

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OSSEOENTTEGRASYON VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİ
ARTIRILMIŞ TİTANYUM İMPLANTLARIN ÜRETİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS

H. Turgut DURMAZ

Kimya Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Turgay SEÇKİN
Eş Danışman Arş.Gör.Dr.F.Nülüfer KIVILCIM**

ŞUBAT 2021

**T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OSSEOENTTEGRASYON VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİ
ARTIRILMIŞ TİTANYUM İMPLANTLARIN ÜRETİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS

**H.Turgut DURMAZ
(36173613017)**

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Turgay SEÇKİN
Eş Danışman Arş.Gör.Dr.F.Nülüfer KIVILCIM**

ŞUBAT 2021

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında beni motive eden ve tez çalışmalarım süresince, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemedi bana yardımcı olan hocam Sayın Prof. Dr. Turgay SEÇKİN'e

Mikrobiyal Kondritin sülfat örneklerinin hazırlanması ve biyoyumluluk testlerindeki yardımlarından dolayı Prof.Dr. Burhan Ateş'e, Doç.Dr. A. Şebnem Erenler'e, ve Dr.Öğr. Üye İdil Karaca Açarı'ya, Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Arş.Göv.Dr. Nilifer KIVILCIM'a

Yaşamsal döngümün ikinci perdesindeki süreçte benden her türlü desteğini esirgemeyen eşim Pınar DURMAZ'a,

Bu tez çalışmasında teknik desteklerini esirgemeyen iş yerim Tekno Bağlantı Elemanları A.Ş. firmasına,

FOA-2018-1325 Nolu proje ile desteklerinden ötürü İnönü Üniversitesi İÜBAP Birimine

teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Osseointegrasyon ve Antibakteriyel Özellikleri Artırılmış Titanyum İmplantların Üretilmesi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

H. Turgut Durmaz



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ.....	i
ONUR SÖZÜ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	10
2. KURAMSAL TEMELLER.....	12
2.1.Nanokompozit Yapılar ve Genel Özellikleri.....	14
2.2.Nanokompozitlerin Sınıflandırılması.....	14
2.2.1.Seramik nanokompozitler.....	14
2.2.2.Metal nanokompozitler.....	16
2.2.3.Polimer nanokompozitler.....	16
2.3.Doğal Bileşen Temelli Nanokompozitler.....	18
2.4.Kemik Nanokompozitler.....	19
2.4.1.Kemik aşılama için nanokompozit.....	21
2.4.2.Kemik için nanokompozit geliştirilmesi.....	22
2.4.2.1.Konveksiyonel yöntem.....	22
2.4.2.2.Doku mühendisliği yöntemi.....	23
2.4.2.3.Biyomimetik yöntem.....	25
2.5.Osseoentegrasyon Süreci.....	25
2.6.Osseoentegrasyon İçin Kullanılan Malzemeler.....	27
2.6.1. Metaller.....	27
2.6.1.1.Titanyum ve titanyum alaşımı.....	28
2.6.1.2.Tantal.....	28
2.6.1.3.Kobalt-krom alaşımı.....	29
2.6.2.Polimerler.....	31
2.7.Yüzey Modifikasyon Teknikleri.....	32
2.7.1.Fiziksel teknikler.....	32
2.7.1.1.Kum püskürtme.....	33
2.7.1.2.Katmanlı(eklemeli) üretim.....	33
2.7.1.3.Plazma püskürtme.....	34
2.7.1.4.Fiziksel buhar biriktirme.....	34
2.7.2.Kimyasal teknikler.....	35
2.7.2.1.Anodik oksidasyon.....	35
2.7.2.2.Sol-jel.....	36
2.7.2.3.Kimyasal buhar birikimi.....	36
2.8. Amaç.....	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1.Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar.....	39
3.2.Kondroitin Sülfat Üretimi ve Saflaştırma İşlemleri.....	39
3.3.Titanyum Yüzeylerin Hazırlanması.....	40

3.4.Kondroidin Sülfat Yüklü Mikro Kürelerin Üretilmesi,Karakterizasyonu	41
3.5. Kürelerin Titanyum Yüzeyle Tutunması,Nano-Hidroksiapatit Yapıları İle Kaplanması ve Karakterizasyonu	42
3.5.1.Kürelerin titanyum yüzeyle tutunması.....	42
3.5.2.Yüzeylerin nano-hidroksiapatit yapıları ile kaplanması	42
3.5.3.Karakterizasyon çalışmaları.....	43
3.6.Mikrobal KS + Sol-jel Matriksin In Vitro Antimikrobal Aktivitesinin Belirlenmesi	44
3.7. Hazırlanan Yüzeylerin Biyouyumluluk Özelliklerinin Değerlendirilmesi	44
3.8.Deneysel Hayvan Çalışmaları, Makroskobik İnceleme, Histolojik Analizler	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
4.1.Mikrobiyal KS Yapısal Karakterizasyonu	48
4.2.KS/Sol-jel KaplanmışTitanyum İmplant Yapıların Yüzey Karakterizasyonu	50
4.3.Mikrobiyal KS+Sol-jel Matriksin In Vitro Antimikrobiyal Aktivitesi.....	55
4.4.Biyouyumluluk	56
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 : Kemiğin Yapısı.....	20
Çizelge 2.2 : Kemiğin Biyomekanik Özellikleri.....	20
Çizelge 2.3 : Kemik Onarımı ve Rejenerasyonu İçin Kullanılan Kemik Grefti Malzemeleri.....	21
Çizelge 2.4 : Yaygın Olarak Kullanılan Malzemelerin Sınıflandırılması ve Özellikleri.....	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.: Nanokompozit yapıları	13
Şekil 2.2.: Nanokompozitlerin sınıflandırılması	14
Şekil 2.3.: (a) Mg/HA/TiO ₂ ,nanokompozitinin şematik gösterimi, ve (b,c) MgO kaplı Mg/HA/TiO ₂ nanokompozitin FESEM mikrografları	15
Şekil 2.4.: Saf PVA film ile karşılaştırıldığında osteoblastın PVA/TiO ₂ hibrit nanokompozit yüzey ile daha yüksek derecede etkileşiminin şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.5.: (a) PP-hBN-nHA nanokompozitinin kırık yüzeyini düşük seviyede gösteren SEM mikrografları ve (b) Büyütülmüş resimlerde Siyah ok: hBN; Beyaz ok : HA.....	17
Şekil 2.6. : Doğal kemiğin hiyerarşik yapısal organizasyonu	19
Şekil 2.7.: HA-TiO ₂ nanokompozit ile Co-Cr alaşımının daldırma kaplama işleminin şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.8.: Doku mühendisliği yapılmış nanokompozit kemik grefti tasarım stratejisi	24
Şekil 2.9.: İmplantlarda osteoentegrasyonsürecinin şematik gösterimi.....	27
Şekil 3.1.: Çalışma kapsamında kullanılan Ti ₆ Al ₄ V implant yapıları.....	41
Şekil 4.1.: Sentezlenen mikrobiyal kondroitin sülfat yapısına ait FTIR (a) ve NMR (b) spektrumları.....	49
Şekil 4.2.: Mikrobiyal KS yapısına ait HPLC-MS kromatogramı.....	50
Şekil 4.3.: KS/Sol-gel kaplı Ti ₆ V ₄ Al yüzeylere ait SEM görüntüleri.....	51
Şekil 4.4.: Saf Ti ₆ Al ₄ V yüzeyi ve KS/Sol-gel kaplı Ti ₆ V ₄ Al yüzeyine ait optik mikroskop görüntüleri.....	51
Şekil 4.5.:Saf Ti ₆ Al ₄ V yüzeyi ve KS/Sol-gel kaplı Ti ₆ V ₄ Al yüzeyine ait EDX spektrumları ve yüzeylerin elementel haritaları.....	52
Şekil 4.6.: KS/Sol-gel kaplı Ti ₆ V ₄ Al yüzeyine ait farklı büyütmelerdeki AFM yüzey görüntüleri.....	53
Şekil 4.7. :Saf Ti ₆ Al ₄ V (a) yüzeyi ve KS/Sol-gel kaplı Ti ₆ V ₄ Al (b) yüzeyine ait sıvı temas açısı ölçüm sonuçları.....	54
Şekil 4.8.: KS/Sol-gel kaplı Ti ₆ V ₄ Al implant yüzeyine ait farklı büyütmelerdeki SEM yüzey görüntüleri.....	54
Şekil 4.9. : <i>Staphylococcus aureus</i> 'a karşı MIC değerinin belirlenmesi.....	55
Şekil 4.10. :Farklı oranlarda kondroitin sülfat katkılanmış polimerlerin % canlılık oranları.....	56
Şekil 4.11.: Farklı oranlarda kondroitin sülfat katkılanmış polimerlerin hücre morfolojileri üzerindeki etkisi.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
DLS	: Dinamik ışın saçınımı
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DTA	: Diferansiyel Termal Analiz
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
IR	: Kızılötesi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
X-ray	: X ışınları spektroskopisi



ÖZET

Yüksel Lisans Tezi

OSSEOENTTEGRASYON VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİ ARTIRILMIŞ TİTANYUM İMPLANTLARIN ÜRETİLMESİ

H. Turgut DURMAZ

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Fizikokimya Anabilim Dalı

66 + ix sayfa

2021

Danışman: Prof. Dr. Turgay SEÇKİN.

Bu çalışma kapsamında; titanyum ve titanyum alaşımlı kaplamalardaki sorunların çözümüne güçlü bir alternatif oluşturabilme yönünde; yara iyileşimi, kemik doku oluşumu yanında biyomedikal ürün sektöründe yaygın ve etkili bir kullanım alanına sahip olabilecek, antibakteriyel ve osseoentegrasyon özellikleri artırılmış titanyum implantlar elde edildi. Öncelikle, titanyum yüzeylerinde nano hidroksiapatit (nHA) yapıları büyütüldü, bu yapıların eldesinde sol-jel ve tabaka-tabaka “1b1” tekniği kullanıldı. Gözenekli olarak elde edilen bu yapılar içerisine E. coli K4 suşundan üretilen kondroitin sülfat eklendi. Elde edilen bu kaplamaların yüzey ve morfolojik özellikleri, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), sıvı temas açısı ölçümleri ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapıldı. Kimyasal içerik fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR) ve enerji yayımlı x-ışını analizi (EDX) yöntemi kullanılarak belirlendi. Elde edilen yüzeylerin morfolojik karakterizasyonları, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlendi. Kimyasal içerik ile ilgili analizler X ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ve X ışını kırınım yöntemi (XRD) kullanılarak gerçekleştirildi. Antibakteriyel ve biyoyumluluğu belirlemede sırasıyla oldukça yaygın kullanılan broth mikrodilüsyon ve MTT yöntemleri kullanıldı. İmplantın osseoentegrasyon özellikleri ise in vivo deneysel hayvan çalışması ile gerçekleştirildi. Çalışma sonuçlarının histopatolojik değerlendirmesi ile de üretilen biyomalzemenin canlı doku ile uyumu değerlendirildi. Değerlendirme sonuçlarına göre proje sonucu tasarlanan implant yüzey kaplama ürününün; antibakteriyel, biyoyumlu osseoentegrasyonu geliştirerek hasta refahına katkı sunan ortopedik ve diş implant yüzey kaplamalarında yaygın bir kullanım potansiyeli göstereceği aşikardır.

Anahtar Kelimeler: Osseoentegrasyon, titanyum implant, hidroksi apatit, kondroitin sülfat, sol-jel kimyası, antibakteriyel aktivite, biyoyumluluk.

