarda [34, 35] ve travma [36, 37] implantlarında metalik malzemelerin yerini alan termoplastik bir polimer olarak literatüre geçmeye başlamıştır. Bu gelişmeler PEEK’in omurga ameliyatlarında vücut içi füzyon kafes malzemesi olarak kullanılmasını da beraberinde getirmiştir [38].

PEEK’in fiziksel ve kimyasal özelliklerine bakıldığında, yapısında bulundurduğu amorf ve kristalin bölgeler sayesinde yarı-kristalin özellikte olduğu ve 343°C gibi yüksek bir erime sıcaklığına sahip olduğu görülmektedir. Camsı geçiş sıcaklığı 143°C olup, *in-vitro* ve *in-vivo* uygulamalarda gerekli olan 37°C vücut sıcaklığının oldukça üzerindedir ki, bu da PEEK’ten üretilen biyomalzemelerin kullanıldığı klinik çalışmaların sorunsuz bir şekilde devam ettirilebilmesini mümkün kılmaktadır. Bunun yanı sıra, yapılan mekanik test sonuçlarına göre, camsı geçiş sıcaklığının oldukça altında olan biyomalzeme uygulamalarında (37°C - vücut sıcaklığı) PEEK’in elastik özellikleri korunmaktadır [2]. Özellikle ultra yüksek moleköl ağırlıklı poli(etilen) (UHMWPE) gibi poliolefinler ve diğer birçok polialifatik polimerlerde yaşanan ışımaya kararsızlığı da PEEK de görülmeyen bir özelliktir. Bir başka deyişle, PEEK özel aromatik ana zincir yapısı sayesinde, ultraviyole (UV), gama ve elektron demeti gibi ışımalara maruz kaldığında UHMWPE gibi serbest radikaller oluşturarak bozunmaz ki, bu da PEEK’e UV ve gama sterilizasyonunun uygulanabilirliği avantajını sağlamaktadır [39]. Yapılan hücre kültürü ve hayvan çalışmaları da PEEK’in sitotoksik veya mutajenik olmadığını göstermiştir. Klinik çalışmalara bakıldığında, PEEK’in inflamasyona neden olmadığı görülmektedir [2, 40, 41].

2.3.3.PEEK’ten üretilen implantlarda karşılaşılan sorunlar

Biyomalzeme – doku etkileşimleri açısından, implant malzemeler dört gruba ayrılmaktadır. Bu gruplardan ilkini **toksik** malzemeler oluşurmaktadır. Toksik malzemeler implante edildikten sonra çevresindeki dokunun ölümüne neden olmaktadırlar. İkinci grup ise **biyoinert** malzemeleri içermektedir. Biyoinert malzemeler, implantasyon sonrası çevre

dokuda toksik etki göstermemekle beraber biyolojik olarak inaktif malzemelerdir. Çevre dokuda ölüm olmamasına rağmen süreç, implant çevresinde fibröz doku enkapsülasyonu nedeniyle implantın başarısızlığıyla sonuçlanmaktadır. Üçüncü grubu oluşturan **biyoaktif** malzemeler ise toksik olmama ve biyolojik olarak aktif olma özelliklerine sahiptirler. Biyolojik olarak aktivite ya da biyoaktivite terimi, implant malzemesi ile konak doku arasında ara yüzey kemik dokusunun oluşmasını ifade etmektedir. Biyoaktif camlar, bir çok polimer türü ve çoğu kalsiyum fosfat bazlı seramikler gibi biyoaktif biyomalzemeler kullanılarak yapılan implantasyon denemeleri başarıyla sonuçlanma ihtimali en yüksek olan çalışmalardır. Dördüncü malzeme grubu ise **biyoemilebilir** implant malzemelerinden oluşmaktadır. Kalsiyum sülfat, tirkalsiyum fosfat, PLGA ve biyoaktif camlar gibi biyoemilebilir implant malzemeleri *in-vivo* uygulamalarda toksik olmayan özellikler göstererek zamanla konak dokunun sentetik malzeme ile yer değiştirmesine olanak sağlayan malzemelerdir [16].

Literatürden alınan bilgiler ışığında PEEK değerlendirildiğinde, implant uygulamalarında kullanımı oldukça mümkün bir biyomalzemedir. Ancak, implant malzemelerinin üretiminde ve klinik kullanımlarında henüz altın bir standarda ulaşamadığı gibi PEEK'in implant malzemesi olarak kullanımında da bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. Mekanik, termal ve kimyasal dayanım, biyouyumluluk gibi bir çok avantajına rağmen PEEK'in **biyo inert** doğası implant malzeme olarak kullanımındaki en büyük kısıtı oluşturmaktadır.

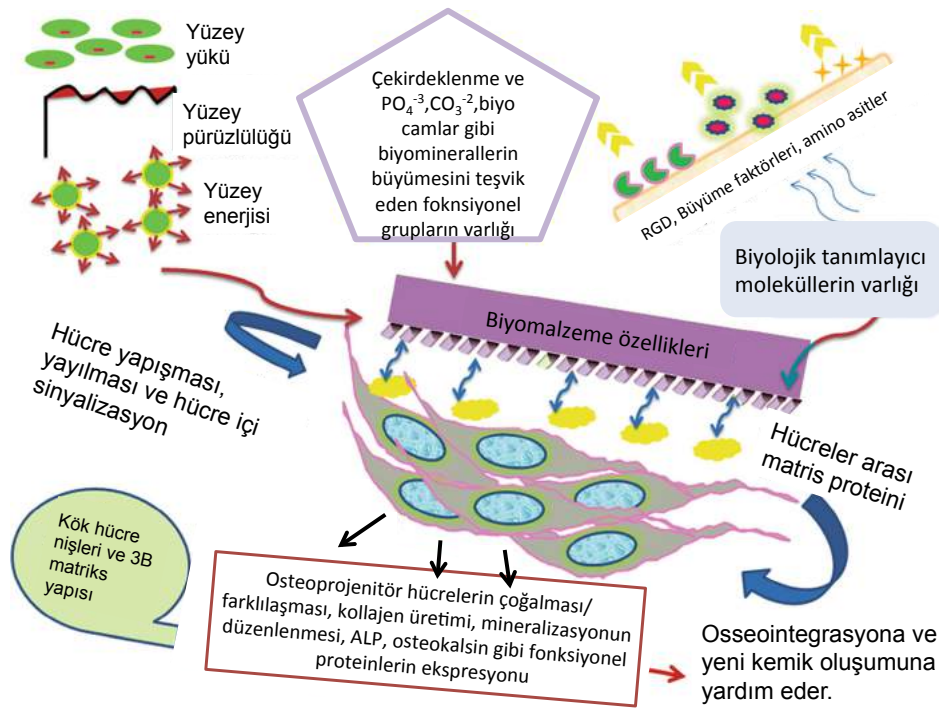
2.3.3.1. Kemik oluşumu ve osseointegrasyonun sağlanamaması

İmplantasyon sonrası yeni kemik dokunun oluşumu üç aşamada gerçekleşmektedir. Operasyon sonrası ilk 48 saat içerisinde mezenkimal hücreler bölgeye kemotaktik olarak yönelmekte ve doku kalıntılarının fagositozu gerçekleşmektedir. Hematomdaki trombosit ve lökositlerin aktivasyonu sonucunda implantın çevresinde kan pıhtılaşması meydana gelmekte ve implant yüzeyinde fibrin ağı oluşmaya başlamaktadır. Osteojenik hücreler bu fibrin ağı üzerinden implant yüzeyine göç ederek osteositleri ve sonrasında da yeni kemik dokusunu oluşturmaktadırlar. Bu süreç geniş bir biyokimyasal sinyal yolağı üzerinden gerçekleşmekte ve inflamatuvar (yangısal) yanıt olarak adlandırılmaktadır. Bu süreci takip eden sonraki 72 saat içerisinde kan damarlarının oluşumu başlamakta ve 3 haftalık süreç içerisinde granülasyon gerçekleşmektedir. Günde 50 µm kalınlığında büyüyerek ilerleyen anjiyogenez, 10 güne kadar mikrosirkülasyonun onarımını tamamlamaktadır. Bu sürecin ardından 4-6 hafta süren osteogenez başlamakta ve kemik morfojenik proteini (BMP) gibi indükleyici ajanlarla uyarılmaktadır. Katmanlı kemik doku oluşumu sonraki 7 gün

içerisinde örülmüş yapıdaki olgunlaşmamış kemik ile kademeli yer değiştirme sonucu gerçekleşmektedir. Rejenerasyon olarak adlandırılan bu süreci yeniden modellenme aşaması takip etmektedir. Örgülü olgun kemik yapısında maksimum kemik birikimi 3-4 ay içerisinde elde edilmektedir. Bu aşama yaklaşık 18 ay kadar sonra fonksiyonel yüklemeye verilen sistemik cevap durağan faza ulaşana kadar devam etmektedir [42].

Osseointegrasyon kavramının tanımı göz önünde bulundurulduğunda, implantasyon sonrası malzeme ile konak kemik dokusu arasında fibrin ağı oluşumundan sonra bu etkileşimin sağlanamaması sonucu ara yüzeyde fibröz doku oluşumu gerçekleşmektedir. Fibröz doku yapısı gerek mekanik gerekse morfolojik özellikler açısından kemik dokusundan farklı olup, işsi yapıdaki fibrotik hücrelerden oluşan bu yumuşak doku malzeme çevresini kaplayarak implant üzerinde kemik doku oluşumunu engellemektedir.

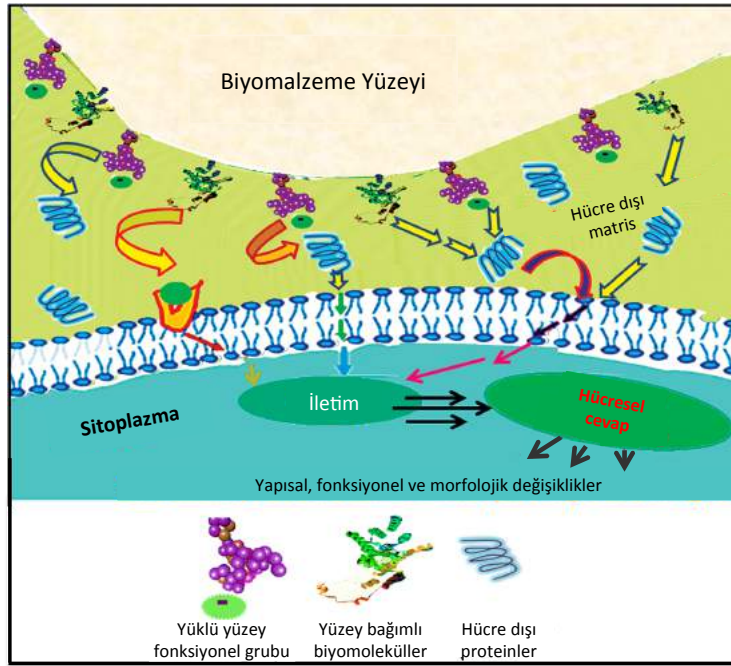
Belirtilen bütün avantajlarına rağmen, PEEK'in biyoinert oluşu osseointegrasyonun gerçekleşmesine de engel olmaktadır. Bu durum implantasyon sonrasında kemik ile malzeme arasındaki bütünleşmeyi engellemekte ve ara yüzeyde dayanımı düşük fibröz doku oluşturarak malzemenin kaybına neden olmaktadır. Şekil 2.4'te biyomalzeme yüzeyiyle hücre etkileşiminde belirleyici faktörler şematize edilmiştir.



Şekil 2.4. Hücre-malzeme etkileşiminde belirleyici faktörler, [43]'ten değiştirilerek.

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan implant malzemelerin osseointegrasyon yeteneği biyoaktivitesi ile de ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla, malzemenin osseointegrasyon eğilimini artırmak için biyoaktivitesinde artış sağlamaya çalışmak son yıllarda sıklıkla kullanılan yaklaşımı oluşturmaktadır. Biyomalzemelerin yüzeylerine fibronectin proteininin RGD sekansı gibi biyomoleküller, büyüme faktörleri veya aminoasitler gibi biyolojik tanımlayıcı moleküllerin bağlanması ya da emdirilmesi malzeme biyoaktivitesini artırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin yanı sıra, biyomalzeme yüzeyinde HAp gibi biyoseramikler, PO_4^{-3} , CO_3^{-2} iyonları veya biyocamlar gibi biyominerallerin çekirdeklenmesini tetikleyen fonksiyonel grupların oluşturulması da sıklıkla kullanılan bir yaklaşımdır. Biyoaktiviteye ek olarak, yüzeyin elektriksel yükü, kimyasal yapısı ve pürüzlülüğü gibi malzemenin topografik özellikleri de implantın osseointegrasyonu üzerinde etkisi olan diğer parametrelerdir [18].

Şekil 2.5'te biyomalzeme yüzeyine hücre tutunması sırasında oluşan biyosinyalizasyon ağı gösterilmiştir.



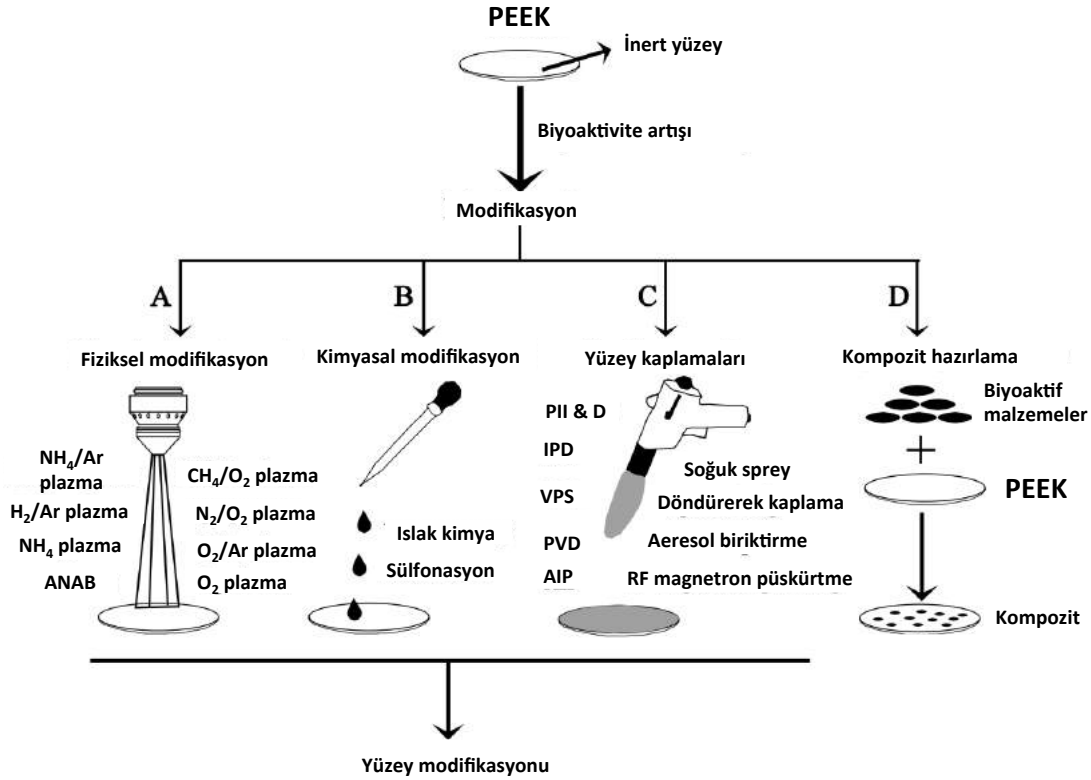
Şekil 2.5. Biyomalzeme–hücre etkileşiminde biyosinyal yolağı, [43] 'ten değiştirilerek.

Biyomalzeme yüzeyine tutturulan fibronectin gibi yüzey bağımlı biyomoleküller, hücre dışı proteinler ve yüklü yüzey fonksiyonel gruplar, hücre zarındaki proteoglikan komplekslerinin integrin reseptörleri ile etkileşmektedir ve bu etkileşim hücre zarı boyunca iletilerek sitoplazma içerisinde hücresel bir cevap oluşturulmaktadır. Oluşan cevaba uygun

olarak hücreler yüzeye tutunma eğilimi gösterecek yapısal, fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler göstermektedirler [43].

2.3.4.Poli(etereterketon)'un biyoaktifleştirilmesi

PEEK'e osseointegrasyon yeteneğinin kazandırılması ve biyoinert doğasının giderilebilmesi için kullanılan iki temel yöntem bulunmaktadır. Şekil 2.6'da PEEK'in biyoaktifleştirilmesi için kullanılan yöntemler özetlenmiştir.



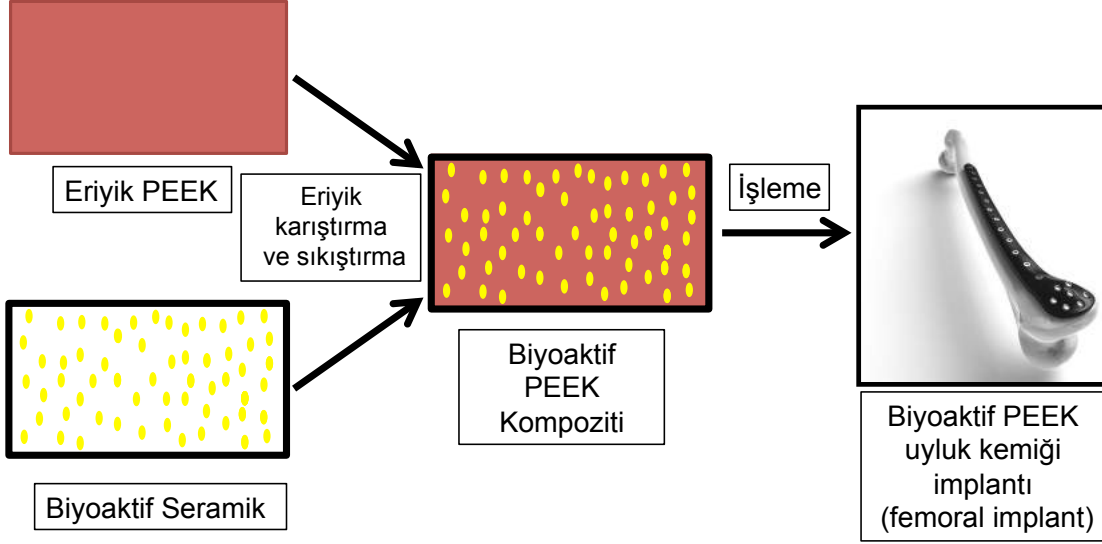
Şekil 2.6. PEEK'in biyoaktifleştirilmesi için kullanılan yöntemler, [5]'ten değiştirilerek.

Bu yöntemlerin ilki, PEEK malzemenin üretimi sırasında yapısına çeşitli biyoaktif katkı maddeleri ekleyerek biyolojik olarak aktif bir PEEK kompoziti elde etmektir. Diğer yöntem ise PEEK'in yüzeyinin modifiye edilerek biyoaktif hale getirilmesidir [5].

2.3.4.1.Poli(etereterketon) kompozitleri

Yapay kemik malzemesi olarak kullanılan hidroksiapatit (HAp), trikalsiyum fosfat (TCP), kalsiyum silikat (CaS), cam seramikleri ile biyocam gibi bazı seramiklerin özellikleri Bölüm 2.2.2'de belirtilmiştir. Bu malzemeler kemiğe bağlanabilme yetenekleri sayesinde biyoaktif olarak adlandırılmış olup klinik çalışmalarda kullanılmaktadırlar [24]. Fakat kortikal kemikle uyuşmayan elastik modül özellikleri ve kırılabilirlikleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Seramiklerin bu özellikleri, PEEK'in sağladığı kemik benzeri mekanik

özelliklere rağmen inert oluşunun getirdiği kemik dokuya fikse olamama problemi ile beraber düşünüldüğünde, her iki malzeme grubunun da iyi özelliklerinden faydalanılan bir kompozit yapı elde etme fikri ortaya çıkmıştır [44]. Şekil 2.7’de biyoaktif PEEK femoral implant hazırlanmasında kullanılan kompozit malzeme üretimi şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. PEEK ve seramik malzeme ile kompozit maddelerin eldesi [26, 45]’ten değiştirilerek.

PEEK polimer reçineleri ile biyoaktif seramik malzeme ekstrüder sistemi veya benzeri işleme metotları kullanılarak eriyik haldeyken karıştırılıp sıkıştırılmakta ve işleme sonrası şekillendirilerek implantasyona hazır hale getirilmektedir.

HAp/PEEK Kompozitleri

Geleneksel PEEK kompozitlerine bakıldığında en yaygın üretim, hidroksiapatitin yüksek biyouyumluluk, biyoaktivite ve osteokondüktivite özellikleri nedeniyle hidroksiapatit (HAp)/polietereterketon (PEEK) kompozitlerine aittir. HAp/PEEK kompozitler üzerine yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bakar ve ark., eriyik bileştirme, granülasyon ve enjeksiyon kalıplama yöntemlerini kullanarak hacimce farklı HAp oranına sahip (%0-%40) HAp/PEEK kompozitleri üretmiş ve kompozit içerisindeki HAp miktarına bağlı olarak malzeme özelliklerindeki değişimi incelemişlerdir. Çalışmada HAp içeriği artırıldıkça çekme modülü ve mikrosertlik artarken, çekme dayanımı ve kırılma mukavemetinde azalma olduğu sonucuna varılmıştır [46, 47]. Mekanik özelliklerinin yanı sıra HAp/PEEK kompozitlerin biyouyumluluğu ve biyoaktivitesi de araştırmacıların ilgisini çeken bir başka konudur. Zhang ve ark., seçici lazer sinterleme (SLS) tekniği kullanarak ürettikleri HAp/Polietilen ve HAp/Poliamit kompozitleri ile ilgili bir çalışmada, primer insan

osteoblast hücrelerini kullanarak, hücre tutunması, yayılması, farklılaşması ve morfolojik değişimleri incelemiştir. Deneysel veriler yorumlandığında, kompozit yapısının osteoblast gelişimini desteklediği, yüksek HAp içeriğinin hücre yayılması ve artan ALP aktivitesine bağlı olarak osteojenik farklılaşmayı tetiklediği sonucuna varılmıştır [48]. Bu çalışma PEEK malzemenin HAp ile kompozit olarak kullanıldığında biyoaktivitesinin artırılacağı yönünde yapılan çalışmalara ışık tutmuştur. Yu ve ark., karıştırma, sıkıştırma ve basınçsız sinterleme işlemlerini kullanarak hazırladıkları HAp/PEEK kompozitlerinin biyoaktivitesini belirlemek amacıyla iyon konsantrasyonu insan kan plazmasına çok yakın olan yapay vücut sıvısı (SBF) içerisine daldırma yöntemini kullanmışlardır [49]. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kompozitler SBF içerisinde bekletilerek üzerinde kemik benzeri apatit oluşumu gözlenmiştir. Çalışma sonucunda kompozit yapısında HAp miktarının artması ile SBF içerisinde kemik benzeri apatit oluşum hızının arttığı ve kontrol grubu olarak kullanılan saf PEEK üzerinde 28. gün sonunda dahi kemik benzeri apatit oluşmadığı belirtilmiştir [49]. İlerleyen çalışmalarında Bakar ve ark., geleneksel yöntemlerle üretilen kompozitlerde HAp partiküllerin, uzun dönem kuvvet uygulamalarında zayıf ara yüzey tutunmaları yüzünden PEEK matris yapısından uzaklaştığını fark etmişlerdir. Çalışmada, HAp partiküllerin yapıdan uzaklaşmaya başladığı noktadan itibaren matris ara yüzeyinde gerçekleşen ufak çatlakların daha büyük çatlaklara döndüğü ve malzemenin uzun dönemde yorulmaya bağlı başarısızlığına neden olduğu belirtilmiştir [50, 51]. Bu sorunun üstesinden gelebilmek adına HAp/PEEK kompozitleri gözenekli bir yapıda hazırlanarak incelenmiştir. Gözeneklilik problemini çözmek için Converse ve ark., HAp lifçikleri ile güçlendirilmiş PEEK iskeleler üretmişlerdir. HAp liflerini toz haline getirdikten sonra baskıyla kalıplama ve partikül uzaklaştırma yöntemi kullanarak hazırlanan kompozit iskelelerin gözenekliliğinin %75-%90 aralığında olduğu saptanmış, ancak çalışmanın mekanik kısmını takiben iskelelerin kullanıldığı *in-vitro* veya *in-vivo* herhangi bir çalışma yayınlanmamıştır [52]. Doğal kemik yapısının nanotopografisini taklit edebilmek adına nano boyutta HAp partikülleri kullanılarak PEEK kompozitleri hazırlanması yaklaşımı ile Roeder ve ark., HAp partikül boyutunun mekanik özellikler üzerinde etkisini araştırmışlardır. Çalışma kapsamında, nano ve mikro boyutta HAp ile hazırlanan kompozitler arasında mekanik olarak bir fark olmadığı belirtilmiştir [53].

CFR/PEEK Kompozitleri

Jarman-Smith, Bradley ve ark.'nın karbon fiberlerle güçlendirilmiş polimer (CFR-epoksi) [54] yaklaşımından yola çıkarak, PEEK'e karbon fiberlerin eklenmesi ile yeni bir kompozit üretimini gerçekleştirmiştir. Bu kompozit malzeme kırık fiksasyonu ve kalça eklemlerinde femoral protez olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sert ve manipülasyonu zor paslanmaz çelik kalça implant malzemelerinin yerini alan bu yarı-sert kompozit uygulamaları, Bradley ve ark.'nın çalışmasında kullanılan epoksi gibi termoset bir polimer yerine PEEK gibi bir yüksek mühendislik polimeri kullanılarak hazırlandığından mekanik performansı yüksek, ısıl işleme şekillendirilebilir bir implant malzemenin elde edilmesi sağlanmıştır [55]. Scotchford ve ark.'nın, CFR-PEEK ve titanyum alaşımını (Ti-6Al-4V) karşılaştırdıkları çalışmaya göre, iki malzeme arasında osteoblastların tutunma ve yayılma mekanizmaları açısından belirgin bir fark saptanmamıştır [56]. Sagomonyants ve ark. ise, işleme metotlarının yüzey pürüzlülüğünü değiştirerek PEEK ve CFR-PEEK biyoaktivitesini etkilediğini göstermiştir [57]. Her ne kadar 1990'ların başında CFR-PEEK kırık fiksasyonu için uygun bir malzeme olarak tanımlansa da, kompozit malzemelerin vücut içi kırık fiksasyonunda kullanılabilirliği halen araştırma aşamasında olup, klinik uygulamalara yönelik araştırmalar oldukça azdır. Ayrıca CFR-polimer tabakalarının üretiminin metalik tabakalara kıyasla daha zor ve daha maliyetli olması bu yaklaşımdan uzaklaşılmasına neden olmuştur [58-61].

Diğer PEEK Kompozitleri

Hidroksiapatit ve karbon fiberlerin yanı sıra, kalsiyum silikat (CS), cam fiberleri, biyocam, β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) ve stronsiyum katkılı hidroksiapatit gibi biyoaktif seramikler kullanılarak PEEK kompozitleri hazırlanmıştır. Kim ve ark, CS ile güçlendirilmiş PEEK kompozitleri hazırlamış ve kontrol grubu olarak aldıkları saf PEEK ile beraber SBF içerisinde bekleterek biyoaktivitesini incelemişlerdir. Mekanik özellikleri PEEK'e oranla daha iyi olan CS/PEEK üzerinde kemik benzeri HAp birikimi gözlenmiş ve araştırmacılara göre hacimce %20 CS içeren kompozit yapısı kemiğe yakın bulunmuştur [62]. Cam fiberler ile üretilen PEEK kompozitlerinde yapının biyoaktivitesi artarken [63, 64], stronsiyum katkılanmış PEEK (Sr-PEEK) ve HAp/PEEK (Sr-HAp/PEEK) kompozitlerinin karşılaştırıldığı çalışmada, Wong ve ark., Sr-HAp/PEEK'in de biyoaktif bir kompozit olduğunu kanıtlamış, ancak *in-vitro* hücre kültür çalışmaları sonucunda iki malzeme arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir [65]. Bu malzemelerin dışında kullanılan β -

TCP ile yapılan kompozit çalışmalarının hiçbirinde β -TCP'nin biyoaktivite artışı sağladığı, hücre tutunma, yayılma ve farklılaşmasını desteklediği belirtilmemiştir [66-68].

Yukarıda belirtilen bu malzemelerin dışında, TiO_2 de PEEK ile kompozit malzeme oluşturmak için literatürde kullanımına rastlanan bir bileşiktir. Wu ve ark., nano boyutta TiO_2 partiküller ve toz PEEK karışımından basınçla kalıplama yöntemi ile nano- TiO_2 /PEEK kompozitleri üretmiş ve bu yeni yapının yüzey morfolojisinin, pürüzlülüğünün PEEK'in biyoaktivitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Ayrıca çalışmada MG-63 kemik kanser (osteosarkoma) hücre hattı ile *in-vitro* hücre kültürü çalışmalarına ek olarak *in-vivo* biyoyumluluk çalışmaları da yapılmıştır. Deneysel sonuçlar, kontrol grubu olarak saf PEEK ile karşılaştırılan nano- TiO_2 /PEEK kompozitlerinin biyoaktivitesinde artış olduğunu, *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda başarı sağlandığını göstermiştir [69].

2.3.4.2. PEEK malzeme yüzey modifikasyonları

PEEK'i biyoaktif hale getirmek için kullanılan yöntemlerden ikincisi malzeme yüzeyinin modifiye edilmesidir. Her ne kadar PEEK, kimyasal ve fiziksel olarak kararlı bir polimer olsa da çeşitli işlemlerle modifiye edilebilmektedir. Bu işlemleri üç başlık altında toplamak gerekirse fiziksel modifikasyonlar, kimyasal modifikasyonlar ve yüzey kaplamaları olarak ayırmak mümkündür.

Fiziksel Modifikasyonlar

Yaygın olarak kullanılan fiziksel işlemler; oksijen (O_2) plazma, amonya (NH_4) plazma, azot/oksijen (N_2/O_2) plazma, metan/oksijen (CH_4/O_2) plazma, oksijen/argon (O_2/Ar) plazma, amonya/argon (NH_4/Ar) plazma ve hidrojen/argon (H_2/Ar) plazma gibi plazma modifikasyonları ve ivmelendirilmiş nötral atom demeti (ANAB), eksimer lazer ışımaya ve UV ışımaya gibi ışımaya uygulamalarıdır.

İlk plazma modifikasyon çalışmaları Briem ve ark. tarafından yapılmış olup PEEK malzeme yüzeyinin 2 farklı plazma işlemine maruz bırakılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada NH_4/Ar ve H_2/Ar plazma kullanılarak modifiye edilen gruplarda, primer osteoblast ve fibroblastların tutunma, yayılma ve farklılaşması araştırılmış ve polistiren doku kültür kaplarıyla (TCPS) karşılaştırılmıştır. Deneysel verilere dayanarak, hücrelerin osteojenik aktivitelerinin PEEK malzeme yüzeyinde daha yüksek olduğu ve plazma modifikasyonlarının biyoaktivite artırımında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [70]. Awaja ve ark., farklı plazma metotları kullanarak CH_4/O_2 gaz karışımı ile PEEK malzeme yüzeyini modifiye etmiştir. İlk çalışmalarında radyo-frekans

(RF) plazma kullanarak 2 adet pürüzsüz yarı-kristalin PEEK yüzeyin birbirine bağlanması sağlanmış ve muamele edilmemiş PEEK örneklerle oranla daha yüksek bağ dayanımı olan PEEK örnekler elde edilmiştir. Plazma daldırma iyon implantasyon ve biriktirme (PIII&D) tekniğini yine aynı gaz karışımı kullanılarak yapılan başka bir çalışmada PEEK malzeme yüzeyinde oksijence zengin yüksek yüzey enerjili nanofilmler oluşturulmuş, örneklerin hücre tutunmasını yüksek oranda artırdığı saptanmıştır [71, 72]. Brydone ve ark., nanodesenli PEEK çubukları üretmiş ve O₂ plazma ile örneklerini muamele ederek biyoaktivitelerini artırmıştır. Kalça bozukluğu olan tavşan modellerine implante ettikleri örneklerin hayvan test sonuçları, PEEK'in *in-vivo* osteoindüktif özellik kazanabildiğini göstermiştir [73]. Waser-Althaus ve ark. ise PEEK malzeme yüzeyini O₂/Ar ve NH₄ plazma ile modifiye etmişler ve yüzey üzerinde yağ doku türevli mezankimal kök hücrelerin (AdMSC) tutunma, yayılma ve osteojenik farklılaşmalarında artış elde etmişlerdir [74]. Khoury tarafından PEEK malzeme yüzeyinde argon gazı ile denenen ANAB tekniği ile elde edilen malzemeler ve çalışmanın devamındaki *in-vivo* sonuçlar, biyoaktif bir ajan eklemesi yapılmaksızın ya da polimer yüzey kimyası değiştirilmeden osteointegrasyonun sağlanabildiğini göstermiştir [75]. Fiziksel manipülasyonlar yığın haldeki saf PEEK malzeme yüzeyine uygulanabileceği gibi CFR-PEEK gibi kompozitlerin biyoaktivitesini artırmak için de kullanılabilir yöntemlerdir. Luo ve ark., 3 boyutlu CFR-PEEK kompozitleri üzerine atmosferik ortamda dielektrik set boşaltım plazma uygulayarak yüzey özelliklerini ve *in-vitro* biyoaktivite artışını incelemişlerdir. Sonuçlar, yüzeyin pürüzlülüğü ve ıslatılabilirliğinin arttığını göstermiştir. SBF çözeltisi içine daldırma yöntemi kullanılarak biyoaktivitesi incelenen yüzeylerde kemik benzeri apatit oluşumu gözlenirken modifiye edilmemiş CFR-PEEK malzeme yüzeyinde apatit oluşumuna rastlanmamıştır. CFR-PEEK kullanılan çalışmaların genelinde olduğu gibi bu çalışmada da hücrelerin malzemeye vereceği cevap incelenmemiştir [76].

Kimyasal Modifikasyonlar

Kimyasal modifikasyon işlemleri fiziksel işlemlere göre daha az olup sadece sülfonasyon muameleleri ve ıslak kimya uygulamaları PEEK malzeme yüzeyini kimyasal olarak modifiye edebilmektedir.

PEEK'in oda sıcaklığında %98'lik sülfürik asit çözeltisi hariç geleneksel çözücülerde çözünmediği Bölüm 2.3.1'de belirtilmiş olmakla birlikte sülfürik asit kullanarak PEEK malzeme yüzeyinin biyoaktif hale getirilmesi ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Zhao ve ark.'nın 2013 yılında yayınladıkları çalışmada, %98 H₂SO₄ çözeltisi ile sülfonasyon

işlemine takiben suya daldırma işlemi gerçekleştirilen örneklerin yüzeyinde biyo-fonksiyonel gruplar oluşturularak 3-boyutlu, gözenekli ve nanometre boyutunda detaylara sahip ağıs bir yapı oluşturulmuştur. Sülfonasyon sonrası SPEEK, suya daldırma işleminden sonra SPEEK-W ve ayrıca bu basamaklardan sonra aseton muamelesi gören örnekler SPEEK-WA olarak adlandırılmış, malzeme yüzeyinde *in-vitro* hücre davranışı, *in-vivo* osseointegrasyon ve örneklerin apatit oluşturabilme özellikleri incelenmiştir. SPEEK-WA olarak adlandırılan örneklerin *in-vitro*'da tutunma, yayılma ve osteojenik farklılaşmayı artırdığı, *in-vivo* ortamda ise osteointegrasyonu sağlarken kemik-implant ara yüzeyinde bağlanmayı iyileştirdiği ve apatit oluşturabildiği sonuçları elde edilmiştir. SPEEK-W örnekler, SPEEK-WA ile yakın yüzey özellikleri göstermesine rağmen, yapıdaki sülfürik asit kalıntıları sebebiyle hücre uyumluluğu aşamasında başarısızlığa uğramıştır [77].

Zheng ve ark.'nın PEEK malzeme yüzeyinde karboksil radikal grupları oluşturmak şeklinde gerçekleştirdikleri çalışmada, akrilik asit monomerleri basınçlandırılarak PEEK malzeme yüzeyinde polimerleştirilmiştir. Polimerleşmeyen monomerlerin yapıdan uzaklaştırılması işleminden sonra örnekler PEEK-COOH olarak adlandırılmış ve 28 gün boyunca SBF çözeltisi içinde bekletilerek HAp tabakası oluşturup oluşturmadıklarına bağlı olarak biyoaktivitelerindeki artış incelenmiştir. Mekanik analizler sonucu, polimerizasyonun yığın malzemeye zarar vermediği sadece yüzeyi etkilediği belirtilmiş olup kontrol grubu olarak kullanılan saf PEEK üzerinde HAp birikimi gerçekleşmezken PEEK-COOH yüzeyinde kemik benzeri HAp oluşumu gerçekleşmiştir [78]. Zhang ve ark.'nın bir başka çalışmasında ise PEEK malzeme yüzeyi üzerinde hücre yapışmasını destekleyen bir peptit olan Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) kovalent kimyasal bağlanma yöntemi kullanılarak immobilize edilmiştir. Çalışmanın hücre kültürü kısmında MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı kullanılmış ve modifiye edilmiş PEEK örneklerin modifiye edilmemişlere oranla daha yüksek tutunma ve yayılma gösterdiği belirtilerek bu yöntemle hazırlanan örneklerin ortopedik ve dental uygulamalarda kullanılabileceği belirtilmiştir [79].