ABSTRACT

Master Thesis

OSSEOENTEGRASYON VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİ ARTIRILMIŞ TİTANYUM İMPLANTLARIN ÜRETİLMESİ

H.Turgut DURMAZ

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of physical chemistry

66+ ix sayfa

2021

Supervisor: Prof. Dr. Turgay SEÇKİN

In this work to be a strong alternative to the problems of titanium and titanium alloy coatings; In addition to wound healing, bone tissue formation, titanium implants with increased antibacterial and osseointegration properties were obtained, which could have a widespread and effective use in the biomedical product sector. First of all, nano hydroxyapatite (nHA) structures were grown on titanium surfaces, sol-gel and layer-layer "lbl" techniques were used to obtain these structures. Chondroitin sulfate produced from E. coli K4 strain was added to these porous structures. The surface and morphological properties of these coatings were measured by atomic force microscopy (AFM), liquid contact angle measurements and scanning electron microscopy (SEM). Chemical content was determined using fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and energy dispersive x-ray analysis (EDX) method. Morphological characterizations of the surfaces obtained were determined by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). Chemical content analyzes were carried out using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and X-ray diffraction method (XRD). Broth microdilution and MTT methods, which are widely used, respectively, were used to determine antibacterial and biocompatibility. The osseointegration properties of the implant were performed by an in vivo experimental animal study. With the histopathological evaluation of the study results, the compatibility of the produced biomaterial with living tissue was evaluated. According to the evaluation results, the implant surface coating product designed as a result of the project; It is obvious that it will show a widespread use potential in orthopedic and dental implant surface coatings that contribute to patient well-being by improving antibacterial, biocompatible osseointegration.

Keywords: Osseointegration, titanium implant, hydroxy apatite, chondroitin sulfate, sol-gel chemistry, antibacterial activity, biocompatibility.

1. GİRİŞ

İmplant, tıpta pek çok alanda kullanımı olan, vücut içerisine kemik ve eklemler düzeyinde yerleştirilmiş ayrıca vücut içerisinde erimeden kalabilen ve vücut dokularıyla uyumluluk gösteren her türlü malzemeye yapılan genel bir tanımlamadır (plak, vida, endoprotez, çivi, tel, omurga enstrmanı vb.). Biyomalzemeler ise, implant yapımında kullanılan, eksik veya hastalıklı biyolojik yapıların işlev ve eksikliklerini tamamlamak için kullanılan doğal ya da yapay malzemelerdir. Kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler oluşturmayan, yani biyoyumlu doğal veya sentetik biyomalzemeler implant malzemeleri olarak kullanılmaktadır. Kemik deformasyonu sonucunda oluşan hastalıkların tedavisinde implant malzemesi olarak metalik titanyum (Ti) malzemeler tercih edilmektedir. Ti implant malzemeleri, vücut içerisinde istenilen mekanik özellikleri karşılayabilmektedirler. Ancak implant kaynaklı enfeksiyon oluşumu ve implant malzemesinin kemikle bütünleşmemesi (osseoentegrasyon) gibi implant ve canlı doku arasında birtakım uyumsuzluklar oluşması, Ti implantların önemli dezavantajları arasındadır. Klinikte karşılaşılan sorunların engellenmesi için implant malzemelerinin yüzeylerine çeşitli modifikasyonlar uygulanmaktadır [1-11]. Günümüzde sıklığı giderek artan metal implantların kullanıldığı cerrahi girişimlerde iki önemli sorun vardır. Bu sorunlar, biyomateryal merkezli enfeksiyonlar ve implant ile konak arasındaki doku uyumsuzluğudur [12]. Kondroitin sülfat'ın (KS) sahip olduğu antimikrobiyal ve antioksidan etki, kollojen oluşumunu sağlayan mekanizma ile ilgili sorunların aşılması sürecine katkı sunabileceğini düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada, KS'nin enfeksiyon tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir [13]. Biyomateryallerin başarılı doku bütünleşmeleri ise; temas halinde oldukları dokuların hücrelerine çok iyi yapışmalarına, biyomateryal yüzey ve membran molekülleri arasındaki kimyasal bağların kurulabilmesine bağlıdır [14-15]. Biyomateryal konak dokuya implante edildikten sonra fibronektin, fibrinojen, kollajen ve diğer proteinleri içeren glikoprotein yapısındaki biyofilmler oluşur. Oluşan biyofilmler, biyomateryallerin ve konak dokusunun biyomateryallerle temas eden yüzeyini kaplar. Böylece bakterilerin ve konak doku

hücrelerinin adezyonu için gerekli olan reseptör bölge oluşmuş olur [16,17]. Bu biyofilm tabakanın her bir makromoleküler yapısının, her organizma veya doku hücresi için özel rolü vardır. Cam, seramik ve titanyum gibi materyallerde, biyofilm tabakaların oluşturulması ile yapılan deneylerde, osseoentegrasyonun bu biyofilm tabakalar tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [18]. Günümüzde ortopedi cerrahisinde kullanılmakta olan pek çok implant, bir ya da daha fazla metal ve polimerden oluşmaktadır. Bu implant yapılar hedef dokuya yerleştirilirken enfeksiyona direnç gösteremezler ve enfeksiyona karşı hassastırlar [19]. Bu nedenle; ülkemiz başta olmak üzere dünya genelinde kemik onarımı veya kemiğin yeniden yapılanması için yeni, antibakteriyel etkinliğin ve osseoentegrasyonun artırıldığı alternatif implantlara gereksinim büyüktür. Bu gereksinim doğrultusunda hasta morbiditesi ve sağlık sistemindeki maliyet azaltılacaktır.

Bu gereklilik doğrultusunda proje kapsamında; özellikle bakteriyel enfeksiyona karşı implant hassaslığını gidermek, osseoentegrasyonu arttırmak amacı ile mikrobiyal rekombinant bakteri suş temelli antibakteriyel KS üretilmiş ve bu KS yapısı ve hidroksiapatit kullanılarak antibakteriyel ve osseoentegrasyon etkinliği artırılmış titanyum implant yüzey kaplamalar elde edilmiştir. Elde edilen yüzey kaplamaların morfolojik karakterizasyonları, atomik kuvvet mikroskobu AFM ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Kimyasal içerik ile ilgili analizlerde X ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ve X ışını kırınım yöntemi (XRD) kullanılmıştır. Üretilen malzemenin biyoyumluluğu ve antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir. Deneysel hayvan çalışması sonrası histo-patolojik değerlendirme ile de üretilen biyomalzemenin canlı doku ile uyumu kanıtlanmıştır. Değerlendirme sonuçlarına göre proje sonucu elde edilen yeni implant yüzey kaplama ürününün ortopedi ve diş kaplamalarında yaygın bir kullanım potansiyeli olacağı öngörülmektedir.

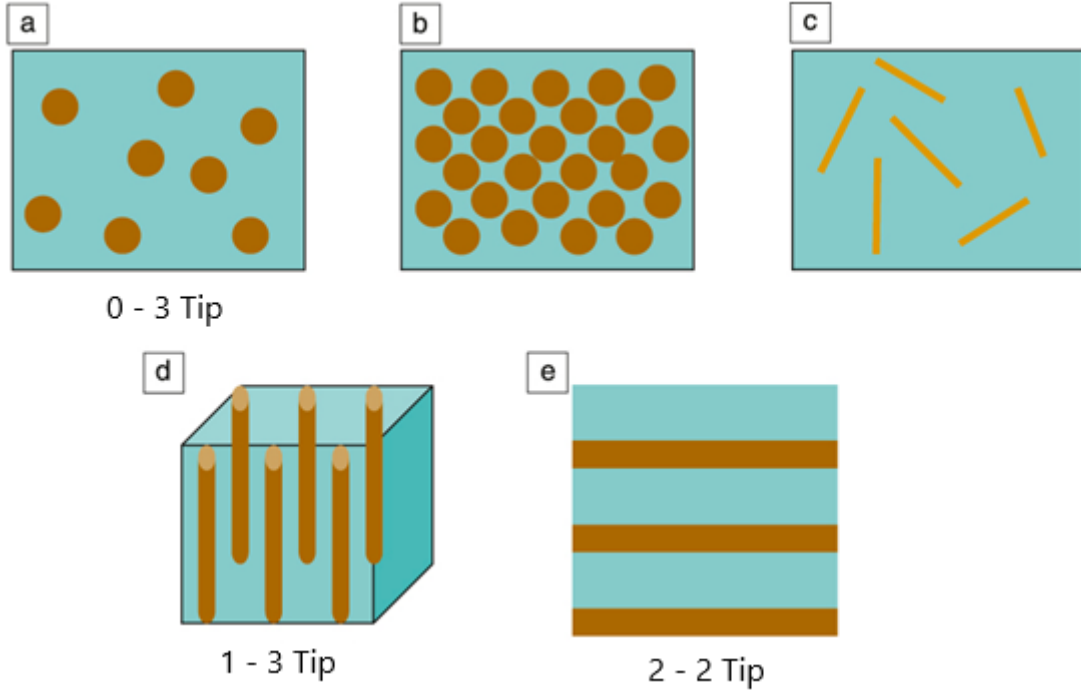
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Nanokompozit Yapılar ve Genel Özellikleri

Nanokompozit malzemeler, benzersiz tasarım ve özellikler sayesinde geleneksel kompozite benzemeyen malzemelerdir [1]. Yeni bir kompozit türü olarak tanımlanırlar. Mükemmel özellikler gösterebilen mikro ölçekli malzemelerdir. Bu yeni tür malzemeler ileri teknolojilerde ortaya çıkan potansiyel adaylar olarak kabul edilir [2]. Nano ile ilgili sorunların üstesinden gelmek için araştırmacılar farklı tiplerde hazırlanan bir çok nanokompozit türlerini hazırlama süreçlerinde hala büyük zorluklar yaşamaktadır. [3]. Nanokompozit malzemelerin araştırılmalarında Geniş bir alan yelpazesinde büyük fırsatlar vardır. [4]. Son zamanlarda Kemik dokusu ikameleri için artan ihtiyaçlar nedeniyle yaşlı popülasyon ve hasta sayısındaki artış travma ve kemik kanserini arttırmaktadır. [5]. Amerika Birleşik Devletleri yılda bir yapılan istatistiklere göre, yaklaşık 6,3 milyon kemik kırığı meydana gelmektedir. [6]. Ek olarak araştırmacılar, 1990'da 1,7 milyon iken 2050'de kalça kırıklarının yaklaşık 6,3 milyon olacağını tahmin edilmektedir. [7]. Çok çeşitli ortopedik gereksinimler son 25 yılda farklı kompozit türdeki malzemelerin geliştirilmesine ve uygulanmasını sağladı. İmplantasyonun başarı oranını artırmak için anahtar faktörler tüm ortopedide kullanılan implantlara, fizikokimyasal gibi çeşitli özellikler, mekanik ve biyolojik özellikler eklemek gerekmektedir. [8,9]. Son zamanlarda nanokompozitlerdeki gelişmeler, güncel ortopedik implantların performansını artırmak için mükemmel bir potansiyele sahiptir [10]. Kemiğin kendisi şaşırtıcı ve gerçek bir nanokompozittir, inanılıyor ki nanokompozitler ve nanoyapı malzemeleri bu alanda anahtar rol oynamaktadır. [11].