Pino ve ark.'nın, yapay kornea malzemesi üzerinde HAp tabaka oluşumu ve artışına bağlı olarak biyoaktiviteyi inceledikleri çalışmalarında PEEK, HDPE ve UHMWPE filmler kullanılmıştır. Literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada farklı derişimlerde sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi kullanılarak polimer yüzeyleri modifiye edilmiş ve SBF çözeltisine daldırma yöntemiyle derişimin HAp tabaka oluşum süresine

etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre PEEK malzeme yüzeyleri için NaOH konsantrasyonu arttıkça HAp tabaka oluşum süresinin azaldığı belirtilmiştir [80].

Yüzey Kaplamaları

Bir diğer yüzey modifikasyonu ise PEEK malzeme yüzeyinde soğuk püskürtme, radyo-frekans (RF) magnetron püskürtme, döndürerek kaplama, aerosol biriktirme (AD), iyonik plazma biriktirme (IPD), plazma daldırma iyon implantasyon ve biriktirme (PIII&D), elektron demeti biriktirme, vakum plazma püskürtme (VPS), fiziksel buhar biriktirme (PVD) ve ark iyon tabakalama (AIP) gibi kaplama yöntemleri kullanılarak biyoaktif bir malzeme biriktirme esasına dayanır. Kimyasal ve fiziksel modifikasyonlar tek başına ya da yüzey kaplama yöntemleriyle beraber kullanıldıklarında PEEK biyoaktivitesini artırmada önemli gelişmeler kaydedilmiştir [5, 6].

PEEK malzeme yüzeyinin biyoaktivitesini artırmak üzerine yapılan kaplama çalışmalarında kullanılan bazı malzemeler hidroksiapatit (HAp), titanyum (Ti), altın (Au), titanyum dioksit (TiO₂), elmas benzeri karbon (DLC) ve *tert*-bütoksitlerdir. Bu malzemeler içerisinde en yaygın kullanılanı ise kimyasal formülü Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ ile fosfat bazlı bir biyoseramik olan hidroksiapatittir. HAp, insan kemik minerallerine en yakın sentetik malzeme olması, yüksek biyouyumluluğu, biyoaktivitesi ve *in-vivo* osteokondüktif özelliği sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [44, 81-83]. Bu bölümde değerlendirilen yöntemler arasında en yaygın kullanılan iki yöntem plazma püskürtme ve soğuk püskürtmedir. Plazma püskürtme metodu, metalik implant yüzeyine biyoaktif kaplama yapmak için kullanılan çok iyi tanımlanmış bir yöntem olup PEEK malzeme yüzeyi kaplamalarında da kullanımı literatüre geçmiş bir yöntemdir. Ticari olarak kullanılan plazma püskürtme tekniğinin yüksek sıcaklık değerlerinde çalışılması nedeniyle getirdiği zayıf tutunma mukavemeti ve kaplama malzemesinin kristalinitesini değiştirme gibi dezavantajları nedeniyle daha düşük sıcaklıklarda çalışılabilen vakum plazma püskürtme tekniği geliştirilmiş ve PEEK malzeme yüzeylerinde kullanımı daha uygun bulunmuştur [84-89]. Fakat metalik implantlara göre termal kararlılığı daha düşük olan polimerler ailesinden olan PEEK malzeme yüzeyinde sıcaklığa bağlı bozunmaları önlemek amacıyla daha düşük sıcaklıklarda çalışma imkanı veren soğuk püskürtme metodunun kullanımı da tercih edilmektedir [90]. Lee ve ark., soğuk püskürtme tekniği ile hazırladıkları HAp kaplı PEEK malzeme yüzeylerinin *in-vitro* ve *in-vivo* biyoaktivitesini inceledikleri çalışmada, insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin (hBMSCs) tutunma, canlılık ve osteoblastik farklılaşmalarının HAp kaplama sayesinde arttığını belirtmişlerdir. *In-vivo* testler için

kullanılan HAp kaplı PEEK silindirler tavşan kalça kemik modeline yerleştirilmiş, kontrol grubu olarak kullanılan kaplanmamış PEEK malzeme yüzeylerden farklı olarak HAp kaplı olan PEEK örneklerde mikro-CT (μ -CT) ve histomorfometrik analiz sonuçlarına göre implant çevresindeki kemik doku ile osseointegrasyonun sağlandığı saptanmıştır [91]. Yüksek sıcaklık değerlerinde ısı işlem gerektirmeyen aerosol biriktirme ve radyo-frekans magnetron püskürtme gibi fiziksel modifikasyon işlemleri de yüzey kaplamalarında kullanılan yöntemlerdir [92, 93]. Almasi ve ark.'nın çalışmasında plazma püskürtme yöntemine göre daha avantajlı bir kaplama yöntemi geliştirmek amaçlanmış ve bu nedenle kimyasal biriktirme işlemi kullanılarak PEEK malzeme yüzeyinde kristalin morfolojide HAp tabakası oluşturulmuştur. Zımparayla ön pürüzlendirmeye tabi tutulan ve asetonla yıkanıp kurutulan örnekler, oda sıcaklığında farklı sürelerde sülfürik asitle muamele edilip %10 HAp süspansiyonunda 5 saat bekletilerek kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sülfürik asit ile muamele süresinin artışına bağlı olarak artan pürüzlülüğün kaplama kalınlığı ile de doğru orantılı olduğu belirtilmiştir [94].

Titanyum (Ti) mükemmel mekanik ve biyolojik özellikleri nedeniyle yük mukavemeti gerektiren ortopedik ve dental uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir biyomalzemedir. Bu nedenle PEEK malzeme yüzeyine kaplanması farklı çalışmalarda araştırılmıştır. Örneğin, Cook ve ark. plazma buhar biriktirme (PVD) yöntemi ile PEEK silindirik implant yüzey üzerine Ti kaplama yapmış ve örnekleri melez köpek kalça modeline implante etmişlerdir. Dört ve 8 hafta sonunda implant-kemik etkileşiminin incelendiği çalışmada Ti kaplamaya sahip örneklerin osseointegrasyonunun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [95]. PEEK polimer yüzeyine Ti kaplama yapılabildiği gibi literatürde CFR/PEEK kompozitler üzerine de VPS ve PVD gibi yöntemler kullanılarak titanyum kaplamaların yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır [96, 97].

Titanyum gibi titanyum dioksit (TiO_2) de yüksek biyouyumluluk, biyoaktivite, hidrofilisite ve korozyon direncine sahip bir malzemedir [98, 99]. Tsou, Chi ve ark., TiO_2 kaplı biyomedikal polimer ara katmanında biyomimetik hidroksiapatit gelişimi üzerine yayınladıkları çalışmalarında, ark iyon tabakalama (AIP) tekniğiyle; argon iyonu bombardımanı, altta titanyum tabaka oluşturma ve en üst katman olarak titanyum dioksit kaplama oluşturma şeklinde ilerleyen prosedürle PEEK substratları kaplamışlardır. Parametreler değiştirilerek anatazca zengin (A- TiO_2) veya rutilce zengin (R- TiO_2) TiO_2 kaplamalar elde edilmiştir ve örnekler belirli sürelerle SBF'ye daldırılmıştır. Daldırma süresine bağlı olarak HAp tabaka kalınlığı her grupta artsa da en yüksek artış eğilimi R-

TiO₂ kaplı PEEK örneklerde görülmüştür. Osteouyumluluk testleri MC3T3-E1 preosteoblast hücre hatlarıyla yapılmış ve HAp tabaka kalınlığı ile arasında doğrusal ilişki olduğu görülerek kemiğe en fazla uyumlu örnek R-TiO₂ kaplamalı PEEK örnekler olarak belirlenmiştir [100-102]. Yaygın olarak kullanılan HAp, Ti ve TiO₂ gibi kaplamaların yanı sıra, Wang ve ark. ile Dennes ve ark.'nın çalışmalarında kullandığı elmas benzeri karbon (DLC) gibi farklı malzemelerin de PEEK malzeme yüzey kaplaması olarak kullanımı üzerine çalışmalar literatürde yer almıştır [103, 104].

Du ve ark.'nın çalışmasında kullandıkları kollajen kaplama yöntemi de PEEK malzeme yüzey modifikasyonunda kullanılan kaplamalara farklı bir bakış açısı getirmiştir [105].

Literatürde ayrıca implant yüzeylerin pürüzlendirilerek ıslatılabilirliğinin artırıldığı ve bu sayede biyoaktivite sağlandığı yönünde çalışmalar da bulunmaktadır. Hallmann ve ark.'nın çalışmalarında, dental uygulamalarda kullanılacak PEEK implantların tutunma özelliklerini güçlendirmek için farklı ön muamele işlemleri araştırılmıştır. Kimyasal modifikasyon işlemi için pirana çözeltisi kullanılmış, mekanik aşındırma için ise farklı boyutlarda alüminyum partiküllerin yanı sıra farklı çaplı silika kaplı alüminyum partiküller kullanılmıştır. Kimyasal dağlamanın mikro-pürüzlülüğü sağladığı, fonksiyonel grupların sayısını artırdığı ve çekme bağ kuvvetini artırdığı belirtilen çalışmada mekanik aşındırma ve kimyasal dağlama arasında bir fark görülmemiştir. Tribokimyasal silika çöktürme işlemi, kimyasal modifikasyonla yapıdan uzaklaştığı için PEEK'in bağlanma kuvvetine etki etmemiştir. Tek başına beklentileri tam olarak karşılamayan bu iki yöntem birlikte kullanılarak PEEK malzeme yüzey üzerinde maksimum pürüzlülük ve fonksiyonel grup açılımı elde edildiği belirtilmiştir [106].

Kimyasal/Fiziksel Uygulamalar ve Yüzey Kaplamalarının Etkileştirilmesi

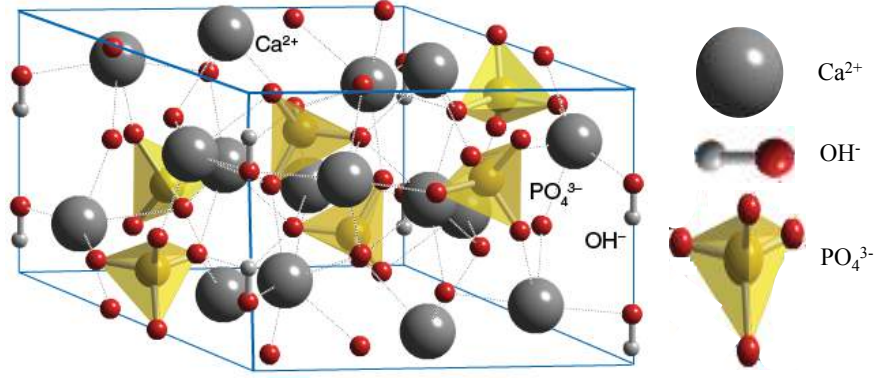
Kimyasal ya da fiziksel uygulamalarla beraber yüzey kaplamalarının kullanıldığı ve modifikasyonların kaplamaya, *in-vitro* ve *in-vivo* biyouyumluluğa olan etkisinin incelendiği az sayıda çalışma bulunmaktadır. Zhou ve ark., PEEK malzeme yüzeyini mikrodalga sistem desteği kullanarak biyoaktif hale getirmeyi amaçlamıştır. Grup, PEEK malzeme üzerine HAp kaplama öncesi mikrodalga destekli sodyum hidroksit (NaOH) muamelesi yaparak yüzeyin pürüzlülüğünü fiziksel olarak sağlamış ve daha sonra yine mikrodalga desteğiyle SBF çözeltisinden HAp çöktürme yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışmanın en önemli avantajı; dağlama ve kaplanma süresinin azaltılması, plazma sprej gibi yöntemlere kıyasla daha düşük sıcaklıklarda çalışabilme imkanı sağlaması ve yüksek pürüzlülükte homojen bir kaplama elde edilmesidir. Hücre uyumluluk testleri dahilinde 7

günlük kısa bir hücre kültür çalışması yapılmış, MC3T3-E1 hücre hattının kullanıldığı çalışma sonuçlarına göre hücrelerin 7. günün sonunda malzeme yüzeyinde yayıldıkları ve besi ortamında bekletilen hücresiz örnekler üzerindeki apatit miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar dahilinde bu yöntemle hazırlanan PEEK örneklerin ortopedik ve dental uygulamalarda kullanılabilir, sitotoksik etkisi olmayan, biyoaktif bir malzeme olduğu belirtilmiştir [107].

2.3.5.Hidroksiapatit Kaplama Yöntemleri

Yüksek biyouyumluluk ve biyoaktivite gibi özelliklerinin yanı sıra insan kemik dokusunun inorganik yapısında bulunan apatit yapısıyla benzer kimyasal bileşime sahip hidroksiapatitler (HAp), biyomimetik yaklaşım dahilinde dişçilik ve implant malzeme kaplamalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Genel formülü $M_{10}(PO_4)_6X_2$ (M:Ca⁺², Mg⁺², Sr⁺², Ba⁺², Mn⁺², Al⁺³, K⁺ ve X:F₂⁻, Cl₂⁻, Br₂⁻, (OH)₂⁻, CO₃⁻²) olarak bilinen hidroksiapatitin saf halinin formülü ise Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂'dir [108]. Kemikte bulunan HAp sitokiyometrik olmayan apatit yapısında olup, Ca/P oranı sitokiyometrik HAp'lere ait 1.67 değerinden daha düşüktür. Zayıf kristalin yapıdaki bu biyolojik HAp'lerin yapısında eser miktarda katyonik ve anyonik bileşenler bulunmaktadır ve en büyük pay da kemikte ağırlıkça %5-8 arasında bulunan karbonat (CO₃²⁻) iyonuna aittir. Karbonat iyonları, OH⁻ iyonları ile yer değiştirerek A tipi veya PO₄⁻³ iyonları ile yer değiştirerek kemikte yaygın olarak bulunan B tipi HAp oluşturmaktadır [9]. Şekil 2.8'de saf hidroksiapatitin kristalin yapısı ve molekül geometrisi içerisinde PO₄⁻³, Ca⁺² ve OH⁻ iyonlarının yerleşimi gösterilmiştir.

Biyouyumlu, biyoaktif, osteokondüktif oluşları, toksik ve immunojenik olmama özellikleri nedeniyle sağlık alanında kullanımı oldukça yaygın olan kalsiyum fosfat türevi sentetik HAp'ler [108, 109]; sol-jel yöntemi, sulu çözeltiden çöktürme yöntemi, hidrotermal yöntem, mikrodalga-hidrotermal yöntem, çoklu emülsiyon yöntemi, elektrokristalizasyon yöntemi ve biyomimetik çöktürme yöntemi gibi birden fazla yöntem kullanılarak üretilmektedirler. Bu yöntemler karşılaştırıldığında kemik yapısını en iyi taklit eden HAp yapısı biyomimetik yöntem ile elde edilmektedir.



Şekil 2.8. Saf hidroksiapatitin kristalin yapısı; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, [110]'dan değiştirilerek.

Çizelge 2.2. HAp kaplama yöntemlerinin karşılaştırması

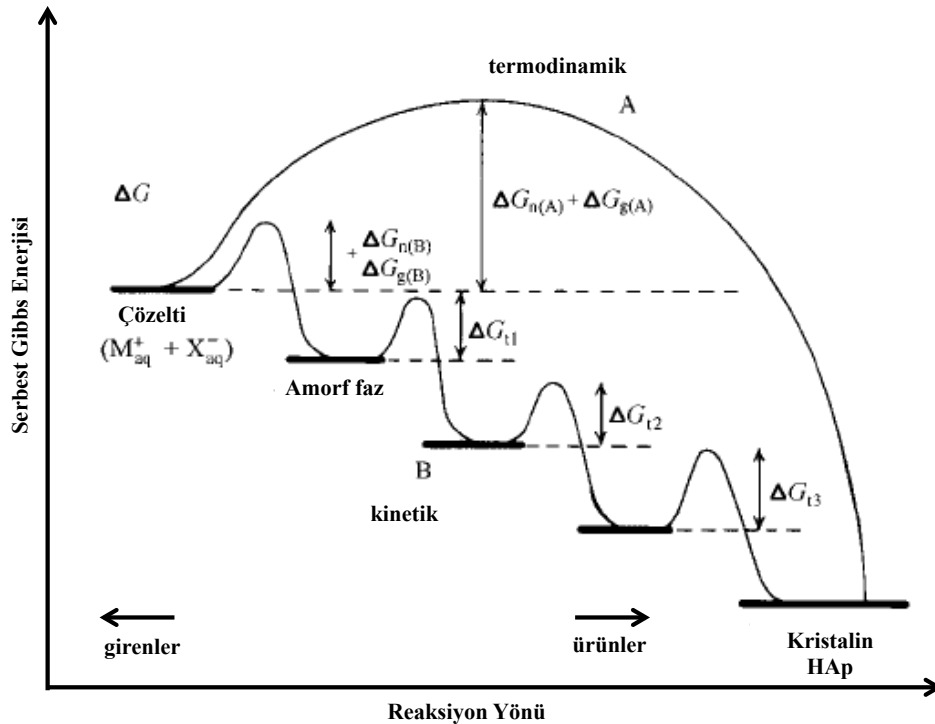
Yöntem	Avantaj	Dezavantaj	Kaplama Kalınlığı
Biyomimetik	Karmaşık şekilli malzeme kaplama Biyomoleküllerle birlikte kaplama	pH kontrolü Uzun kaplanma süresi	< 30 μm
Sol-jel	Karmaşık şekilli malzeme kaplama Düşük izleme sıcaklığı	Pahalı hammadde Ortam koşullarının kontrolü	< 1 μm
Elektro püskürtme	Biyomoleküllerle birlikte kaplama Bileşim ve kaplama alanının kontrolü	Düşük mekanik dayanım	0.1 – 5 μm
RF magnetron püskürtme	Homojen ve yoğun kaplama Güçlü tutunma	Düşük kaplama kalınlığı Uzun kaplanma süresi Tek taraflı kaplanma	0.5 – 5 μm
Plazma püskürtme	Yüksek kaplama kararlılığı	Yüksek kaplama kararsızlığı	0.1 – 5 μm
Pulslu lazer	Bileşim ve kaplama alanının kontrolü	Tek taraflı kaplanma	0.05 – 5 μm
İyon demeti dinamik karıştırma	Güçlü tutunma	Tek taraflı kaplanma Yüksek sinterleme sıcaklığı	0.05 – 1 μm
İyon demeti birikim	Gerilme dayanımında artış	Tek taraflı kaplanma	0.05 – 1 μm

Biyomimetik yöntemde insan vücut sıvısını taklit eden organik bir tuz çözeltisi olan yarı kararlı sentetik vücut sıvısı (SBF) kullanılır. Fizyolojik ortam pH'ında ve sıcaklığında, kendiliğinden çekirdeklenme oluşumu ile nano boyutta, kemik benzeri HAp eldesi gerçekleşmektedir [111]. Özel ekipman gerektirmeme, yüksek işleme sıcaklıklarına ihtiyaç duymama ve üretiminin kolay olması gibi avantajları [42] sayesinde polimerler gibi yüksek termal direnci olmayan malzemelerde güvenle kullanılabilir olmasına [112] rağmen

çözelti derişiminin düşük olması nedeniyle biyoaktif malzeme üzerinde HAp çekirdeklenmesi için uzun süreler gerekmektedir. Literatürde, çökelme süresinin kısaltılması için SBF çözeltisinin iyon derişiminin insan kan plazmasının katları şeklinde hazırlanan çözeltilerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Taş ve ark. tarafından iyon konsantrasyonu kan plazmasının $n= 1.5, 2, 5$ ile 10 katı kadar fazla olan SBF çözeltileri hazırlanmış ve artan konsantrasyona bağlı olarak kaplama süresinin azaldığı gösterilmiştir [113].

2.3.5.1. Biyomimetik yöntem kullanılarak mikrodalga destekli hidroksiapatit kaplama

Polimer malzemeler 10xSBF çözeltisine daldırıldıklarında, çözeltideki kalsiyum ve fosfat iyonları malzeme yüzeyinde apatit çekirdeklenmesini gerçekleştirmekte ve yüzeyde kalınlığı yüksek bir kaplama oluşmaktadır. Fakat, Ca ve P içeren biyoseramiklerin çökelmesinde çözelti derişimi kadar Ca/P çekirdeklerinin varlığı, sıcaklık, pH ve iyonik gücün de etkisi bulunmaktadır [114]. Bu nedenle doymun veya süper doymun SBF çözeltisinden HAp çökelmesi sırasında birden fazla kimyasal reaksiyon oluşabilmektedir. Tepkimenin termodinamik ya da kinetik kontrollü ilerleyişine bağlı değişen serbest Gibbs enerjisi farklı yapıda HAp veya HAp benzeri yapıların oluşmasına neden olmaktadır. Şekil 2.9'da doymun Ca/P çözeltisinden HAp oluşumu sırasında reaksiyon adımları gösterilmiştir [115].



Şekil 2.9. Termodinamik ve kinetik kontrollü HAp kristalizasyon yolağı, [115]'ten değiştirilerek.

Şekil 2.9'dan da görülebileceği gibi çözelti serbest Gibbs enerjisi yenildiğinde, A yolağı izlenerek tek adımda kristalin HAp fazına dönüşüm gerçekleşebileceği gibi kinetik kontrollü reaksiyonda B yolağı izlenerek çekirdeklenme, büyüme ve faz geçişinden oluşan seri çökeltme de gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte hazırlanan hiçbir SBF çözeltisi ile insan kan serum bileşimi tamamen taklit edilememektedir. İnsan kan serumunda apatit çekirdeklenmesinde önemli rol oynayan proteinlerin (çekirdeklenme inhibitörleri) SBF içerisinde bulunmaması, SBF çözeltilerine çeşitli tamponların eklenmesi ve serum içerisinde pH tamponu olarak görev alan karbonat içeriğinin SBF çözeltisinde kontrol edilememesi çözeltiler arası en temel farklılıkları oluşturmaktadır [116]. Bu nedenle Taş ve ark.'nın geliştirdiği 10xSBF çözeltisi [114] yüksek derişimine bağı kaplama süresinin kısaltılması, diğler SBF çözeltilerinde kullanılan HEPES gibi tampon çözeltiler içermemesi ve fazladan ara basamak gerektirmemesi gibi avantajlara sahiptir.

Grubumuzca 10xSBF-benzeri çözelti geliştirilerek mikrodalga desteğıyle kaplanma süresinin 2-6 saat aralığından dakikalar mertebesine kadar düşürülebilmesi, malzemenin konveksiyonel ısıtmaya kıyasla bölgesel değıil de homojen ve doğrudan ısıtılması ile minimum sıcaklık gradienti oluşturulması, optimum koşullarda minimum enerji kaybı sağlanması gibi avantajları [117] nedeniyle iki yöntem birleştirilmiş ve biyomimetik yöntem kullanılarak mikrodalga destekli hidroksiapatit kaplama yöntemi geliştirilmiştir [118]. Yöntem tezin deneysel çalışmaları kısmında detaylandırılmıştır.

2.3.5.2. İyon katkılı hidroksiapatitler

Biyouyumluluğı ve korozyon direnci yüksek olan hidroksiapatitlerin kırılmalığı, zor işlenebilirliğı, esnek olmaması, zayıf mekanik dayanımı ve yüksek yoğunluğı gibi dezavantajları kompozit malzemelerin geliştirilmesiyle beraber iyon katkılı HAp üretimini de tetiklemiştir [109].

Yapısında Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , F^- , Cl^- ve CO_3^{-2} gibi bir çok iyon barındıran biyolojik HAp'lerden ilham alınarak kemik mineral faz yapısı ve bileşimini taklit eden iyon katkılı HAp'ler; biyoaktiviteyi artırmak, mekanik ve yığın özellikleri değııştirmek, tane boyutunu küçültmek, bozunma hızını değııştirmek ve farklı fazların oluşmasını engellemek için yapılan araştırmalar yeni bir çalışma alanı oluşturmaktadır [119, 120].

İlgili literatür incelendiğinde, PEEK örnekler üzerine iyon katkılı hidroksiapatit kaplamalara yönelik çalışma bulunmamakla beraber, stronsiyum ve seriyum katkılı hidroksiapatit (Sr, Ce-HAp) parçacıklar kullanılarak PEEK malzeme ile kompozit

yapıldığı bir çalışmada biyoaktivitenin artırıldığı belirtilmiştir [121]. Wang ve ark.'nın nano boyutta flor katkıli hidroksiapatit ile PEEK malzemeyi birleştirdikleri bir çalışmada ise biyoaktivite ve osteoaktivitenin yanı sıra florun antibakteriyel özellik sağladığı da belirtilmiştir [122].

2.3.5.3. Bor katkıli hidroksiapatitler

Literatürdeki diğer iyon katkılama yöntemlerinin HAp'in fiziksel ve kimyasal yapısına etkisi incelenmiş olup, ilgili literatürde PEEK malzeme yüzeyine yapılan iyon katkıli HAp kaplamalara bakıldığında bor elementinin daha önce kullanılmadığı görülmektedir. Tunçay ve ark. tarafından 2013 yılında yapılan, bor katkıli hidroksiapatit-kitosan (B-HAp/Kitosan) kompozit doku iskelelerinin geliştirildiği çalışmaya kadar biyomimetik yöntemle sentezlenen bor katkıli hidroksiapatitin hücre çoğalma ve farklılaşmaya etkisi incelenmemiştir [9]. Bor elementinin cam sanayiinden sağlık alanına kadar çok geniş bir yelpazede kullanılıyor olması ve ülkemizce rezerv bakımından zengin bir maden olmasının yanı sıra doku mühendisliği yaklaşımındaki yeri bu çalışmanın çarpıcı yönü olmuştur. Borun, mineral ve hormon metabolizmasında, hücre membran fonksiyonlarında, enzim reaksiyonlarında, hücre dışı matris üretimini destekleyerek yara iyileşmesini hızlandırma [123, 124] gibi özelliklerine ek olarak kemik doku üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Çalışmalardan çıkarılabilecek ortak sonuçlar, borun *in-vitro* kemik doku mühendisliğinde kullanıldığında osteojenik farklılaşmayı desteklediğini [125, 126] ve osteoporoz gibi önemli kemik hastalıklarından kaynaklanan rahatsızlıkların giderilmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. [127].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tezin bu bölümünde, çalışma kapsamında kullanılan malzemeler ve yapılan deneyler detaylandırılmıştır. Çalışmanın ilk kısmında, polietereeterketon (PEEK) malzemenin yüzeyi zımparalama işlemi ile ön pürüzlendirme işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra fiziksel ve kimyasal yöntemlerle aşındırılan malzeme yüzeyi üzerinde biyoaktivite testi yapılarak malzeme topografisinin biyoaktiviteye etkisi incelenmiştir. İkinci bölümde pürüzlendirilen örnekler üzerine 10 kat derişik yapay vücut sıvısından (SBF) biyomimetik yöntemle nano boyutta hidroksiapatit (nHAp) ve bor katkılı nano boyutta hidroksiapatit (B-nHAp), mikrodalga desteği kullanılarak kaplanmıştır. Fiziksel ve kimyasal modifikasyonu ile biyoaktif hidroksiapatit yüzey kaplaması tamamlanmış ve karakterize edilmiş PEEK malzemeler ile MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı kullanılarak 28 günlük bir hücre kültürü deneyi yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında hücrelerin malzeme yüzeyine tutunması, morfolojisi, çoğalması ve osteojenik farklılaşması alt başlıklarda detaylandırılan analizlerle incelenmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Tıbbi kullanıma uygun polietereeterketon (PEEK-OPTIMA, Invibio Biomaterial Solutions, İngiltere) OS İmplant (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Kesim, zımparalama ve kumlama işlemi sonrası PEEK malzemeleri yıkamak için kullanılan *izo*-propanol Sigma-Aldrich'ten alınmıştır. PEEK malzemenin yüzeyinin fiziksel modifikasyonu ve bor katkılı 10xSBF çözeltisinde pH kontrol etmek için kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) yanı sıra 10xSBF ve bor katkılı 10xSBF çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), magnezyum klorür hekzahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sodyum hidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ve sodyum hidrojen karbonat (NaHCO_3) tuzları Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Sodyum klorür (NaCl) tuzu ise Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Bor katkılı 10xSBF çözeltisinde kullanılan borik asit ve fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7.4) tabletleri sırasıyla, BDH Chemicals (British Drug Houses, İngiltere) ve Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı Riken Hücre Bankası'ndan (Tsukaba, Japonya) satın alınmıştır. Minimum Essential Medium - Alfa Modifikasyonu (α -MEM) kültür ortamı ve hücrelerin yüzeyden kaldırılmasında kullanılan Tripsin-EDTA çözeltisi sırasıyla, Biochrom (Almanya) ve Sigma (Almanya) firmalarından, kültür ortamına eklenen L-glutamin, penisilin-streptomisin çözeltileri, fetal

sığır serumu (FBS) ile Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi (DPBS) Biowest (Fransa) firmasından temin edilmiştir. Osteojenik farklılaşma ortamının hazırlanmasında kullanılan L-askorbik asit ve β -gliserol fosfat ile hücrelerin fiksasyonunda kullanılan glutaraldehit ve heksametildisilazan Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan PrestoBlue® reaktantı Invitrogen (Thermo Fisher, ABD) firmasından tedarik edilmiştir. Yapılan boyamalarda hücre geçirgenliğini artırmak için kullanılan Triton X-100 Sigma (Almanya), alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi ölçümünde kullanılan 2-amino-2-metil-1,3-propandiol Sigma-Aldrich ve $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ Merck (Almanya) firmalarından tedarik edilmiştir. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gerçek zamanlı-PCR analizinde kullanılan Qiazol, RNeasy mini kit ve kloroform Qiagen (Almanya) ve Merck firmalarından tedarik edilmiştir. Kollajen analizi için kullanılan hidroksiprolin kiti BioVision, Inc (ABD) firmasından alınmıştır. Canlı-ölü hücre boyama analizinde kullanılan etidyum homodimer-1 (Eth-1) ve kalsein AM (C-AM) Sigma firmasından, hücre iskeleti-çekirdeği boyaması için kullanılan Alexa Fluor 488 Phalloidin (F-aktin) ve propidyum iyodür (PI), sırasıyla, Thermo Fisher (ABD) ve Sigma (ABD) firmalarından tedarik edilmiştir.

3.2. PEEK İmplant Malzemelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.2.1. PEEK malzemenin kesimi, pürüzsüzlendirilmesi ve modifikasyon öncesi temizlenmesi

Tıbbi kullanıma uygun polietereterketon (PEEK-OPTIMA), İvedik Organize Sanayi Bölgesi'nde SMS Tıbbi Cihazlar isimli firmadan destek alınarak yarıçapı 19 mm, kalınlığı 1 mm silindirler şeklinde kesilmiştir. Bu işlem sonrasında bütün örnekler, kesim izlerinin silinmesi için 5 dakika boyunca tek yönde 800 numaralı zımpara kağıdıyla zımparalanmıştır. Tez kapsamında yapılan modifikasyonlar öncesi malzemeler, kesim ve zımparalama kaynaklı kalıntılardan arındırılmak için 10 dakika boyunca izopropanol ve 10 dakika boyunca distile su ile sonikatörde yıkanmıştır. Temizlenen örnekler 37°C etüvde 2 saat boyunca tutularak kurutulmuştur. Örnekler, bu aşamada yapılan modifikasyonlara göre 4 farklı gruba ayrılmıştır. Bunlar: 1) Modifiye edilmemiş boş PEEK, (B-PEEK), 2) Kumlanmış PEEK, (K-PEEK), 3) NaOH dağlanmış PEEK, (N-PEEK), 4) Kumlanmış ve NaOH dağlanmış PEEK (K,N-PEEK)'tir. Temizleme işlemi sonrası elde edilen örneklerin bir kısmı ilk grup olarak ayrılmış ve boş PEEK (B-PEEK) olarak adlandırılmıştır.

3.2.2. PEEK malzemenin mekanik olarak modifikasyonu

PEEK malzemenin mekanik modifikasyonu için İvedik Organize Sanayi Bölgesi'nde bulunan metalik malzeme yüzeyini kumlayarak aşındıran bir firmadan destek alınarak kabin tipi kumlama makinası ile modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için kabin tipi kumlama makinasının seçilme nedeni vakumlu hava ile püskürtülen kumun, metal yüzeylere göre daha hassas olan polimerik yüzeylere zarar vermeden pürüzlendirme işlemini sağlamasıdır. Bu nedenle örnekler, hava akış hızı 1,000 L/dk, nozul çapı 8 mm ve fan gücü 0.60 kW/hz (3,000 devir/dk) olan cihaz içerisinde vakum ortamında Al_2O_3 parçacıklarla 30 s boyunca muamele edilmiştir [128]. Kumlama işlemi sonrası, kesim aşamasından sonraki temizleme işlemi tekrarlanmış, örnekler $37^{\circ}C$ 'de kurutma etüvünde 2 saat boyunca kurutulmuş ve bu malzeme grubu kumlanmış PEEK (K-PEEK) olarak adlandırılmıştır.

3.2.3. PEEK malzemenin fiziksel modifikasyonu

PEEK malzemenin fiziksel modifikasyonu için NaOH ile dağlama prosedürü uygulanmıştır. PEEK'in %98'lik H_2SO_4 çözeltisi haricinde geleneksel kimyasallarda çözünmediği ve NaOH dağlama ile yığın malzemede değişiklikler olmadığı bilgisi literatürden edinilmiştir. Bununla birlikte NaOH muamelesi sonrası malzeme yüzeyinde bazı fonksiyonel grupların olduğu farklı çalışmalarda belirtilmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkarak zımparalama sonrası örnekler, hazırlanan 10 M NaOH çözeltisi içinde $60^{\circ}C$ etüvde 48 saat boyunca dağlanmış [80, 129]. Dağlama sonrası kimyasal çözeltiden arındırma amacıyla 10 dk boyunca sonik olarak karıştırılan distile su içerisinde bekletilen örnekler, önceki koşullarda kurutulmuştur. Literatürdeki bu iki çalışmayı referans alan bir diğer çalışmada ise dağlama süresinin düşürülmesi amacıyla mikrodalga desteği kullanılmıştır. Modifikasyon sonrası bu malzeme grubu NaOH dağlanmış PEEK (N-PEEK) olarak adlandırılmıştır.

Uygulanan mekanik ve fiziksel modifikasyonların yapılacak nano hidroksiapatit (nHAp) kaplamaya etkilerini gözlemleyebilmek için kumlama ile aşındırma sonrası NaOH çözeltisi ile dağlamanın uygulandığı ayrı bir deney grubu daha oluşturulmuş ve iki modifikasyon yönteminde belirtilen deneyler birbirini takip ederek örneklere uygulanmıştır. Bu deney grubu kumlanmış ve NaOH dağlanmış PEEK (K,N-PEEK) olarak adlandırılmıştır.

3.2.4. Mekanik ve/veya fiziksel modifikasyonu yapılmış PEEK malzemelerin yüzey karakterizasyonu

Bu bölümde mekanik ve/veya fiziksel modifikasyonu yapılmış PEEK malzemelerin yüzeyinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi için uygulanan analizler açıklanmıştır.

3.2.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Mekanik ve/veya fiziksel yöntem kullanılarak modifiye edilen PEEK malzeme yüzeylerin morfolojik incelemeleri SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) analizi ile yapılmıştır. Analiz öncesi örnekler, döndürerek kaplama yöntemi kullanılarak altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır.

3.2.4.2. Enerji dağılımlı X-ışını mikroanalizörü (EDX) analizi

Kumlama ve/veya NaOH dağlama yöntemi ile modifiye edilen PEEK malzeme yüzeylerindeki elementel bileşiminin tayin edilebilmesi için yapılan bu analizde SEM örnekleri kullanılmış olup, analiz SEM cihazına takılı EDX mikroanalizörü ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3 Yüzey pürüzlülüğünün tayini

Yüzeyi zımparalanmış PEEK (B-PEEK) örnekler, zımparalama sonrası kumlanmış PEEK (K-PEEK) örnekler, zımparalama sonrası NaOH dağlanmış PEEK (N-PEEK) ile zımparalama sonrası kumlanmış ve NaOH dağlanmış PEEK (K,N-PEEK) örneklerin, yüzey pürüzlülüğünün kantitatif analizi için pertometre (Mahr, M2, ABD) kullanılmıştır. Diğer analizlerde de olduğu gibi B-PEEK örnekler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.4. Su temas açısı (WCA) ölçümü

Hücre kültür çalışmalarında kullanılmak istenen her malzemenin yüzeyinin ıslatılabilirliği önemli bir özellik olup, bu özelliğin belirlenmesinde su temas açısı ölçümleri en yaygın kullanılan deneysel yaklaşımdır. Mekanik ve/veya fiziksel yöntem kullanılarak modifikasyonu sağlanan PEEK malzeme yüzeylerinin WCA ölçümü (Krüss DSA 100 , Almanya) durgun damla (sessile drop) yöntemi kullanılarak oda koşullarında gerçekleştirilmiş ve katı-sıvı-gaz ara yüzeyinde damlacığın yaptığı açı mikro kamera yardımıyla ölçülmüştür.