Nanokompozitler, 50 yıldan fazla bir süredir incelenmektedir [12]. Bununla birlikte, 1990 dan beri nanokompozit malzemelerin önemi birçok uygulamada karşımıza çıkıyor [1]. O zamandan beri biyomalzemeler, seramikler vb. nanokompozit bilim ve mühendislik gibi tüm malzeme alanlarında kullanılıyor. Malzemedeki en az birinin olduğu farklı özellikleri nano ölçeğinde (100 nm'den az) nanokompozit bir, iki veya daha fazla malzemenin heterojen kombinasyonudur. [13,14] Benzersiz, verimli bir malzeme oluşturmak için ortaya çıkan büyük tasarım fırsatları gelişen nanokompozitlerin en iyi özelliklerini harmanlama çabasıdır. [15] Eşsiz Nanokompozitlerin özellikleri aşağıdaki kaynaklardan elde edilebilir. orijinal bileşenlerin tek bir malzeme, Nanokompozitlerin yapısı, nanopartiküller, nanofiberler şeklinde takviye, nanotüpler artı matris malzemesi [16]

Nanokompozit malzemeler birçok uygulamalarda kullanılmaktadır. kemik, çimento [17] gibi alanlar, güneş pili [18], filtre ve membranlar [19]. Nanokompozit malzemelerdeki kompozisyon ve stokiyometrinin kontrolü nedeniyle, alternatif olarak uygulanabilirler mikro kompozitin kısıtlanmasını sınırlamaya aday ve monolitik malzemelerdir. [1,20].

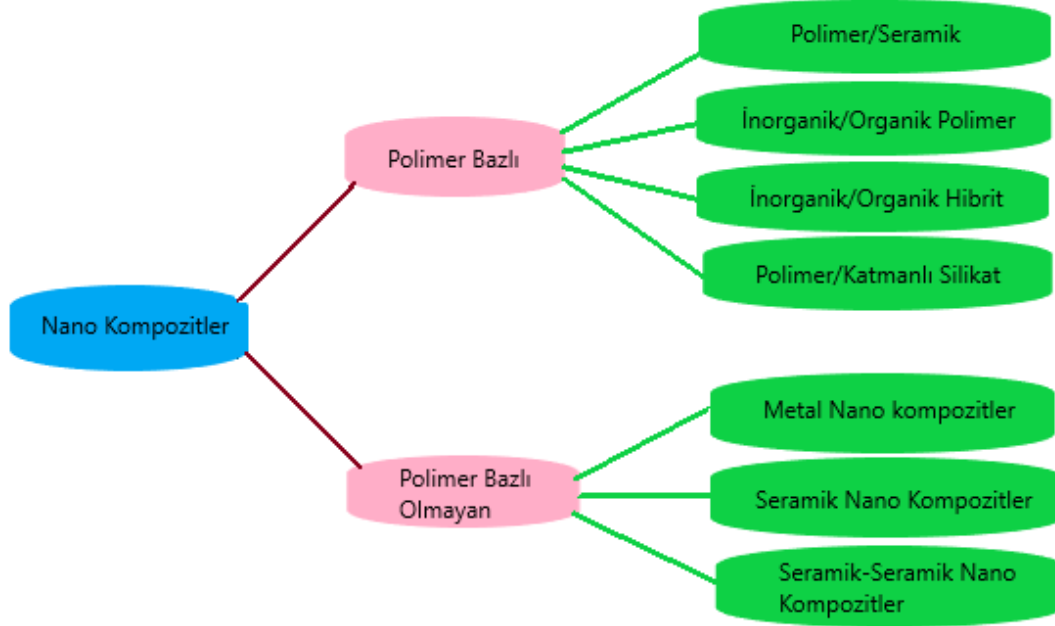


Şekil 2.1. : Nanokompozit yapıları [Nan, C., & Jia, Q. (2015). Nanokompozitlerde nihai işlevselliklerin elde edilmesi : Tasarım, Kontrol, ve İmalat . MRS Bülteni, 40(9), 719-724. doi:10.1557/mrs.2015.196].

Bugüne kadar birçok nanokompozit malzeme, ortopedi uygulamalarında geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Örneğin, trikalsiyum fosfatın (TCP) kimyasal özellikler açısından doğal kemiğe benzer, bu nedenle biyolojik olarak kemik iyileştirme cihazlarında uygun bir aday olabilir. [22]. Bulgular tüm nanokompozitlerin farklı konsantrasyonları üstün mekanik dayanıma sahip olduğunu bize gösteriyor. Ek olarak, antimikrobiyal sayesinde Ag [25] özellikleri, geliştirilmiş β -TCP-FeAg nanokompozitler, önemli ölçüde antibakteriyel etki sağlar.

2.2. Nanokompozitlerin Sınıflandırılması

Ortopedik uygulamalarda kullanılan nanokompozit malzemeler dört farklı kategoriye ayrılmıştır: seramik, metal, polimer ve doğal bazlı nanokompozitler. Yapıları ve özellikleri ile ilgili detaylar bu dört tür nanokompozit, ortopedik uygulama şu şekilde tartışılmaktadır.



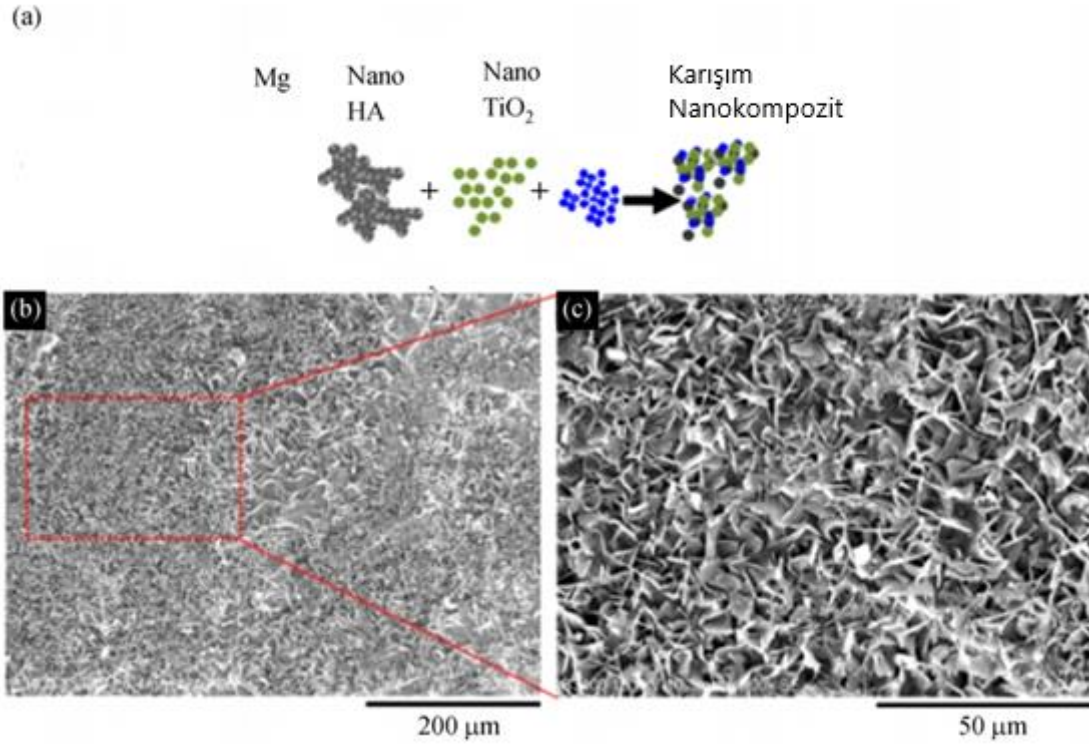
Şekil 2.2.: Nanokompozitlerin sınıflandırılması [Mousumi Sen (June 27th 2020). Nanokompozit malzemeler ,Nanoteknoloji ve çevre, DOI: 10.5772/intechopen.93047.].

2.2.1 Seramik nanokompozitler

Seramik matris nanokompozitler (CMNC) bir alt gruptur. Nanokompozit malzemelerin gelecekteki uygulamaları için son derece önemli malzemelerdir [16]. Gelişmiş mekanik özellikleri sayesinde mükemmel aşınma direnci ve kimyasal stabilitededir. CMNC birçok çalışma alanında büyük ilgi görmüştür. [26]. CMNC'nin ana uygulamalarından biri ince filmlerdir.

Katı bir katman birkaç nm ile birkaç μm 'den oluşur. Bir substrat üzerine kaplanan kalınlığa ince film denir [27]. Geçtiğimiz yarım yüzyılda hidroksiapatit (HA) bir biyoseramik malzemeler özellikle ortopedide istenilen yüksek biyoyumumluluk ve osseointegrasyon oranı gibi özellikleri nedeniyle kemiğe benzer yapı ve kompozisyonlar oluşturur. [28,29]. Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), ortopedik implantlar için uygun bir kaplama malzemesidir. Ancak kırılma tokluğu gibi zayıf mekanik özellikleri birçok yük taşıma uygulamasında uygun olmayan bir aday haline getirir.

Bu problemlerin üstesinden gelmek için HA tabanlı nanokompozitler elde etmek gerekir. HA tabanlı nanokompozitler elde etmek için Nano ölçeklerdeki farklı pekiştiricilerden yararlanarak alümina nanopartiküller, TiO_2 nanopartiküller ve nanotüpler ve karbon nanotüpler kullanılabilir. Shirdar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, TiO_2 nanotüpler, mekanik özellikleri iyileştirmek için katman mikro sertlik ve yapışma gücü açısından HA kaplama matrisine dahil edildi. Alan emisyon taramalı elektron mikroskopları saf HA görüntülerini ve HA- TiO_2 nanotüpler metalik implant üzerinde kaplama tabakası Şekil 2.3'de gösterilmiştir. 1. HA- TiO_2 nanotüp kaplama tabakası, karşılaştırıldığında daha yoğun bir yapıya sahiptir ve yüzeyde saf HA kaplama tabakasına rastlandı. Bu çalışma gösterdi ki TiO_2 nanotüpler saf HA'nın mikro gözeneklerini doldurdu ve çatlaksız, gelişmiş mekanik özelliklere sahip bir nanokompozit kaplama tabakası oluşturuldu.



Şekil 2.3.: (a) Mg/HA/ TiO_2 , nanokompozitin şematik gösterimi, ve (b,c) MgO kaplı Mg/HA/ TiO_2 nanokompozitin FESEM mikrografları [45]

2.2.2 Metal nanokompozitler

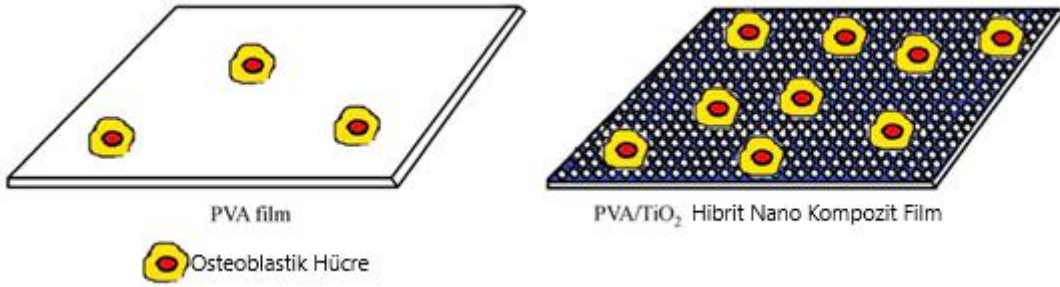
Metal matris nanokompozitler (MMNC) malzemeler sünek metal veya alaşım matrisinden oluşur. İmplant edilmiş nano boyutlu takviye MMNC lerde vardır. Bu gibi malzemelerin üretimi için gelecek vaat eden adaylar yeterli mekanik özelliklere sahip ortopedik implantlar için gereklidir [39]. Metal matris nanokompozitler, sürekli ve sürekli olmayan takviyeli olarak sınıflandırılır. Karbon nanotüp metal matris kompozit önemli sürekli nanokompozitlerden biri olan yüksek çekme mukavemetine sahip yeni ortaya çıkan bir malzemedir. [40,41]. Örneğin, magnezyum (Mg) yüksek biyouyumluluğuyla bilinir ve doğal, karşılaştırılabilir mekanik özellikleri ile ortopedi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, Mg dezavantajı başlangıçta hızlı olan iki büyük bozunma ve düşük biyoaktivite seviyesi, bu alandaki uygulamada soruna neden olur. Yakın zamanda, Mg'de takviye malzemesi olarak nano-HA ve nano-TiO₂ matrisin kullanılabileceği rapor edilmiştir [45]. Sonuçlar gösterdi ki Dikkat çekici bir şekilde MgO kaplı Mg-HA-TiO₂ nanokompozit, Mg esaslı nanokompozit süneklik ve korozyon direncini arttırdı.