3.2.4.5. Toplam reflektansı azaltılmış - Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

Gerçekleştirilen mekanik ve/veya fiziksel modifikasyon işlemleri nedeniyle PEEK malzemenin yüzeyinde oluşabilecek kimyasal yapı değişiklikleri ATR-FTIR analizi ile incelenmiştir. Bu analiz için Thermo Scientific Nicolet iS10 marka cihaz ATR ünitesi ile kullanılmış olup analiz $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında yapılmıştır.

3.2.4.6. Biyoaktivite testi

Yüzeyi mekanik ve/veya fiziksel yöntem kullanılarak modifiye edilen PEEK örneklerin biyoaktivitesinin belirlenmesi amacıyla **23317:2014** numaralı ve ‘Implants for surgery – *In vitro* evaluation for apatite-forming ability of implant materials’ başlıklı ISO standardına uygun olarak biyoaktivite testi yapılmıştır [130]. Özetle; ilgili standartta detaylandırılmış olan Kokubo’nun SBF çözeltisi kullanılmış ve Çizelge 3.1’de belirtilen reçetede ilk 8 bileşen teker teker sırasıyla $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ’deki 700 mL distile su içerisinde çözülmüş ve toplam su miktarı 900 mL’ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.1. Biyoaktivite testinde kullanılan Kokubo’nun SBF reçetesi, [130]’dan değiştirilerek.

Sıra	Bileşen	Miktar
1	NaCl	8.035 g
2	NaHCO ₃	0.355 g
3	KCl	0.225 g
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.231 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.311 g
6	c(HCl) = 1M	39 mL
7	CaCl ₂	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g
9	TRİS	6.118 g
10	c(HCl) = 1M	0-5 mL

9. ve 10. bileşen ise pH ayarlanması amacıyla kontrollü olarak eklenmiş ve toplam hacim 1000 mL’ye tamamlanmıştır. Örnekler standarda uygun hesaplanan hacimde çözelti içerisine daldırılmış ve 4 hafta boyunca 36.5°C ’de inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyonun 7. ve 28. gününde toplanan örnekler üzerinde nHAp tabaka oluşumunu gözlemek için SEM ve apatit oluşumunu nicel olarak tanımlamak için XRD analizi gerçekleştirilmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Modifiye edilmemiş (B-PEEK), kumlanmış (K-PEEK), NaOH dağlanmış (N-PEEK) ve kumlama üzerine NaOH dağlanmış (K,N-PEEK) örneklerin ilgili standarda uygun olarak elde edilen yüzeyleri üzerinde de karakterizasyon amaçlı SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) analizi yapılmıştır. Analiz öncesi örnekler, döndürerek kaplama yöntemi kullanılarak altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır.

X ışını kırınımı (XRD) analizi

Modifiye edilmeyen ve mekanik ve/veya fiziksel yöntem kullanılarak modifiye edilen PEEK örnekler üzerinde gerçekleştirilen biyoaktivite testi sonucu yüzeylerin kimyasal bileşiminin ve kaplamanın etkinliğinin incelenmesi için XRD analizi Rigaku Ultima IV X-ışını Kırınım cihazı ile 3°-50° tarama aralığı (2θ), 2°/dk tarama hızı, 1°'lik ince film geliş açısı deney parametreleri ve bakır (Cu) kaynak kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3. Hidroksiapatit ve Bor Katkılı Hidroksiapatit Kaplamalar ve Karakterizasyonu

Tezin bu bölümünde mekanik ve/veya fiziksel yöntemle modifiye edilmiş ve edilmemiş PEEK malzeme yüzeyler üzerine biyomimetik yöntem kullanılarak mikrodalga destekli nano hidroksiapatit (nHAp) ve bor katkı nano hidroksiapatit (B-nHAp) kaplama yapılarak hem nHAp veya B-nHAp kaplamaların malzeme yüzeyinin osteoaktif hale getirilmesi üzerine katkısı, hem de modifikasyon işlemlerinin kaplama morfolojileri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3.3.1. Mikrodalga destekli nano hidroksiapatit kaplama

Biyomimetik yöntem kullanılarak mikrodalga destekli hidroksiapatit (nHAp) kaplama için Maviş ve ark.'nın geliştirdiği, insan kan plazmasındaki kalsiyum ve fosfat iyon derişimlerinin 10 katına sahip olan 10xSBF-benzeri çözelti kullanılmıştır [131]. 10xSBF benzeri çözeltinin bileşenleri Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. Beş çeşit tuzun bulunduğu çözeltinin hazırlanması için Çizelge 3.2'deki bileşenler 800 mL distile su içerisinde çözünmüş ve çözelti hacmi distile su ile 1,000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan yapay vücut sıvısı çözeltisi stok olup, kaplama işlemi öncesine kadar 4°C'de saklanmış ve kaplama işlemi öncesi çözelti sıcaklığı 25°C'ye getirilmiştir. Çizelgede verilen reçete,

diğer SBF çözeltilerine oranla Ca/P çekirdeklenmelerinin daha hızlı gerçekleşmesini sağlamaktadır.

Çizelge 3.2. 1,000 mL 10xSBF-benzeri çözelti bileşenleri ve miktarları [131]

Sıra	Bileşen	Miktar (g)	Molarite (M)
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	1.026	5
5	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.250	3.62
6	NaHCO ₃ *	0.084	10

**100 mL SBF için*

Kaplama işlemi yapılmadan önce, çözelti içerisindeki karbonat iyonu derişimini artırmak için stok çözeltilerden 100 mL alınarak içerisine 0.084 g NaHCO₃ eklenmiştir. Daha sonra, mikrodalga fırında (Milestone, İtalya) 600 W mikrodalga enerjisi ile nHAp kristallerinin oluşturulması sağlanmıştır. Mikrodalga enerjisi, bu 100 mL'lik çözeltiliye 30 s süreyle 9 kez uygulanmıştır [132]. Homojen ve etkili bir kaplama elde edilmesi için bu işlem 4 kere tekrarlanmıştır. Bu tekrarlar arasında örnekler, 2 dk boyunca %96'lık (v/v) etanol çözeltisi ve iki kere ikişer dakika distile su ile yıkanarak PEEK polimer yüzeyine kaplanmamış nHAp çekirdeklerin ve istenmeyen fazların yapıdan uzaklaştırılması sağlanmıştır [118].

3.3.2. Mikrodalga destekli bor katkılı hidroksiapatit kaplama

Biyomimetik yöntem kullanılarak mikrodalga destekli hidroksiapatit (nHAp) kaplama için Maviş ve ark.'nın geliştirdiği 10xSBF-benzeri çözeltilisine [131] bor katkılanabilmesi için reçetede bazı değişiklikler yapılmıştır. Toplamda 1,000 mL ultra saf suya 10 g borik asit eklenerek hazırlanmaya başlayan çözeltilinin pH kontrolü 10 M NaOH çözeltilisinden 900 µL eklenmesi ile sağlanmış olup daha sonra 10xSBF-benzeri reçetesi aynı şekilde takip edilmiştir. Optimum koşulları sağlayan reçete Çizelge 3.3'te verilmiştir [9].

Çizelge 3.3. 1,000 mL bor katkılı 10xSBF çözelti bileşenleri ve miktarları [133]

Sıra	Bileşen	Miktar	Molarite (mM)
1	Borik asit	10 g	0.16
2	NaOH	900 µL	10
3	NaCl	58.443 g	1000
4	KCl	0.373 g	5
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	3.675 g	25
6	MgCl ₂ .6H ₂ O	1.026 g	5
7	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.250 g	3.62
8	NaHCO ₃ *	0.084 g	10

***100 mL SBF için**

Çizelge 3.3'teki reçeteye uygun olarak hazırlanan bor katkılı 10xSBF-benzeri stok çözeltisinden 100 mL alınarak içine 0.084 g NaHCO₃ eklenmiş ve Bölüm 3.3.1'de anlatılan kaplama işlemi tekrarlanmıştır.

Malzeme grupları üzerinde yapılan modifikasyonların özeti Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Modifiye edilmiş PEEK malzemelerin hazırlanması

Örnek Adı	Zımparalama	Yıkama	Pürüzlendirme	Yıkama/ Kurutma	Kaplama	Yıkama/ Kurutma
B-PEEK *	✓	✓	✗	✗	✗	✗
K-PEEK *	✓	✗	Kumlama	✓	✗	✗
N-PEEK *	✓	✓	NaOH dağlama	✓	✗	✗
K, N-PEEK	✓	✗	Kumlama + NaOH dağlama	✓	✗	✗
B-PEEK/nHAp *	✓	✓	✗	✗	nHAp	✓
B-PEEK/B- nHAp *	✓	✓	✗	✗	B-nHAp	✓
K-PEEK/B- nHAp *	✓	✗	Kumlama	✓	B-nHAp	✓
N-PEEK/B- nHAp *	✓	✓	NaOH dağlama	✓	B-nHAp	✓
K, N-PEEK/B- nHAp	✓	✗	Kumlama + NaOH dağlama	✓	B-nHAp	✓

* Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan örnek gruplarını temsil etmektedir.

3.3.3. nHAp veya B-nHAp kaplı PEEK malzeme yüzeylerinin karakterizasyonu

Hidroksiapatit veya bor katkılı hidroksiapatit kaplanmış PEEK malzemelerin yüzeyinde meydana gelen değişiklikler Bölüm 3.2’de açıklanan SEM, EDX, WCA ve ATR-FTIR analizleriyle incelenmiştir.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Karakterizasyonu tamamlanan malzeme yüzeyleri üzerinde biyoaktivite oluşumu ve hücre uyumluluğunun incelenebilmesi için MC3T3-E1 hücre hattı ile 28 günlük bir hücre kültürü çalışması yapılmış ve çalışma sonucu malzeme yüzeyindeki hücre kültür davranışları aşağıda açıklanan analizler kapsamında incelenmiştir.

3.4.1. PEEK malzemenin sterilizasyonu ve yüzeylere hücre ekimi

Hücre kültür çalışmaları, Riken Hücre Bankası’ndan (Japonya) alınan pasaj sayısı 5 ile 8 arasında olan MC3T3-E1 fare öncül kemik hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. MC3T3-E1 hücreleri %10 (v/v) Fötal Sığır Serum (FBS), antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin- 100µL/mL streptomisin) ve 2 mM L-glutamin içeren Alpha Minimum Essential

Medium (α -MEM)'dan oluşan büyüme ortamında (BO) CO₂ etüvünde (Heraus Instruments, Almanya) 37°C'de inkübe edilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler %0.25 tripsin-EDTA çözeltisiyle yüzeyden kaldırılıp hücre ekimi için hazırlanmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan PEEK malzemeler, 0.50 cm² alanlı ¼ diskler şeklinde hazırlanmıştır. Seçilen PEEK malzeme yüzeylerine hücre ekimi yapılmadan önce, örnekler 1 saat boyunca %70 (v/v) etanol çözeltisi içerisinde bekletme, Dulbecco'nun steril fosfat tampon çözeltisi (D-PBS - pH:7.4) ile 3 kere yıkama sonrası, 1 saat boyunca UV ışık altında bekletilerek sterilize edilmiştir [131]. Sterilizasyonu tamamlanan örnekler 24 gözlü bakteriyolojik kültür kaplarına alınmış ve yoğunluğu 7.5x10⁴ hücre/örnek olacak şekilde 20 µL hücre süspansiyonu (BO içerisinde) örnekler üzerine eklenmiştir. Bir saat 15 dk boyunca hücre tutunması beklendikten sonra gözlere 1'er mL daha BO eklenerek örnekler %5 CO₂ atmosferinde 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücre kültürünün 6. gününde BO, 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 µg/mL L-askorbik asit içeren kemik farklılaşma ortamı (KFO) ile değiştirilmiş ve hücre kültür çalışması örneklerin besi ortamının her üç günde bir değiştirilmesiyle 22 gün boyunca sürdürülmüştür. Tüm hücre kültürü çalışmaları, steril hava çevrimli laminar akışlı tip II kabin (Bioair, İtalya) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. PrestoBlue® analizi

Örnekler üzerindeki hücrelerin yayılması ve çoğalması hücre kültürünün farklı günlerinde yapılan PrestoBlue® analizi ile kantitatif olarak incelenmiştir. Belirlenen günlerde örnekler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve hücreler %10 PrestoBlue® çözeltisi içeren 400 µL hücre kültür ortamı eklenerek 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası çözeltinin optik yoğunluğu 570 nm dalga boyunda ve 600 nm dalga boyu referans alınarak mikropilaka okuyucuda kantitatif olarak belirlenmiştir. Analiz sonrası hücreler canlılığını yitirmeyeceği için D-PBS ile yıkanarak üzerlerine besi ortamı eklenmiş ve 37°C'de CO₂ etüvünde inkübasyona devam edilmiştir. Her bir grup için 5 farklı paralel ile çalışılmış ve hücre içermeyen kontrol örnekleri de aynı işlemlere tabi tutularak elde edilen değerler hücreli örneklerinkinden çıkarılmıştır.

3.4.3. SEM analizi

Hücrelerin malzeme yüzeyine tutunması ve yüzeyde yayıldıkları morfolojileri hücre kültürü çalışmasının 1, 7, 14, 21 ve 28. gününde toplanan örnekler üzerinden SEM analizi ile incelenmiştir. Belirlenen günlerde örnekler üzerindeki ortamlar uzaklaştırılıp PBS ile 3 kere yıkandıktan sonra 30 dk boyunca oda sıcaklığında %2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi (PBS içerisinde) ile hücreler fikse edilmiştir. Daha sonra 3 kere PBS ile yıkanan örnekler,

analiz gününe kadar PBS içerisinde 4°C’de saklanabilmektedir. Analiz öncesi farklı derişimlerde etanol çözeltilerinde (%30, %50, %70, %90 ve %100, v/v) ikişer dk bekletilerek susuzlaştırılan örnekler, %100 hekzametildisilazan ile 5 dk boyunca muamele edilerek kurumaya bırakılmış ve inceleme öncesi tüm örnekler altın-paladyum tabakası ile kaplanmıştır. Her bir grup için en az 3 paralel ile çalışılmıştır.

3.4.4. Alkalen fosfataz (ALP) analizi

Örnekler üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşma kapasitesini gözlemleyebilmek için hücre kültürünün 7, 14, 21 ve 28. günlerinde hücrelerdeki erken dönem farklılaşma belirteci olan alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi incelenmiştir. Örnekler, D-PBS ile 2 kez yıkanarak analiz gününe kadar -80°C’de saklanmıştır. Hücre parçalanması için örnekler 500 µL lizis çözeltisi (%0.01 v/v Triton X-100 içeren PBS çözeltisi) içerisinde 30 dk boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. Parçalanmış hücreler toplanarak 12,000 rpm’de 10 dk boyunca 4°C’de santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası 50 µL süpernatant 125 µL ALP çözeltisine (1 mM MgCl₂ ve 56 mM 2-amino-2metil-1-propanol içeren 10 mL p-nitrofenil fosfat substrat sistemi) eklenerek 37°C’de 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, reaksiyonu durdurmak için 50 µL 2.5 M NaOH çözeltisi her bir göze eklenmiştir. Mikroplaka okuyucu kullanılarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik metot üzerinden analiz gerçekleştirilmiştir ve absorbans değerleri daha önce elde edilmiş olan ve Ek 1’de verilen kalibrasyon eğrisi yardımıyla örneklerin birim hacimdeki kantitatif ALP aktivitesine dönüştürülmüştür. Her bir grup için en az 3 paralel ile çalışılmıştır.

3.4.5. Toplam DNA miktarının belirlenmesi

PEEK malzeme yüzeyleri üzerindeki hücre miktarı DNA analizi ile hücre kültürü çalışmasının 7, 14, 21 ve 28. günlerinde belirlenmiştir. Örnekler, 2 kere D-PBS ile yıkanarak analiz gününe kadar -80°C’de saklanmıştır. Analiz öncesi hücre parçalanmasını sağlamak için örnekler 500 µL lizis çözeltisi (%0.01 v/v Triton X-100 içeren PBS çözeltisi) içerisinde 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kalibrasyon grafiğinin eldesi için 50°C’de 30 dk inkübe edilen DNA standartları ile iki farklı derişimde (100 µg/mL ve 10 µg/mL) DNA stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 0.05 µg/mL boya konsantrasyonuna sahip boya çözeltisi (9 mL su + 1 mL analiz tamponu + 0.5 µL bisbenzimid) hazırlanmıştır. Çizelge 3.5’te belirtilen ölçülerde DNA stok çözeltisi ile karıştırılan boya çözeltisi üzerinden kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

Çizelge 3.5. Kalibrasyon grafiği için gerekli DNA miktarları (20-1000 ng)

Örnek	DNA stok çözeltisi (10µg/mL)	DNA stok çözeltisi (100µg/mL)	Boya çözeltisi	DNA miktarı (ng)
1	-	-	200 µL	0
2	2 µL	-	200 µL	20
3	5 µL	-	200 µL	50
4	10 µL	-	200 µL	100
5	-	2 µL	200 µL	200
6	-	5 µL	200 µL	500
7	-	10 µL	200 µL	1000

İnkübasyon sonrası 12,000 rpm’de 10 dk oda sıcaklığında santrifüjlenen örnekler alınmış ve önceden 200 µL boya çözeltisi eklenen 96 gözlü kültür kabının gözlerine 10’ar µL olacak şekilde eklenmiştir. Analiz, Cary Eclipse marka mikroplaka okuyucuda 20 nm slit aralığı, 360 nm eksitasyon; 460 nm emisyon değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Her bir grup için en az 3 paralel ile çalışılmıştır.

3.4.6. Kollajen analizi

Kollajenin yapısında bulunan hidroksiprolin amino asidinin miktarsal ölçümüne dayalı bu analiz, hücre kültürü çalışmasının 14. ve 28. günlerinde yapılmıştır ve kolorimetrik hidroksiprolin analiz kiti (BioVision, ABD) kullanılmıştır. Hidroksiprolin, doku yapılarının hidrolizatlarında bulunan kollajen miktarının doğrudan ölçütüdür. Kit içeriğindeki protokoller sırasıyla izlenmiştir. Özetle, ekstraksiyon için homojenizasyon amaçlı örnekler üzerine 100 µL ultra saf su eklenmiş ve daha sonra 100 µL 12 N HCl ile 3 saat boyunca 120°C’de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Üç saat sonunda vortekslenen örnekler 10,000 rpm’de 3 dk boyunca santrifüjlenerek çökelti ve süpernatan ayrımı sağlanmıştır. Elli µL süpernatan 96 gözlü bir Petri kabına alınarak 1 gece boyunca çeker ocakta kurutulmuştur ve kuruyan örnekler üzerine 100 µL kloramin T ajanı eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 100 µL DMAB reaktantı eklenerek 60°C’de 90 dk boyunca inkübasyona devam edilmiştir. Kimyasal reaksiyonun sonucunda oluşan hidroksiprolinin absorbansı 560 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Absorbans değerleri daha önce elde edilmiş olan ve Ek 2’de verilen

kalibrasyon eğrisi yardımıyla örneklerin kantitatif hidroksiprolin içeriği miktarına dönüştürülmüştür.

3.4.7. Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

Hücre kültürünün 7, 14, 21 ve 28. gününde toplanan hücre ekili örnekler üzerinden yürütülen analizin amacı, hücrelerin osteoblastlara özgü genleri (osteokalsin-OCN, osteopontin-OPN, tip-1 kollajen-Coll1a1, runt-bağlantılı transkripsiyon faktörü 2-RUNX2) eksprese edip etmediğinin incelenmesidir. Toplanan örnekler üzerine Qiazol (trizol çözültisi) eklenerek hücrelerin parçalanması sağlanmış ve kloroform ile faz ayrımı gerçekleştirilerek santrifügasyon sonrası RNA süpernatanda toplanmıştır. Bu aşamadan sonra RNA izolasyonuna Qiagen'in RNeasy Mini Kit'i ile devam edilmiştir. Kit içerisinde belirtilen protokol kapsamında RNA izolasyonu sonrası Yüksek Kapasite cDNA Ters Transkripsiyon Kit (Applied Biosystem) yardımı ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Araştırma grubumuzca kullanılan Light Cycler Nano, RT-PCR analiz sistemi (Roche, İsviçre) ile yapılan RT-qPCR analizi için Solis Biotec'in 5x HOT FIREPol® ve EvaGreen® qPCR Supermix çözültisi kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri

Hedef	Erişim numarası	Primerler (5'-3')
β-Aktin	NM_007393.5	F-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG R-GATGCCACAGGATTCACATACCC
Kollajen I (Col1a1)	NM_007742.4	F-CAAGATGTGCCACTCTGACT R-TCTGACCTGTCTCCATGTTG
Osteokalsin (OCN)	NM_007541.3	F-CTTTCTGCTCACTCTGCTG R-TATTGCCCTCCTGCTTGG
Osteopontin (OPN)	NM_001204201.1	F-CACTTTCCTCAATCGTCCCTAC R-ACTCCTTAGACTCACCCTCTTC
RUNX2		F-GCATGGCCAAGAAGACATCC R-CCTCGGGTTTCCACGTCTC
ALPL	NM_007431.3	F-GGAGATGGTATGGGCGTCTC R-GGACCTGAGCGTTGGTGTTA

Her bir genin ekspresyon değerinin referans gen olarak seçilen β -aktin geni ekspresyonuna oranı $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Genler için kullanılan primerler Metabion (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Genlere ait primer dizileri izelge 3.6'da verilmiştir. Her bir grup için en az 3 paralel ile çalışılmıştır.

3.4.8. Immunofloresan boyama ve canlı/l hücre görüntüleme

Hücre kültürünün 1. saati ve 28. gününde hücre ekili örnekler üzerinden gerçekleştirilmiş bu analiz için 4 farklı boyanın kullanıldığı iki farklı yöntem uygun grlmştir. Hücre iskeleti ve çekirdeğinin boyanacağı Alexa Fluor 488 konjuge anti F-aktin antikor/Propidyum İyodür (PI) boyamasının hücrelerin morfolojileri hakkında bilgi edinmeye yardımcı olacağı dşnlmştir. Bu boyama için, hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve örnekler 3 kere D-PBS ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında %2.5'luk (v/v) glutaraldehit zeltisi ile 30 dk boyunca fikse edilen örnekler 2 kez PBS ile yıkanmış ve %0.1 Triton X-100 zeltisi içeren PBS ile 5 dk inkübe edilerek membran geçirgenliği sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 2 kere PBS ile yıkanarak fazla Triton X-100 uzaklaştırılmış ve %1 Sığır Serum Albümin (w/v) içeren PBS (PBS/A) zeltisinde 1:100 dilüsyonda hazırlanan anti F-aktin antikor ve hücre çekirdeğinin boyanması için 1:1000 dilüsyonda kullanılan PI ile 30 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası rnekler PBS/A ile 3 kere yıkanarak konfokal mikroskobu (Zeiss LSM 510, Almanya) ile analiz edilmiştir. Her bir grup için en az 3 paralel ile çalışılmıştır.

Hücrelerin 28. gündeki canlılıkları ise Calcein AM ve Etidyum Homodimer-1 boyları kullanılarak analiz edilmiştir. Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren D-PBS (D-PBS+) ile yıkanan rnekler, 1 μ M Calcein AM ve 1 μ M EthD-1 içeren D-PBS+ ile 30 dk boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası D-PBS+ ile 2 kez yıkanan örnekler, konfokal mikroskobu ile analiz edilmiştir. Her bir grup için en az 3 paralel ile çalışılmıştır.

3.4.9. İstatistiksel analiz

Çalışma sonuçları Graphpad Software InStat - Prism programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için One Way Anova testi uygulanmış ve p-değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

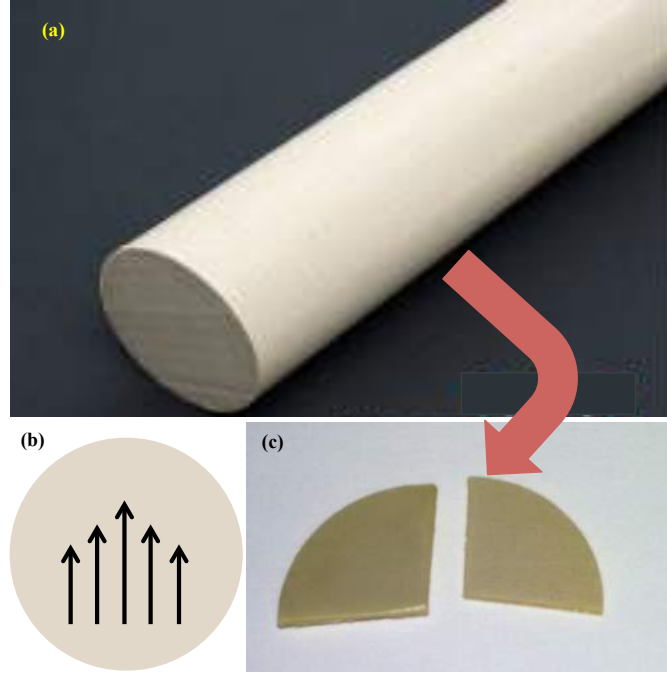
Bu bölümde tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deney ve analiz sonuçlarından söz edilmiş ve çıktılar üzerine tartışmalar yapılmıştır. İlk olarak, PEEK implant malzemelerinin yüzeyine yapılan pürüzlendirmeye yönelik uygulamalar ve karakterizasyon sonuçları incelenmiştir. Bu pürüzlendirmeler üzerine biyoaktiviteyi ve osseointegrasyonu sağlayan nano hidroksiapatit (nHAp) ile bor katkılı nano HAp (B-nHAp)'in mikrodalga destekli biyomimetik yöntemle kaplamaları ve kaplanmış PEEK malzemelerin karakterizasyonu detaylı bir şekilde incelenmiştir. İkinci aşamada, farklı yöntemler kullanılarak gerek pürüzlülüğü değiştirilmiş gerekse pürüzlendirme üzerine kaplama yapılmış örnekler ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiş ve bu sonuçlar ilgili literatür ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

4.1. PEEK İmplant Malzemelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

PEEK'in yüksek termal ve kimyasal direnci, korozyon mukavemeti, toksik olmaması, mekanik özelliklerinin metalik implantlara göre kortikal kemiğe daha yakın olması ve FDA onayı taşıma gibi özellikleri uzun yıllardır implant malzemesi olarak kullanımına olanak sağlamaktadır [3]. Bununla birlikte PEEK'in biyoinert doğası uygulamalara kısıtlamalar getirmektedir ve implantasyon sonrası malzeme-kemik etkileşiminde osseointegrasyonunun sağlanamaması sonucu uygulamanın başarısızlığına neden olmaktadır [2]. PEEK'in biyoaktivitesini artırmak amacıyla kullanılan yöntemlerden biri malzeme yüzeyinin mekanik, fiziksel ve kimyasal etkilerle modifiye edilerek pürüzlülüğünün değiştirilmesidir [5]. Literatürde yüzey pürüzlülüğünün hücre tutunmasına etkisinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Tez çalışmasının ilk aşamasında bu yaklaşımların malzeme yüzeyinde meydana getirdiği ve *in-vitro*'da hücrelerle olan etkileşimindeki değişiklikler incelenmiştir. İkinci aşamada ise bu modifikasyonların nHAp ve B-nHAp kaplanma verimine etkisi ve bu örneklerle gerçekleştirilmiş *in-vitro* hücre kültürü çalışmasından alınan cevaplar irdelenmiştir.

4.1.1. PEEK malzemenin kesimi, pürüzsüzlendirilmesi ve modifikasyon öncesi temizlenmesi

Medikal kullanıma uygun PEEK, Os İmplant (Türkiye) firmasından Şekil 4.1.a'da gösterildiği gibi 1.9 cm çaplı 50 cm boyunda silindirik çubuk formunda temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanımını kolaylaştırmak adına çubuğun 1 mm kalınlıkta pul parçalar şeklinde kesimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. (a) Firmadan tedarik edilen PEEK silindir, (b) kesim sonrası zımparalama yönü, ve (c) PEEK örneklerin modifikasyon öncesi görüntüleri

PEEK'in yüksek kopma dayanımı ve sertliği gibi mekanik özellikleri nedeniyle bu kalınlık ve uzunluktaki bir silindirin diğer polimerlerle karşılaştırıldığında makas, maket bıçağı, bisturi gibi el kuvvetiyle çalışan bir aletle kesimi mümkün olmamaktadır. Her ne kadar yüksek camsı geçiş ve erime sıcaklığı değerine [134] sahip olsa da nihayetinde bir polimer olan PEEK, kesim esnasında bıçağın yarattığı sürtünmeye bağlı oluşan yüksek sıcaklık bölgeleri nedeniyle su jeti, lazer kesim yapan CNC tezgahları gibi genellikle metal parçaların kesiminde kullanılan yöntemlerle de kesilememektedir. Bu nedenle malzeme kesiminde İvedik Organize Sanayi Bölgesi'nde faaliyet gösteren SMS Tıbbi Cihazlar firmasından destek alınarak klasik torna tezgahı ya da freze tezgahı olarak adlandırılan sistem kullanılmıştır. CNC tekniğinde olduğu gibi kesilecek malzeme kalınlığının bilgisayar komutlarıyla ayarlandığı kesme işlemi talaş çıkardığı ve malzeme yüzeyindeki bıçak izlerinin giderilmesi gerektiği için Şekil 4.1.b'de gösterildiği gibi 800 numara zımpara kağıdı ile tek yönlü zımparalama işlemi örnekler 5 dk boyunca uygulanmıştır. Zımparalama sonrası malzeme üzerindeki kalıntıları temizlemek amacıyla yıkanan örnekler kurutulduktan sonra Şekil 4.1.c'de gösterildiği gibi modifikasyona hazır hale getirilmiştir.

4.1.2. PEEK malzemenin mekanik olarak modifikasyonu

Kumlama ile yüzey pürüzlülüğünün değiştirilmesi tekniği, PEEK'in diş implantı olarak kullanıldığı uygulamalarda sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. Bu çalışma kapsamında kumlama tekniği ile malzemenin biyo inert doğasının giderilmesi hedeflenmiş olsa da teknik genellikle PEEK yüzeyin pürüzlülüğünün artırılması ile mekanik özellikler, bağlanma kuvveti ve ıslatılabilirlik özelliğinin değişimi arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda kullanılmaktadır [135]. Schmidlin ve ark., farklı yüzey modifikasyonlarının dental uygulamalarda kullanılan PEEK malzemenin yapışma mukavemetine olan etkisini inceledikleri çalışmada asit dağlama ve farklı partikül büyüklüğüne sahip alüminyum parçacıklarla kumlama yöntemini karşılaştırmış ve bağlanma mukavemeti en yüksek örneklerin asit modifikasyonu sonucu elde edildiğini belirtmiştir. Çalışma her ne kadar dental uygulamalarda kullanılacak bir malzeme için yürütülmüş olsa da malzemenin *in-vitro*'da oluşturacağı cevap incelenmemiştir [136]. Deng Y. ve ark., oluşturdukları karbon fiber- PEEK- hidroksiapatit üçlü kompozitinin yüzeyinde farklı tanecik büyüklüklü alüminyum oksit parçacıklarla gerçekleştirdikleri kumlama işlemi sonrası oluşan pürüzlülüğün *in-vitro* osteogenez ve *in-vivo* osseointegrasyona etkisini incelemiştir. *In-vitro*'da pürüzlendirilen yüzeylerin, hücre tutunması ve farklılaşmasını teşvik ettiği saptanmış ve sonuçların *in-vivo* deneylerle uyumlu olduğu belirtilmiştir [13]. Deng F. ve ark, kemik yerini alacağını savundukları TiO₂/PEEK kompozitlerinin üretimi, *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarında, klinikte hemen hemen tüm implant malzemelerin yüzeyinin kumlama ile pürüzlendirildiğini belirtmişlerdir [137]. Ourahmoune ve ark. ise, bir çalışmalarında kumlama modifikasyonunda ıslak ve kuru kumlama arasındaki farka değinerek ıslak kumlama sonucu yüzey kristalinitesinde değişim olduğunu belirtmişlerdir [138].

PEEK malzemenin mekanik olarak modifikasyonunda kullanılan kumlama yönteminin biyoaktiviteye etkisinin yanı sıra HAp kaplama morfolojisine etkisi ve bu etkinin *in-vitro* hücre kültüründe yaptığı değişiklikler ilk defa bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir.

4.1.3. PEEK malzemenin fiziksel modifikasyonu

NaOH çözeltisi ile fiziksel modifikasyon, PEEK'in implant malzemesi olarak kullanımının dışında uzay, havacılık ve yakıt pili uygulamalarında da kullanılan bir yöntemdir [139]. Modifikasyon yönteminin biyomalzeme alanındaki kullanımına bakıldığında ise ilk çalışma Ha ve ark.'na ait olup, çalışmada karbon fiberlerle güçlendirilmiş PEEK kompozitinin yüzeyinde alüminyum parçacıklarla oluşturulan pürüzlülük üzerine buhar

plazma spreyleme yöntemiyle Ti kaplama yapılmıştır [96]. Kaplama sonrası örnekler 10 M NaOH çözeltisi ile 60°C sıcaklıktaki 80 rpm hızında çalkalamalı etüvde 2 saat boyunca muamele edilmiştir. Kokubo'nun hazırladığı SBF çözeltisi kullanılarak HAp kaplanan yüzeylerde NaOH modifikasyonunun malzeme yüzeyinde daha fazla HAp birikimini sağladığı saptanmış ve sonuçlar kontrol grubu olarak seçilen Ti örneklerle karşılaştırmalı olarak verilmiştir [96]. Pino ve ark., çalışmalarında UHMWPE (ultra yüksek yoğunluklu polietilen), HDPE (yüksek yoğunluklu polietilen) ve PEEK örnekler üzerine SBF çözeltisinden oda koşullarında HAp çökelme sürelerini incelemişlerdir. Çöktürme öncesi 60°C etüvde 48 saat boyunca farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile muamele edilen örneklerde artan NaOH çözelti derişimi ile HAp çökelme süresi arasında ters orantı olduğu saptanmıştır [80]. Zhou ve ark.'nın bu çalışmadan yola çıkarak yaptıkları çalışmada NaOH çözeltisi ile modifikasyon süresini kısaltmak adına 800 W mikrodalga enerjisi kullanılarak modifikasyon 4 dk.da gerçekleştirilmiştir [107].

Tez çalışması kapsamında ise 10 M NaOH çözeltisi ile modifikasyonda hem 48 saat 60°C etüvde muamele hem de 4 dk boyunca 800 W mikrodalga enerjisi ile muamele yöntemleri denenmiş ancak yöntemler arasında, sürenin kısaltılmasından başka bir üstünlük saptanmamıştır.

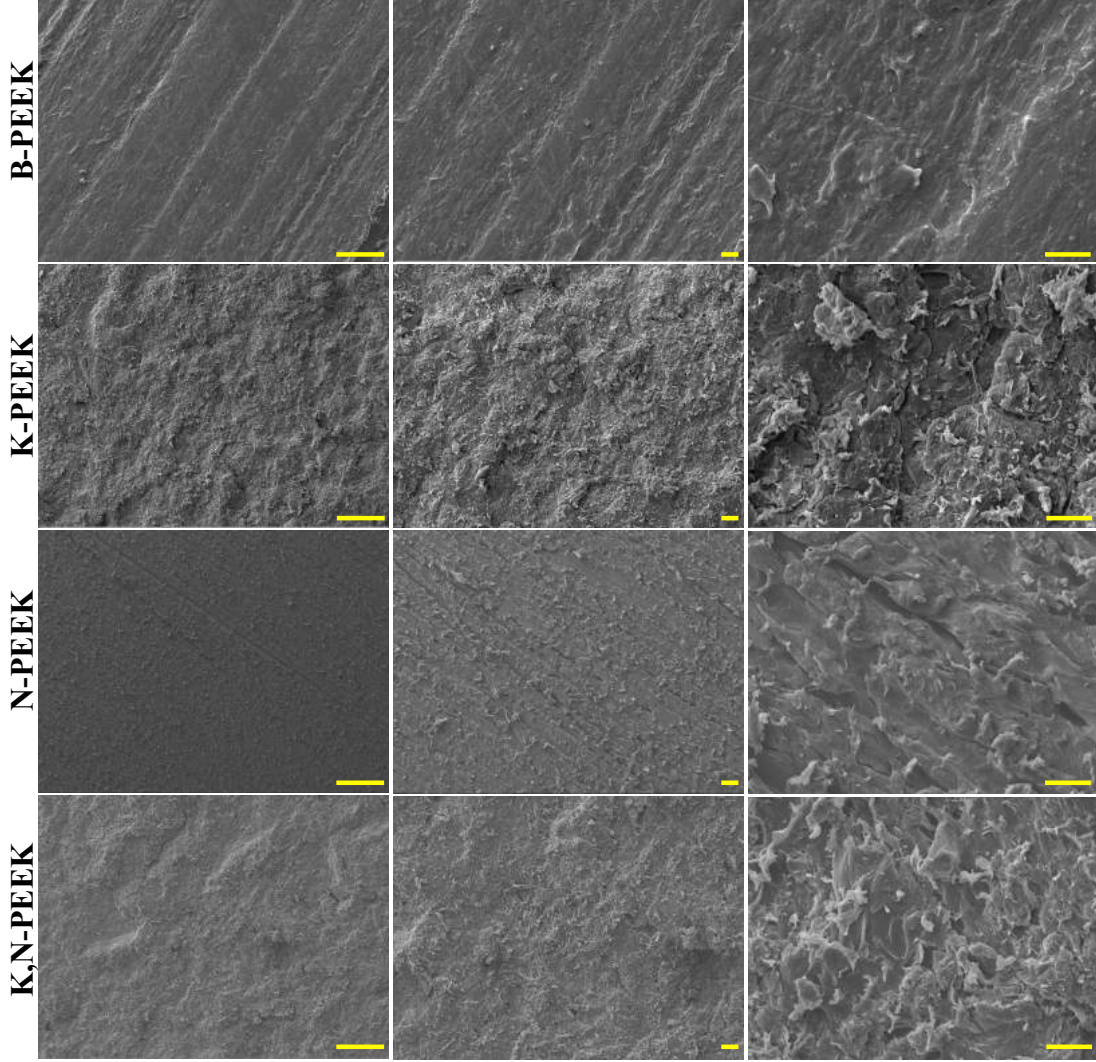
Mekanik ve fiziksel olarak modifiye edilmiş örneklere ek olarak pürüzlülüğün HAp kaplanma verimine etkisini inceleyebilmek adına kumlanmış yüzeyler üzerine NaOH dağlama ve NaOH dağlama üzerine kumlama yapılarak modifikasyonlar birleştirilmeye çalışılmıştır. Bu aşamada kumlamanın yüzeyde yarattığı agresif pürüzlülük nedeniyle NaOH dağlama üzerine kumlama modifikasyonu yapılan grupta NaOH muamelesinin etkilerinin tamamen sönümlendiği saptanmış ve 4. grup olarak kumlama üzerine NaOH dağlama yapılan grup seçilmiştir.

4.1.4. Mekanik ve/veya fiziksel modifikasyonu yapılmış PEEK malzemelerin yüzey karakterizasyonu

Tez çalışması dahilinde yapılan yüzey modifikasyon işlemleri literatürdeki benzer çalışmalar göz önünde bulundurularak çeşitli tekniklerle karakterize edilmiş ve bu bölümde sonuçları detaylı olarak incelenmiştir.

4.1.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Zımparalama sonrası yüzeyinde tek yönlü izlerin olduğu PEEK malzemenin ve yüzeyinde gerçekleştirilen modifikasyon sonrası morfolojik değişimlerin incelenebilmesi için SEM analizi yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.2'deki fotoğraflarda gösterilmiştir.



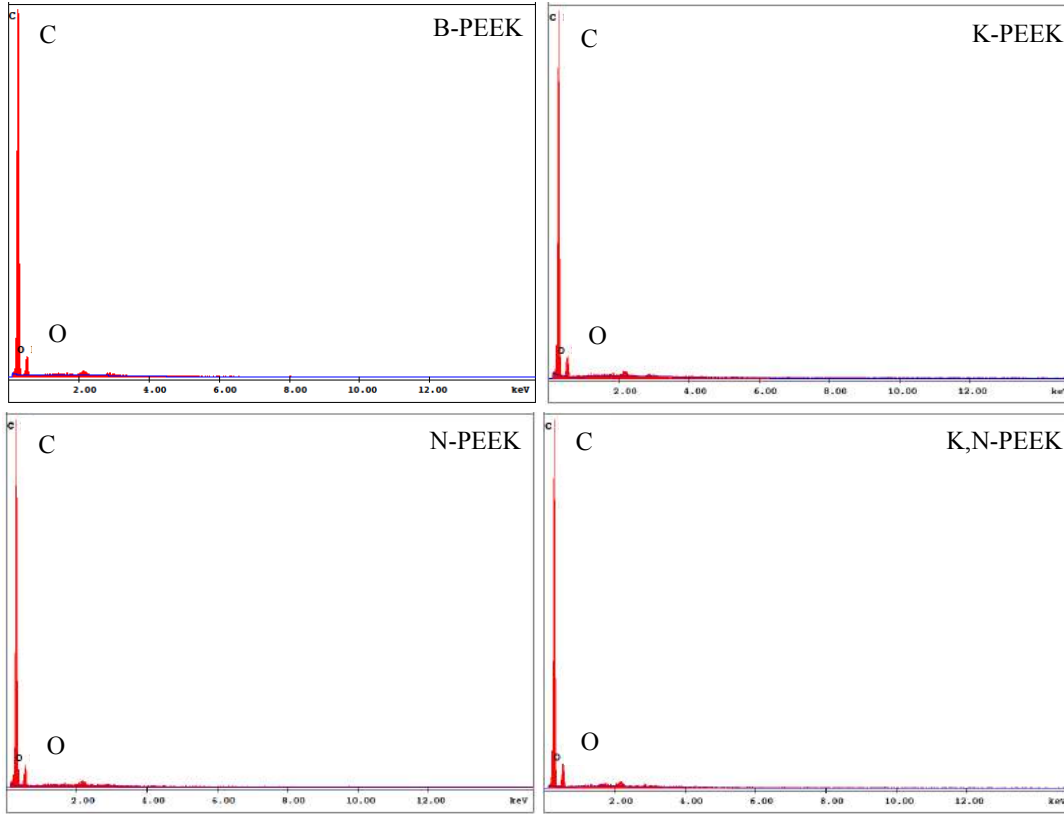
Şekil 4.2. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklerin yüzey modifikasyonu sonrası farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları soldan sağa sırasıyla 100 µm, 20 µm ve 10 µm'yi temsil etmektedir.

B-PEEK örneklerin yüzeyi zımparalama ile pürüzsüzleştirilmiş ve morfolojik olarak malzemenin zemini hakkında bilgi edinilmiştir. Zımparalama sonrası yüzeyde tek yönlü kanal benzeri yapıların olduğu belirlenmiştir. Malzeme yüzeyine kumlama tekniği ile yapılan mekanik modifikasyon sonucu K-PEEK örneklerin yüzeyinin homojen bir şekilde pürüzlendirildiği görülmüştür fakat homojenitenin agresif bir şekilde ilerlediği saptanmıştır. NaOH dağlama tekniği kullanılarak modifiye edilen N-PEEK gruplarda ise

yüzeyin dağlama sonucu gerilerek zımparalama yönü doğrultusunda kanalların açılmasına neden olduğu gözlenmiştir. Mekanik ve fiziksel modifikasyonun bir arada kullanıldığı K,N-PEEK örnek grubunda ise kumlamanın yarattığı agresif topografyada yapılan NaOH dağlamanın etkisi pek belirgin olmamakla birlikte, kabaca pürüzler üzerinde dağlamaya bağlı matlaşma görülmüştür.

4.1.4.2. Enerji dağımlı X-ışını mikroanalizörü (EDX) analizi

SEM analizinde kullanılan Au/Pd kaplanmış örnekler EDX analizinde de kullanılmıştır. Analiz sırasında yüzeyde kaplamaya bağlı olarak Au ve Pd da tespit edilmiş ancak pikler spektrum üzerinde işaretlenmemiştir. Şekil 4.3'te modifiye edilmemiş ve mekanik ve/veya fiziksel modifikasyonu gerçekleştirilmiş PEEK örneklere ait EDX analizi sonuçlarına yer verilmiştir.



Şekil 4.3. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklere ait EDX spektrumları

Analiz sonrası modifiye edilmemiş PEEK örneklerle mekanik ve/veya fiziksel modifikasyonu gerçekleştirilmiş örnekler arasında farka rastlanmamıştır. Analizde, PEEK polimerinin yapısında bulunan karbon (C) ve oksijen (O) elementlerine ek olarak kaplama sonrası yüzeyde biriken Au ve Pd dışında hiçbir element saptanmamıştır. Bu bulgu mekanik modifikasyon sonrası kum kalıntılarında kaynaklanacak Silisyum (Si)

elementinin ve fiziksel modifikasyon sonrası yapıda NaOH izlerinin bulunmadığını ifade etmektedir. Böylece modifikasyonlar sonrası yapılan yıkama işleminin yeterli olduğu sonucuna varılabilmektedir.

4.1.4.3. Yüzey pürüzlülüğünün tayini

Malzeme yüzey pürüzlülüğünün belirlenmesinde pertometre analizi kullanılmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Pertometre cihazının probu tüm malzeme üzerinde gözlemlenebilecek büyüklükteki modifikasyon etkilerine dik ve paralel olarak yüzeyi taramış ve topladığı pürüzlülük değerlerini kantitatif verilere çevirmiştir. Analiz, yüzeyin büyük bir bölümünün veya tamamının taranmasına olanak verdiği için atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi küçük alanların tarandığı analizlere kıyasla görece daha geçerli bir yöntemdir. Pertometre analizinde K-PEEK örneklerin SEM görüntüleriyle paralel olarak kuşlamanın malzeme yüzeyinde yarattığı agresif uygulamanın pürüzlülüğü en çok artıran modifikasyon olduğu saptanmıştır. Kuşlama modifikasyonunda, modifikasyona dik ve paralel yüzey pürüzlülük değerlerinde yakın sonuçlar elde edilmiş ve homojen pürüzlendirmenin gerçekleştirildiği bu analizle de tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Mekanik ve fiziksel olarak modifiye edilmiş PEEK malzemelerin pertometre analiz sonuçları

Örnek	Modifikasyona dik pürüzlülük Ra (nm)	Modifikasyona paralel pürüzlülük Ra (nm)
B-PEEK	982.7±23.3	488.0±1.4
K-PEEK	5051.0±27.3	4056.0±40.9
N-PEEK	2884.0±3.4	1077.0±82.1
K,N-PEEK	4404.0±21.2	2586.0±14.5

N-PEEK örneklerin Ra değerleri incelendiğinde yüzeyde oluşan kanal benzeri yapılara dik olan değerler paralel olan değerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, kanallara paralel doğrultuda pürüzlülüğün azaldığını ve hücre tutunması için daha uygun pürüzlülük değerlerine sahip malzemeler elde edilebileceğini göstermiştir. K,N-PEEK örneklerde ise kuşlamanın yarattığı agresif yapı NaOH dağlama ile bir miktar sönümlenmiş olsa bile kanallara dik konumlarda kuşlamanın etkisi belirgin bir şekilde görülmektedir. Modifikasyona paralel bölgelerde NaOH boşluklara yayılarak pürüzlülüğü optimal değerler seviyesine çekmiştir.

4.1.4.4. Su temas açısı (WCA) ölçümü

Modifiye edilmiş PEEK yüzeylerde asılı damla metoduyla gerçekleştirilen su temas açısı analizine ait ölçüm değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Modifiye edilmemiş yüzeylerin su temas açısı değeri, mekanik ve fiziksel modifikasyon sonucu elde edilmiş örneklerin değerleriyle karşılaştırıldığında, modifikasyon sonrası pürüzlülüğe bağlı olarak artan yüzey alanının, geriliminin ve enerjisinin damlacığın yüzeyde yayılmasını zorlaştırdığı ve damlacık-PEEK-hava ara yüzeyinde daha büyük su temas açısı değerleri oluşturduğu saptanmıştır. Artan su temas açısı değerleri malzemenin hidrofobisitesinde yaşanan artışın kantitatif bir ölçütü olarak alınmıştır.

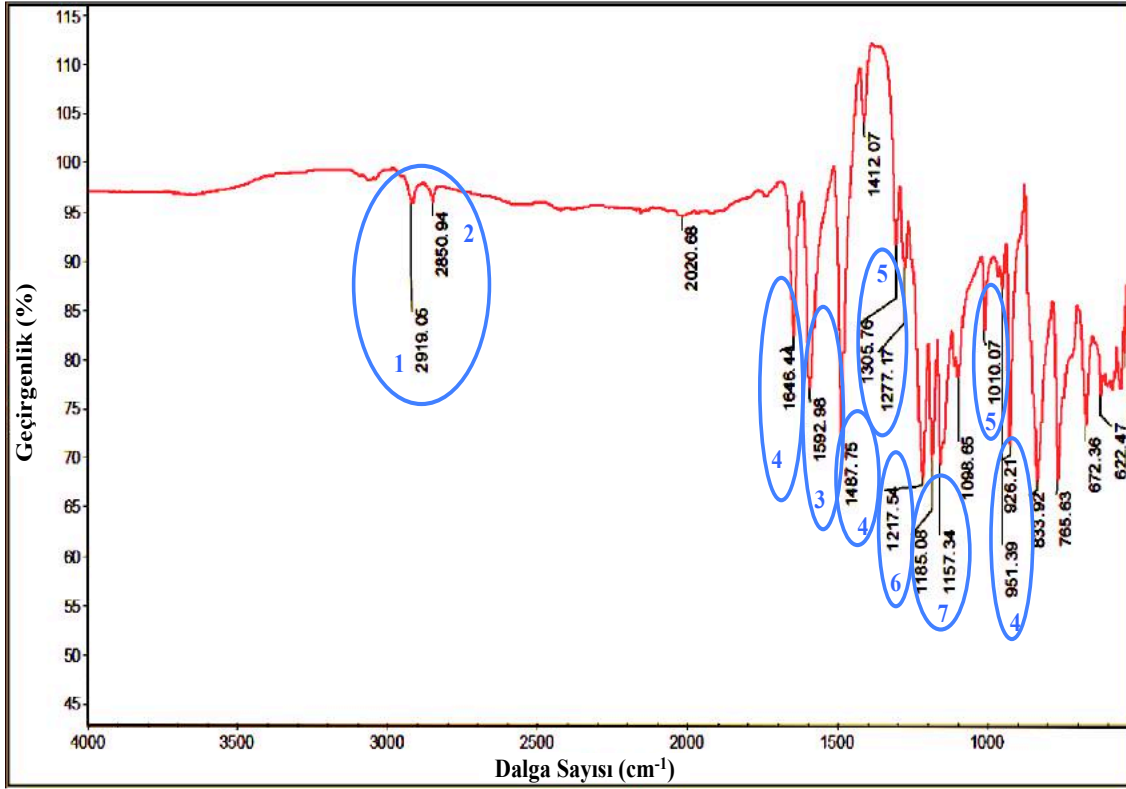
Çizelge 4.2. Mekanik ve fiziksel olarak modifiye edilmiş PEEK malzemelerin su temas açısı ölçüm sonuçları

Örnek	Su Temas Açısı (°)
B-PEEK	62.8±2.9
K-PEEK	90.8±3.3
N-PEEK	71.0±9.6
K,N-PEEK	108.6±1.7

Kumlama yönteminin kullanıldığı çalışmalarda mikropürüzlülüğün hidrofilitiyi artırdığı belirtilmiş [13] olmasına karşı nanopürüzlülüğün malzeme yüzeyinde hidrofobik etki yarattığı saptanmıştır. Agresif pürüzlülük ile karşılaştırıldığında NaOH dağlama sonucu elde edilen düşük yüzey enerjili kanallar boyunca yayılabilecek zemin bulan su damlacığının su temas açısı değerinin daha küçük olduğu gözlemlenmiş ve malzeme yüzeyinin hidrofilitisinin artırılmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, mekanik ve fiziksel modifikasyon bir arada kullanıldığında dağlama sonucu oluşan kanal içi pürüzlülüğünün yüksek olması yüzey gerilimini artırarak hidrofobisiteyi baskın hale getirmiştir. Tüm bu modifikasyonlar sonucu elde edilen yüzeylerde oluşturulan nano pürüzlülüklerin, bir sonraki basamakta yapılacak nano HAp ve nano B-HAp kaplama işlemleri için ekstra yüzey alanı oluşturarak yüzeydeki detaylar arasına yerleşecek HAp ve B-HAp partiküller için uygun ortam sağlayacağı öngörülebilmektedir. Yüksek pürüzlülüğe bağlı en yüksek hidrofobisiteye sahip K,N-PEEK grubunun, biyomalzeme yüzeylerin ıslatılabilirlik gerekliliğini karşılayamayacağından hücre kültürü çalışmalarında kullanılmamasına karar verilmiştir.

4.1.4.5. Toplam reflektansı azaltılmış – Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

ATR-FTIR analizi PEEK malzeme yüzeyinde yapılan modifikasyonlar sonucu oluşan kimyasal yapı değişikliklerini incelemek için gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4'te B-PEEK örneğe ait FTIR spektrumu gösterilmiştir.



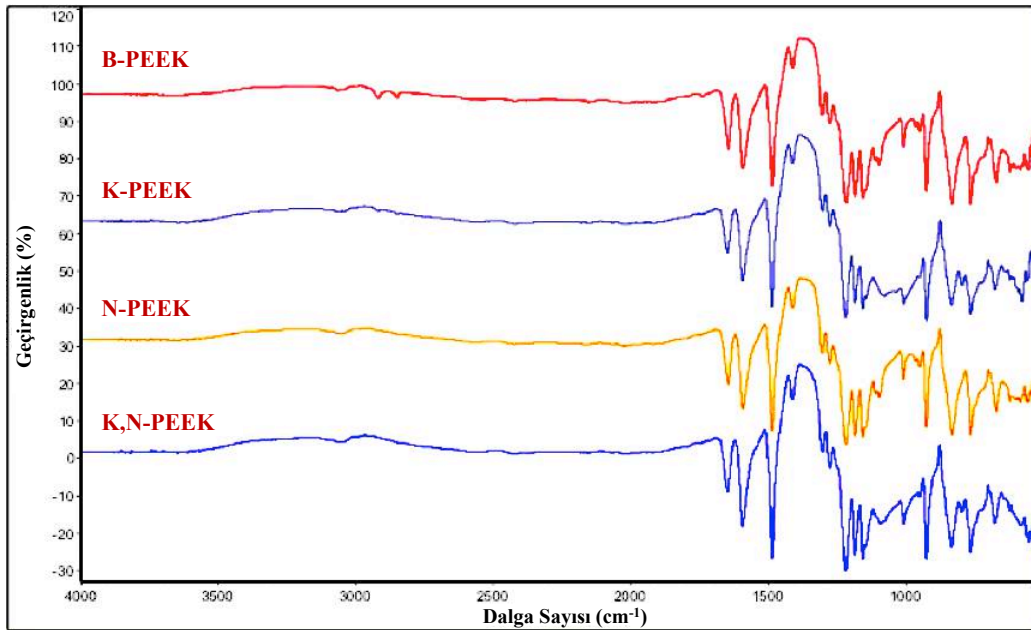
Şekil 4.4. B-PEEK örneğe ait ATR-FTIR spektrumu

Yukarıda verilen spektrum Çizelge 4.3 ile beraber değerlendirildiğinde modifiye edilmemiş örneklerin PEEK polimerine ait literatürdeki bütün karakteristik piklere sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. PEEK polimerine ait karakteristik FTIR pikleri [3, 93, 103]

Pik numarası	Dalga Boyu	Pik karakteristiği
1	2940-2915 cm^{-1}	Benzen halkasındaki CH_2 gruplarının asimetrik gerilme titreşimi
2	2870-2840 cm^{-1}	Benzen halkasındaki CH_2 gruplarının simetrik gerilme titreşimi
3	1850-1550 cm^{-1}	C=O gerilme titreşimi
4	1650,1490 ve 928 cm^{-1}	Difenil keton bandı
5	1310,1280 ve 1010 cm^{-1}	Polimerizasyon prosesinde kullanılan tipik sülfonil grupları
6	1230 cm^{-1}	Arileter bandı
7	1186-1158 cm^{-1}	Diaril eter gruplarının karakteristik C-O-C gerilme piki

Şekil 4.5'te PEEK polimerinin modifikasyonu sonucu elde edilen örneklere ait ATR-FTIR spektrumlarına yer verilmiştir.



Şekil 4.5. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklere ait ATR-FTIR spektrumlarının karşılaştırılması

Şekil 4.5 incelendiğinde yüzey modifikasyonunun gruplar arasında yüzey kimyası açısından anlamlı bir farklılık yaratmadığı gözlemlenmiştir. B-PEEK örneklerin ATR-

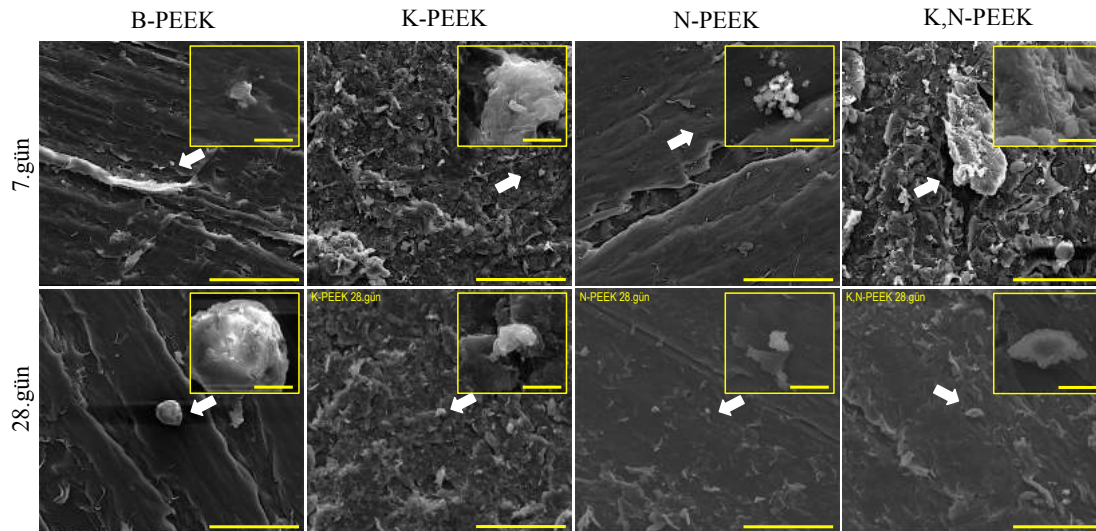
FTIR spektrumu ile hemen hemen aynı özelliklere sahip PEEK örneklerin yüzey yapısında herhangi bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

4.1.4.6. Biyoaktivite testi

Kemik implant malzemesi olarak kullanılan biyomalzemelerin biyoaktivitesinin analizinde Kokubo ve ark. tarafından geliştirilen derişimi insan kan plazmasıyla aynı olan SBF çözeltisi Bölüm 3.2.4.6’da verilen reçeteye uygun olarak hazırlanmıştır. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örnekler kullanılarak gerçekleştirilen 28 günlük inkübasyon sonrası örnekler üzerinde biriken HAp miktarı inkübasyonun 7. ve 28. gününde SEM ve XRD analizleri ile incelenmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Biyoaktivite testi yapılırken haftalık ortam değişimleri sırasında inkübasyonun 7. ve 28. gününde alınan örnekler nazikçe yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuş ve analize kadar desikatörde saklanmıştır. Analiz öncesi Au-Pd ile kaplanan örneklere ait SEM görüntülerine Şekil 4.6’da yer verilmiştir.



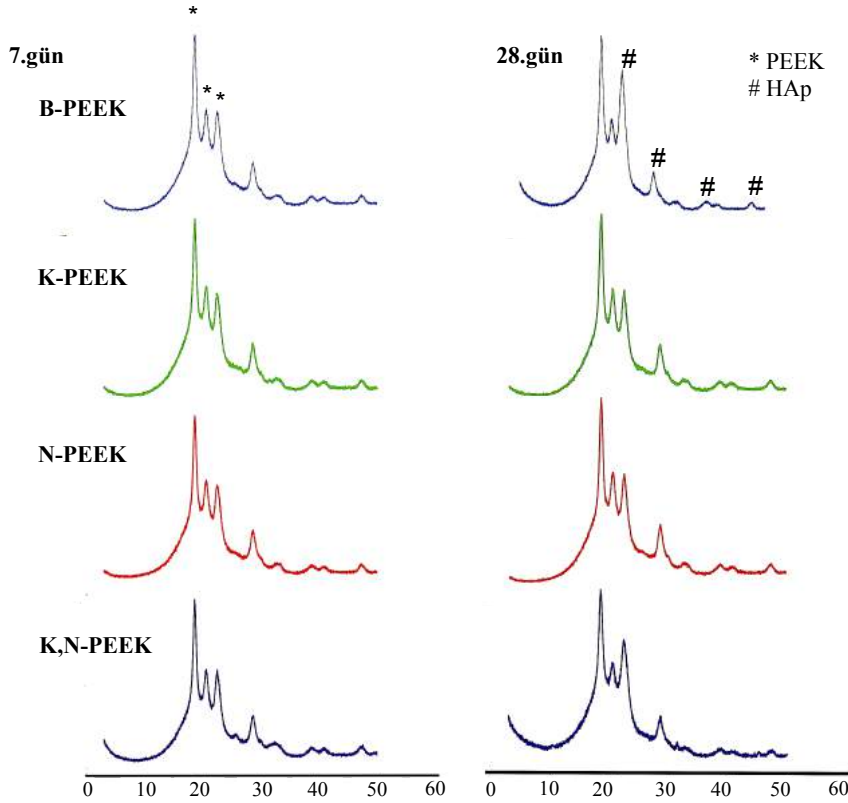
Şekil 4.6. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklerin SBF çözeltisine daldırıldıktan 7 ve 28 gün sonraki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları büyük fotoğraf ve sağ üst köşedeki fotoğraf için sırasıyla 100 µm ve 10 µm’yi temsil etmektedir. Oklar yüzey üzerine çökelmiş HAp partikülleri göstermektedir.

SEM görüntüleri XRD analiz sonuçları ile beraber yorumlandığında örnekler üzerinde 7.günde biriken HAp miktarında 28.günde tüm örneklerde artış olsa da en yoğun birikim K-PEEK örneklerde saptanmıştır. K-PEEK örnekler üzerindeki agresif pürüzlülük göz önünde bulundurulduğunda HAp birikiminin en yüksek bu grupta çıkması beklenen bir

sonuç olmakla beraber, N-PEEK örneklerde dağlamaya bağlı açılan kanallarda HAp birikimi görece daha az olmuştur.

X ışını kırınımı (XRD) analizi

Cu kaynak kullanılarak 2θ değeri 3° - 50° aralığında 1° lik geliş açısıyla 2° /dk tarama hızında gerçekleştirilen XRD analiz sonuçları Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Biyoaktivite testinin (solda) 7. ve (sağda) 28. gününde toplanan (yukarıdan aşağı) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örneklere ait XRD spektrumları

İlgili şekil incelendiğinde 7. günde tüm grupların PEEK’e ait karakteristik XRD spektrumlarına sahip olmaları ile birlikte HAp’a özgü bölgede belirgin olmayan bir pik elde edilmiştir. Bununla beraber, 28.gün XRD sonuçları incelendiğinde PEEK yapısında SBF çözeltisinde bekletmeye bağlı bir değişim olmadığı, ancak kristalin HAp fazına ait piklerin şiddetinde artış olduğu gözlemlenmiştir [13].

4.2. Mikrodalga Destekli Hidroksiapatit ve Bor Katkılı Hidroksiapatit Kaplamalar ve Karakterizasyonu

Bu bölümde modifikasyonu mekanik ve/veya fiziksel olarak tamamlanmış PEEK örneklerin yüzey topografisinin biyomimetik yöntem kullanılarak 10xSBF-benzeri çözeltiden mikrodalga destekli nHAp ve B-nHAp kaplanma verimine etkisi ve bu etkinin

in-vitro cevaplarda oluşturacağı değişiklikleri incelemek için gerçekleştirilen kaplama sonrası karakterizasyon analizleri irdelenmiştir.

4.2.1. Mikrodalga destekli hidroksiapatit kaplama

Biyomimetik yöntem kullanılarak derişimi insan kan plazmasının 10 katı olan SBF-benzeri çözelti Bölüm 3.3.1’de verilen reçeteye uygun olarak hazırlanmış ve kaplama işlemi, daha önce üzerinde durulan süreyi kısaltma, homojen ve minimum sıcaklık gradienti oluşturma gibi avantajları nedeniyle mikrodalga desteği ile gerçekleştirilmiştir [118].

4.2.2. Mikrodalga destekli bor katkılı hidroksiapatit kaplama

Biyomimetik yöntem kullanılarak 10xSBF-benzeri çözülden mikrodalga destekli HAp üretiminin yanı sıra aynı yöntem kullanılarak ve reçetede gerekli değişiklikler yapılarak B-HAp üretimi de gerçekleştirilmiştir. Literatürde borun kemik doku oluşumunu ve farklılaşmasını desteklediği çalışmalar bulunmakla birlikte, bor katkılı 10xSBF-benzeri çözelti üretimi ilk defa araştırma grubumuzca geliştirilmiştir [9]. Bu çalışma kapsamında kullanılan nHAp ve B-nHAp kaplanmış B-PEEK örnekler üzerinden yapılan ve sonuçları Bölüm 4.3’te yer alan optimizasyon çalışması doğrultusunda hücre kültürü çalışmalarında B-nHAp kaplı örneklerin kullanılmasına karar verilmiştir. Mikrodalga destekli hidroksiapatit ve bor katkılı hidroksiapatit kaplamaları özetlemek amacıyla Çizelge 4.4’te nHAp ve B-nHAp üretim koşullarının ve Çizelge 4.5’te üretim sonrası elde edilen nHAp ve B-nHAp’ın içeriklerinin karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 4.4. nHAp ve B-nHAp üretim yöntemlerinin karşılaştırılması, [133]’den değiştirilerek

HAp örnek	H ₃ BO ₃ (mg)*	NaOH (10 M) (µL)**	NaHCO ₃ (g)*	pH	Mikrodalga koşulları	
					Güç (W)	Tekrar x süre(s)
nHAp	0	-	0.0840	-	600	9x30
B-nHAp	10	900	0.0840	7.02 ±0.03	600	9x30

*100 mL ve **1000 mL içerisindeki miktarları temsil etmektedir.

Çizelge 4.5. nHAp ve B-nHAp içeriklerinin karşılaştırılması, [133]'ten değiştirilerek

HAp örnek	Ca (%)	P (%)	B (%)	Ca/P [#]	Ca/P+B [#]	P/B [#]
nHAp	34.40±0.28	16.55±0.07	-	1.61	-	-
B-nHAp	28.10±0.28	15.55±0.35	1.15±0.11	1.40	1.16	4.75

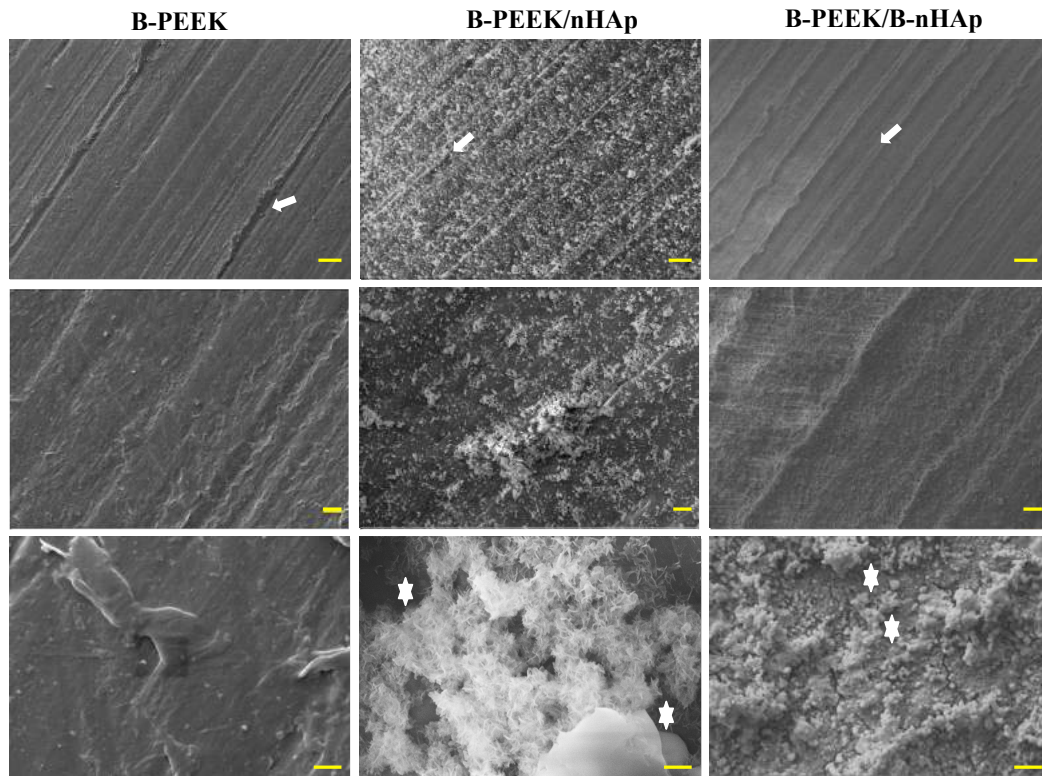
Ca/P, Ca/P+B ve P/B molar oranı

4.2.3. Mikrodalga destekli hidroksiapatit veya bor katkı hidroksiapatit kaplı PEEK malzeme yüzeylerinin karakterizasyonu

PEEK malzemenin modifikasyonu aşamasında kullanılan analiz teknikleri nHAp veya B-nHAp kaplı örneklerin karakterizasyonu için de gerçekleştirilmiş ve alt başlıklarda karakterizasyon sonuçları incelenmiştir.

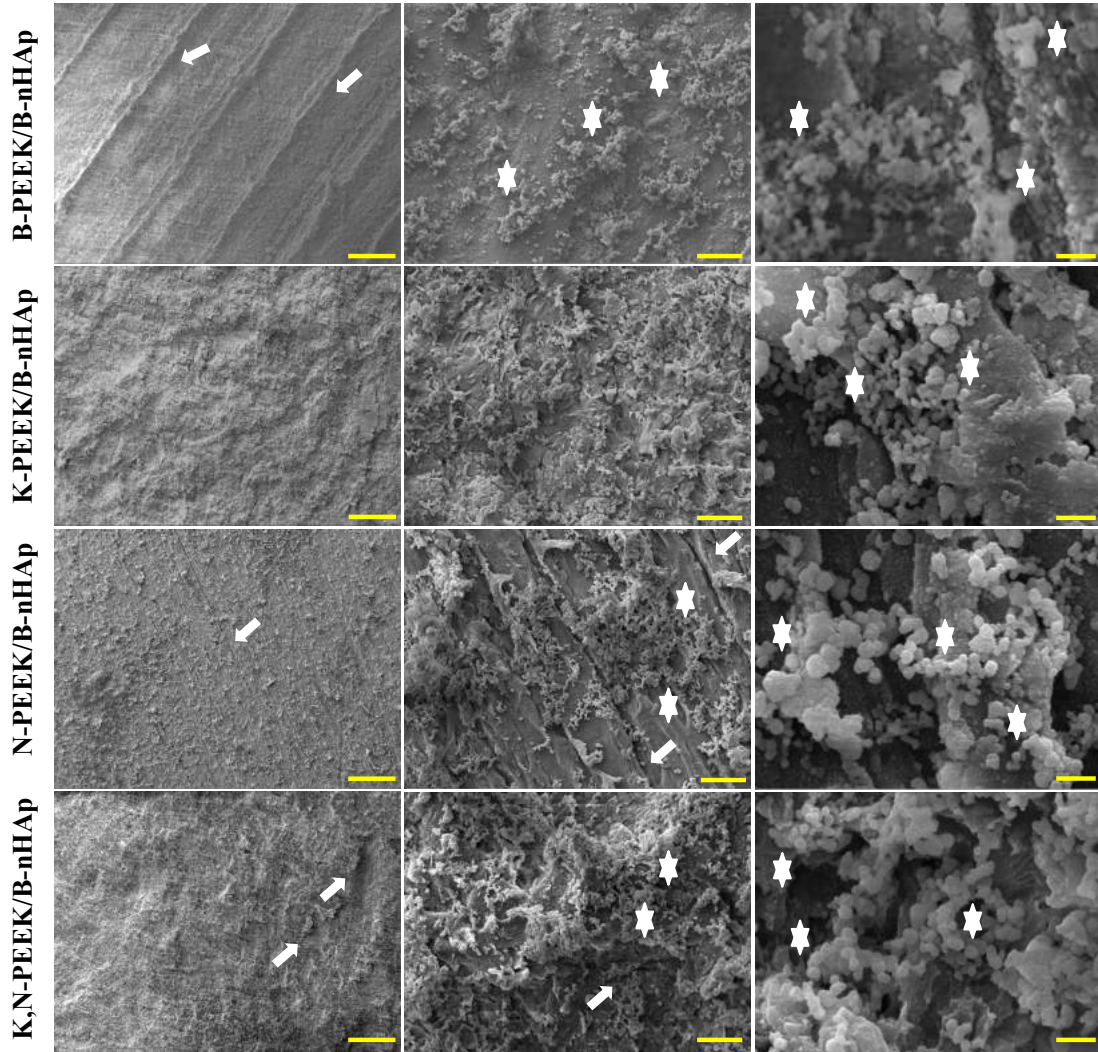
4.2.3.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

nHAp ve B-nHAp kaplı örneklerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntülerine Şekil 4.8'de ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8. B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp örneklerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları yukarıdan aşağıya sırasıyla 100 μm, 20 μm ve 2 μm'yi temsil etmektedir. Oklar kesim sonrası zımparalama ile malzeme yüzeyinde oluşan pürüzlülükleri, yıldızlar ise B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kaplanan HAp partikülleri temsil etmektedir.