Bulgular, geliştirilen nanokompozitin sadece gerilim altında üstün mekanik özelliklere sahip olduğunu, koşulların yanı sıra hücre bağlanması için gelişmiş yüzey ve fizikokimyasal özellikler sağladığını gösterir. Ayrıca geliştirmek için yüzey mekanik özelliklerinin yanı sıra osteojenik kapasite, yeni bir Ti-6V-4V / çinko yüzey nanokompozit sürtünmeli karıştırma işlemi kullanılarak geliştirilmiştir. Sonuçlar bu yeni nanokompozitin önemli ölçüde gelişmiş mekanik özellikler ve biyouyumluluk gösterdiğini, osseoentegrasyonu teşvik etmenin yanı sıra dental ve ortopedik uygulamalar için potansiyeli olduğunu gösteriyor.

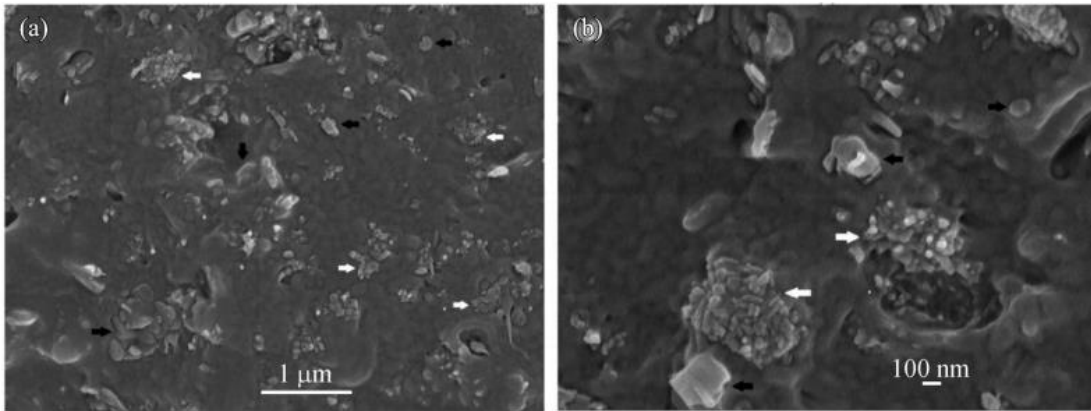
2.2.3 Polimer nanokompozitler

Polimer matris nanokompozitler (PMNC) aşağıdakilerden oluşur: polimer veya kopolimer ve filtre olmayan veya partikül olmayan polimer matris. Bu yeni nanokompozit sınıfında malzemelerin hafif olması büyük ilgi gördü. Ortopedik olarak uygulamalarda, PMNC modülünün kemiğe etkin yük transferi için karşılaştırılabilir olması gerekir. Ek olarak, toksik olmamalı, aşındırıcı olmamalı ve gerektiğinde kolay kaldırılabilmeli. Sonuç olarak, bir polimer tabanlı nanokompozit implant mekanik özellikler ve fonksiyonel kriterler açısından belirli bir tasarımı karşılamalıdır. Talepler biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve muhtemelen estetik olması yönündedir. Biyomedikal uygulamalarda Poli (vinil alkol) veya PVA, yüksek hidrofiliğe, esnekliğe sahip vinil polimerler yaygın olarak kullanılır. Ancak, yetersiz dayanıklılık ve mekanik mukavemeti

nedeniyle ortopedik cerrahide uygulanabilirliğini kısıtladı. PVA termomekanikliği iyileştirmek için TiO_2 nanopartiküller ile güçlendirilmiştir. Bu nedenle, bir PVA- TiO_2 nanokompozit film yeterli mekanik ve biyouyumlu özelliklere sahip olarak geliştirildi. Bulgular, optimum TiO_2 nanopartiküllerinin bileşimini mekanik olarak sonuçlandırdı. Gelişmiş mekanik özellikli kararlı nanokompozit film özellikleri yanı sıra korozyon direnci gösterdi. Ek olarak, hücre yapışması ve in vitro biyoaktivite testlerinden elde edilen sonuçlar TiO_2 'nin hücre arasındaki etkileşimi teşvik ettiğini belirtti ve substratlar ve geliştirilmiş apatit kullanıldı. Şekil 2.4 şematik olarak osteoblastın daha yüksek derecede etkileşimini gösterir



Şekil 2.4.: Saf PVA film ile karşılaştırıldığında osteoblastın PVA/ TiO_2 hibrit nanokompozit yüzey ile daha yüksek derecede etkileşiminin şematik gösterimi [54]



Şekil 2.5.: (a) PP-hBN-nHA nanokompozitinin kırık yüzeyini düşük seviyede gösteren SEM mikrografları ve (b) Büyütülmüş resimlerde Siyah ok: hBN; Beyaz ok : nHA [57]

Bu gelişmiş nanokompozit film, PVATiO₂ Nanokompozit muhtemelen kemik implant uygulamaları için gelecek vaat eden bir adaydır. Çalışmalar gösteriyor ki, seramik-polimer nanokompozitlerin kemik dokusu rejenerasyonunda uygulama için

mekanik özelliklerdeki iyileşme nedeniyle ve seramik ve polimerlere kıyasla daha etkilidir. Büyük hidroksiapatit mikropartikülleri ile daha iyi mekanik özelliklere sahip nanokompozit özellikleri ve biyouyumluluk için yeni bir polimer geliştirilmiştir. Polipropilen (PP), altıgen bor nitrür (hBN) nanoplateletler ve Nanohidroksiapatit (nHA) PP-hBN-nHA nanokompozit polimer hazırlanması için kullanıldı. Mekanik ve biyolojik sonuçlar, bu nanokompozitin ortopedik uygulamalar için uygun bir aday olduğunu gösterir. Şekil 2.5 taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri PP-hBN-nHA nanokompozitin kırık yüzeyi.

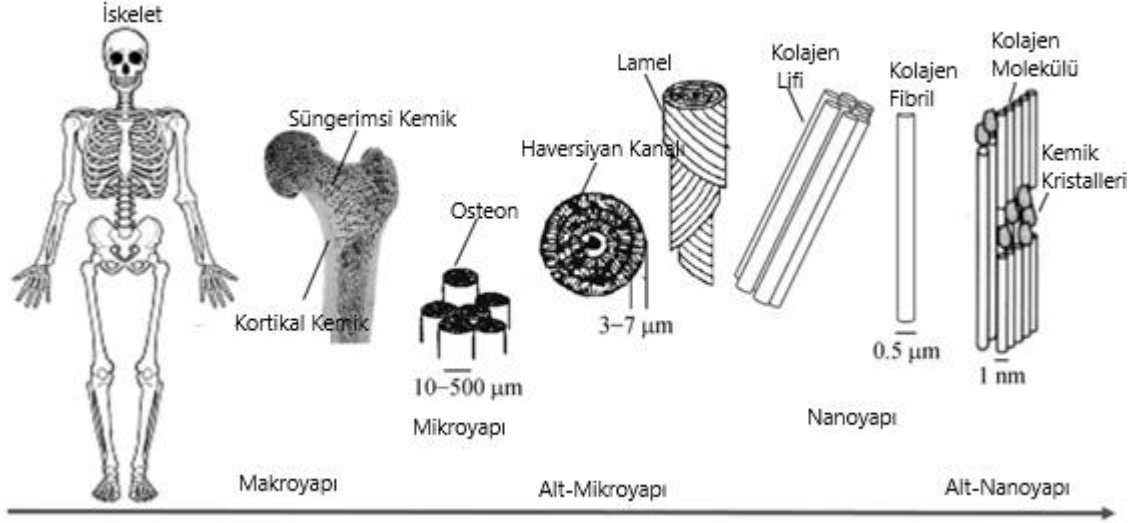
2.3. Doğal Bileşen Temelli Nanokompozitler

Hücreyi geliştirme kabiliyetleri nedeniyle yeni kemik büyümesine yol açan yapışma ve proliferasyon mikro ölçeklerde geleneksel malzemelerle karşılaştırıldığında son zamanlarda, nanokompozitler gibi nanoyapılı biyomalzemeler kemik dokusu ile giderek daha popüler hale geldi. Özellikle biyopolimerik içeren nanokompozitler matrisler ve biyoaktif nano boyutlu dolgular, kemik dokusu mühendisliğinde kullanılan kemiğin hiyerarşik yapısını bize gösterdi. Bu materyaller yüksek mekanik dayanıma, biyolojik olarak parçalanabilirliğe ve osteointegrasyon sahip olmalıdır. Örneğin kalsiyum fosfatlar (CaP) istenen osteokondüktiviteye, yeniden emilebilirliğe sahiptir, ve biyouyumluluk gösterir. Biyopolimerler uygun biyolojik performans, hücre dışı ile benzerlik matrisleri ve arzu edilen bozunma oranlarına sahiptir. Böylece, nano boyutlu CaP'yi birleştiren nanokompozit malzeme ve biyopolimerler ortopedide yapıyı ve mekaniği ile kemik dokularının özelliklerini taklit etme yeteneği büyük ilgi gördü. Kalsiyum fosfatların bozulma oranları gerekli biyouyumluluğu ve osteokondüktiviteyi sağlayarak doğal polimerlerden farklı özellikler gösterdi. Şimdiye kadar doku mühendisliği için birkaç doğal polimer /CaP nanokompozit iskeleler geliştirildi. Örneğin, bir kolajen / nano-HA nanokompozit iskele, yeterli mekanik özellikleri ve yüksek biyolojik aktivitesi ile kolajen kontrol iskelesi, Cunniffe's tarafından rapor edilmiştir. Ek olarak, Yan ve ark. [65] bir ipek fibroin ve nano boyutundan oluşan nanokompozit iskele ile kendinden mineralizasyon özelliğine sahip CaP ve sitotoksiste ulaştı. Barbani vd. [66] jelatin / HA kimyasal bileşimli nanokompozit iskeleler, yapısal organizasyon ve elastik modül karşılaştırılabilir doğal kemiğe ulaştı.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular gösterdi ki organik ve inorganik arasındaki yüksek etkileşimler tarafından onaylanan matrisin elemanları iskele üzerinde uygun yapışma ve çoğalma gösterdi.

2.4. Kemik Nanokompozit

Kemik, şaşırtıcı bir dengeye sahip doğal bir nanokompozittir. tokluk, sertlik ve titreşim sönümlenme özellikleri fizyolojik, koruyucu ve mekanik hizmet veren fonksiyonlardır. Bu karmaşık bağlantılı sistemler vücudun iskeletini oluşturan dokulardır.



Şekil 2.6. : Doğal kemiğin hiyerarşik yapısal organizasyonu [73]

Kemik CaP gibi mineraller için bir mağaza olarak mekanik destek rolü oynar. Kemik dinamik bir dokudur. Sırasında kendini yeniden şekillendirme ve kendini yenileme yeteneği vardır. İki ana nano ölçekli aşama vardır. organik ve inorganik içeren kemik matrisi doğal bir nanokompozit malzemenin ilginç bir örneğidir. Her aşama aşağıdakileri içeren birden fazla bileşenden oluşur: mineraller, kollajen, su, kollajen olmayan proteinler, lipidler, vasküler elemanlar ve hücreler. Bazı eser elementler magnezyum, potasyum, sitrat, karbonat, sodyum gibi klorür ve florür, kemik fonksiyonundaki farklı minerallerdir. Kemik son derece zor ve yumuşak (kolajen) ve kırılğan (HA) bileşenlerden oluşan sert doğa ürünüdür. Kolajenin temel rolü, gerilme mukavemeti ve esneklikği sağlarken kemiğe mineraller sertlik ve tokluk sağlar.