Şekil 4.8 incelendiğinde, PEEK örnekler üzerine nHAp ve B-nHAp kaplamaların homojen bir şekilde gerçekleştiği görülebilmektedir. Bununla beraber nHAp kristalleri iğne benzeri bir morfoloji sergilerken [118], B-nHAp kristalleri literatürdeki diğer HAp moleküllerin morfolojisiyle benzerlik göstererek karnabahar çiçeği formunda bir morfoloji sergilemektedir [140]. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örnekler üzerine yapılan B-nHAp kaplamalara ait SEM görüntüleri ise Şekil 4.9’da karşılaştırılmıştır.



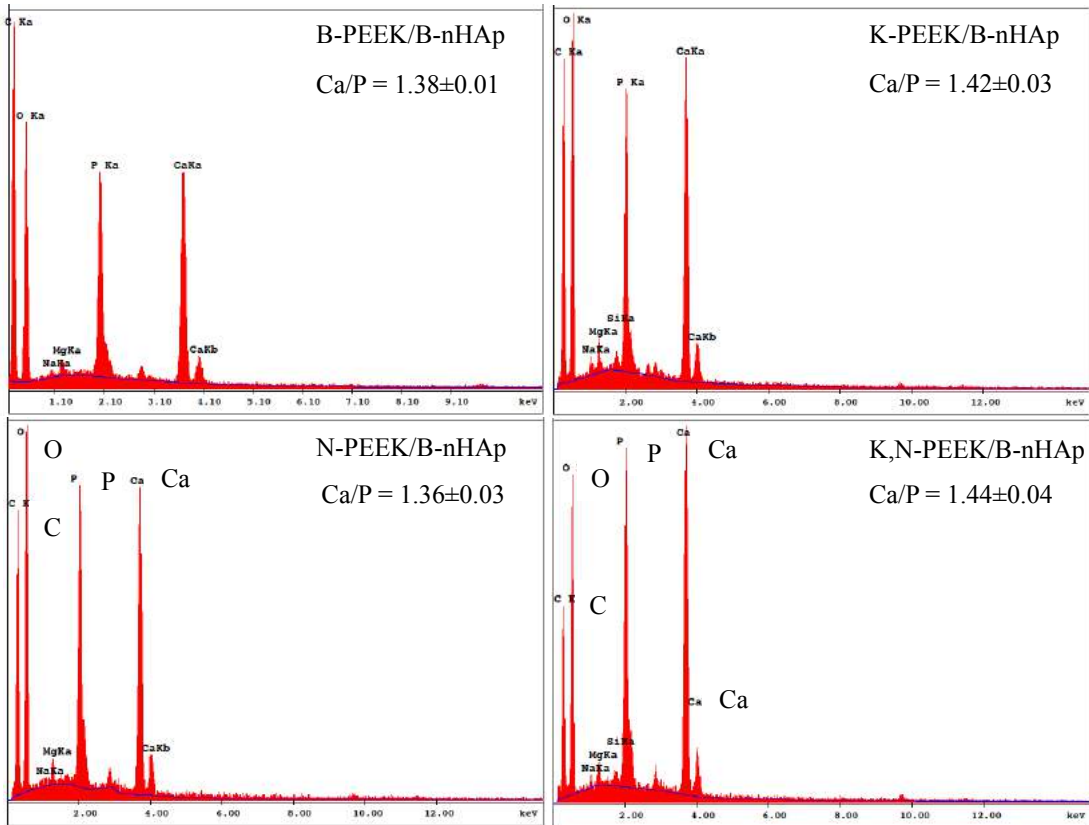
Şekil 4.9. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp, N-PEEK/B-nHAp ve K,N-PEEK/B-nHAp örneklerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları soldan sağa sırasıyla 100 µm, 10 µm ve 2 µm’yi temsil etmektedir. Oklar kesim sonrası zımparalama ile malzeme yüzeyinde oluşan pürüzlülükler ve NaOH dağlama sonrası yüzeyde oluşan kanalları, yıldızlar ise B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kaplanan B-nHAp partikülleri temsil etmektedir.

Şekil 4.9’da B-nHAp kaplı tüm örneklerin yüksek büyütmelerde çekilen SEM fotoğraflarında B-nHAp partiküllerin karnabahar çiçeği formundaki morfolojileri gözlemlenmiştir. K-PEEK/B-nHAp örneklerdeki nanotopografik agresif pürüzlülük B-

nHAp kaplamaların homojenitesini değiştirmemiş ve bunun yanı sıra, N-PEEK/B-nHAp ve K,N-PEEK/B-nHAp örneklerde NaOH dağlama sonucu oluşan kanal yapıları da B-nHAp kaplamalarla beraber gözlenmiş ve kanallar arasında B-nHAp partiküllerin mekanik olarak bağlandığı saptanmıştır.

4.2.3.2. Enerji dağılımlı X-ışını mikroanalizörü (EDX) analizi

Modifiye edilmemiş ve mekanik ve/veya fiziksel modifikasyonu tamamlanmış PEEK örnekler üzerinde yapılan B-nHAp kaplamaların elementel analizi için önceki örnek gruplarında olduğu gibi Au/Pd kaplanmış örnekler kullanılmış ve bu elementlere ait pikler spektrum üzerinde işaretlenmemiştir. Analize ait EDX spektrumları Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp, N-PEEK/B-nHAp ve K,N-PEEK/B-nHAp örneklere ait EDX spektrumları

Modifikasyon sonrası biyomimetik yöntem kullanılarak bor katkılı 10xSBF-benzeri çözeltiden mikrodalga destekli B-nHAp kaplama işlemi uygulanan örnek yüzeylerinde, PEEK polimerine ait C ve O elementlerine ek olarak yüksek oranda fosfor (P) ve kalsiyum (Ca) elementleri tespit edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırmalı olarak sonuçlar değerlendirildiğinde bu beklenen bir bulgudur ve B-nHAp çökmesi sırasında

istenmeyen fazların yapıdan yıkamalarla uzaklaştırılabildiği saptanmıştır. Ca ve P elementlerinin molariteleri oranı yapılan kantitatif ölçüm sonuçları olarak spektrumlar üzerinde gösterilmiştir. Araştırma grubumuzca geliştirilen B-nHAp için Ca/P oranının, örneğin tamamından ölçüm alındığı için keskinliği ve doğruluğu daha yüksek bir analiz olan ICP-OES tekniği ile, 1.40 bulunduğu bilgisi literatürde yer almıştır [9]. Tez kapsamında yapılan EDX analizi ise örnek yüzeyinin 10 farklı bölgesinden rastgele tarama şeklinde gerçekleştirildiği için sonuçlar önceki verilerle uyumlu olarak elde edilmiştir.

4.2.3.3. Su temas açısı (WCA) ölçümleri

Biyomimetik yöntem kullanılarak 10xSBF-benzeri çözeltiden nHAp ve bor katkılı 10xSBF-benzeri çözeltiden B-nHAp kaplamaları yapılmış örneklerle ait su temas açısı ölçümleri Bölüm 3.3.3.3'de anlatılan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ölçüm sonuçları kantitatif olarak Çizelge 4.6'da verilmiştir.

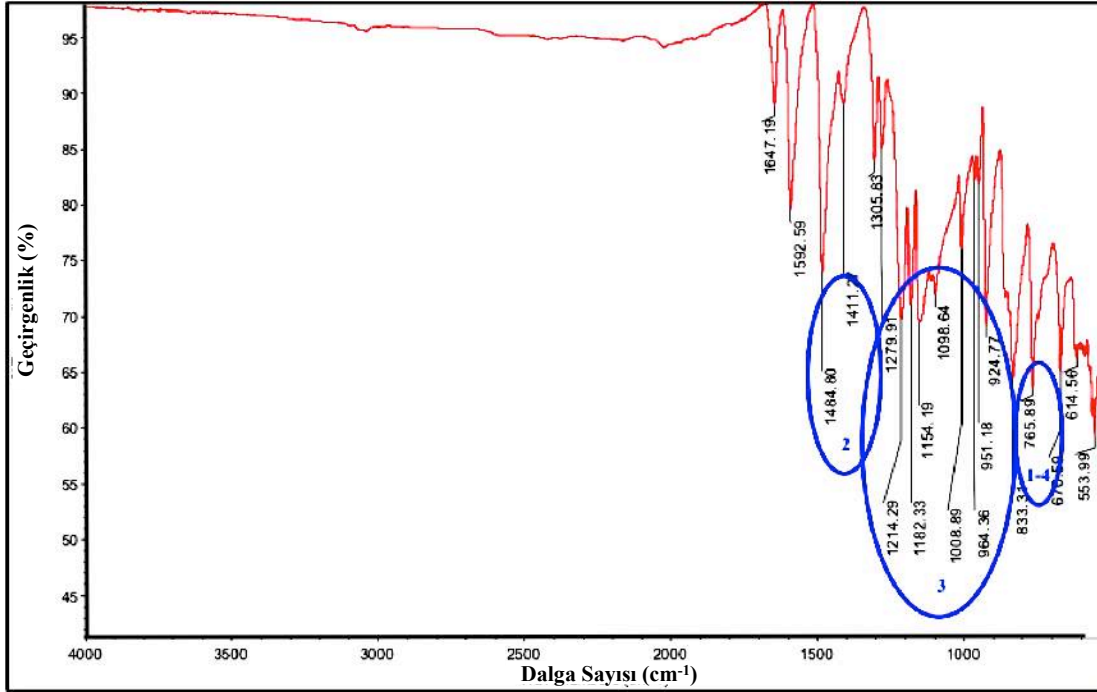
Çizelge 4.6. nHAp ve B-nHAp kaplı PEEK malzemelerin su temas açısı ölçüm sonuçları

Örnek	Su Temas Açısı (°)
B-PEEK/nHAp	39.0±7.6
B-PEEK/B-nHAp	24.4±5.9
K-PEEK/B-nHAp	29.5±5.5
N-PEEK/B-nHAp	22.8±5.7
K,N-PEEK/B-nHAp	25.8±5.6

Çizelge 4.2'deki sayısal veriler incelendiğinde nHAp kaplamanın modifiye edilmemiş PEEK (B-PEEK) örneklerle ait $62.8\pm 2.9^\circ$ olan su temas açısı değerini $39.0\pm 7.6^\circ$ 'ye düşürdüğü görülmektedir. Su temas açısının düşüşü malzemenin üzerine damlatılan asılı damlacığın yüzeyde yayılabildiğini bir başka deyişle yüzeyi ıslatabildiğini göstermekte olup hidrofilisitenin artışı temsil etmektedir. B-nHAp kaplı örneklerde daha düşük su temas açısı değerleri elde edilmiştir. En düşük değer N-PEEK/B-nHAp grubunda olup malzeme yüzeyinde NaOH dağlama sonucu oluşan OH⁻ gruplarının B-HAp partiküller içerisindeki Ca⁺² iyonlarının yüzeye tutunarak çekirdeklenmeye başlatması ve Ca/P içeren fazların yüzeyde çekirdeklenmesi ile B-HAp partiküllerin afinitesini etkileyerek daha fazla çökelmeye neden olduğu varsayılabilmektedir [96].

4.2.3.4. Toplam reflektansı azaltılmış – Fourier dönüşüm kızılötesi spektrofotometresi (ATR-FTIR) analizi

Biyomimetik yöntem kullanılarak 10xSBF-benzeri çözeltilerden nHAp kaplaması yapılmış örnekler için ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.11’de verilmiştir.



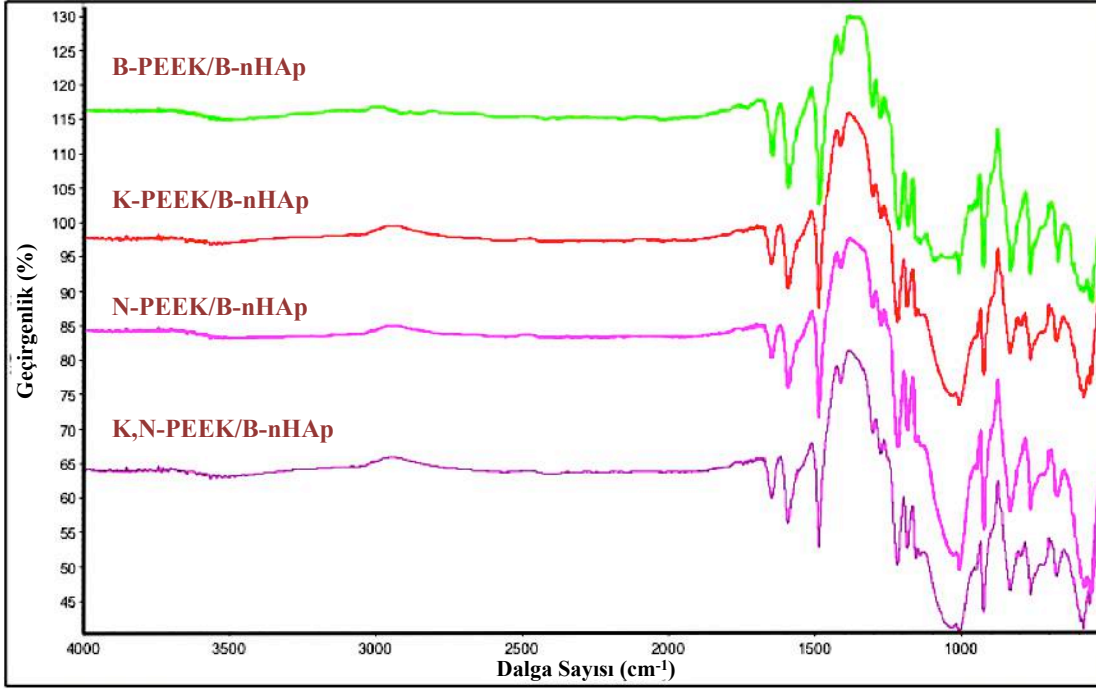
Şekil 4.11. B-PEEK/nHAp örneklerin ATR-FTIR spektrumu

B-PEEK/nHAp örnekler için ATR-FTIR spektrumu incelendiğinde Çizelge 4.7’te verilen HAp’ın karakteristik pikleri ile örtüştüğü görülmektedir.

Çizelge 4.7. HAp’a ait karakteristik FTIR pikleri [5, 78, 93]

Pik numarası	Dalga Boyu	Pik karakteristiği
1	3650 ve 630 cm^{-1}	Kristalin HAp fazındaki OH ⁻ gerilmesi
2	1470-1420 cm^{-1}	Karbonat (CO_3^{2-}) grubu titreşim piki
3	1084, 1035 ve 850 cm^{-1}	Fosfat (PO_4^{3-}) grubu titreşim piki
4	601-563 cm^{-1}	Kristalin HAp fazı

Biyomimetik yöntem kullanılarak bor katkıli 10xSBF-benzeri çözeltilerden B-HAp kaplamaları yapılmış örnekler için ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp, N-PEEK/B-nHAp ve K,N-PEEK /B-nHAp örneklerin ATR-FTIR spektrumları

B-nHAp kaplanmış örneklerin spektrumlarına bakıldığında 1304, 1253, 1208, 784, 771 ve 755 cm^{-1} 'de görülmesi beklenen BO_3^{3-} asimetrik gerilme ve simetrik eğilme bantları ile 2002 cm^{-1} ve 1932 cm^{-1} 'de kristal yapının boşluklarına girmesi beklenen BO_2^- iyonlarına ait bantların spektrumda saptanamamış olması boratlara ait piklerin zayıflığı ve borik asitin yapıya kütlece düşük bir oranda katılmasından kaynaklanmaktadır. Spektrumlardan çıkarılacak en önemli önerme B-nHAp kaplamalarda genel olarak nHAp kaplamaya ait piklerin olduğu, fakat BO_3^{3-} iyonlarının yarışmalı olarak PO_4^{3-} veya OH^- ile yer değiştirmesi sonucu CO_3^{2-} iyon piklerinin şiddetinin azaldığı ve genişliğinin arttığıdır [9].

4.3.Hücre Kültürü Çalışmaları

Statik koşullarda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında PEEK örnek üzerine yapılan modifikasyonların ve modifikasyon sonrası nHAp ve B-nHAp kaplanmış örneklerdeki kaplamaların *in-vitro*'daki etkisini incelemek adına MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları 28 gün boyunca devam ettirilmiş olup 6. günden itibaren örneklerin kültürasyonu büyüme ortamı yerine farklılaşma ortamı ile gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları kapsamında yapılan analizlerde preosteoblastik hücrelerin canlılıkları, morfolojileri ve osteoblastik farklılaşmaları modifiye edilmiş örnekler ile modifikasyon sonrası B-nHAp kaplı örnekler karşılaştırılarak incelenmiştir.

4.3.1. PEEK malzemenin sterilizasyonu ve yüzeylere hücre ekimi

PEEK implant malzemesinin hücre kültür çalışmaları laboratuvarımızda ilk defa bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olduğu için malzemenin sterilizasyonu ve örneklere hücre ekimi için gerekli uygun yöntemler için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

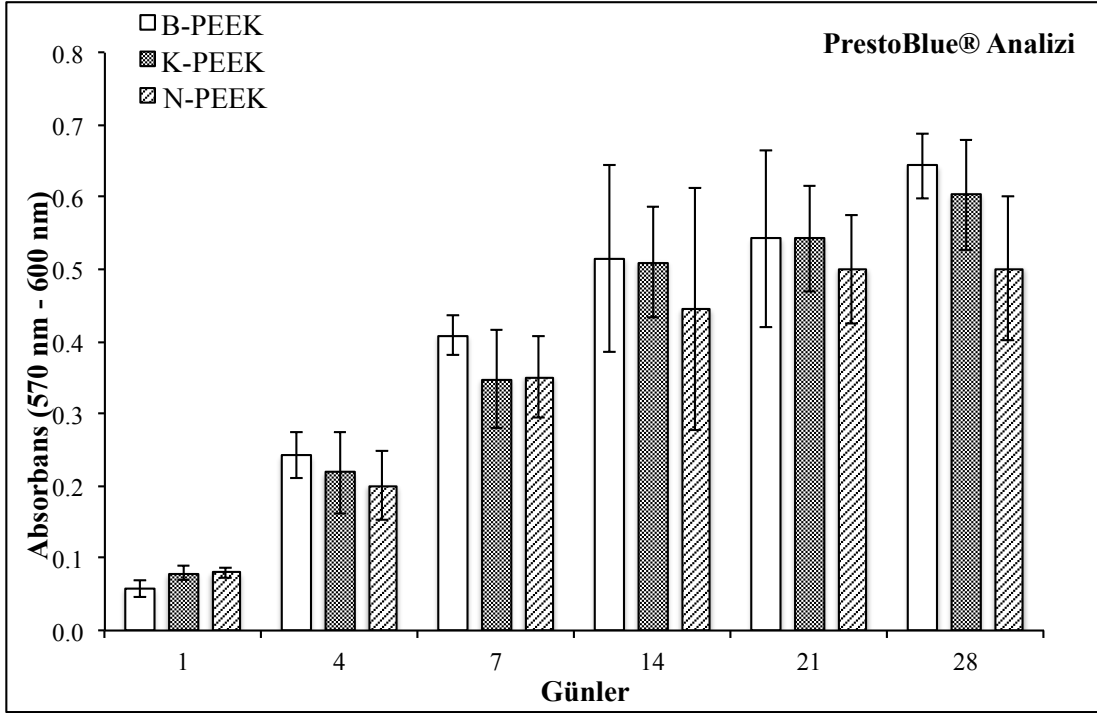
Hücre kültür çalışmalarının yürütüldüğü laboratuvarlarda sterilite oldukça önemli bir parametredir ve uzun süreli devam ettirilen çalışmalar için kontaminasyonun önlenmesi şarttır. PEEK polimeri 143°C camsı geçiş ve 343°C erime sıcaklığına sahip olma özelliği nedeniyle 121°C’de otoklavlanarak sterillenebilir bir malzeme olduğu için yöntem, sıklıkla kullanılan steril %70 etanolde 1 saat yıkama, steril PBS ile etanolün yer değiştirmesi için yıkama ve 1 saat boyunca UV ışığa maruz bırakma yöntemi ile karşılaştırmalı olarak denenmiş ve 2 yöntemde de sterilizasyon açısından bir sorun saptanmamıştır. Bununla beraber, daha düşük maliyete sahip olduğu ve otoklavlamamanın B-nHAp kaplamaya zarar verebileceği ihtimali nedeniyle etanol-PBS-UV sterilizasyonu tercih edilmiş ve tüm örnekler bu yöntemle sterilize edilmiştir.

Ekim sırasında kullanılacak hücre süspansiyon hacmi 10, 20 ve 50 µL olarak denenmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması için gerekli olan 1 saatlik süreç içerisinde 10 µL hücre süspansiyonu 37°C’de kuruduğu ve 50 µL hacim örnek yüzey alanına fazla geldiği için 20 µL hücre süspansiyonu ile ekim, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Ekimden 1 saat sonra 24 gözlü bakteriyolojik Petri kabındaki örnekler üzerine 1 mL büyüme ortamı eklenerek ekim tamamlanmıştır.

4.3.2. PrestoBlue® analizi

Modifiye edilmemiş PEEK örnekler ile mekanik ve fiziksel modifikasyonu tamamlanmış PEEK örnekler üzerinden gerçekleştirilen ilk hücre kültürü çalışmasında malzeme üzerinde hücrelerin yayılması ve çoğalmasının incelenebilmesi için hücre kültürünün farklı günlerinde kantitatif sonuçlar veren PrestoBlue® analizi yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları öncesi kumlamanın yarattığı agresif pürüzlülük üzerine NaOH dağlama etkinliğinin az olması nedeniyle yapılan karakterizasyon analizleri sonucu K,N-PEEK örnek grubu elenmiş ve bu grup hücre kültürü çalışmalarında kullanılmamıştır. Şekil 4.13’te B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK örnekler ile 6. günden itibaren farklılaşma ortamında devam ettirilen 28 günlük hücre kültürü çalışmasına ait PrestoBlue® analiz sonuçları verilmiştir. Şekil, farklı günlerde elde edilen kolorimetrik süpernatantların absorbanlarının günlere karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilmiş ve hücresiz örneklerin

PrestoBlue® çözeltisi ile verdiği absorbans örnek gruplarının absorbans değerinden çıkarılarak bağıl sonuçlar elde edilmiştir.



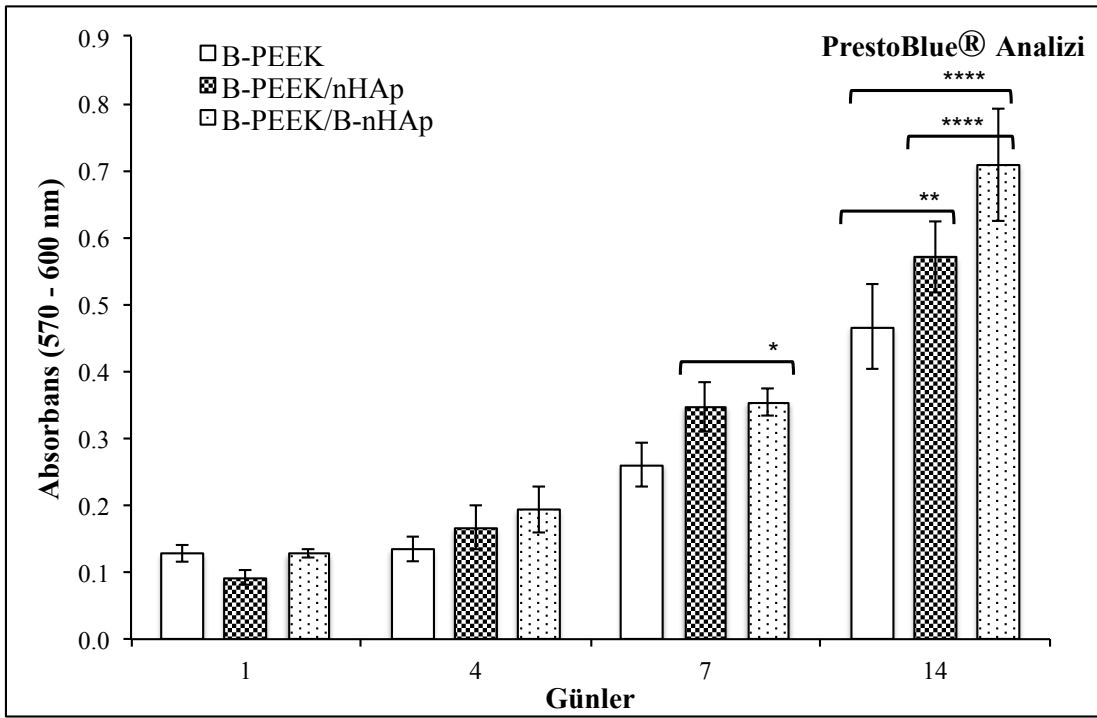
Şekil 4.13. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin PrestoBlue® analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar $n=5$, aynı günde gruplar arası anlamlılık $*p < 0.05$; aynı grubun bir önceki güne göre farklı günlerdeki değerleri arasında $\diamond\diamond p < 0.01$)

Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan PrestoBlue® analiz sonuçları incelendiğinde 3 PEEK malzeme yüzeyinin de hücrelerin tutunup çoğalması için uygun olduğu görülmektedir. Hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra alınan ilk gün verilerine bakıldığında sadece N-PEEK örneklerde B-PEEK örneklere göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p < 0.05$). Diğer değerler arasında anlamlı bir farklılık elde edilememiş olsa da ($p > 0.05$) kantitatif olarak K-PEEK ve N-PEEK gruplarının B-PEEK'e yüzeylere göre daha yüksek hücre tutunmasını sağladığı Şekil 4.13'te görülmektedir. Yüzey pürüzlülüğünün hücre tutunması üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda da belirtildiği gibi malzemenin ortalama yüzey pürüzlülüğünün artması yüzeyine tutunan hücre sayısını artırmaktadır [13].

Kültürün ilerleyen günlerinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmasa da ilk 7 günde B-PEEK örnek grubunda ve 14. günden itibaren K-PEEK örnek grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.01$). İlk 7 gün içerisindeki logaritmik artış eğilimi, 6. günde eklenen farklılaşma ortamı etkisiyle 7. günden itibaren farklılaşan hücrelerin çoğalma kapasitesinin düşmesi nedeniyle ivme kaybetmiştir. 28.

günde en yüksek canlılık miktarının B-PEEK örneklerde bulunması da yüzey pürüzlülüğü nedeniyle hücrelerin çoğalmaktan ziyade farklılaşmaya yönelmeleriyle açıklanabilir [13]. Bu önerme PCR analizi sonuçları ile beraber değerlendirildiğinde doğruluğu kanıtlanmaktadır. Ancak literatürde yüzey pürüzlülüğünün hücre canlılığı üzerine etkisi kesin yargılarla belirlenmemiş olup, çalışmalar uygun düzeylerdeki pürüzlülüğün hücre tutunma, yayılma ve farklılaşmasını desteklediğini belirtir niteliktedirler [141, 142].

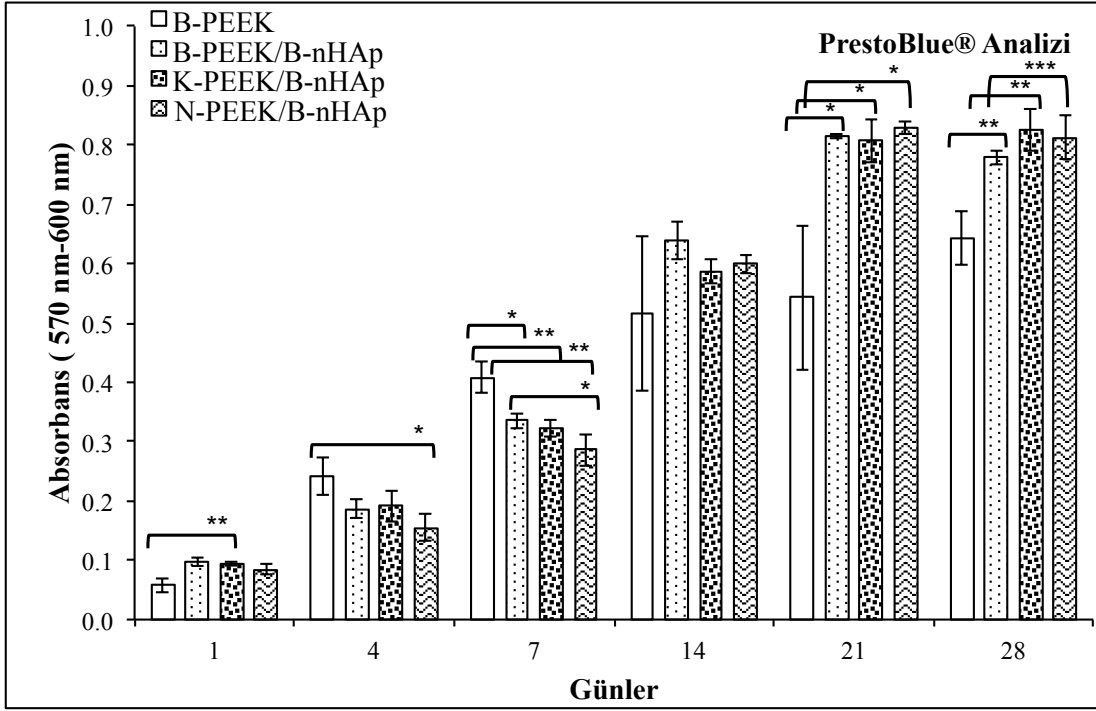
B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK örnekler modifikasyon sonrası yapılacak olanın kaplamanın nHAp kaplama ya da B-nHAp kaplama olmasına karar verebilmek adına B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp örneklerle 28 günlük bir ön hücre kültürü çalışması yapılmış ve kültür 28 gün boyunca büyüme ortamında devam ettirilmiştir. Böylece farklılaşma ortamından farklılaşmayı indükleyerek hücre proliferasyonunu düşürecek etmenler bertaraf edilmiştir. Şekil 4.14'te B-PEEK, B-PEEK/nHAp, B-PEEK/B-nHAp örnekler için 14 günlük PrestoBlue® analiz sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.14. B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin PrestoBlue® analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=5, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001)

B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp örneklerle büyüme ortamında yapılan kültür çalışmasında bütün gruplarda canlılığın üstel artışındaki istatistiksel anlamlılık 4. günde 1. güne göre ($p<0.0001$), 7. günün 4. güne göre ($p<0.0001$), ve 14. günün 7. güne ($p<0.0001$) oldukça yüksek olup şekil üzerinde yaratacağı karışıklık nedeniyle gösterilmemiştir. En yüksek hücre canlılığı B-PEEK/B-nHAp örneklerde elde edilmiştir ($p<0.0001$). Borun hormon metabolizmasında, hücre membran fonksiyonlarında, enzim reaksiyonlarında ve hücre dışı matris üretimini destekleyerek yara iyileşmesini hızlandırdığı belirtilen çalışmalar [123, 124] ile grubumuzca yapılan kemik doku rejenerasyonundaki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar [9, 10, 133] göz önünde bulundurulduğunda bu çıkarım, literatür ile uyumludur. Hücrelerin farklılaşmalarını tetikleyecek yüzey pürüzlülüğü ya da farklılaşma ortamında bulunan kimyasal tetikleyiciler gibi etmenler olmadığı için proliferasyonu devam eden hücrelerde istatistiksel olarak B-PEEK/nHAp grubuna göre de anlamlılığı ve kantitatif değeri en yüksek olan B-PEEK/B-nHAp grubu kaplamada kullanılmak üzere seçilmiştir ($p<0.0001$).

B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeyler üzerine biyomimetik yöntem kullanarak bor katkılı 10xSBF-benzeri çözelti ile mikrodalga destekli B-nHAp kaplama sonucu elde edilen örnekler ile hücre kültür çalışmaları yürütülmüştür. Şekil 4.15'te B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örneklerle 6. günden itibaren farklılaşma ortamında devam ettirilen 28 günlük hücre kültürü çalışmasına ait PrestoBlue® analiz sonuçları verilmiştir.

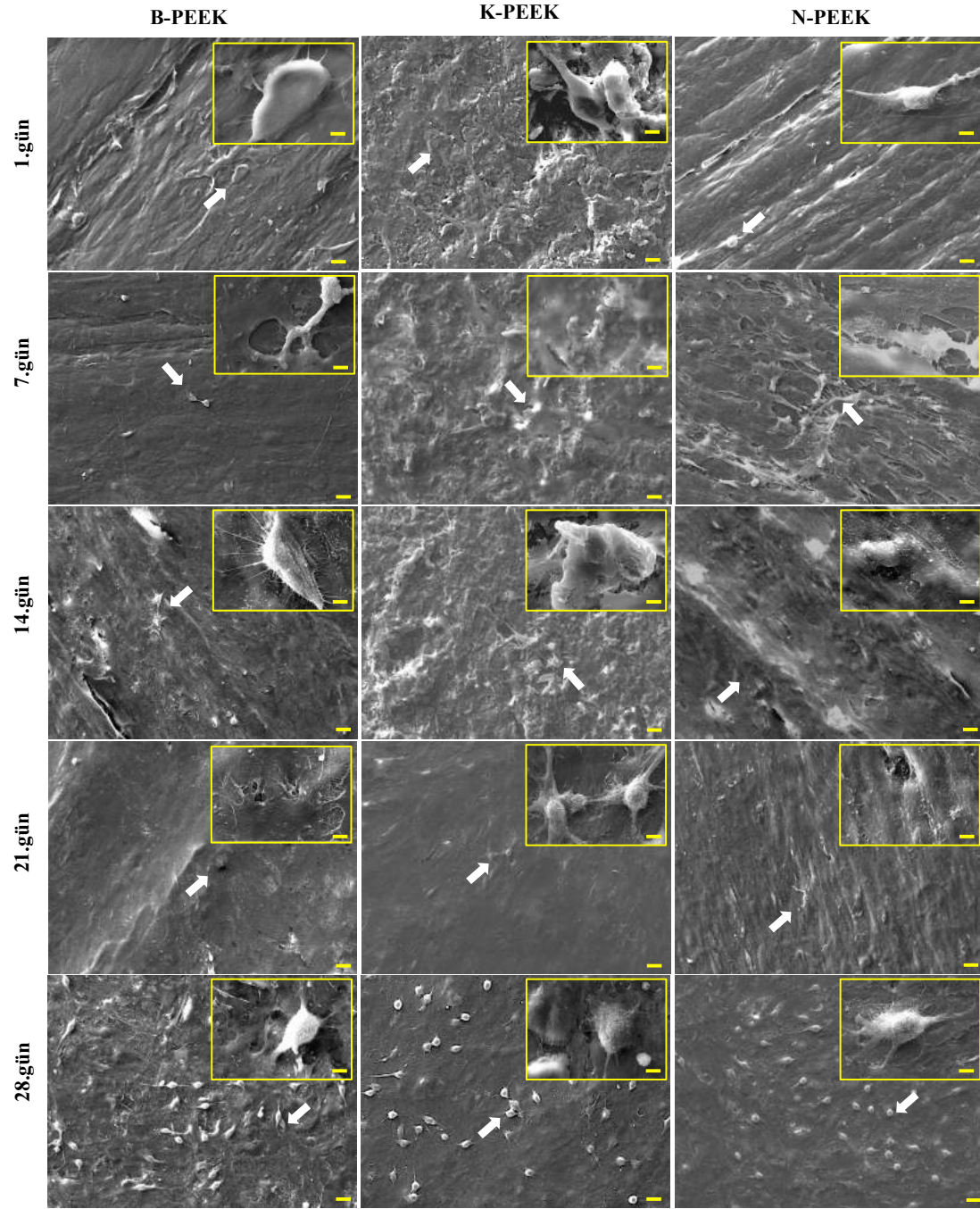


Şekil 4.15. B-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin PrestoBlue® analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=5, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

Kültürün ilk gününde K-PEEK/B-nHAp örneklerin canlılık değerindeki anlamlılık (p<0.01), yüzey pürüzlülüğünün hücre tutunmasını desteklemesi ile açıklanabilmektedir. Kültürün ilk 7 günündeki absorbans değerlerine bakıldığında, ortamda farklılaşmayı indükleyecek kimyasal ajanlar olmasa dahi B-nHAp kaplı örneklerde hücrelerin farklılaşma eğilimlerinin daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır (p<0.01). Kültürün 14. gününde gruplar arası anlamlı bir farklılık elde edilememiştir (p>0.05). 21. günden B-nHAp kaplı tüm gruplar istatistiksel olarak B-PEEK grubundan anlamlı derecede yüksek canlılık göstermişlerdir (p<0.05) ve kültürün 28. gününde B-PEEK/B-nHAp ile K-PEEK/B-nHAp gruplarının B-PEEK grubuna göre anlamlı yüksek canlılığa sahip olduğu bulunmuştur (p<0.01). Bununla birlikte kültürün 28. gününde N-PEEK/B-nHAp grubunda B-PEEK/B-nHAp grubuna göre en yüksek istatistiksel anlamlılık elde edilmiştir (p<0.001). Borun kemik farklılaşma üzerindeki etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla beraber hücre canlılığında artışı ve öncül hücrelerin kemiğe farklılaşmasını desteklediği belirtilmektedir [133].

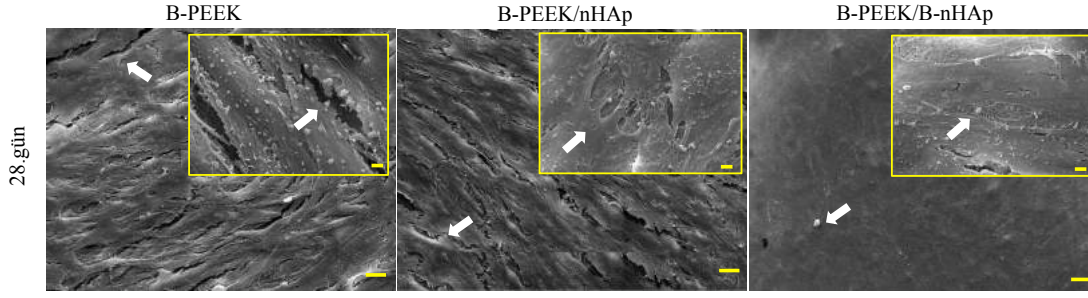
4.3.3. SEM analizi

B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeylerdeki MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojik özellikleri SEM analizi kullanılarak incelenmiştir. Devam eden hücre kültürü çalışmasının 1, 7, 14, 21 ve 28. gününde toplanan örnekler analiz için Bölüm 3.4.3'te açıklanan yöntemle hazırlanmış ve analize başlamadan Au/Pd karışımı ile kaplanmıştır. Şekil 4.16'da B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK örnekler üzerindeki hücrelerin farklı günlerdeki SEM fotoğraflarına yer verilmiştir. SEM fotoğrafları Şekil 4.13'te verilen PrestoBlue® analiz sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde 1. günde hücrelerin uzantılarını oluşturarak malzeme yüzeyinde tutunmaya çalıştıkları söylenebilmektedir. Birinci gün fotoğrafları incelendiğinde K-PEEK örneklerdeki agresif pürüzlülüğe bağlı yüzey alanı artışının hücreler üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmaktadır. Bununla birlikte N-PEEK örneklerde NaOH dağlamaya bağlı oluşan mikro kanallar üzerine ekimi yapılan hücrelerin kanallar arasında tutunma eğilimi gösterdikleri gözlenmiştir. Bu eğilim hücrenin kanal arası mesafe boyunca uzantı oluşturmaya, bölünmeyle artan hücre sayısı ile doğru orantılı hücre dışı matris (extracellular matrix-ECM) oluşumuna ve malzeme yüzeyinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında görece daha kısa sürede hücrelerle kaplanmasına neden olmuştur. Kültürün ilerleyen günlerinde çekilen SEM fotoğrafları da bu önermeyi doğrulamaktadır. Kültürün 7. ve 14. gününde tüm yüzeydeki hücreler çoğalarak birbirleriyle iletişime geçmeye başladıkları gözlenmiştir. 21. günde tüm gruplara ait örnek yüzeyleri hücrelerle tamamen kaplanmış ve yüzey üzerinde bir hücre tabakası görünümü elde edilmiştir. Yüzey alanının tamamını dolduran hücreler 28. günde tabaka üzerinde tekrar çoğalmaya başlamış ve yeni bir tabaka oluşumunun temelleri atılmaya başlanmıştır. Statik kültürlerde besin ortamdan sadece difüzyon yoluyla alınmaktadır. Statik kültürlerde hücreler 2 boyutlu malzeme ya da 3 boyutlu doku iskelelerinin yüzeyini kapladıktan sonra alt bölüme besinin difüze edilmesini engelleyebilmektedirler [143]. Bu nedenle hücre kültürü çalışmasının bu aşamadan sonra devam ettirilmesi alt tabakalara doğru besin ve oksijen alışverişinin kısıtlanması nedeniyle sağlıklı olmamakla beraber hücrelerin canlılığı da bu aşamadan sonra tehlikeye girmektedir.



Şekil 4.16. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeyler üzerinde hücrelerin hücre kültürünün (yukarıdan aşağıya sırasıyla) 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerindeki SEM görüntüleri, ölçek çubukları büyük fotoğraf ve sağ üst köşedeki fotoğraf için sırasıyla 20 μm ve 2 μm 'yi göstermektedir. Oklar küçük büyütmelerde örnek üzerinde yaklaşılan noktaları ve hücreleri temsil etmektedir.

B-PEEK, B-PEEK/HAp ve B-PEEK/B-HAp örneklerle gerçekleştirilen hücre kültür çalışmasının 28. gününde yapılmış olan SEM analizine ait görüntüler Şekil 4.17'de verilmiştir.

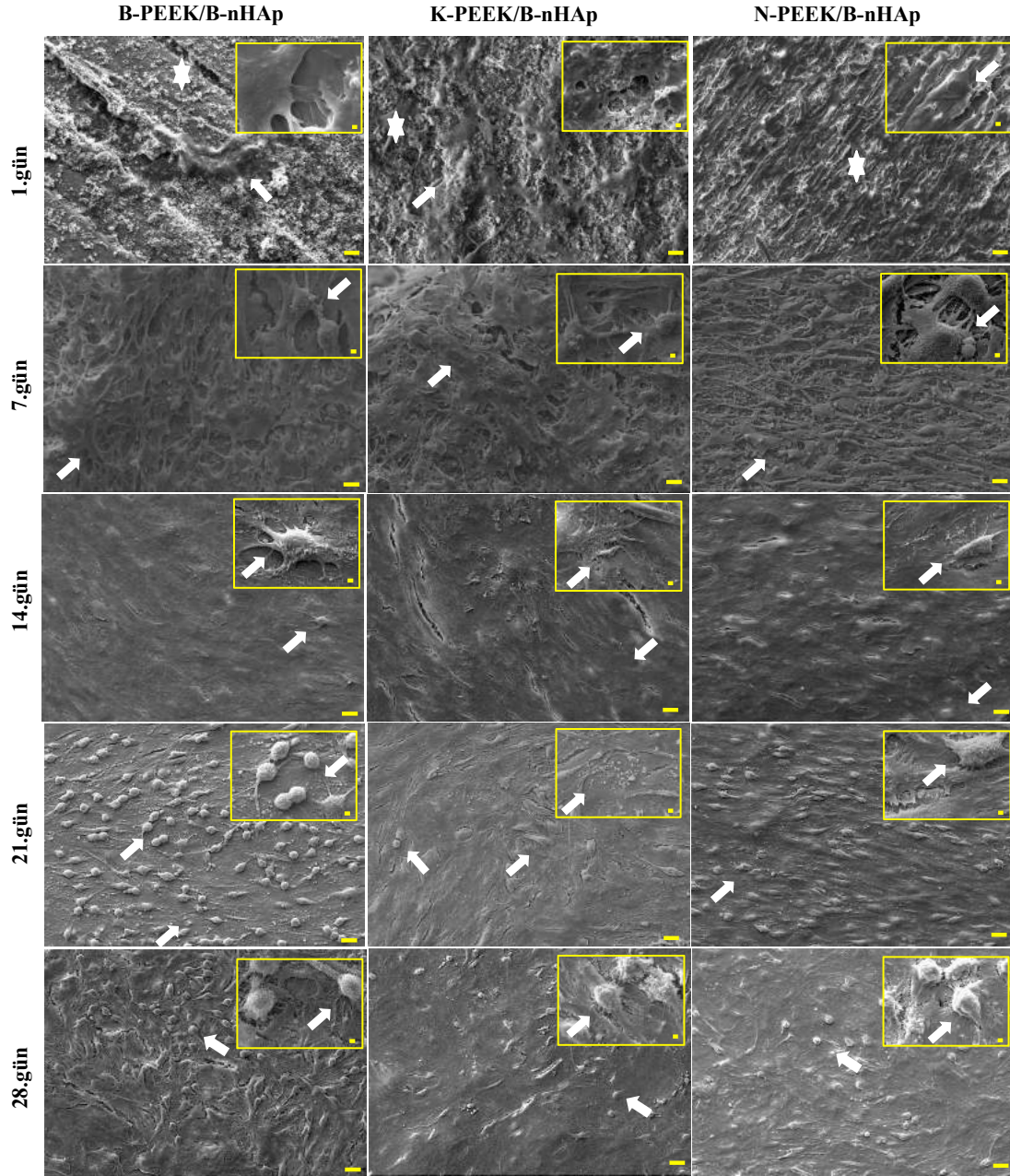


Şekil 4.17. B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin hücre kültürünün 28. günündeki SEM görüntüleri. Ölçek çubukları büyük fotoğraf ve sağ üst köşedeki fotoğraf için sırasıyla 20 μm ve 2 μm 'yi göstermektedir. Oklar küçük büyütme örneklerinde yakınlaşılan noktaları ve hücreleri temsil etmektedir.

Farklılaşma ortamı olmaksızın gerçekleştirilen çalışmanın SEM fotoğraflarına bakıldığında B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK örneklerde 28. günde gözlenen tam bir hücre tabakasının oluşmadığı, özellikle B-PEEK ve B-PEEK/n-HAp örneklerde tabaka üzerinde çeşitli yırtılmaların bulunduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte B-PEEK/B-nHAp örneklerde diğer örneklerle karşılaştırıldığında göre bütünsel bir tabaka oluşumu, bor katkılamanın hücre morfolojisi üzerine etkisini de göstermektedir.

B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK örneklerin üzerine B-nHAp kaplama yapılmasıyla elde edilen B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örneklerin farklılaşma ortamında gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmasının 1., 7., 14., 21. ve 28. gününde toplanan örnekler analiz için Bölüm 3.4.3'te açıklanan yöntemle hazırlanmış ve analize başlamadan Au/Pd karışımı ile kaplanmıştır. Şekil 4.18'de B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örnekler üzerindeki hücrelerin farklı günlerdeki SEM fotoğraflarına yer verilmiştir.

Birinci gün fotoğraflarına bakıldığında malzeme üzerine yapılan kaplamanın modifikasyon sonucu oluşan yüzey özelliklerini kapatmadığı karakterizasyon amaçlı çekilen SEM fotoğraflarında olduğu gibi bu analizde de gözlenmektedir. Kültürün 7. günündeki fotoğraflar değerlendirildiğinde hücrelerin yüzeyde Şekil 4.16'da verilen örneklere göre daha hızlı çoğaldıkları görülmektedir. B-nHAp kaplı yüzeyler arasında hücre çoğalmasında kantitatif datalarda anlamlı bir farklılık elde edilememiş olsa da hücre morfolojileri yüzeyler arası farklılık göstermektedir. 7. günde B-PEEK/B-nHAp ve K-PEEK/B-nHAp örnekler üzerinde hücreler rastgele bir dağılım gösterirken, N-PEEK/B-nHAp örneklerdeki mikro kanallar doğrultusunda yönelme mevcuttur.



Şekil 4.18. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin hücre kültürünün (yukarıdan aşağıya sırasıyla) 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerindeki SEM görüntüleri, ölçek çubukları büyük fotoğraf ve sağ üst köşedeki fotoğraf için sırasıyla 20 μm ve 2 μm 'yi göstermektedir. Oklar küçük büyütme örneklerinde örnek üzerindeki noktaları ve hücreleri, yıldızlar ise kaplama sonrası modifikasyon topografisinin gözlemlendiği bölümleri temsil etmektedir.

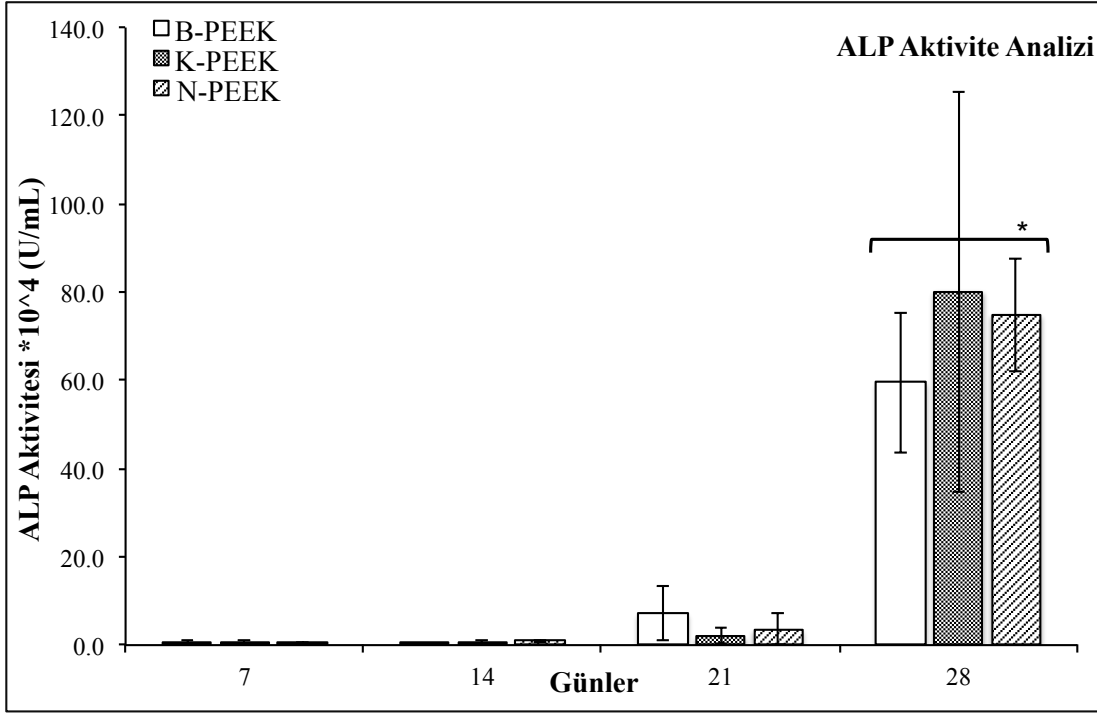
B-nHAp kaplaması yapılmamış örneklerde malzeme yüzeyi 21. günde tamamen hücrelerle kaplanmış olmasına rağmen B-nHAp kaplı örneklerde bu tabaka oluşumu 14. günde gerçekleşmiş ve 21. günde hücreler tabaka üzerinde tekrar çoğalmaya başlamışlardır. B-nHAp kaplanmış örneklerde, bor katkılı hidroksiapatitin etkisiyle çoğalan hücreler kültürün 28.gününde ECM'lerini oluşturarak yeniden tabakalaşma eğilimi göstermişlerdir.

4.3.4. Alkalen fosfataz (ALP) aktivite analizi

Hücreler tutundukları yüzey üzerinde çoğaldıkça oluşturdukları ECM miktarı da artar. Çoğalma fazını takiben gerçekleşen farklılaşma fazında erken ve geç dönem belirteci olarak adlandırılan bir çok indikatörden biri de alkalen fosfataz (ALP) enzimidir. ALP enzimi, kemik içerisinde fosfataz aktivitesiyle fosfat iyonları oluşturmakta ve bu oluşum kalsiyum fosfat bileşiklerini çöktürerek ossifikasyonu sağlamaktadır. Bunun yanı sıra ALP enzimi, mineralizasyonu inhibe eden pirofosfatları parçalamakta mineral oluşumunu kolaylaştırmaktadır [144, 145]. Kemik oluşumu süresince sentezlenen ALP enziminin aktivasyonu ECM’de minerallerin birikmesi ve osteoblastların osteositlere farklılaşması ile azalmaktadır [146]. Bu nedenle ALP aktivitesi kemik doku oluşumunda erken dönem farklılaşma belirteçlerinden biri olarak sınıflandırılmaktadır [147].

Şekil 4.19’da modifiye edilmemiş PEEK örnekler ile mekanik ve fiziksel modifikasyonu tamamlanmış PEEK örnekler üzerinde ilk 6 gün büyüme ortamı, 6. günden itibaren farklılaşma ortamı ile kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerine ait kültürün 7., 14., 21. ve 28. gününde toplanan örneklerin ALP aktivite analiz sonuçları verilmiştir. Şekil, Bölüm 3.4.4’te açıklanan yöntemle elde edilen kolorimetrik absorbans değerlerinin Ek 1’de verilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak birim hacimdeki ALP aktivitesine dönüştürülmesi ile elde edilmiştir.

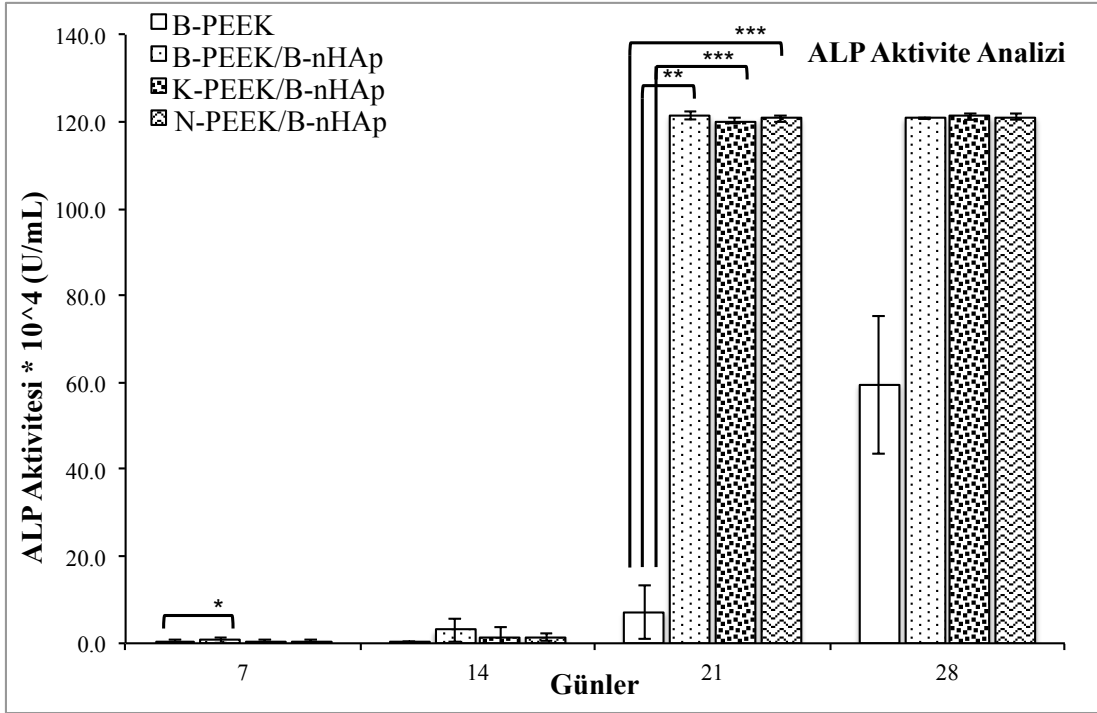
Şekil incelendiğinde ilk 14 günde grupların ALP aktivitelerinin düşük olduğu görülmektedir. Bununla beraber, örnekler üzerindeki hücrelerin ALP aktivitesi 21. günden itibaren artmış fakat 21. gündeki bu artış istatistiksel bir anlamlılığa dayandırılmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.19. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin ALP analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05)

Kültürün 28. gününde ise sadece N-PEEK örneklerde B-PEEK örneklere göre anlamlı bir farklılık elde edilmiştir (p<0.05). Bu bulgu Şekil 4.13'teki PrestoBlue® analiz sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, 28. günde N-PEEK örneklerdeki MC3T3-E1 hücre canlılığının gruplar arası en düşük değere sahip olduğu görülmektedir. Hücrelerin çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri arasındaki ters orantı [148], bu analizle de gösterilmiş olup Bölüm 4.3.2'de verilen önermenin doğruluğu pekiştirilmiştir.

B-nHAp kaplı modifiye edilmemiş PEEK örnekler ile B-nHAp kaplı mekanik ve fiziksel modifikasyonu tamamlanmış PEEK örnekler üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerine ait kültürün 7., 14., 21. ve 28. gününde toplanan örneklerin ALP aktivite analiz sonuçları, B-PEEK örneklerle karşılaştırmalı olarak Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. B-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin ALP analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

B-nHAp kaplı örneklerde de B-nHAp kaplanmamış örneklerde olduğu gibi kültürün ilk 14 gününde ALP aktiviteleri oldukça düşüktür. Analizin ilk gününde B-PEEK/B-nHAp örnekler üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin ALP aktivitesi B-PEEK örnekler üzerindikilerle karşılaştırıldığında anlamlı bir artışa sahip olduğu görülmektedir (p<0.05). Kültürün 21. gününde B-nHAp kaplı tüm örnekler üzerindeki hücrelerin ALP aktiviteleri B-PEEK örnek üzerinde çoğalan hücrelere göre anlamlı bir şekilde yüksektir (p<0.01 ve p<0.001). Bu bulgu bor katkılı hidroksiapatit kaplamanın hücrelerin kemiğe farklılaşmasını desteklediğini belirten yargı ile de uyumludur [149]. Yirmi bir ve 28. günde ise B-nHAp kaplı örneklerin ALP aktiviteleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p>0.05).

4.3.5. Toplam DNA miktarının belirlenmesi

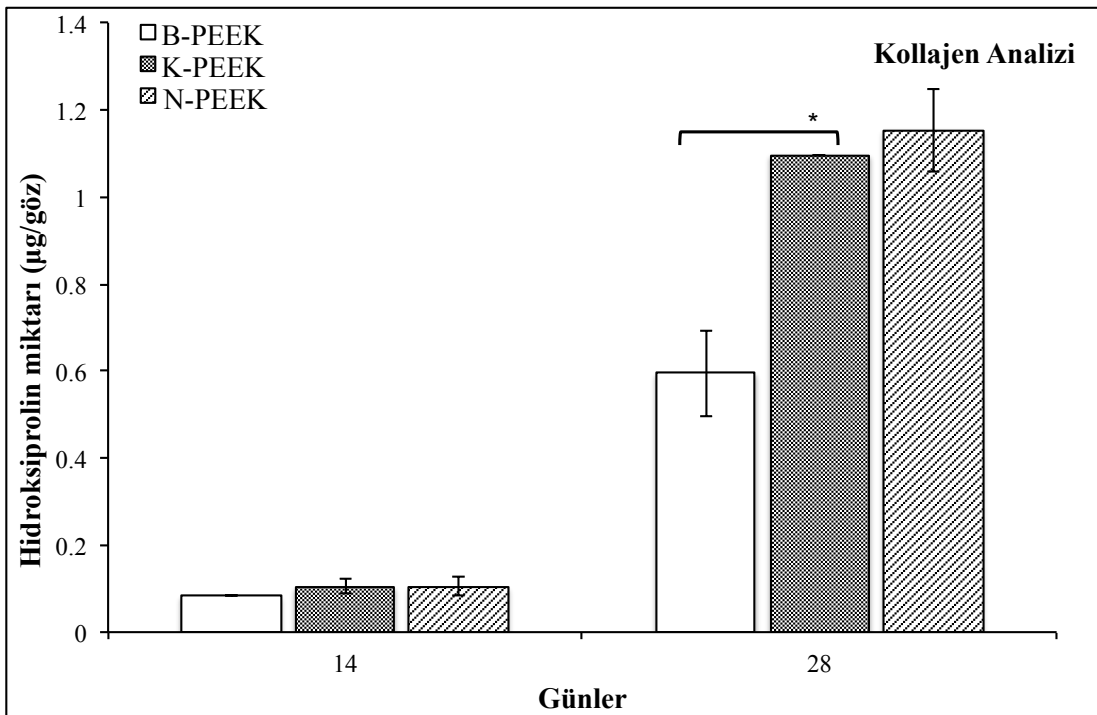
İki boyutlu film veya membran gibi malzeme yüzeylerinde ve 3 boyutlu doku iskeleleri üzerindeki hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan bir çok yöntemden biri de örnekler üzerindeki hücrelerin toplam DNA miktarının belirlenmesidir. Örnek üzerinde kültüre edilen hücrelerin toplam DNA miktarındaki değişim, hücre canlılığı ile doğru orantılı olarak ilişkilendirilmektedir. Bölüm 3.4.5'te anlatılan yöntemde anlatılan ve miktersal DNA tayini için kullanılan floresan kitle (Sigma- Aldrich, ABD) yapılan çalışmalarda

deneysel hatalar nedeniyle kalibrasyon grafiği elde edilememiştir. Sıfır ng DNA miktarı için 0.0 absorbans değerı fluorimetrede okutulamamış ve örnekler için analiz gerçekteştirilememiştir.

4.3.6.Kollajen analizi

Kemiğin organik yapısının büyük bir kısmını kollajen fibriller oluşturmaktadır ve kollajen-I olarak adlandırılan tip I kollajen hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. Kollajen miktarındaki artış, ALP aktivitesi gibi hücrelerin erken dönem farklılaşma belirteçlerindedir [150].

Hücre kültürü çalışmasının 14 ve 28. gününde toplanan örneklerden elde edilen kolorimetrik absorbans değerlerinin Ek 2'de verilen kalibrasyon grafiği yardımıyla örnek başına hidroksiprolin miktarına dönüştürülmesiyle oluşturulan grafik B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK örnekler için Şekil 4.21'de verilmiştir.

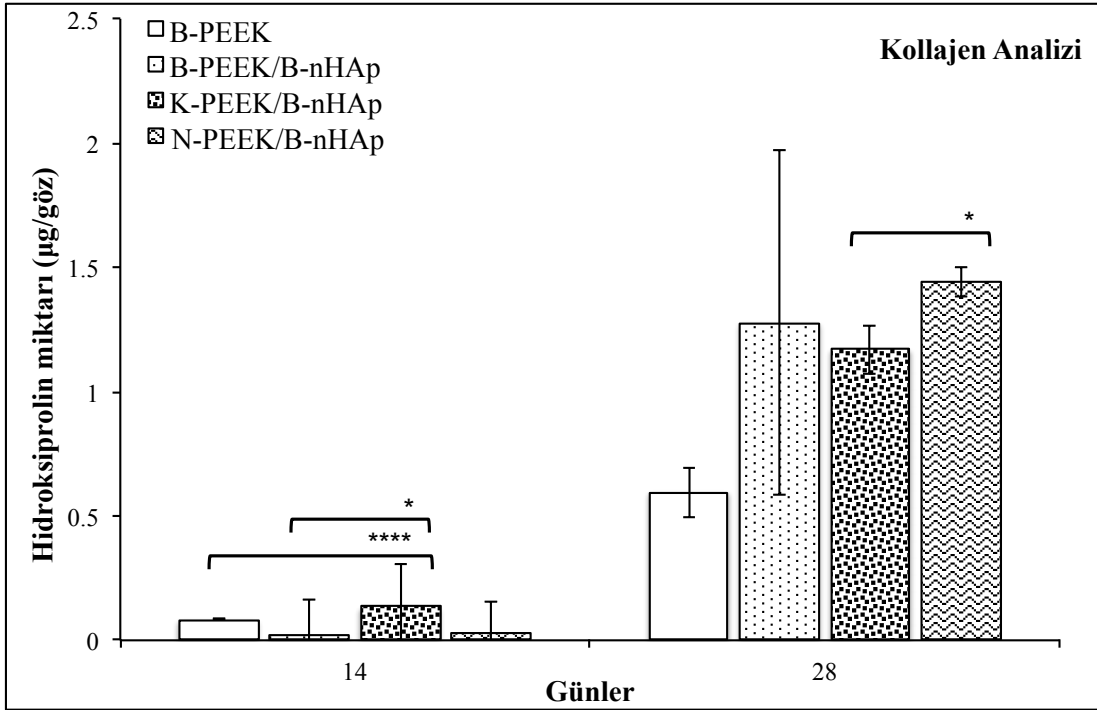


Şekil 4.21. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin kollajen analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05)

İstatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece kültürün 28. gününde K-PEEK örneklerde gözlenmiştir (p<0.05). En yüksek hidroksiprolin miktarı istatistiksel anlamlılığa sahip olmasa da kantitatif olarak N-PEEK örneklerde elde edilmiştir. Kültürün 1. saatinde immunofloresan boyama görüntüleri ve farklı günlerdeki SEM fotoğrafları dikkate

alındığında, N-PEEK örneklerde hücrelerin kanallar arasında çoğalma eğilimleri nedeniyle yüksek miktarda ECM oluşturduğu ve bu nedenle örnek üzerindeki hücrelerin kollajen miktarının fazla olduğu söylenebilir.

B-nHAp kaplı örnekler için yapılan hücre kültür çalışmasının da 14. ve 28. gününde gerçekleştirilen kollajen analizi sonuçları modifiye edilmemiş (B-PEEK) örneklerle karşılaştırmalı olarak Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. B-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin kollajen analiz sonuçları (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, ****p < 0.0001)

Kültürün 14. gününde K-PEEK örnekler üzerinde çoğalan hücrelerin kollajen içeriğinin göstergesi olan hidrokspirolin miktarı, B-PEEK örneklerdeki hücrelerin sahip olduğu miktara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklılık göstermektedir (p<0.0001). B-nHAp kaplı PEEK örneklere göre de anlamlılığı bulunan grup (p<0.005) için kültürün 28. gününde aynı anlamlılık elde edilememiştir. Yirmi sekizinci günde N-PEEK/B-nHAp örnekler, K-PEEK/B-nHAp örneklere kıyasla daha anlamlı bir artış göstermektedir (p<0.05) ve bu örnek grubu üzerindeki hücreler kantitatif olarak en yüksek değere sahiptir. Bu bulgu hücrelerin NaOH dağlama sonucu oluşan kanal yapıları arasında çoğalmaya eğilimi göstermesi ve bu kanallar arasındaki bor katkılı hidroksiapatit tarafından indüklenmeleri ile ilişkilendirilebilmektedir.

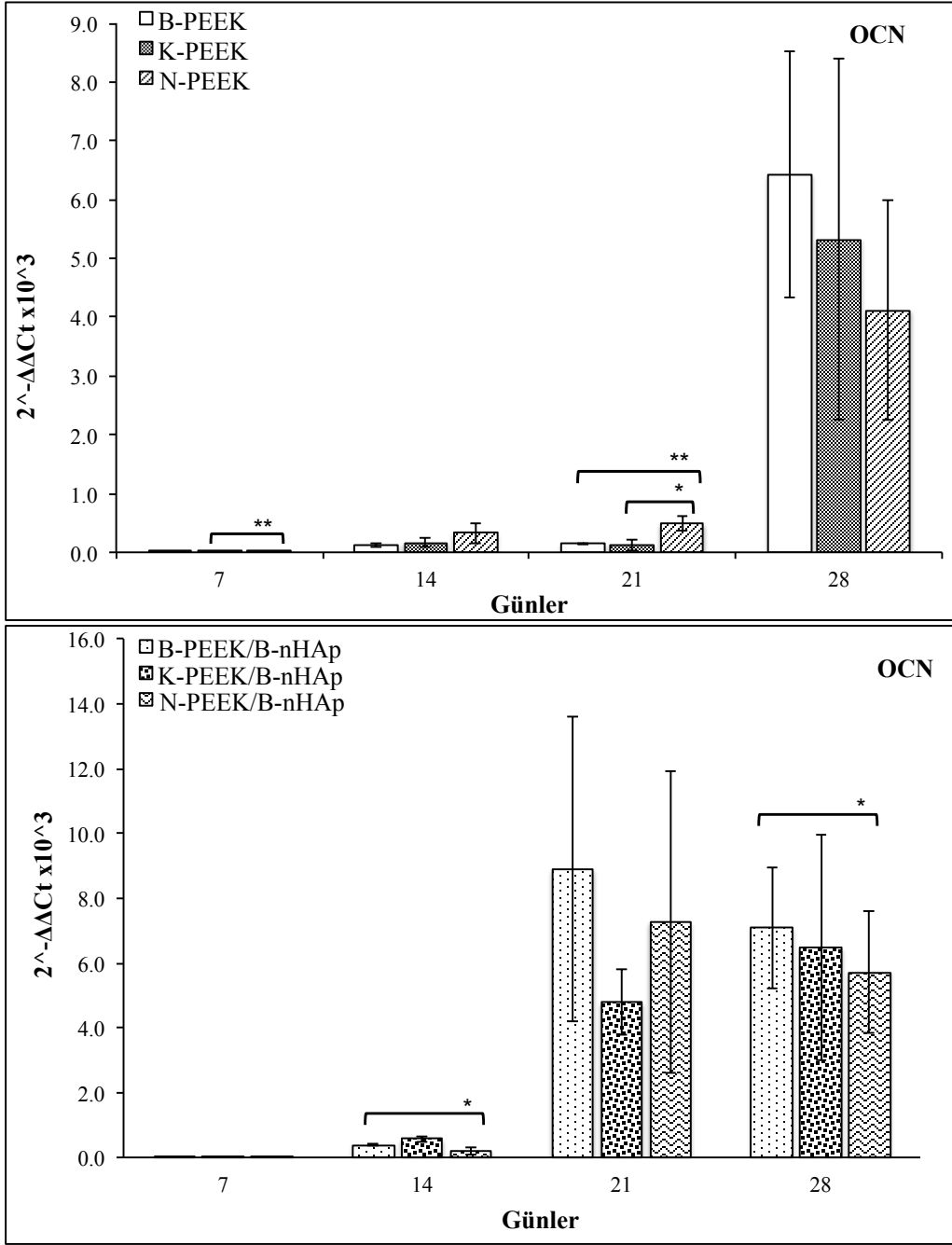
4.3.7. Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR analizi hücrelerin osteojenik farklılaşmalarının değerlendirilmesi için Colla1, ALPL, OCN, OCN ve RUNX2 gibi gen ifadelerinin ekspresyonunun incelenmesi için yapılmıştır. Bölüm 3.4.7’de açıklanan yöntemde örnekler üzerindeki hücreler parçalanarak sahip oldukları RNA, kit yardımıyla yapıdan uzaklaştırılmıştır. İzole edilen RNA zinciri Yüksek Kapasite cDNA Ters Transkripsiyon Kit kullanılarak tamamlayıcı DNA’ya çevrilmiştir. cDNA üzerinden 3 basamakta PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Denatürasyon basamağında sıcaklık artışıyla çift sarmal halinde bulunan DNA zincirlerinin açılması sağlanarak kalıp DNA’lar elde edilmiştir. Çizelge 3.5’te verilen kalıp DNA bölgesine uygun sentezlenen oligonükleotid primer dizilerinin yapıya bağlandığı annealing basamağından sonra 3. basamak olan polimerizasyonu takip eden döngüler tekrarlanarak DNA sentezlenmiştir. Referans gen (housekeeping gene) olarak seçilen β -aktin genine oranlanarak bağıl olarak hesaplanan gen ekspresyonları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak kantitatif sonuçlar elde edilmiştir.

Şekil 4.23’te (üstte) B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK ile (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örnekler üzerindeki hücrelerin bağıl osteokalsin (OCN) gen ifadelerine yer verilmiştir.

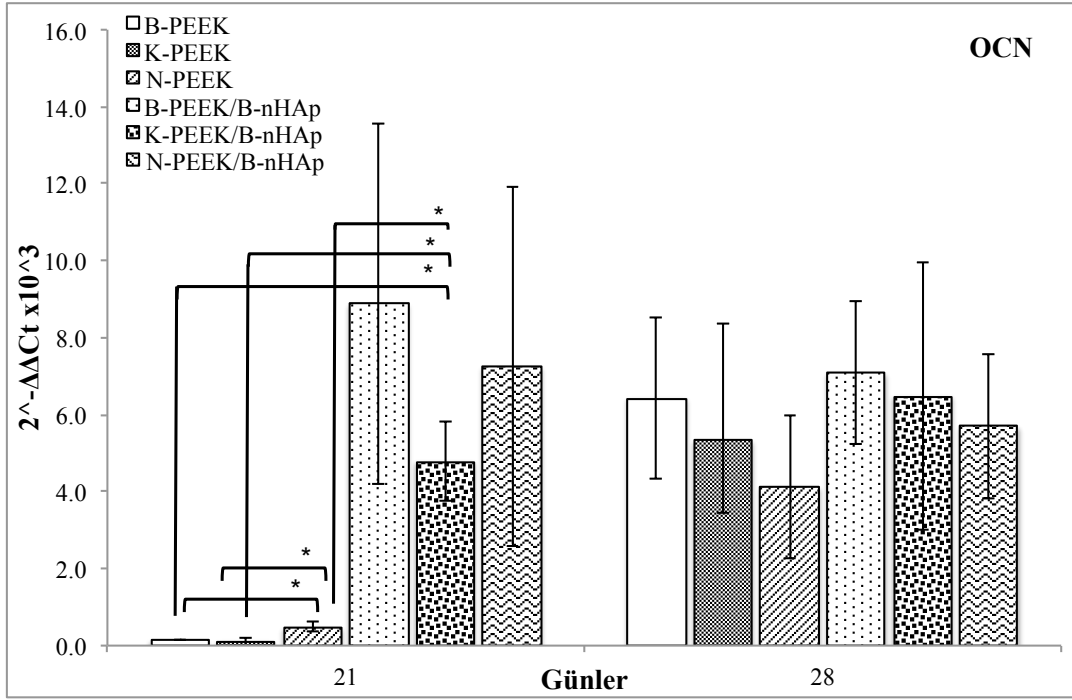
Osteokalsin, kemik matürasyonu sonrasında en yüksek değerine sahip olan, osteoblastların osteositlere farklılaşması sırasında geç dönemde eksprese olan ve mineralize dokuya spesifik bir proteindir [151].

Şekil 4.23 incelendiğinde, tüm örneklerde 7. günde ekspresyon değerinin çok düşük olduğu ve N-PEEK ile K-PEEK örnekler ($p < 0.01$) hariç, hiç bir grupta istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$).