Organik Faz	w1-%	İnorganik Faz	w1-%
Kolajen	20	Hidroksiapatit	60
Su	9	Karbonat	4
Kolajen olmayan protein	3	Sitrat	0,9
Diğer yapılar: Polisakkaritler, Yağlar, etokinezler		Sodyum	0,7
İlkel Kemik Hücreleri: Osteositler, Osteoklastlar		Magnezyum	0,5
		Diğer Yapılar: Cl ⁻ , F ⁻ , K ⁺ , Sr ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺	

Çizelge 2.1: Kemiğin Yapısı [6]

Doğal kemiğin yapısının % 50'si Çizelge 2.1'de özetlenmiştir. Kemik aşılama için ideal nanokompozit tasarımı kemik yapısının temel olarak anlaşılmasını gerektirir. Kemik oluşturma stratejisi olmayan biyolojik henüz tam olarak keşfedilmemiş bir mekanizma içerir. Hiyerarşik yapısal organizasyon nano, mikro ve farklı ölçeklerde kemiğin makro mekanik özellikleri açısından önemlidir. Şekil 2.6, doğal kemiğin hiyerarşik yapısal organizasyonu göstermektedir. Mekanik özellikleri belirlemek için kemiğin mekanik özellikleri, her bir bileşenin aşama ve aralarındaki yapısal ilişki hiyerarşik yapısal organizasyonun çeşitli seviyeleri araştırılması gerekiyor.

Çizelge 2.2 kemiğin biyomekanik özelliklerini temsil eder. kemiğin mekanik özellikleri farklı yapısal seviyelerini gösterir. Örneğin, Young'ın katsayısı gerilme sırasında kemik 14–20 GPa aralığındadır, güç 50-150 MPa aralığındadır. Kemikte bir miktar su vardır. Kemiğin mekanik özellikleri ayrıca kemikte bulunan su miktarına da bağlıdır [6].

Özellikler	Ölçüm	
	Korikal Kemik	Süngerimsi Kemik
Basınç Dayanımı /Mpa	170-193	7-10
Genç Modüller /Gpa	14-20	0,05-0,5
Çekme Kuvveti /Mpa	50-150	10-20
Kırılma Tokluğu /(Mpa.m ^{1/2})	2-12	0,1
Gerilme Zorlaması	1-3	5-7
Yüzey/Kemik hacmi	2,5	20
Yoğunluk	18-22	0.1-1.0
Görünen Yoğunluk	1.8-2.0	0.1-1.0
Toplam Kemik Hacmi	1.4 x 10 ⁶	0.35 x 10 ⁶
Toplam İç Yüzey	3.5 x 10 ⁶	7.0 x 10 ⁶

Çizelge 2.2: Kemiğin biyomekanik özellikleri

2.4.1 Kemik aşılama için nanokompozit

Eksik kemiğin yerini alan cerrahi bir prosedürdür. kemik kırıklarında yapılan onarımlara kemik aşılama denir [74].

Birinci nesil kemik aşılama gereksinimleri karşılama tek başına aşılama yeterli değildir. Bu nedenle bir ideal tasarlamak işlevini ve yapısını taklit eden kemik aşılama doğal kemik sentezinde büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir [11].

Malzemeler	Örnekler
Doğal Polimerler	Protein: Kolajen, Fibrin, Jelatin, İpek Fibroin Poli sakkaritler: Hiyaluronik asit, Kondrotin sülfat, Selüloz, sitrat, agaroz kitosan, dextran
Sentetik	Poliglolikolik asit (PGA); Polilaktik asit (PLA) Polikaprolakton (PCL); Polilaktid glikolid (PLGA)
Seramik	Mercan veya sentetik HA
Kalisyum fosfat	Silikat - ikame HA β -TCP Dikalsiyum fosfat dehidrat
Biyocamlar ve Cam seramikler	Silikat biyoaktif camlar Borat / Borsilikat biyoaktif camlar
Metaller	Titanyum ve alaşımları Tantal, Paslanmaz çelik Magnezyum ve alaşımları
Kompozitler	Metal üzerine Kalsiyum fosfat kaplama HA / Poli-(D,L- laktid) HA / Kitosan jelatin
Nanokompozitler	Nano-HA/Kolajen Nano-HA/Jelatin Nano-HA/Kitosan Nano-HA/PLLA

Çizelge 2.3: Kemik onarımı ve rejenerasyonu için kullanılan kemik grefti malzemeleri

Çizelge 2.3 farklı kemik ikame gruplarını özetler: doğal ve sentetik biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, seramik metaller, kompozitler ve nanokompozitler [6,75].

Son günlerde, araştırmacılar kemik aşılamasının performansını artırıyor. İstenen performansı oluşturmak için biyomimetik süreçte nano yapı malzemeler kullanılıyor. Nanokompozit malzemeler geliştirilme potansiyeline sahip nano ölçekli özelliklerinden dolayı ideal kemik aşılama ve kemik hücresi büyümesini dolayısıyla dokuyu teşvik eden oluşumlar geliştirilebiliyor. Kemiğin kendisi karmaşık bir hiyerarşiye sahip doğal bir nanokompozit malzemedir. Bu alanda yeni nesil nanokompozit malzemelerin oranı, kemik aşılama da gelecek vaat edetmekte. Bu malzemeler farklı nano ölçekli kemik grefti

ile birlikte osteojenik hücrenel bileşenler ve osteoindüktif büyüme faktörler bir kombinasyon olarak kullanılır. Örneğin, nanokompozit kemik grefti aşağıdakilerden oluşur: nano-HA ve kollajen veya nano-HA kitosan karşılaştırıldığında üstün osteokondüksiyon ve ilgili fonksiyonlar mikro ölçekli kemik greftlerine oluşturur.

Bu çeşit nanokompozit kemik greftleri benzer yapı gösterir ve doğal kemiğe en yakın kompozisyondadır. Gelişmiş performansa sahip yeni kemik greftleri geliştirme olasılığı nanokompozitin işlenmesindeki yeniliklerle artmıştır.

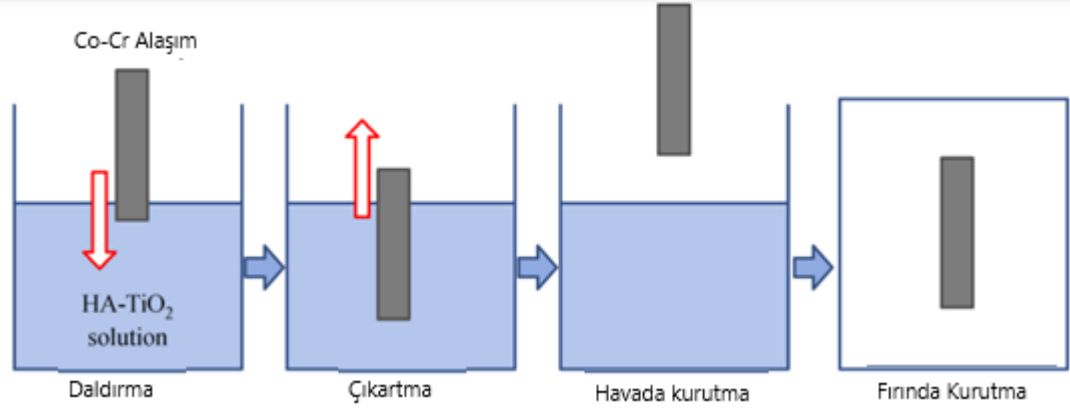
2.4.2. Kemik için nanokompozit geliştirilmesi

Kemik aşılmasında kullanılan geleneksel malzemeler Düşük seviyelerinden dolayı ideal kemik ikamelerine yakın değildir. Örneğin, geleneksel malzemeler muhtemelen mekanik olarak tahrip olur ve normal kemikte alerji ve iltihaplanma nedeniyle nikel, kobalt gibi aşındırıcı ve toksik partiküller, metalik krom, alüminyum ve vanadyum titanyum alaşımları, paslanmaz çelik, kobalt gibi implantlar kullanılır. Ayrıca metal oksitlerin implantasyonu alümina (Al_2O_3) ve zirkonyum (ZrO_2) gibi aynı klinik ve mekanik problemler içerir. HA ve β -TCP biyoaktif seramiklerdir ve kemikle doğrudan bağlantı kurarlar. Ancak bu iki malzemenin kırılabilirliği kemikte çökmeye neden olabilir. En önemli nokta ideal bir yapay kemik geliştirmek için kriter seçmektir. kompozisyonda en çok benzerliğe sahip malzemeler, nano yapı ve kemiğe biyolojik yanıt verirler. Görünüşe göre nanokompozit malzemeler en iyisidir. bu gereksinimleri karşılamak için Nanokompozit kemik implantlarından faydalanılır. nanokompozit malzemeler geliştirmek için Üç işleme yöntemi vardır .geleneksel, doku mühendisliği ve biyomimetik.

2.4.2.1 Konveksiyonel yöntem

Nanokompozit üretmek için geleneksel yöntemler, heterojen bir kombinasyonun karıştırılmasını veya harmanlanmasını içerir. farklı kombinasyonlara sahip en az iki malzemedan veya morfolojiden oluşur. [101]. Bu yöntem yeni bir kavram değildir ve uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Karışmaya rağmen teknikler, özel yapımla ile nanokompozit üretir. Ancak, homojenlik ve tekdüzelik kontrolü oldukça zordur [6]. nano ölçekli bileşenlerin Nanokompozit oluşturmak için makroskopik malzemeler ile Karıştırma prosedürü başlar. Bunda boyut ve yapısını kontrol eden teknik karmaşıktır. Çok az çalışma TiO_2 'nin HA ile harmanlanmasının geliştiğini bildirir. Bu nanokompozit ortopedik metal için kaplama tabakası olarak uygulanabilir. kobalt krom ve titanyum gibi

biyomateryaller implantlarda kullanılır. İlk olarak, takviye olarak titanyum nanotüpler ajan olarak sentezlenir ve daha sonra spesifik HA'nın sol-jeline oranı belirlenir. [102]. Son olarak, metalik implant HA-TiO_2 ile daldırma kaplama işlemi ile kaplanır. Dalmanın şematik gösterimi kaplama işlemi Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Bu teknikte kaplama tabakası muhtemelen tek tip değildir ve farklı kristal boyuta sahiptir. Titanyum nanotüpler