Şekil 4.23. (üstte) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağlı OCN gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01)

Kültürün 14. gününde de örneklerdeki ekspresyon oldukça düşük olup tek anlamlı farklılık N-PEEK/B-nHAp örneklerde elde edilmiştir (p<0.05). Geç dönem farklılaşma belirteci olan bu genin ekspresyonunun 21. ve 28. gününe ait veriler tüm gruplar Şekil 4.24'te karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

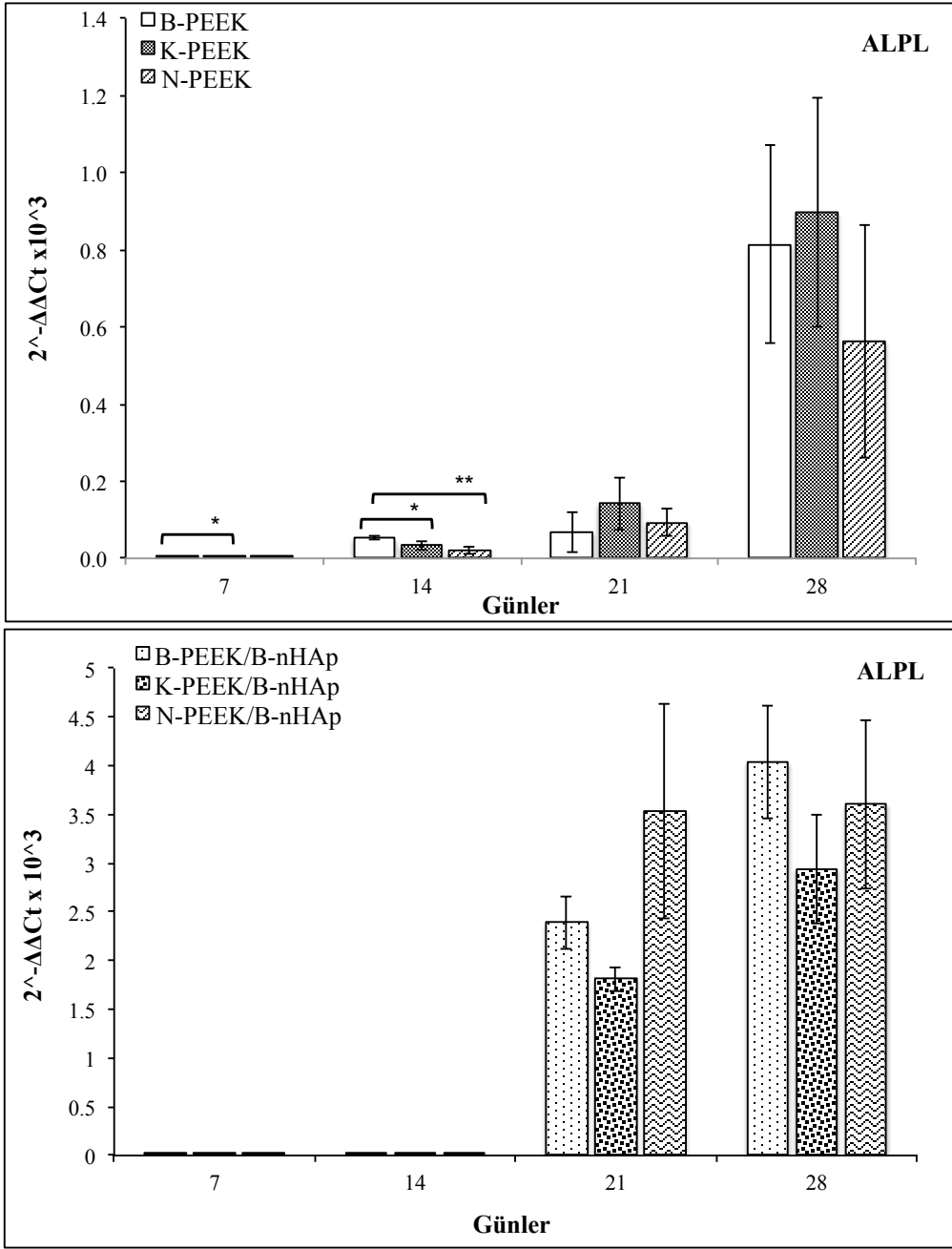


Şekil 4.24. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 21 ve 28. günlerdeki bağıl OCN gen ifadelerinin karşılaştırılması. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05)

Yirmi birinci gün OCN ekspresyonuna bakıldığında K-PEEK (p<0.05), N-PEEK (p<0.05), B-PEEK/B-nHAp (p<0.05) ve K-PEEK/B-nHAp (p<0.05) örneklerin kontrol grubu olan B-PEEK örneklere göre anlamlı farklılığa sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca 21. günde B-nHAp kaplı örneklerin kantitatif gen ekspresyonları kaplanmamış örneklerden en az 8 kat fazla olarak hesaplanmıştır. Kültürün 28. gününde de herhangi bir anlamlılığı bulunmasa da (p>0.05) B-nHAp kaplı örneklerin gen ekspresyonlarının 1.5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır.

Tunçay ve ark., çalışmalarında HAp ve B-HAp katkılamanın kitosan iskeleler üzerindeki OCN gen ekspresyonunu 21. günde maksimum seviyeye çıkardığını belirlemişlerdir [133]. B-nHAp kaplı PEEK örneklerin üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin OCN gen ekspresyonunun kültürün 21. gününde kaplanmamış örneklere oranla yüksek çıkması literatürdeki bu çalışmayla uyumluluk göstermektedir.

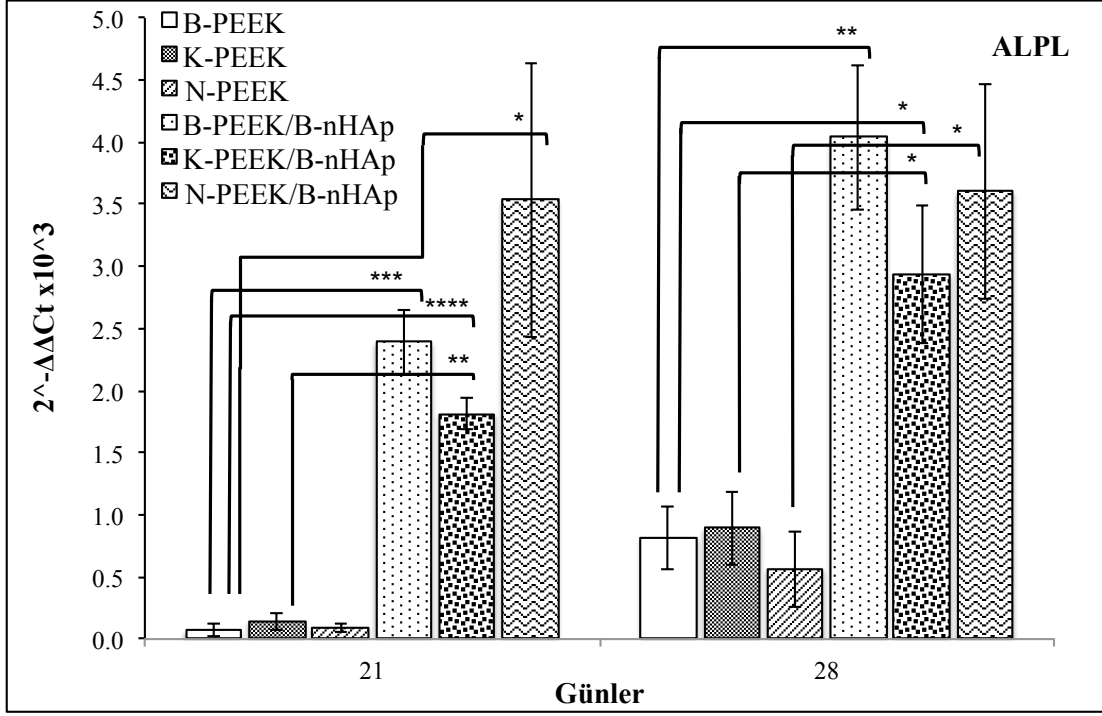
Örnekler üzerindeki hücrelerin bağıl ALPL gen ifadeleri incelendiğinde (Şekil 4.25), OCN gen ifadesinde olduğu gibi geç dönem farklılaşma belirteci olan bu genin ekspresyonunda da grafiksel olarak aynı eğilim gözlemlenmiştir.



Şekil 4.25. (üstte) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağıl ALPL gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01)

Kültürün 7. gününde K-PEEK (p<0.05) ve 14. gününde K-PEEK (p<0.05) ile N-PEEK (p<0.01) örnekler üzerindeki hücrelerin ALP gen ekspresyonu B-PEEK örneklerdeki hücrelerin gen ekspresyonuna göre anlamlı olsa da kültürün ilerleyen günlerinde istatistiksel bir anlamlılık gözlenmemiş olsa da (p>0.05) 28. günde maksimum ekspresyon elde edilmiştir. B-nHAp kaplı örneklerin hiç birinde analiz günlerinde anlamlılık elde edilmemiş (p>0.05) ancak gen ekspresyonlarındaki ilk logaritmik artış kültürün 21.

gününde saptanmıştır. Geç dönem farklılaşma belirteci olan ALPL gen ekspresyonunun kültürün 21. ve 28. gününde tüm gruplar için karşılaştırılmalı analiz sonuçları Şekil 4.26'da verilmiştir.

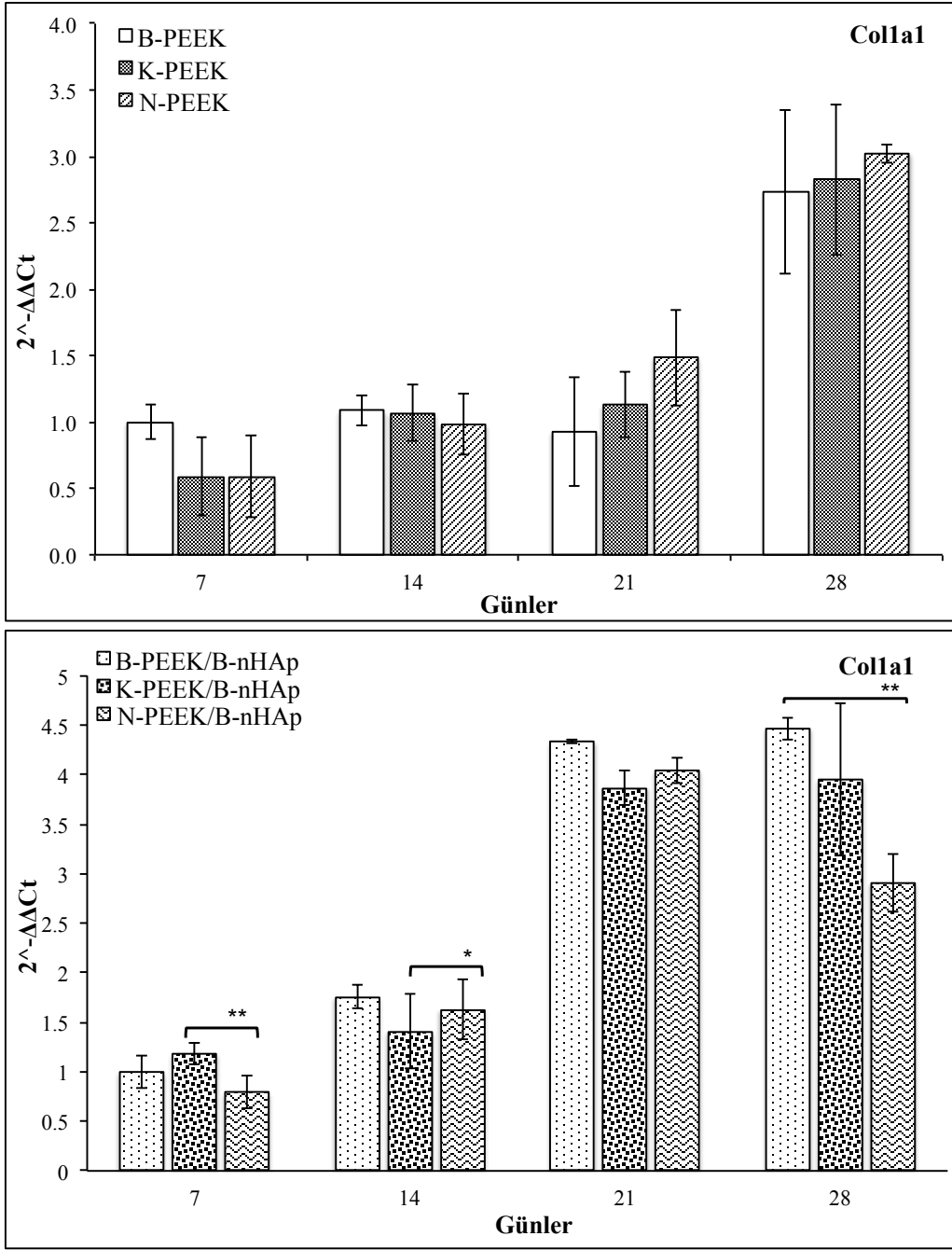


Şekil 4.26. B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 21 ve 28. günlerdeki bağıl ALPL gen ifadelerinin karşılaştırılması. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001)

Şekil incelendiğinde 21. günde B-PEEK/B-nHAp (p<0.001), K-PEEK/B-nHAp (p<0.0001) ve N-PEEK/B-nHAp (p<0.05) örnekler üzerindeki hücrelerin ALPL gen ekspresyonları B-nHAp kaplanmamış örneklerdekilere göre daha anlamlı ve yüksek değere sahiptirler. Kültürün 28. gününde de B-nHAp kaplanmamış gruplara göre anlamlılığı olan (p<0.05) örnek gruplarındaki hücrelerin gen ekspresyonu kantitatif olarak fazladır. OCN gen ekspresyonunda olduğu gibi malzeme yüzeyindeki B-nHAp varlığı hücrelerin kaplanmamış örneklerdeki ALPL geninin eksprese olma eğilimlerini 28. günden 21. güne çekmiştir [133]. ALP gen ekspresyon sonuçları kolorimetrik ALP aktivitesi analizinden elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

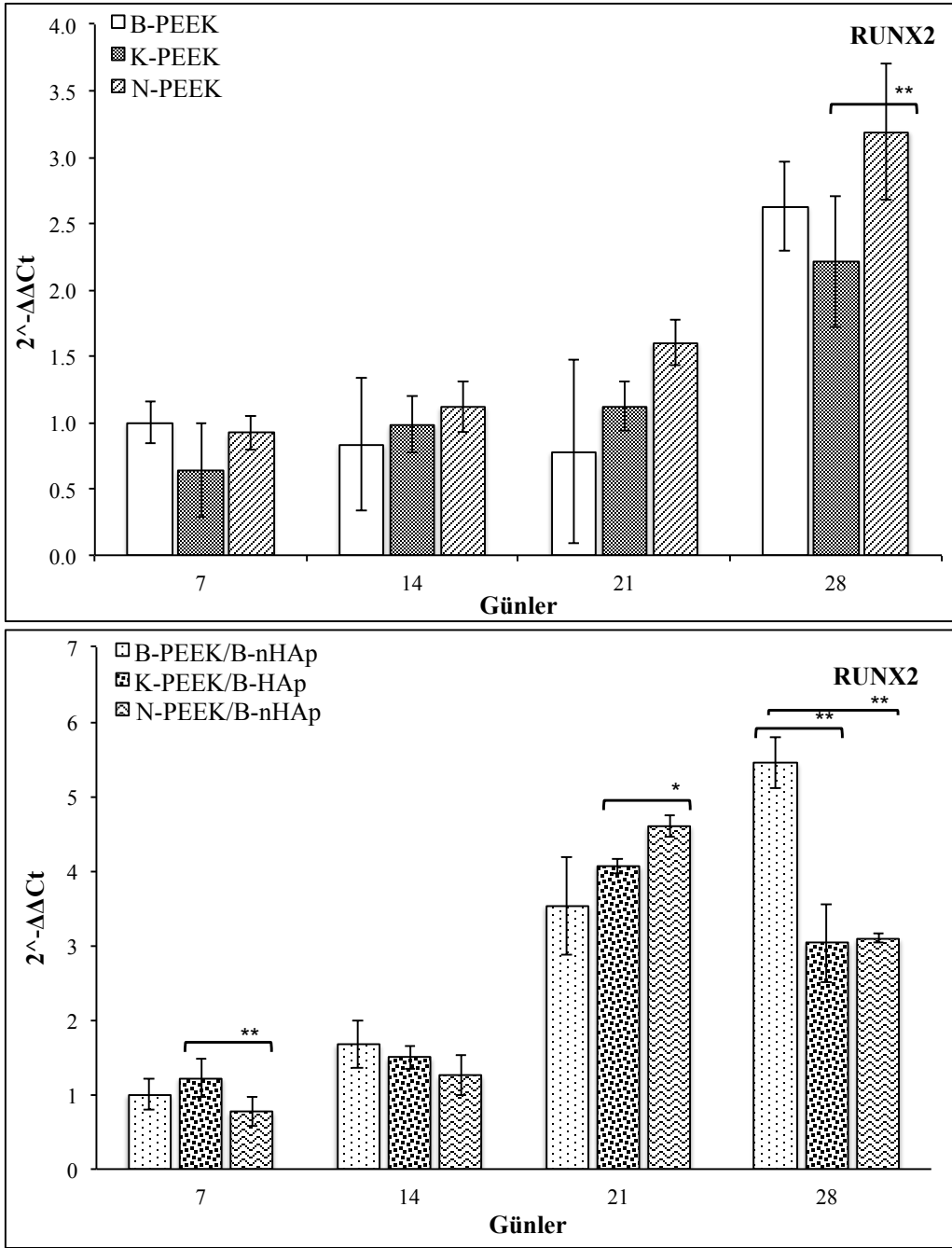
Kollajen I (Colla1) geni hücre üremesi boyunca eksprese olurken, teorik olarak osteojenik farklılaşma ve matürasyon sürecinde ekspresyon seviyesi azalmaktadır [152].

Şekil 4.27’de (üstte) modifiye edilmemiş PEEK (B-PEEK) örnekler, mekanik (K-PEEK) ve fiziksel (N-PEEK) modifikasyonu yapılmış PEEK örnekler ile (altta) bu grupların B-nHAp kaplanmış örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen 28’er günlük hücre kültürü çalışması sonucu elde edilen Colla1 geninin ekspresyon grafiği verilmiştir. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK örneklere ait ekspresyon grafiğinde herhangi bir günde örnekler arası anlamlılık elde edilememiş ($p>0.05$) olmakla beraber Colla1 miktarının logaritmik olarak 7. günden itibaren arttığı saptanmıştır. 28. günde N-PEEK örneklerde Colla1 gen ekspresyonunun fazla olması hücrelerin kanallar boyunca ECM oluşturma çabasıyla ilişkilendirilebilmektedir. Şekil 4.27 incelendiğinde B-nHAp kaplı örnekler arasında N-PEEK/B-nHAp örnekler 7. günde ($p<0.01$) ve 14. günde ($p<0.05$), K-PEEK/B-nHAp örneklere göre farklılık göstermiştir. Kültürün 21. gününde istatistiksel farklılık gözlenmemiş ancak 28. günde N-PEEK/B-nHAp örnekler hem istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) hem de en yüksek kantitatif değere sahiptir. Bu bulgular, kolorimetrik kollajen analizi ile uyum içerisinde sonuçlar vermiştir. Bunun yanı sıra teorik olarak azalması gereken Colla1 gen ekspresyonunun kültürün ilerleyen zamanlarında artış gösterdiği çalışmalar da bulunmaktadır [77].



Şekil 4.27. (üstte) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağlı Coll1a1 gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01)

Şekil 4.28'de (üstte) B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK ile (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örnekler üzerinde çoğalmış MC3T3-E1 hücrelerinin RUNX2 gen ekspresyon ifadelerine yer verilmiştir.

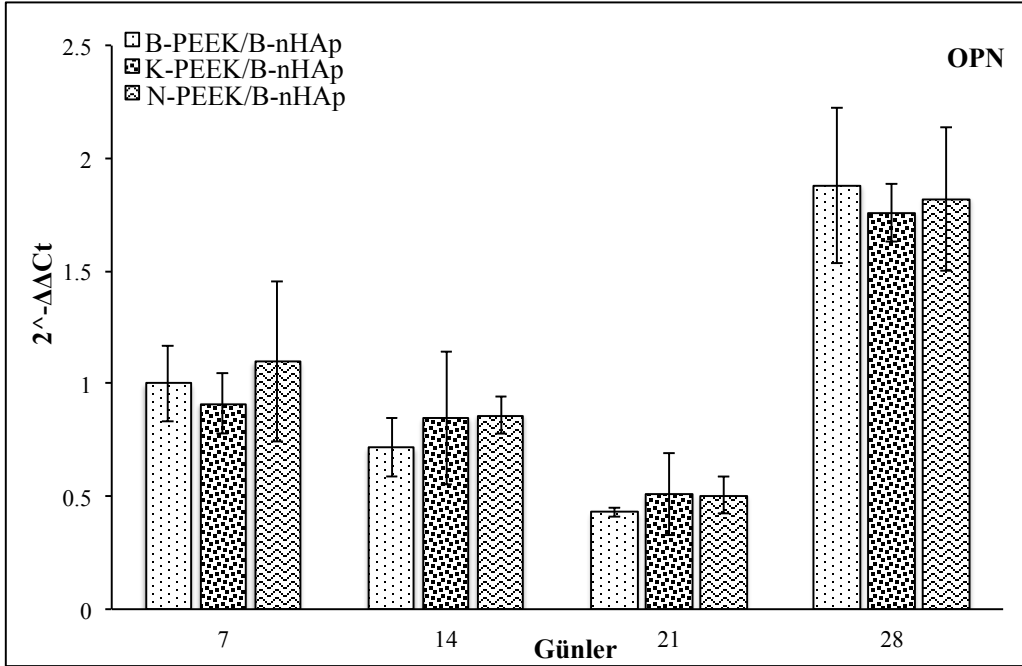


Şekil 4.28. (üstte) B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, (altta) B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağlı RUNX2 gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, (üstte) aynı günde gruplar arası anlamlılık *p < 0.05, **p < 0.01)

RUNX2, OCN ve OPN gibi geç dönem farklılaşma belirteci olan bir gen olup B-nHAp kaplama yapılmamış gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık sadece 28. günde N-PEEK (p<0.01) örnekler üzerinde çoğalmış hücrelerde görülmüştür. N-PEEK/B-nHAp örnekler K- PEEK/B-nHAp örneklere göre 7. günde (p<0.01) ve 21. günde (p<0.05) anlamlılık gösterirken 14. günde gruplar arası anlamlılık saptanmamıştır. 28. günde kantitatif olarak

en yüksek ekspresyon B-PEEK/B-nHAp örneklerde bulunmakla birlikte K-PEEK/B-nHAp ($p < 0.01$) ve N-PEEK/B-nHAp ($p < 0.01$) örnekler üzerinde çoğalan örneklerde ekspresyon düşüşü anlamlılığa sahiptir [153].

Şekil 4.29’da B-nHAp kaplaması yapılmış örnekler üzerinde prolifer olmuş MC3T3-E1 hücrelerine ait osteopontin (OPN) gen ekspresyonu grafiği verilmiştir.

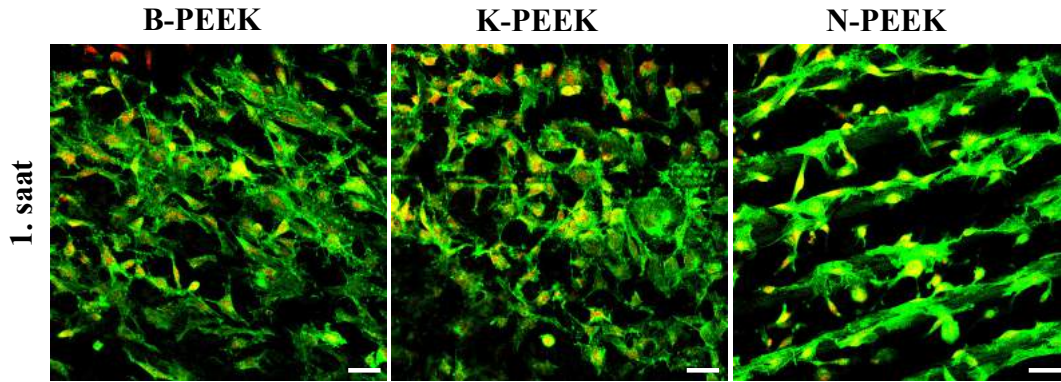


Şekil 4.29. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeylerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin bağıl OPN gen ifadeleri. (istatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, aynı günde gruplar arası anlamlılık $*p < 0.05$)

Osteopontin, kemik hücrelerinin yapışması ve geç dönemde mineralizasyonun düzenlenmesinden sorumlu bir gendir [154]. İlgili grafikte gruplar arası anlamlılık saptanmamış ($p > 0.05$) olmasına rağmen geç dönem farklılaşma belirteci olan OPN geninin ekspresyonunun en yüksek değeri 28. günde elde edilmiştir. Erken dönemde de gen ekspresyonunun görülmesi hücrelerin kemiğe farklılaşarak yeniden modellendiğinin ve B-nHAp kaplamaların kemik doku oluşumunu indüklediğinin göstergesi olarak yorumlanabilmektedir [155].

4.3.8. Immunofloresan boyama ve canlı/ölü hücre görüntüleme

Bu bölümde, modifiye edilmemiş PEEK (B-PEEK) örnekler ile mekanik (K-PEEK) ve fiziksel (N-PEEK) modifikasyonu yapılmış PEEK örnekler üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücreleri, B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp örnekler üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücreleri ile B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örnekler üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerine ait immunofloresan boyamalara ait konfokal görüntülerine yer verilmiştir. Fotoğraflar çekilmeden önce, Bölüm 3.4.8’de açıklanan yöntemle fikse edilen hücrelerin membran geçirgenliği artırılarak hücre iskeletinin F-aktin antikoru ile boyanarak yeşil, hücre çekirdeğinin propidyum iyodür (PI) ile boyanarak kırmızı renkte ışığa vermesi sağlanmıştır. İki ayrı filtre ile çekilen resimler çakıştırılarak elde edilen fotoğraflar Şekil 4.30’da verilmiştir.

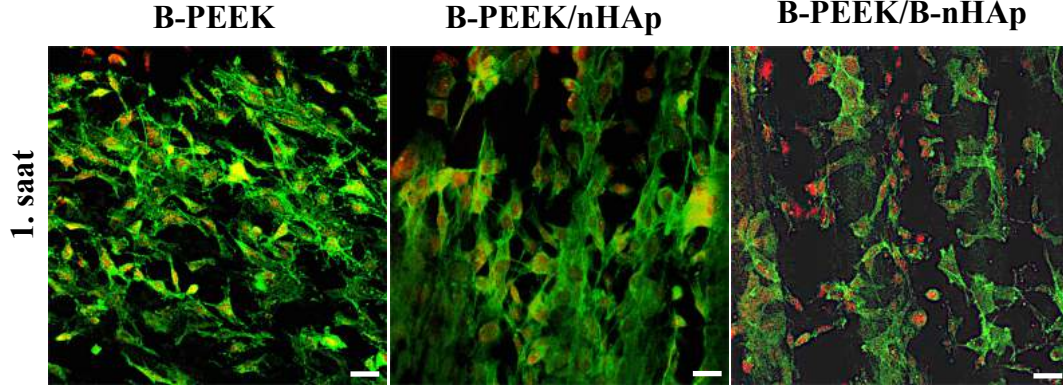


Şekil 4.30. B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK yüzeyler üzerinde hücrelerin kültürünün 1. saatindeki immunofloresan boyama konfokal mikroskop görüntüleri, ölçek çubukları 20 μm 'yi göstermektedir.

Hücre kültür çalışmalarında 7.5×10^4 hücre/20 μL inokülasyon yoğunluğuna sahip hücre süspansiyonu kullanılmış ve 1. saatin sonunda malzeme yüzeyine yapışan hücreler fikse edilerek boyamaları gerçekleştirilmiştir. Malzeme yüzey morfolojisinin hücre tutunmasına etkisi fotoğraflarda açıkça görülmektedir. PEEK malzemenin biyo inert doğası nedeniyle üzerindeki hücreler birbirleri üzerine tutunma eğilimi göstermişlerdir. Kumlanmış örneklerde (K-PEEK) pürüzlülüğe bağlı artan yüzey alanının hücrelerin yüzeye tutunmasına diğer gruplara oranla görece daha fazla imkan sağladığı görülmekte ve bu sonuçlar PrestoBlue® analiz sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. N-PEEK örneklerde NaOH dağlamaya bağlı oluşan kanallar arasında tutunma ve çoğalmaya çalışan hücreler açıkça görülmektedir. Bu çıkarım, N-PEEK örneklerde kolorimetrik kollajen analizi ve

Colla1 gen ekspresyonunda elde edilen yüksek değerlerin yorumlanmasına yardımcı olmaktadır.

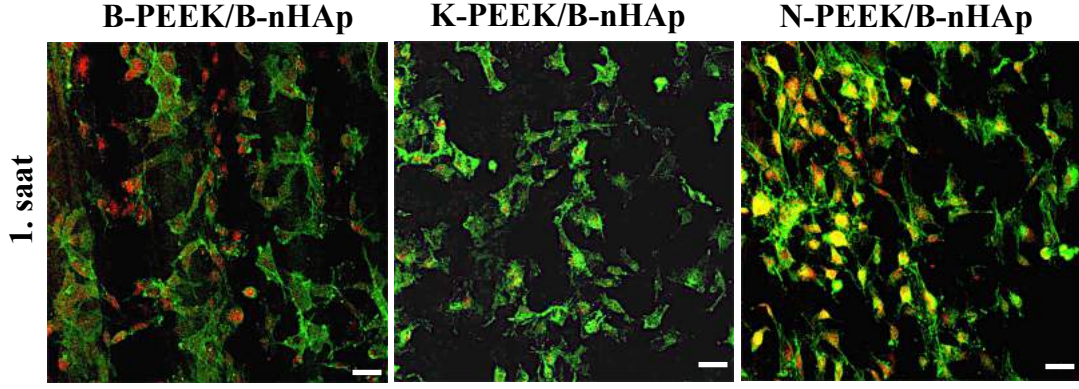
Şekil 4.31’de B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp örneklere ait 1. saat tutunma konfokal görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.31. B-PEEK, B-PEEK/nHAp ve B-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin kültürün 1. saatindeki immunofloresan boyama konfokal mikroskop görüntüleri, ölçek çubukları 20 µm’yi göstermektedir.

B-PEEK örnekler üzerine ekilen hücreler, yüzeyin hidrofobik ve biyoinert olması nedeniyle birbirlerinden ayrılmama eğilimi gösterirken; nHAp ve B-nHAp kaplamının yarattığı biyoaktivitedeki artış hücrelerin üzerinde stres oluşmaması ve 1. saatin sonunda yüzeyde yayılma isteklerine neden olmuştur.

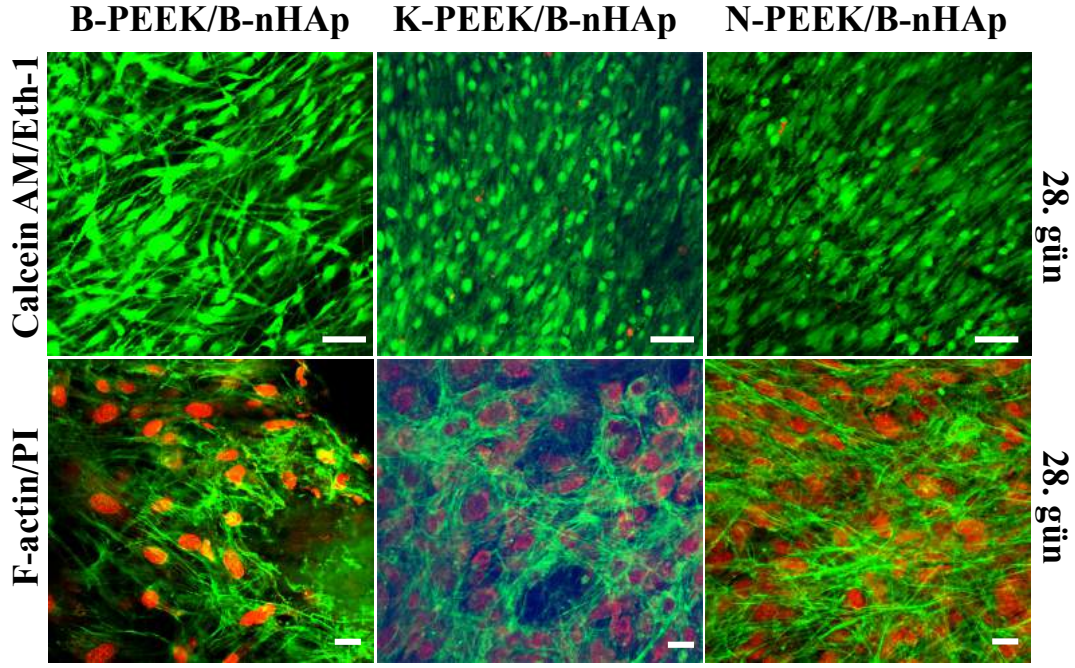
B-PEEK, K-PEEK ve N-PEEK örnekler üzerine B-nHAp kaplama yapılarak elde edilen B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örneklere ait 1. saat konfokal görüntüleri Şekil 4.32’de verilmiştir.



Şekil 4.32. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin kültürün 1. saatindeki immunofloresan boyama konfokal mikroskop görüntüleri, ölçek çubukları 20 μm 'yi göstermektedir.

Fotoğraflara bakıldığında K-PEEK/B-nHAp kaplı yüzeylerdeki hücrelerin diğer gruplara göre daha küresel bir formda kaldığı görülmektedir. Yüzey pürüzlülüğünün hücrelerin tutunma sırasında filopodyalarını (hücresel uzantılarını) uzatmasına ilk aşamada engel olması neden olarak gösterilebilir. B-nHAp kaplanmış N-PEEK örneklerde ise dağlama sonrası oluşan kanallar arasında biriken B-nHAp partiküller üzerine tutunmaya çalışan hücreler diğer gruplara göre 1. saatin sonunda daha içsi bir yapı kazanmışlardır [156].

Şekil 4.33'te B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örnekler ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmasının 28. gününde canlı/ölü hücre boyama ve immunofloresan boyamaya ait görüntüler verilmiştir. F-aktin/PI boyamadan farklı olarak canlı/ölü hücre boyama için Calcein AM/Ethidyum Homodimer I boya karışımıyla hücreler inkübe edilmiştir. Ölü hücrelerin parçalanmış çekirdek zarından geçebilen Eth-I, floresan mikroskopta kırmızı renk vermektedir. Bu bilgi göz önünde bulundurularak Şekil 4.33 (üstte) incelendiğinde, fotoğraflardaki örnekler üzerinde ölü hücre sayısının oldukça az olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 4.33. B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp yüzeyler üzerinde hücrelerin kültürün 28. günündeki (üstte) canlı-ölü hücre boyama, (altta) immunofloresan boyama konfokal mikroskop görüntüleri, ölçek çubukları yukarıdan aşağıya sırasıyla 20 µm ve 40 µm'yi göstermektedir.

Örneklerin immunofloresan boyamalarına ait fotoğraflara bakıldığında hücre çekirdeklerinin farklılaşmaya bağlı olarak büyüdüğü, ECM yoğunluğuna ve hücrelerinin aktin filamentlerinin matürasyonuna bağlı olarak 1. saat fotoğraflarına göre daha parlak görüntüler elde edildiği görülmektedir. B-PEEK/B-nHAp örnekler üzerindeki hücrelerin K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örnekler üzerindeki hücrelerle karşılaştırıldığında daha az ECM matris ürettikleri görülmektedir. K-PEEK/B-nHAp örneklerdeki hücreler rastgele çoğalırken N-PEEK/B-nHAp örneklerdeki hücre çekirdeklerinin çizgi benzeri bir doğrultuda olması, dağlamaya bağlı kanallar arasında hücrelerin çoğalma eğilimi gösterdiklerini ve parlak F-aktin boyanmaya bağlı olarak örnek üzerindeki hücrelerin kollajen miktarının fazla olduğunu açıklamaktadır [13].

5. GENEL SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında, çeşitli modifikasyon yöntemleri kullanılarak PEEK yüzeyin biyoinert doğasının giderilmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Öncelikle mekanik ve fiziksel etkilerle malzeme topografisindeki değişimin hücre canlılığına, daha sonra bu topografik değişimin nHAp ve B-nHAp kaplama morfolojisi ve kaplama etkinliği üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları sonunda elde edilen verilerle önemli bulgular, bu bölümde özetlenmiştir.

- œ Çalışmanın ilk aşamasında PEEK malzemelere yüzey modifikasyonları yapılmıştır. Zımparalama işlemiyle malzeme yüzeyinde kesim sonrası oluşan izler ve kirlilikler giderilmiştir. Temizlenen örnekler modifikasyona hazır hale getirilmiştir.
- œ PEEK malzemeler üzerinde kuşlama tekniği kullanılarak yüzeyde mekanik etkiyle agresif ancak homojen bir pürüzlülük elde edilmiştir.
- œ Fiziksel modifikasyon için 60°C etüvde 48 saat konvansiyonel ısıtma ile NaOH dağlama yöntemi kullanılmıştır.
- œ Modifikasyon sonrası karakterize edilen yüzeylerin pürüzlülük değerleri sırasıyla B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK ve K,N-PEEK örnekler için 982.7 ± 23.3 , 5051.0 ± 27.3 , 2884.0 ± 3.4 ve 4404.0 ± 21.2 nm olarak bulunmuştur. Su temas açısı değerleri aynı sırayla 62.8 ± 2.9 , 90.8 ± 3.3 , 71.0 ± 9.6 ve $108.6 \pm 1.7^\circ$ olarak ölçülmüştür.
- œ Modifikasyonlar sonrası yapılan ATR-FTIR analizi sonuçları değerlendirildiğinde örneklerin yüzey kimyasında bir farklılık olmadığı saptanmıştır.
- œ Yüzeyi modifiye edilmiş PEEK örnekler biyoaktivite testi yapılmış ve örnekler üzerinde 28. günde 7. güne oranla daha yoğun HAp birikimi olduğu SEM analizi ile saptanmıştır. Ayrıca, XRD analizinde 28. günde örnekler üzerinde HAp'a ait pikler de gözlenmiştir.
- œ Modifiye edilmemiş PEEK yüzeyler (B-PEEK) üzerine 10xSBF-benzeri çözelti ve bor katkılı 10xSBF çözelti mikrodalga destekli yöntemle nano boyutta HAp(nHAp) ve bor katkılı nHAp (B-nHAp) kaplamalar gerçekleştirilmiştir ve MC3T3-E1 hücrelerle gerçekleştirilen ön hücre kültürü çalışması sonuçları doğrultusunda, modifiye edilmiş örnekler B-nHAp kaplama yapılması kararlaştırılmıştır.
- œ Modifikasyonları tamamlanmış yüzeyler üzerine B-nHAp kaplamalar yapıldıktan sonra elde edilen su temas açısı değerleri sırasıyla B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp, N-PEEK/B-nHAp ve K,N-PEEK/B-nHAp yüzeyler için 24.4 ± 5.9 , 29.5 ± 5.5 ,

- 22.8±5.7 ve 25.8±5.6° olarak ölçülmüştür. SEM analiziyle eş zamanlı gerçekleştirilen EDX analizi sonucu B-nHAp kaplı örneklerin yüzeyinde molar Ca/P oranı ≈1.40 olarak hesaplanmıştır. B-nHAp kaplı örnekler için yapılan ATR-FTIR analizi sonucu yüzeylerde HAp'e ait piklerin de var olduğu saptanmıştır.
- œ K,N-PEEK grubunda kumlamanın yarattığı agresif pürüzlülüğün üzerinde dağlamanın etkisi tam olarak gözlenemediği için hücre kültürü çalışmalarına geçerken bu grup elenmiştir.
 - œ B-PEEK, K-PEEK, N-PEEK, B-PEEK/B-nHAp, K-PEEK/B-nHAp ve N-PEEK/B-nHAp örnek yüzeylerinde tutunan MC3T3-E1 hücre hattıyla gerçekleştirilen 28 günlük hücre kültürü çalışmalarında elde edilen SEM görüntüleri en yoğun hücre dışı matris üretiminin NaOH dağlanmış gruplarda olduğunu göstermiştir.
 - œ PrestoBlue® analiz sonuçlarına bakıldığında B-nHAp kaplı yüzeylerde hücre canlılığının modifikasyon sonrası kaplanmamış örneklerle oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır.
 - œ PEEK malzeme yüzeylerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin ALP aktiviteleri 21. günden itibaren yükselmiştir. B-nHAp kaplı örneklerde 21. ve 28. gün değerleri kantitatif olarak neredeyse aynı olmakla beraber, ortamdaki HAp varlığı mineralizasyonun kaplanmamış örneklerle daha erken başlamasını sağlamıştır.
 - œ PEEK yüzeylerdeki hücrelerin kollajen miktarını belirlemek için yapılan hidroksipirolin analizi sonucu en yüksek kollajen miktarı N-PEEK ve N-PEEK/B-nHAp örneklerde elde edilmiştir. Bu bulgu SEM ve konfokal fotoğrafları ile uyum göstermektedir.
 - œ Yüzeylerdeki hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için OCN, ALPL, Col1a1, RUNX2 ve OPN gen ekspresyon seviyelerinin belirlendiği RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Geç dönem farklılaşma belirteci olan OCN ve OPN, hiçbir grup için kültürün 21. gününden önce gözlenmemiştir. Yirmi birinci günde B-nHAp kaplı örneklerde OCN geni eksprese olurken kaplamasız örneklerde ekspresyon oldukça düşük seviyelerde kalmıştır. Erken dönem farklılaşma belirteci olan ALPL geni ekspresyonu da 21. günden itibaren başlamış ve ortamdaki B-nHAp varlığı kaplanmamış örneklerle kıyasla daha yüksek gen ifadeleri elde edilmesini sağlamıştır. Analiz edilen bağıl gen ifadelerinden biri de tip I kollajene ait olup, ekspresyon değerleri kollajen miktarı analiziyle uyumlu sonuçlar vermiştir.
 - œ PEEK yüzey üzerinde yapılan mekanik ve fiziksel yüzey modifikasyonlarla birlikte

malzemenin biyoaktivitesinde artış sağlanmış, malzeme üzerinde hücre tutunması, proliferasyonu ve farklılaşmasını desteklediği saptanmıştır. Modifikasyon sonrası B-nHAp kaplanmış örneklerle yapılan hücre kültür çalışmaları ise HAp'in osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri sayesinde ortamda B-nHAp bulunmasının hücre farklılaşmasını büyük oranda desteklediğini göstermiştir.

Tez kapsamında elde edilen bütün sonuçlar değerlendirildiğinde yüzeyi mekanik ve fiziksel yöntemlerle modifiye edilmiş örnekler üzerine bor katkılı hidroksiapatit kaplama yapılarak PEEK malzemenin osteoindüktif özellik kazandırılacağı düşünülmüştür. Normal şartlarda biyoinert doğası nedeniyle hücre tutunmasını ve kemiğe farklılaşmasını engelleyen PEEK malzemenin osteojenik aktivitesinin B-nHAp kaplama ile giderilebileceği kanıtlanmıştır. Biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılan PEEK malzemenin tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen başarılı kaplama yöntemleri ile biyoaktif hale getirilebileceği saptanmış ve literatürdeki yaklaşımlardan farklı, yenilikçi bir kaplama malzemesi üretimi gerçekleştirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Brydone, A., D. Meek, and S. Maclaine, Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 224(12), 1329-1343, **2010**.
- [2] Kurtz, S.M. and J.N. Devine, PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials*, 28(32), 4845-4869, **2007**.
- [3] Kurtz, S.M., An Overview of PEEK Biomaterials. *PEEK Biomaterials Handbook*, 1, **2011**.
- [4] Abdullah, M.R., et al., Biomechanical and bioactivity concepts of polyetherether ketone composites for use in orthopedic implants—a review, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(11), 3689-3702, **2015**.
- [5] Ma, R. and T. Tang, Current strategies to improve the bioactivity of PEEK. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 5426-5445, **2014**.
- [6] Du, Y.-W., et al., Physical modification of polyetheretherketone for orthopedic implants. *Frontiers of Materials Science*, 8(4), 313-324, **2014**.
- [7] Nayak, A.K., Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview. *International Journal of ChemTech Research*, 2(2), 903-907, **2010**.
- [8] Bernstein, A., et al., Histological and histomorphometric investigations on bone integration of rapidly resorbable calcium phosphate ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84(2), 452-462, **2008**.
- [9] Tunçay, Ö.E., *Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [10] Gümüşderelioğlu, M., et al., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 3, 120-128, **2015**.
- [11] Hollinger, J.O., S. Winn, and J. Bonadio, Options for tissue engineering to address challenges of the aging skeleton. *Tissue Engineering*, 6(4), 341-350, **2000**.
- [12] Ludwig, S.C., J.M. Kowalski, and S.D. Boden, Osteoinductive bone graft substitutes. *European Spine Journal*, 9(1), S119-S125, **2000**.
- [13] Deng, Y., et al., Effect of surface roughness on osteogenesis in vitro and osseointegration in vivo of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone–nanohydroxyapatite composite. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1425, **2015**.
- [14] Siver, F., and Doillon. C., Biocompatibility. *Interactions of Biological and Implantable Materials, Volume 1: Polymers*, V. C. H. Publishers, Inc., New York, 306, **1989**.
- [15] Park, J. and R.S. Lakes, *Biomaterials: an Introduction*. Springer Science & Business Media, **2007**.
- [16] Bandyopadhyay, A. and S. Bose, *Characterization of Biomaterials*, Newnes, **2013**.

- [17] Hoepfner, D. and V. Chandrasekaran, Fretting in orthopaedic implants: a review. *Wear*, 173(1-2), 189-197, **1994**.
- [18] Mavrogenis, A., et al., Biology of implant osseointegration. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interact*, 9(2), 61-71, **2009**.
- [19] Adell, R., et al., A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International Journal of Oral Surgery*, 10(6), 387-416, **1981**.
- [20] Ribeiro, D.A., et al., Genotoxicity of corrosion eluates obtained from endosseous implants. *Implant Dentistry*, 16(1), 101-109, **2007**.
- [21] Stadelmann, V.A., A. Terrier, and D.P. Pioletti, Microstimulation at the bone–implant interface upregulates osteoclast activation pathways. *Bone*, 42(2), 358-364, **2008**.
- [22] Ramakrishna, S., et al., Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology*, 61(9), 1189-1224, **2001**.
- [23] Thomas, P., S. Maier, and B. Summer, Allergic reactions to metal implants. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 35(12), 997-1000, **2004**.
- [24] Kokubo, T., H.-M. Kim, and M. Kawashita, Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24(13), 2161-2175, **2003**.
- [25] Pramanik, S. and K.K. Kar, Functionalized poly (ether ether ketone): Improved mechanical property and acellular bioactivity. *Journal of Applied Polymer Science*, 123(2), 1100-1111, **2012**.
- [26] Najeeb, S., et al., Nanomodified peek dental implants: Bioactive composites and surface modification—A review. *International Journal of Dentistry*, 381759, **2015**.
- [27] Anonim, PEEK implant materials 2016, <http://www.clariance-spine.com/us/idys-c/> (Aralık, **2017**).
- [28] Ha, S.-W., et al., Surface activation of polyetheretherketone (PEEK) and formation of calcium phosphate coatings by precipitation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(11), 683-690, **1997**.
- [29] Rho, J.-Y., L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, 20(2), 92-102, **1998**.
- [30] Williams, D., A. McNamara, and R. Turner, Potential of polyetheretherketone (PEEK) and carbon-fibre-reinforced PEEK in medical applications. *Journal of Materials Science Letters*, 6(2), 188-190, **1987**.
- [31] Wenz, L., et al., In vitro biocompatibility of polyetheretherketone and polysulfone composites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(2), 207-215, **1990**.
- [32] Morrison, C., et al., In vitro biocompatibility testing of polymers for orthopaedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials*, 16(13), 987-992, **1995**.
- [33] Katzer, A., et al., Polyetheretherketone—cytotoxicity and mutagenicity in vitro. *Biomaterials*, 23(8), 1749-1759, **2002**.
- [34] Liao, K., Performance characterization and modeling of a composite hip prosthesis. *Experimental Techniques*, 18(5), 33-38, **1994**.

- [35] Maharaj, G.R. and R.D. Jamison, Intraoperative impact: characterization and laboratory simulation on composite hip prostheses. *ASTM Special Technical Publication*, 1178, 98, **1993**.
- [36] Kelsey, D.J., G.S. Springer, and S.B. Goodman, Composite implant for bone replacement. *Journal of Composite Materials*, 31(16), 1593-1632, **1997**.
- [37] Corvelli, A., P. Biermann, and J. Roberts, Design, analysis, and fabrication of a composite segmental bone replacement implant. *Journal of Advanced Materials*, 28(3), 2-8, **1997**.
- [38] Rao, P.J., et al., Spine interbody implants: material selection and modification, functionalization and bioactivation of surfaces to improve osseointegration. *Orthopaedic Surgery*, 6(2), 81-89, **2014**.
- [39] Sasuga, T. and M. Hagiwara, Radiation deterioration of several aromatic polymers under oxidative conditions. *Polymer*, 28(11), 1915-1921, **1987**.
- [40] Kersten, R.F.M.R., et al., Polyetheretherketone (PEEK) cages in cervical applications: a systematic review. *The Spine Journal*, 15(6), 1446-1460, **2015**.
- [41] Najeeb, S., et al., Applications of polyetheretherketone (PEEK) in oral implantology and prosthodontics. *Journal of Prosthodontic Research*, 60(1), 12-19, **2016**.
- [42] Aday, S. and M. Gümüşderelioglu, Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: Characterization and osteoblastic activity. *Polymer Composites*, 31(8), 1418-1426, **2010**.
- [43] Sailaja, G., et al., Biomimetic approaches with smart interfaces for bone regeneration. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 77, **2016**.
- [44] Roeder, R.K., et al., Hydroxyapatite-reinforced polymer biocomposites for synthetic bone substitutes. *Jom*, 60(3), 38-45, **2008**.
- [45] Anonim. In vivo Biomaterial Solution Femoral plate composed of PEEK-OPTIMA Ultra Reinforced composite material. Available from: <http://www.prweb.com/releases/2014/10/prweb12234150.htm> (Aralık, **2016**).
- [46] Bakar, M.A., P. Cheang, and K. Khor, Tensile properties and microstructural analysis of spheroidized hydroxyapatite–poly (etheretherketone) biocomposites. *Materials Science and Engineering: A*, 345(1), 55-63, **2003**.
- [47] Tang, S., et al., Tension–tension fatigue behavior of hydroxyapatite reinforced polyetheretherketone composites. *International Journal of Fatigue*, 26(1), 49-57, **2004**.
- [48] Zhang, Y., et al., In vitro biocompatibility of hydroxyapatite-reinforced polymeric composites manufactured by selective laser sintering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91(4), 1018-1027, **2009**.
- [49] Yu, S., et al., In vitro apatite formation and its growth kinetics on hydroxyapatite/polyetheretherketone biocomposites. *Biomaterials*, 26(15), 2343-2352, **2005**.
- [50] Bakar, M.A., et al., Tensile properties, tension–tension fatigue and biological response of polyetheretherketone–hydroxyapatite composites for load-bearing orthopedic implants. *Biomaterials*, 24(13), 2245-2250, **2003**.

- [51] Bakar, M.A., P. Cheang, and K. Khor, Mechanical properties of injection molded hydroxyapatite-polyetheretherketone biocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(3), 421-425, **2003**.
- [52] Converse, G.L., et al., Hydroxyapatite whisker-reinforced polyetheretherketone bone ingrowth scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 856-863, **2010**.
- [53] Roeder, R.K., et al., Porous and bioactive PEEK implants for interbody spinal fusion. *Advanced Materials & Processes*, 167(10), 46-48, **2009**.
- [54] Bradley, J., G. Hastings, and C. Johnson-Nurse, Carbon fibre reinforced epoxy as a high strength, low modulus material for internal fixation plates. *Biomaterials*, 1(1), 38-40, **1980**.
- [55] Jarman-Smith, M., Evolving uses for implantable PEEK and PEEK based compounds. *Medical Device Technology*, 19(6), 12-15, **2008**.
- [56] Scotchford, C.A., et al., Use of a novel carbon fibre composite material for the femoral stem component of a THR system: in vitro biological assessment. *Biomaterials*, 24(26), 4871-4879, **2003**.
- [57] Sagomyants, K.B., et al., The in vitro response of human osteoblasts to polyetheretherketone (PEEK) substrates compared to commercially pure titanium. *Biomaterials*, 29(11), 1563-1572, **2008**.
- [58] Huang, Z.-M. and K. Fujihara, Stiffness and strength design of composite bone plates. *Composites Science and Technology*, 65(1), 73-85, **2005**.
- [59] Fujihara, K., et al., Feasibility of knitted carbon/PEEK composites for orthopedic bone plates. *Biomaterials*, 25(17), 3877-3885, **2004**.
- [60] Fujihara, K., et al., Performance study of braided carbon/PEEK composite compression bone plates. *Biomaterials*, 24(15), 2661-2667, **2003**.
- [61] Cordey, J., S. Perren, and S. Steinemann, Stress protection due to plates: myth or reality? A parametric analysis made using the composite beam theory. *Injury*, 31, 1-91, **2000**.
- [62] Kim, I.Y., et al., Bioactive composites consisting of PEEK and calcium silicate powders. *Journal of Biomaterials Applications*, **2008**.
- [63] Lin, T., et al., Glass peek composite promotes proliferation and osteocalcin production of human osteoblastic cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 36(2), 137-144, **1997**.
- [64] Corvelli, A., et al., Characterization of a peek composite segmental bone replacement implant. *Journal of Materials Science*, 34(10), 2421-2431, **1999**.
- [65] Wong, K., et al., Mechanical properties and in vitro response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites. *Biomaterials*, 30(23), 3810-3817, **2009**.
- [66] Pohle, D., et al. Processing of three-dimensional laser sintered Polyetheretherketone composites and testing of osteoblast proliferation in vitro. *Macromolecular Symposia*. Wiley Online Library, **2007**.
- [67] Von Wilmsowky, C., et al., Effects of bioactive glass and β -TCP containing three-dimensional laser sintered polyetheretherketone composites on osteoblasts in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87(4), 896-902, **2008**.

- [68] Petrovic, L., et al., Effect of β TCP filled polyetheretherketone on osteoblast cell proliferation in vitro. *Journal of Biomedical Science*, 13(1), 41-46, **2006**.
- [69] Wu, X., et al., Nano-TiO₂/PEEK bioactive composite as a bone substitute material: in vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1215, **2012**.
- [70] Briem, D., et al., Response of primary fibroblasts and osteoblasts to plasma treated polyetheretherketone (PEEK) surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(7) 671-677, **2005**.
- [71] Awaja, F., et al., Enhanced autohesive bonding of polyetheretherketone (PEEK) for biomedical applications using a methane/oxygen plasma treatment. *Plasma Processes and Polymers*, 7(12), 1010-1021, **2010**.
- [72] Awaja, F., et al., Cell adhesion to PEEK treated by plasma immersion ion implantation and deposition for active medical implants. *Plasma Processes and Polymers*, 9(4), 355-362, **2012**.
- [73] Brydone, A.S.M., D.S.S.; Stormonth-Darling, J.; Meek, R.D.M.; Tanner, K.E.; Gadegaard, N., Design and fabrication of a 3D nanopatterned PEEK implant for cortical bone regeneration in a rabbit model. *European Cells and Materials*, 24, 39, **2012**.
- [74] Waser-Althaus, J., et al., Differentiation of human mesenchymal stem cells on plasma-treated polyetheretherketone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(2), 515-525, **2014**.
- [75] Khoury, J., et al., Neutral atom beam technique enhances bioactivity of PEEK. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 307, 630-634, **2013**.
- [76] Luo, H., et al., Air DBD plasma treatment on three-dimensional braided carbon fiber-reinforced PEEK composites for enhancement of in vitro bioactivity. *Surface and Coatings Technology*, 242, 1-7, **2014**.
- [77] Zhao, Y., et al., Cytocompatibility, osseointegration, and bioactivity of three-dimensional porous and nanostructured network on polyetheretherketone. *Biomaterials*, 34(37), 9264-9277, **2013**.
- [78] Zheng, Y., C. Xiong, and L. Zhang, Formation of bone-like apatite on plasma-carboxylated poly (etheretherketone) surface. *Materials Letters*, 126, 147-150, **2014**.
- [79] Zheng, Y., et al., Covalent attachment of cell-adhesive peptide Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) to poly (etheretherketone) surface by tailored silanization layers technique. *Applied Surface Science*, 320, 93-101, **2014**.
- [80] Pino, M., N. Stingelin, and K. Tanner, Nucleation and growth of apatite on NaOH-treated PEEK, HDPE and UHMWPE for artificial cornea materials. *Acta Biomaterialia*, 4(6), 1827-1836, **2008**.
- [81] Hench, L.L. and J. Wilson, An introduction to bioceramics. Vol. 1., *World Scientific*, **1993**.
- [82] Thamaraiselvi, T. and S. Rajeswari, Biological evaluation of bioceramic materials-a review. *Carbon*, 24(31), 172, **2004**.
- [83] Jarcho, M., Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 157, 259-278, **1981**.

- [84] Fauchais, P., A. Vardelle, and B. Dussoubs, Quo vadis thermal spraying? *Journal of Thermal Spray Technology*, 10(1), 44-66, **2001**.
- [85] Fauchais, P., Understanding plasma spraying. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 37(9), R86, **2004**.
- [86] Suska, F., et al., Enhancement of CRF-PEEK osseointegration by plasma-sprayed hydroxyapatite: A rabbit model. *Journal of Biomaterials Applications*, 0885328214521669, **2014**.
- [87] Furlong, R. and J. Osborn, Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *Journal of Bone & Joint Surgery*, British Volume, 73(5), 741-745, **1991**.
- [88] Montanaro, L., et al., In vitro effects on MG63 osteoblast-like cells following contact with two roughness-differing fluorohydroxyapatite-coated titanium alloys. *Biomaterials*, 23(17), 3651-3659, **2002**.
- [89] Kurtz, S.M., *PEEK Biomaterials Handbook*, William Andrew, **2011**.
- [90] Gardon, M., et al., Cold gas spray titanium coatings onto a biocompatible polymer. *Materials Letters*, 106, 97-99, **2013**.
- [91] Lee, J.H., et al., In vitro and in vivo evaluation of the bioactivity of hydroxyapatite-coated polyetheretherketone biocomposites created by cold spray technology. *Acta Biomaterialia*, 9(4), 6177-6187, **2013**.
- [92] Hahn, B.-D., et al., Osteoconductive hydroxyapatite coated PEEK for spinal fusion surgery. *Applied Surface Science*, 283, 6-11, **2013**.
- [93] Rabiei, A. and S. Sandukas, Processing and evaluation of bioactive coatings on polymeric implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(9), 2621-2629, **2013**.
- [94] Almasi, D., et al., Crystalline ha coating on peek via chemical deposition. *Applied Surface Science*, 314, 1034-1040, **2014**.
- [95] Cook, S. and A. Rust-Dawicki, Preliminary evaluation of titanium-coated PEEK dental implants. *The Journal of Oral Implantology*, 21(3), 176-181, **1994**.
- [96] Ha, S.-W., et al., NaOH treatment of vacuum-plasma-sprayed titanium on carbon fibre-reinforced poly (etheretherketone). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(12), 881-886, **1997**.
- [97] Devine, D.M., et al., Coating of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone implants with titanium to improve bone apposition. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101(4), 591-598, **2013**.
- [98] Shan, C., X. Hou, and K.-L. Choy, Corrosion resistance of TiO₂ films grown on stainless steel by atomic layer deposition. *Surface and Coatings Technology*, 202(11), 2399-2402, **2008**.
- [99] Harle, J., et al., Initial responses of human osteoblasts to sol-gel modified titanium with hydroxyapatite and titania composition. *Acta Biomaterialia*, 2(5), 547-556, **2006**.
- [100] Tsou, H.-K., et al., Low-temperature deposition of anatase TiO₂ on medical grade polyetheretherketone to assist osseous integration. *Surface and Coatings Technology*, 204(6), 1121-1125, **2009**.

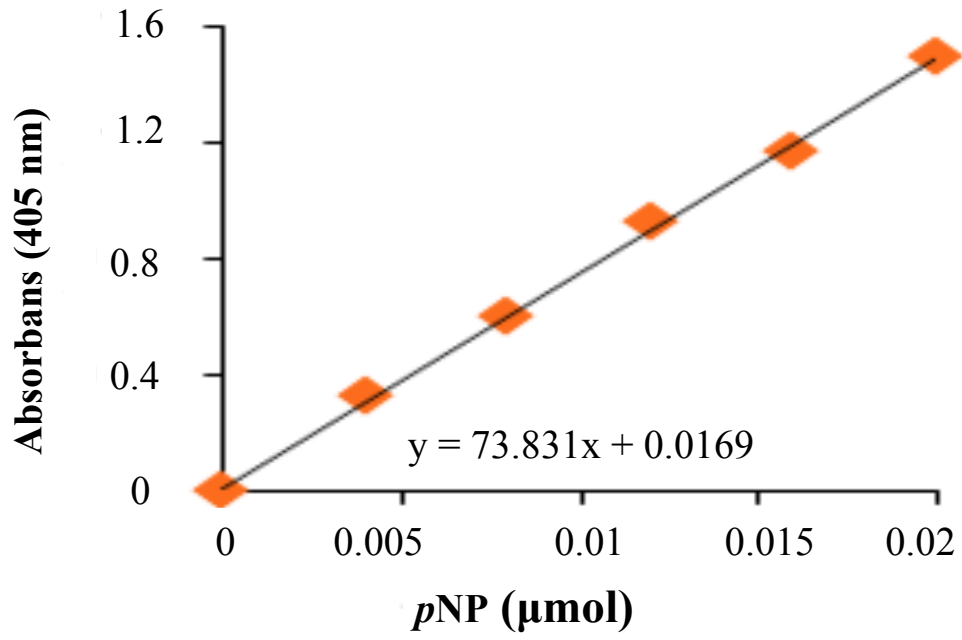
- [101] Tsou, H.K., et al., Improved osteoblast compatibility of medical-grade polyetheretherketone using arc ionplated rutile/anatase titanium dioxide films for spinal implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(10), 2787-2792, **2012**.
- [102] Chi, M.-H., et al., Biomimetic hydroxyapatite grown on biomedical polymer coated with titanium dioxide interlayer to assist osteocompatible performance. *Thin Solid Films*, 549, 98-102, **2013**.
- [103] Wang, H., et al., Mechanical and biological characteristics of diamond-like carbon coated poly aryl-ether-ether-ketone. *Biomaterials*, 31(32), 8181-8187, **2010**.
- [104] Dennes, T.J. and J. Schwartz, A nanoscale adhesion layer to promote cell attachment on PEEK. *Journal of the American Chemical Society*, 131(10), 3456-3457, **2009**.
- [105] Du, Y.-W., et al., In vitro and in vivo evaluation of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) immobilized collagen-coated polyetheretherketone (PEEK). *Frontiers of Materials Science*, 9(1), 38-50, **2015**.
- [106] Hallmann, L., et al., The improvement of adhesive properties of PEEK through different pre-treatments. *Applied Surface Science*, 258(18), 7213-7218, **2012**.
- [107] Zhou, H., V.K. Goel, and S.B. Bhaduri, A fast route to modify biopolymer surface: A study on polyetheretherketone (PEEK). *Materials Letters*, 125, 96-98, **2014**.
- [108] Uysal, U., *Nano ve Mikron Boyutta Hidroksiapatit Üretimine Proses Parametrelerinin Etkisinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2012**.
- [109] Cengiz, B., *Hidroksiapatit Nanoparçacıkların Sentezi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.
- [110] Anonim, University of Liverpool website, Chemtube3d, <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>, (Aralık, **2016**),
- [111] Wang, F. and M.S. Li. A biomimetic method of hydroxyapatite powders synthesized in simulated body fluid. *Key Engineering Materials*, Vols. 297-300, 1371-1375, **2005**.
- [112] Barrere, F., et al., Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF×5 solution. *Biomaterials*, 23(9), 1921-1930, **2002**.
- [113] Jalota, S., A.C. Tas, and S.B. Bhaduri, Microwave-assisted synthesis of calcium phosphate nanowhiskers. *Journal of Materials Research*, 19(06), 1876-1881, **2004**.
- [114] Tas, A.C., Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 C in synthetic body fluids. *Biomaterials*, 21(14), 1429-1438, **2000**.
- [115] Cölfen, H. and S. Mann, Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(21), 2350-2365, **2003**.
- [116] Bohner, M. and J. Lemaitre, Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*, 30(12), 2175-2179, **2009**.
- [117] Gümüşderelioğlu, M., Kaynak, G., Mikrodalgalar ve uygulamaları. *Bilim Teknik* 45(536), 38-42, **2012**.

- [118] Kaynak, G., *Mikrodalga Destekli Çapraz Bağlanma/Çökeltme Reaksiyonları ile Kitosan-HA Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanımının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2012**.
- [119] Evis, Z., Çeşitli İyonlar Eklenmiş Nano-Hidroksiapatitler: Üretim Yöntemleri, İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönlerinden İncelenmesi. *International Journal of Research and Development*, 3(1), 55-61, **2011**.
- [120] Kalita, S.J. and H.A. Bhatt, Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering: C*, 27(4), 837-848, **2007**.
- [121] Rajeswari, D., et al., Investigation of anticorrosive, antibacterial and in vitro biological properties of a sulphonated poly (etheretherketone)/strontium, cerium co-substituted hydroxyapatite composite coating developed on surface treated surgical grade stainless steel for orthopedic applications. *RSC Advances*, 4(106), 61525-61536, **2014**.
- [122] Wang, L., et al., Polyetheretherketone/nano-fluorohydroxyapatite composite with antimicrobial activity and osseointegration properties. *Biomaterials*, 35(25), 6758-6775, **2014**.
- [123] Bakirdere, S., S. Orenay, and M. Korkmaz, Effect of boron on human health. *The Open Mineral Processing Journal*, 3(1), 54-59, **2010**.
- [124] Penland, J.G., Dietary boron, brain function, and cognitive performance. *Environmental Health Perspectives*, 102(Suppl 7), 65, **1994**.
- [125] Wu, C., et al., Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials*, 32(29), 7068-7078, **2011**.
- [126] Ying, X., et al., Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biological Trace Element Research*, 144(1-3), 306-315, **2011**.
- [127] Hakki, S.S., B.S. Bozkurt, and E.E. Hakki, Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(4), 243-250, **2010**.
- [128] Çetin, M. Çetingil Yüzey İşlemede Kuşlama Teknolojisi 2015, Mini Kabin Tipi Kuşlama Makinesi, <http://www.cetingil.com.tr/tr/default>, (Aralık, **2016**).
- [129] Pino, M., et al., Apatite Deposition on NaOH-Treated PEEK and UHMWPE Films for Sclera Materials in Artificial Cornea Implants. *Advanced Engineering Materials*, 12(7), B234-B244, **2010**.
- [130] ISO, *Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*, 13, **2014**.
- [131] Mavis, B., et al., Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. *Acta Biomaterialia*, 5(8), 3098-3111, **2009**.
- [132] Demirtaş, T.T., G. Kaynak, and M. Gümüşderelioğlu, Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation. *Materials Science and Engineering: C*, 49, 713-719, **2015**.

- [133] Tuncay, E.Ö., T.T. Demirtaş, and M. Gümüşdereliolu, Microwave-induced production of boron-doped HAp (B-HAp) and B-HAp coated composite scaffolds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jtemb.2016.12.005>, **2016**.
- [134] Reitman, M., et al., Morphology and crystalline architecture of polyaryletherketones. *PEEK Biomaterials Handbook*, 49, **2011**.
- [135] Zhou, L., et al., The effect of different surface treatments on the bond strength of PEEK composite materials. *Dental Materials*, 30(8), e209-e215, **2014**.
- [136] Schmidlin, P.R., et al., Effect of different surface pre-treatments and luting materials on shear bond strength to PEEK. *Dental Materials*, 26(6), 553-559, **2010**.
- [137] Deng, F., Nano-TiO₂/PEEK bioactive composite as a bone substitute material: in vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1215-25, **2012**.
- [138] Ourahmoune, R., et al., Surface morphology and wettability of sandblasted PEEK and its composites. *Scanning*, 36(1), 64-75, **2014**.
- [139] Yan, X., et al., Quaternized poly (ether ether ketone) hydroxide exchange membranes for fuel cells. *Journal of Membrane Science*, 375(1), 204-211, **2011**.
- [140] Martel-Estrada, S., et al., In vitro bioactivity of chitosan/poly (d, l-lactide-co-glycolide) composites. *Materials Letters*, 65(1), 137-141, **2011**.
- [141] Kunzler, T.P., et al., Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials*, 28(13), 2175-2182, **2007**.
- [142] Guldberg, R.E., et al., 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials. *Biomaterials*, 29(28), 3757-3761, **2008**.
- [143] Gomes, M.E., et al., Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Engineering*, 12(4), 801-809, **2006**.
- [144] Boyer, P.D., *The Enzymes*, Vol. 14. Academic Press, **1982**.
- [145] Millán, J.L., Alkaline Phosphatases. *Purinergic Signalling*, 2(2), 335, **2006**.
- [146] Golub, E.E. and K. Boesze-Battaglia, The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 444-448, **2007**.
- [147] Stein, G.S., J.B. Lian, and T.A. Owen, Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *The FASEB Journal*, 4(13), 3111-3123, **1990**.
- [148] Fragale, A., et al., Decreased proliferation and altered differentiation in osteoblasts from genetically and clinically distinct craniosynostotic disorders. *The American Journal of Pathology*, 154(5), 1465-1477, **1999**.
- [149] Shu, R., et al., Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67(4), 1196-1204, **2003**.
- [150] Kirkham, G. and S. Cartmell, Genes and proteins involved in the regulation of osteogenesis. *Topics in Tissue Engineering*, 3, **2007**.

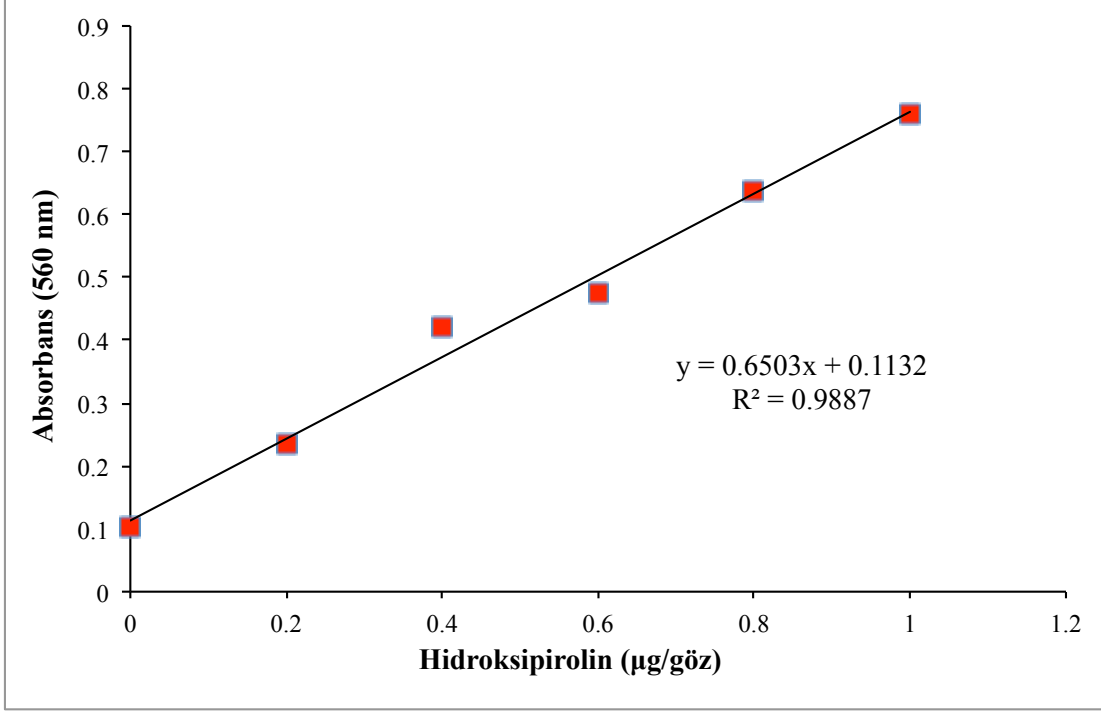
- [151] Young, M.F., Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis International*, 14(3), 35-42, **2003**.
- [152] Stein, G.S. and J.B. Lian, Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews*, 14(4), 424-442, **1993**.
- [153] Zhao, Y., et al., Plasma surface functionalized polyetheretherketone for enhanced osseo-integration at bone-implant interface. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(6), 3901-3911, **2016**.
- [154] You, J., et al., Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3–E1 osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 13365-13371, **2001**.
- [155] You, J., et al., Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow. *Journal of Biomechanical Engineering*, 122(4), 387-393, **2000**.
- [156] Vandrovcová, M. and L. Bacakova, Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiological Research*, 60(3), 403, **2011**.

EK-1



ALP Aktivitesi Kalibrasyon Grafiği

EK-2



Kollajen Analizi Kalibrasyon Grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Tuğçe Gültan

Doğum Yeri : Konak /İZMİR

Medeni Hali : Bekar

E-posta : gultantugce@gmail.com

Adresi : Yukarıyurtçu Mah., Evliya Çelebi Sok., Toki Yapracık Konutları, 1. Bölge, Blok: B2-9, K:1, D:5, Etimesgut/ANKARA.

Eğitim

- **Lise :** İzmir Bornova Anadolu Lisesi (BAL)
- **Lisans :** Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
- **Yüksek Lisans :** Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
- **Doktora :** -

Yabancı Dil ve Düzeyi

- İngilizce : TOEFL – 86/120

İş Deneyimi

- Atılım Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Uygulamalı Kimya Bölümü Araştırma Görevliliği (24.10.2016- devam ediyor).

Deneyim Alanları

- Biyomalzemeler, İmplant malzemeleri, Yüzey modifikasyonları, Doku mühendisliği.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Gültan, T., Yurtsever, Ç. M., Gümüşderelioğlu, M., ***Polietereeterketon (PEEK) İmplantlar İçin Etkin Yüzey Modifikasyon İşlemlerinin Geliştirilmesi, Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi 2016***, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, UKMK 2016, 23-26 Ağustos 2016, **Sözlü sunum.**