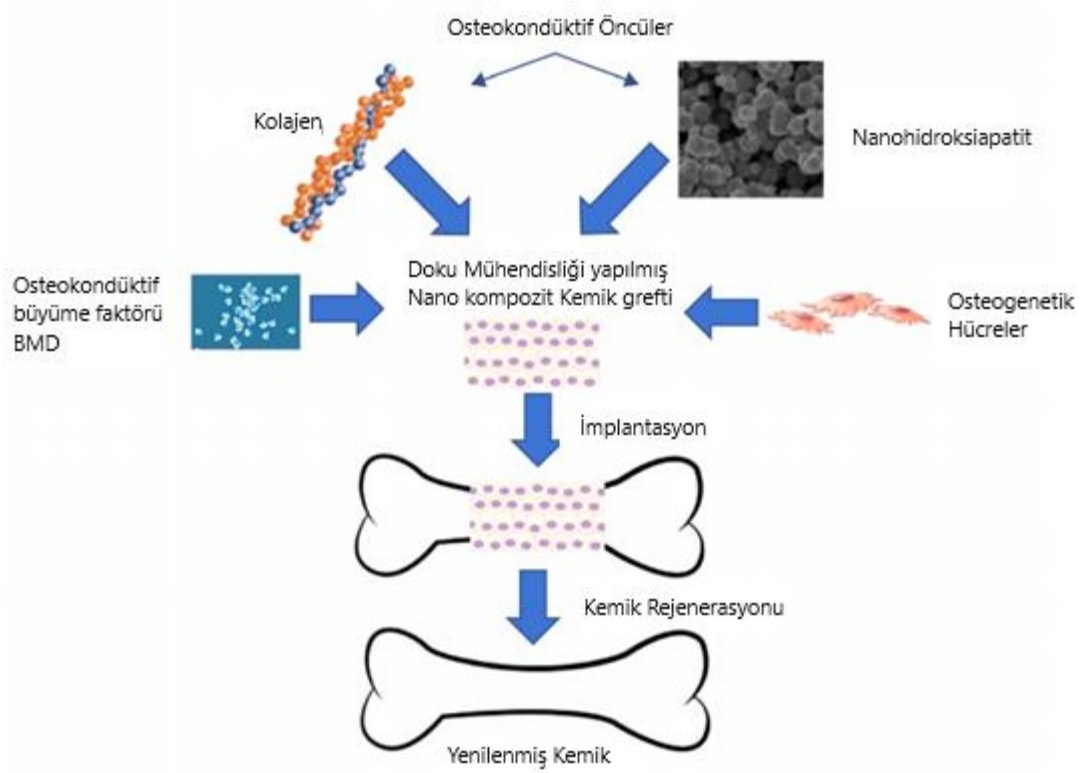
Şekil 2.7.: HA-TiO₂ nanokompozit ile Co-Cr alaşımının daldırma kaplama işleminin şematik gösterimi

HA matrisine heterojen olarak dağılmış genellikle aglomerasyonlardır. Ayrıca kimyasal etkileşim yoktur. nanotüpler ve HA arasında, muhtemelen uygun arayüzey bağının olmamasından dolayı, bu nanokompozit kaplamanın yapı bütünlüğü geleneksel yöntemle yakın değildir

2.4.2.2 Doku mühendisliği yöntemi

Doku mühendisliği yaygın bir yöntem olarak bilinir. Bu yöntemle geliştirilen biyolojik ikame doku işlevini iyileştirip, sürdürür ve eski haline getirir. [104]. İçinde kemik dokusu bulunan iskele implantından önce vücut, hastadan belirli bir hücre olmak üzere izole edilir. iskele üzerinde hücre kültürü yapılmıştır. Üç hayati faktör olan hücreler, iskele ve hücre matrisi etkileşimi dahil kemik dokusu mühendisliğinin başarı oranını belirler [106]. İskele, hücrelerin yerleştirilmesinde kritik bir role sahiptir. İçinde belirli dokunun oluşum süreci, hücrelerin çoğalma, göç ve farklılaşmasını sağlar.[107]. Kemik dokusu mühendisliği, osteojenik osteokondüktif iskeleli ve osteoindüktif hücreler

kemik aşılmasını oluşturan olası büyüme faktörlerini barındırır. [6]. (Şekil 2.8'de gösterilmiştir.)



Şekil 2.8.: Doku mühendisliği yapılmış nanokompozit kemik grefti tasarım stratejisi [6]

HA'nın osteokondüktivitesi nedeniyle, kemik dokusu mühendisliği için iskele matrisi olarak kullanılır. Bununla birlikte, kolajen gibi biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerin düşük biyolojik bozunabilirlik ve osteokondüksiyon eksikliği HA'nın üstesinden gelebilecek bir kompozit yapmak için kullanılır. Çalışmalar HA / kolajen nanokompozit matrisinin umut verici olduğunu gösterir. Araştırmalar gösteriyor ki ideal bir kemik aşılama işlemi osteokondüktif matrisi içerir. Osteojenik hücreler ve benzer büyüme faktörü ile kompozisyon, yapı, fizyokimyasal, mekanik ve doğal kemiğin biyolojik özelliğini içerir. Son günlerde, kemik dokusunda nanokompozitin yüzey gerçeğe dönüştürülmesi büyük ilgi gördü. Bir çalışmada Gentile ve ark. işlevselleştirilmiş gözenekli ve erken uyarıcı membran geliştirildi. Katman yüzeyini değiştirmek için katman montajı uygulandı. Poli (lactico-) bazlı osteokondüktif elektrospun glikolik asit ve nanohidroksiapatit, kullanarak ve poli (sodyum 4-stirensülfonat) polielektrolitler olarak yüzey değiştirildi. Karakterizasyonlar taramalı elektron mikroskobu, kızılötesi

spektroskopi ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi başarılı olduğunu doğruladı. Ek olarak, peptid birleşmesi iyi canlılık ile gelişmiş hücresel süreçler ve alkalın fosfataz aktivitesinde önemli artış gözlenirken, osteopontin ve osteokalsin işlevselleştirilmiş membran implantasyondan sonra olumlu bir in vivo tepkiye neden oldu.

2.4.2.3 Biyomimetik yöntem

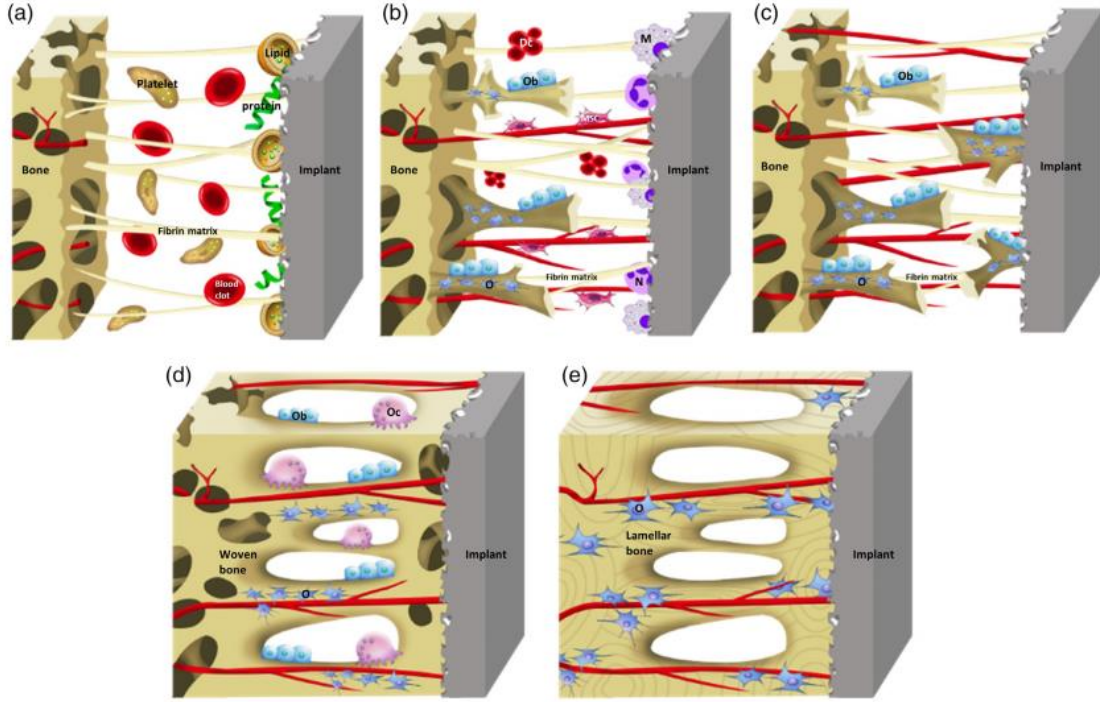
Biyomimetik yöntem kısmen veya tamamen, biyolojik mekanizmayı taklit eder veya ilham verir denilebilir. Geleneksel yöntemlere göre daha faydalı olan fabrikasyon yöntemi için biyomimetik yöntem doğaya dayalı nanokompozit kemik aşılama stratejileri büyük ilgi gördü. Bu yöntem aşağı yukarıya bir yaklaşım, tasarım ve sentezle başlar doğal olarak kendiliğinden birleşebilen veya kendi kendine organize olabilen moleküllerin daha yüksek bir mikro ölçek veya makro ölçekte devam ederek nanokompozit aşılama geliştilmesini sağlar. Doğal kemiğin yapı bakımından bazı özellikleri ve biyomimetik kendi kendine montaj yoluyla kompozisyonu muhtemelen doğal süreci taklit eder.

Bu yöntemde bir nanokompozit implantasyondan sonra biyomineralizasyonu simüle eden kemik uygulamaları için potansiyel bir aday olarak kabul edilir [112,113]. Şekil 8, şematik olarak çekirdeklenmeyi göstermektedir. Kontrollü bir ortamda kollajen üzerinde kristal HA büyümesi ve biyolojik fenomeni taklit ederek, bu işlem kemik rejenerasyonu için uygun bir sistem sağlar. Saf HA ile karşılaştırıldığında daha yüksek osteokondüktiviteye sahip olduğu görülür.

2.5. Osseoentegrasyon Süreci

Osseoentegrasyon, implant yüzeyinin özelliklerinin önemli bir rol oynadığı bir dizi kademeli yanıt içeren dinamik bir süreçtir (Şekil 1). İmplantların etrafındaki kemik iyileşmesi bir dizi hücresel ve hücre dışı biyolojik olayları içerir. (Mavrogenis, Dimitriou, Parvizi, & Babis, 2009). İmplant vücuda yerleştirilir yerleştirilmez meydana gelen ve bir kan pıhtısı oluşturan büyüme faktörleri ve sitokinler gibi çeşitli proteinlerin salınmasına yol açar. (Lotz, Berger, Schwartz ve Boyan, 2018; Terheyden, Lang, Bierbaum ve Stadlinger, 2012). Birkaç dakika içinde, proteinler ve lipidler, implant yüzeyi tarafından kan pıhtısından emilecektir. Yüzeyde kaplı bu proteinler, hücre göçü ve proliferasyonu için bir sinyal görevi görebilir (Rivera-Chacon ve diğerleri, 2013). Spesifik protein türleri ve yapışma sertliği, büyük ölçüde topografik özellikler, pürüzlülük ve hidrofilitiklik gibi implant yüzeyinin özelliklerine bağlıdır (Boyan, Lotz ve Schwartz, 2017; Gittens, OlivaresNavarrete, Schwartz ve Boyan, 2014; Pegueroles, Tonda-Turo, Planell, Gil ve

Aparicio, 2012; Wang ve diğeri, 2016). Sonuç olarak, kan trombositleri, hücre göçü ve bağlanması için "köprü" görevi gören fibrin matrisinin oluşumunu kolaylaştırır (Marx, 2004; Mavrogenis ve diğeri, 2009). İmplantın yerleştirilmesinden toplam 2-3 gün sonra, makrofajlar ve nötrofiller implantlara "köprü" vasıtasıyla yapışarak patojenleri ve nekrotik dokuyu uzaklaştırır yeni kan damarlarına yer açmak için kan pıhtısını ayrıştırır (Caplan & Dennis, 2006; Davies, 2003). 4 gün sonra, damar yapısı etrafında toplanan farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) ile implant ve konak kemik arasındaki boşlukta anjiyogenez (kan damarlarının oluşumu) meydana gelir. Büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etkisi altında, MSC'ler, hücre dışı matriksi üretebilen ve olgunlaşmamış örülmüş kemik oluşturabilen osteoblastlara ayrılır (Berglundh, Abrahamsson, Lang ve Lindhe, 2003; Meyer ve diğeri, 2004). Bununla birlikte, MSC'ler ayrıca implant yüzeyinde fibröz bir zar oluşumunu uyarabilen ve kemik büyümesi sürecini engelleyebilen fibroblastlara da ayrılabilir (Razzouk & Schoor, 2012). Yüzey özelliklerinden ve çevresindeki hücre iletişiminden etkilenir (Boyan, Cheng, Olivares-Navarrete ve Schwartz, 2016; Ma ve diğeri, 2018). Örülmüş kemik oluşumu, implantasyondan 1-2 hafta sonra devam eder. MSC'lerin hareketi fibrin köprüsü tarafından yönlendirildiğinden, MSC'lerin bağlı kaldığı iki tür osteogenez vardır. Temaslı osteogenez, doğrudan implant yüzeyinde başlayan kemik oluşumu olarak tanımlanır. Öte yandan implantı çevreleyen kemiklerde veya dokularda lifli protein köprüsü yoluyla implant yüzeyine göç edebilen mesafe osteogenezi ortaya çıkar (Davies, 1996; Osborn ve Newsely, 1980). Choi ve arkadaşları. iki osteogenez işleminin etkileşimli olarak hareket ettiği ve İmplantasyondan sonra mesafe osteogenezine maruz kalan kemiğin, temas osteogenezini sebep olan sinyaller verebildiğini kanıtlamışlardır. (Choi, Sim ve Yeo, 2017). 2 hafta sonra, kemik-implant boşluğu yenidoğan dokuya kemik ile doldurulur ve sonraki osseointegrasyon prosedürü kemik ekleme ve yeniden şekillendirmedir. Bu işlem sırasında, osteoklastlar mikro çatlakları ortadan kaldırmak ve lameller kemiğin yüzeyini optimize etmek için yeni oluşan kemiği yeniden emer (Mulari, Qu, Härkönen, & Väänänen, 2004). Osteoklastlar bir sızdırmazlık bölgesi oluşturur ve biyokimyasal bilgileri içeren çeşitli mikrotopografi ve nanotopografi oluşturur, bu da osteoblastların yeni kemik oluşumuna ihtiyaç duyan konumu bulmasına yol açar (Minkin & Marinho, 1999). Osteoklastlar ve osteoblastlar uyumlu bir şekilde işbirliği yaparlar ve kırılğan geçici örülmüş kemik, kademeli olarak paralel fiber kemiğe ve ardından lamelli kemiğe dönüşür. Bu dinamik süreç, uzun süreli katılma (sabitleşme) için gerekli olan 1 yıl veya daha uzun süre sürekli olarak mevcuttur.



Şekil 2.9.: İmplantlarda osteoentegrasyon sürecinin şematik gösterimi (a). Anjiyogenez ve dokuma kemik oluşumu (b). Mesafe osteojenez ve temas osteojenez (c). Yeni oluşan dokuma kemikler boşluğu doldurur ve kemiğin yeniden oluşumunu sağlar(d). Dokuma kemikler katmanlı kemiklere dönüşür (e). Dc, parçalanmış pıhtı; M, makrofaj ; MSC, mezenkimal kök hücre; N, nötrofil; O, osteosit; Ob, osteoblast; Oc, osteoklast.

2.6. Osseoentegrasyon İçin Kullanılan Malzemeler

Ortopedik implantlar için malzemeler on yıl içinde önemli bir ilerleme kaydetmiştir. İmalat için kullanılan malzemelerin doğasına bağlı olarak, şu anda mevcut olan implantlar kabaca dört gruba ayrılabilir: metaller, seramikler, polimerler ve hibritler (Tablo 1). Ev sahibi kemikleriyle benzer mekanik özelliklere sahip malzemelerin kemik büyümesinin miktarını ve hızını artırabileceği gösterilmiştir (Mukherjee ve Gupta, 2017; Samira ve diğerleri, 2015).

2.6.1. Metaller

Metaller ve alaşımlar uzun yıllardır kullanılmaktadır ve biyomekanik özelliklerinden dolayı ortopedik cerrahilerde hala en önemli yeri işgal etmektedir. Son zamanlarda, osseoentegrasyon sürecini kolaylaştırabilecek birçok biyoaktif metal türü, ortopedik araştırmalarda artan bir merak uyandırdı.

2.6.1.1. Titanyum ve titanyum alaşımı

Titanyumun (Ti), Bothe ve diğerleri tarafından kemikle kaynaşma potansiyeline sahip olduğu tespit edildiğinden beri implantlar için tercih edilen malzeme haline gelmiştir. 1940'ta (Bothe, 1940). Titanyum, yüksek mukavemet, korozyon direnci, dşuk elastisite modülü ve doğal mineral birikintilerindeki bol miktar gibi mkemmek mekanik özellikleri sayesinde, şu anda dünyada yük taşıyıcı implantlar için en yaygın kullanılan ticari malzemedir (Geetha, Singh, Asokamani ve Gogia, 2009; Shen ve Brinson, 2011; Xue, Krishna, Bandyopadhyay ve Bose, 2007). Ticari olarak saf Ti (CpTi), oksijen içeriğinin artmasıyla birlikte dört farklı derece sergiler: Derece I, Derece II, Derece III ve Derece IV Nitrojen, karbon, demir ve hidrojen gibi diğer elementler de artar, ancak sınıflar arasında çok fazla değişiklik göstermez (Lautenschlager & Monaghan, 1993). Bileşimin bu kk değişiklikleri, saf Titanyumun mekanik özelliklerini Derece I'den Derece IV'e önemli lde geliştirir (McCracken, 1999). Saf Titanyum üzerinde kararlı bir oksit tabakasının oluşununun, CpTi biyouyumluluğundan ve korozyon direnci yeteneğini geliştirmesinden sorumlu olduğu kanıtlanmıştır (Saini, Singh, Arora, Arora ve Jain, 2015; Tiainen, Wohlfahrt, Verket, Lyngstadaas, & Haugen, 2012). Bununla birlikte, Titanyumun oyulmasını (kesilmesini) zorlaştırır. Günümüzde daha yüksek gözenekli yapı ve daha iyi plastiklik (esneklik) için titanyum alaşımları piyasaya srlmştir. Ti₆Al₄V (titanium; % 6 alüminyum; % 4 vanadyum) tüm Titanyum alaşımları arasında en önemli konuma sahiptir. Alüminyum alaşımının mukavemetini artırıp aynı zamanda yoğunluğunu azaltabilirken, vanadyum alüminyumun korozyona uğramasını önleyebilir (Roach, 2007).

2.6.1.2. Tantal

Tantal (Ta), son derece yüksek erime noktasına (3,017 C) sahip, oldukça durağan ve korozyona dayanıklı bir malzemedir. Titanyumdan farklı olarak Tantal, ısıya ve elektriğe karşı oldukça iletkendir ve Titanyumdan daha biyolojik olarak uyumlu olduğu kanıtlanmıştır (Cachinho & Correia, 2008). Tantal yüzeyindeki oksidasyon reaksiyonu, osteoblastların yapışmasını, proliferasyonunu ve farklılaşmasını kolaylaştırır ve yaygın olarak kullanılan Ti₆Al₄V'den daha mükemmeldir (Miyaza ve diğerleri, 2002; Stiehler ve diğerleri, 2008). Bu nedenle Tantal hızlı ve uzun süreli fiksasyonu nedeniyle revizyon kalça eklemi artroplastisinde asetabular yeniden yapılanması için temel bir bileşen olarak ortaya çıkmıştır (Issack, 2013; Paprosky, Perona ve Lawrence, 1994). Tantal ayrıca oldukça gözenekli implant üretiminde kullanılır. Yüksek hacimsel gözenekliliği

nedeniyle Tantal, trabeküler metal olarak bilinir. Gözenekli Tantalın elastik modülü, subkondral kemiğe benzer, bu da stresi azaltmada ve mevcut kemiği korumada ona yardımcı olur. (Meneghini, Ford, McCollough, Hanssen ve Lewallen, 2010). Aynı zamanda, yüksek sürtünme katsayısı, gözenekli Tantal geleneksel çimentosuz protezlerden daha üstün bir başlangıç stabilitesi sergilemesini sağlar (Meneghini, Meyer, Buckley, Hanssen ve Lewallen, 2010). Bununla birlikte, oldukça gözenekli tantal yapısı o kadar incedir ki, doğru iç topografya üretmek zordur (Zardiackas ve diğerleri, 2001). Dahası, depolamada, arıtma ve fabrikasyonda yüksek maliyetler, geniş uygulama yelpazesini engeller. Sonuç olarak, Tantal sürekli olarak bir toz olarak üretilir ve diğer implantların yüzeyleri kaplanır, bu da tatmin edici sonuçlar elde edilmesini sağlar. (Shi et al., 2017; Zhou, Hu ve Lin, 2018).

Tip	İmplant Malzemeleri	Avantajları	Dezavantajları	Ref.
Metal esaslı	Titanyum	Mükemmel mekanik özellikler ;Biyouyumluluk	Alerjik Reaksiyonlar	Takemoto et al. (2005)
	Titanyum alaşımları			
	Tantal	plastikler;Korozyon direnci biyoyumluluk; Yüksek sürtünme katsayısı	Nadir ve Pahalı	Niinomi (1998) Wang et al.(2016)
	Kobalt-Krom alaşımları	Korozyon direnci ;Kararlı.	Kırılğan	Roach (2007)
Seramik esaslı	Zirkonyum (ZrO ₂)	Biyoyumluluk ;Korozyon ve çizilme direnci ;Neredeyse hiç alerjik reaksiyona neden olmaz	Yaşlanma	Sivaraman,Chopra,Narayan and Balakrishnan (2018)
	Alümina (Al ₂ O ₃)	Yüksek mekanik dayanımı;Sertlik	Biyoinert	Camilo et al. (2017)
Polimer esaslı	Polieterketon (PEEK)	Kemiklere benzer elastik modül;plastikler	Biyoinert; Anti bakteriyel aktivite eksikliği	Mishra and Chowdhary (2019)

Çizelge 2.4: Yaygın olarak kullanılan malzemelerin sınıflandırılması ve özellikleri

2.6.1.3. Kobalt-krom alaşımı

Kobalt-krom (CoCr) alaşımı, yüksek aşınma ve korozyon direnci nedeniyle (metal üzeri metal (MoM)) Toplam Kalça Artroplastisinde (THA) yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda mükemmel bir malzeme tokluğu ve akma mukavemeti, süneklik ve sertlik kombinasyonuna sahip olduğu bulunmuştur (Navarro, Michiardi, Castaño ve Planell, 2008). Kobalt, alaşımın gücünü artırırken krom, korozyon direncini artıran bir bileşendir (Camilo ve diğerleri, 2017). Bununla birlikte, % 30'dan fazla krom eklemek, bu alaşımın dökülmesini zorlaştırır ve kırılğan bir faza neden olur. (Christian, Oliver, Paustenbach, Kreider ve Finley, 2014). Sonuç olarak, MoM implantları oluşturmak için kullanılan CoCr alaşımları düzenli olarak ~% 64 Co, ~% 28 Cr ve az miktarda diğer metaller içerir:

(molibden, alüminyum, nikel, manganez, demir ve lantan.) Viennot vd. CoCr alaşımlarının yalnızca yüksek korozyon direnci sergilediğini değil, aynı zamanda çoklu dökümlerden sonra elektrokimyasal olarak eşdeğer olduklarını da göstermiştir (Viennot, Dalard, Lissac, & Grosgeat, 2005). Bununla birlikte, CoCr'nin osseoentegrasyon ve biyouyumluluğunun genellikle Titanyum alaşımlarından daha düşük olduğu kabul edilir. (Jakobsen, Baas, Jakobsen ve Soballe, 2010). CoCr alaşımlarıyla ilgili bir başka sorun da, biyomalzemelerin bozunmasının, alerjik reaksiyonlara ve sitotoksiteye neden olabilecek bol miktarda nano boyutta partikül üretmesidir. (Learmonth, Gheduzzi ve Vail, 2006). MoM CoCr implantları olan hastaların tipik olarak yüksek kan Co ve Cr konsantrasyonlarına sahip olduğu bildirilmektedir. (Engh Jr ve diğerleri, 2009). Ancak parçacıklar ve komplikasyonlar arasındaki biyolojik ilişki tam olarak değerlendirilmemiştir ve Christian ve arkadaşları. MoM implant hastalarının kan ve dokusundaki Co / Cr konsantrasyonlarının sistemik hastalık riskini artıramayacak kadar düşük olduğunu öne sürmüştür. (Christian ve diğerleri, 2014). Seramik, katı parçacıkların yüksek sıcaklıkta kalıba basılmasıyla ve sıkıştırılmasıyla üretilen inorganik bir malzemedir. 1970'lerde ilk uygulamasından bu yana mekanik özellikleri açısından önemli ölçüde iyileştirilmiştir (Sedel, 2000). Aşınma döküntülerini ve alerjik reaksiyonu çok az olduğundan, seramik klinik uygulamada uyluk başı ve asetabular astar olarak yaygın şekilde üretilir. Zirkonyumun oksit formu olan Zirkonya (ZrO_2), 1969'dan beri biyomedikal implant olarak kabul edilen bir seramiktir (Hulbert, Klawitte ve Bowman, 1972). ZrO_2 seramikleri, enkaz (döküntü) parçacıklarının neden olduğu aseptik gevşemeyi azaltmak için üstün aşınma ve çizilme direnci sergiledikleri için, total kalça protezinde uyluk bileşen başları olarak kullanılmaktadır. (Clarke ve diğerleri, 2003). Bunun yanında, ZrO_2 'nin oldukça biyouyumlu olduğu ve insanlarda neredeyse hiç alerjik reaksiyona neden olmadığı bildirilmektedir. (Christel ve diğerleri, 1988). Beyaz diş benzeri rengi ve estetik görünümü sayesinde ZrO_2 , diş hekimliğinde umut verici bir alternatif implant olarak ortaya çıkmaktadır. (Mishra ve Chowdhary, 2019). ZrO_2 'nin sıcaklığa bağlı olarak üç farklı kristalografik duruma sahip olduğu iyi bilinmektedir. Saf ZrO_2 ortam sıcaklığı 1170 C'ye çıktığında tetragonal (T) monoklinik (M), halbuki T 2370 C'de kübik (C) dönüşür. (Brett, 1981). T fazı, en yüksek mukavemete sahip yarı kararlı bir fazdır. T'den M'ye (T – M) faz dönüşümü, çatlakların yayılmasına direnen% 3–4'lük bir hacim genişlemesi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, bu avantaj, T büyük ölçüde M'ye dönüştüğünde kaybolacaktır. Faz dönüşümü nihayetinde çatlak oluşumunu artırabilir ve klinik implantlar için açıkça istenmeyen bir durum olan yüzey sertliğini

azaltabilir. (Catledge ve diğeri, 2003). Ağır nem ve stres ortamında, ZrO_2 seramikleri, malzemenin "eskimesi" olarak bilinen T fazının M fazına artan bir dönüşümüne uğrar. (Catledge ve diğeri, 2003; Lughı ve Sergo, 2010). Bu olguyu önlemek veya geciktirmek amacıyla, T fazlarını stabilize etmek için ZrO_2 'ye çeşitli oksitler eklenir. (Lakusta ve diğeri, 2018). Şu anda, 3 % itriyum oksit (itriya) -stabilize edilmiş ZrO_2 (Y-TZP), neredeyse% 100 T mikroyapısı nedeniyle tercih edilen seramiktir. (Kelly ve Denry, 2008). Alümina olarak da adlandırılan alüminyum oksit (Al_2O_3), alüminyum oksit tozundan elde edilen ve çok yüksek bir sıcaklıkta implantlar halinde imal edilen bir tür polikristalin seramiktir. Al_2O_3 , 1971'den beri Boutin tarafından total kalça protezinde kullanılmıştır. (Boutin, 1971). ZrO_2 'den farklı olarak, Al_2O_3 çok kararlı ve kimyasal olarak atıl bir malzemedir ve kimyasal olarak stabilize edilmesine gerek yoktur. Desai vd. Al_2O_3 'ün düşük elektrik iletkenliği ve ısıl iletkenliğinin temel olarak Al^{3+} ve O^{2-} arasındaki sağlam iyonik ve kovalent kimyasal bağlardan kaynaklandığını açıklamıştır (Desai, Wu, Rohlfing ve Wang, 1997). Al_2O_3 'ün son derece sert ve çizilme direnci gösteren, düşük sürtünme katsayısına ve yüksek seviyede sertliğe sahip bir malzeme olduğu kabul edilmektedir. Al_2O_3 'ün ıslatılabilir ve hidrofilik özellikleri, yağlama işleminde önemli bir rol oynar ve geniş çaplı uyluk başlarının imal edilmesini mümkün kılar. Al_2O_3 'ün en büyük dezavantajları, protez yerleştirme sırasında kırılabilirlik ve ufalanmadır. Gıcırdama oranı, hasta fonksiyonunu etkilemese de hastaları rahatsız eden bir diğer sorundur (Tai ve ark. 2015). Bunun yanında Al_2O_3 atıl olduğu ve osteojenik potansiyel sergilediği kabul edilir. Al_2O_3 implante edildiğinde çoğunlukla fibroblastlardan oluşan bir lifli zarın indüklenmesi ile elde edilir. (Gibon ve ark., 2017).

2.6.2. Polimerler

Polimer bazlı implantlar, düşük elastik modül, biyouyumluluk ve kırılmaya karşı daha yüksek uzama gibi mükemmel özellikler sağlar. Polimerler artık çoğunlukla ortopedik implantlarda vida veya kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır ve polimerlerden yapılan eklem protezi daha fazla bilimsel ilgi gerektirir. Polieterketon Polietereterketon (PEEK), bisfenolatların aşamalı büyüme alkilasyon reaksiyonundan üretilen yarı kristalli bir termoplastik malzemedir. PEEK, 1990'larda AcroMed tarafından ilk kez piyasaya sürüldüğünden beri, kimyasal direnci, mekanik özellikleri ve görüntüleme özellikleri nedeniyle omurga, ortopedi ve artroskopi cerrahisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kurtz ve Devine, 2007; Uzumcugil, Yalçınkaya, Öztürkmen, Dikmen, & Caniklioğlu, 2012). PEEK'in esneklik modülü 3.6 GPa'dır ve karbon lifleri ile güçlendirilerek 18

GPa'ya yükseltilebilir, bu da Titanyum alaşımlarından (~ 110 GPa) kortikal kemiğe (18 GPa) daha yakın olmasına yol açar (Ponnappan et al. , 2009; Ramakrishna, Mayer, Wintermantel ve Leong, 2001). Bu, gerilim korumasını azaltma potansiyeli sağlar. PEEK, radyolüseni nedeniyle X-ışını, CT taraması ve MRI, Ti ile çelişerek görüntülenebilir, bu da postoperatif osseoentegrasyon sürecini tam olarak değerlendirmeyi mümkün kılar (Ponnappan ve ark., 2009). Birçok polimere benzer şekilde PEEK, otoklavlama ile tekrar tekrar sterilize edilebilir ve bireysel uygulamaya uyum sağlamak için işleme ve ısı şekillendirme ile karmaşık şekillerde üretilebilir (Abu Bakar, Cheang ve Khor, 2003). Tüm bu avantajlara rağmen, bazı çalışmalar PEEK'in biyo inert ve pürüzsüz yüzeyinin osseoentegrasyonu engellediğini ve lifli enkapsülasyon oluşumunu tetiklediğini göstermiştir (Najeeb, BDS, BDS ve BDS, 2016). Ayrıca PEEK'in yüzeyde antibakteriyel aktivitesi yoktur, ve kaplama malzemelerinin ayrılması bazen iltihaplanma ve osteoliz ile sonuçlanır (Campoccia, Montanaro ve Arciola, 2006). Bu nedenle, bu dezavantajların üstesinden gelmek için PEEK'in implant yüzeyinin uygun şekilde kaplanması ve modifikasyonunun geliştirilmesi, gelecekte bir odak noktası olarak görünmektedir.

2.7. Yüzey Modifikasyon Teknikleri

Osseoentegrasyon için çok önemli olan implant yüzeyinin özelliklerinin çevre ortamını etkileyebileceği çok sayıda çalışma ile kanıtlanmıştır (Huanhuan, Pengjie, Sheng, Binchen ve Li, 2017; Kang, Jeong, Huh, Park ve Cho , 2018; Kargupta ve diğerleri, 2014). Modifikasyon teknikleri, yüzey pürüzlülüğünü artırmak, konakçı kemik yapısını fiziksel olarak taklit etmek ve implantların biyouyumluluğunu iyileştirmek amacıyla sürekli gelişme ve evrim geçirmiştir. Bu modifikasyon teknikleri, yüzeye getirilen özelliklere bağlı olarak üç kategoriye ayrılabilir: fiziksel, kimyasal ve biyolojik (Tablo 2). Bu teknikler, tek tek veya kombinasyon halinde kullanılabilir. Her methodun kendine özgü avantajları ve sınırlamaları vardır. İmplant materyallerinin, uygulama durumları ve üretim prosedürleri açısından uygun bir yöntemin seçilmesi esastır.

2.7.1. Fiziksel teknikler

Fiziksel yüzey modifikasyonu, osseoentegrasyon için elverişli bir ortam yaratmak amacıyla implant yüzeyinin topografyasını veya morfolojisini değiştirmek için kuru dönüşüm teknolojilerini kullanır. Şu anda, yaygın olarak kullanılan ve etkili fiziksel

teknikler arasında kum püskürtme, eklemeli üretim (AM), buhar biriktirme, plazma püskürtme vb. vardır.

2.7.1.1. Kum püskürtme

Kum püskürtme, aşındırıcı partikülleri kum, alümina, hidroksiapatit, TiO_2) basınçlı hava aracılığıyla basınç uygulayan projeksiyon yoluyla implant yüzeyine zorlayan tipik fiziksel yüzey modifikasyon tekniklerinden biridir. Kum püskürtme, genellikle yüzeyi pürüzlendirmek ve böylece hücre yapışmasını kolaylaştırmak için kullanılan bir tür basit ve düşük maliyetli tekniktir. Yüzeyin topografyası ve pürüzlülüğü esas olarak uygulanan parçacıkların boyutuna, şekline ve özelliklerine bağlıdır. Köpeklerde kum püskürtmeli implantların mekanik ve histolojik farklılıklarını değerlendirmiş ve kum püskürtmenin yapın (sade) implantların kullanımını kolaylaştırdığını göstermiştir (Abe, Nishimura ve Izumisawa, 2008). Kum püskürtme işleminin ardından asitle aşındırma, artık parçacıkların temizlenmesine yardımcı olabilir. Herrero-Climate ve diğerleri. kum püskürtme ve asit aşındırma kombinasyonunun farklı implantasyon prosedürlerinde osteogenez sürecini hızlandırdığını bildirmişlerdir (Herrero-Cstitution ve ark., 2013). Kum püskürtmenin dezavantajı, imal edilmiş pürüzlü yüzeyin aynı zamanda bakterilerin bağlanmasını da destekleyebilmesidir (Jemat, Ghazali, et al., 2015).

2.7.1.2. Katmanlı (Eklemeli) üretim

3D baskı veya hızlı prototipleme olarak bilinen AM, mikrometre veya nanometre ölçeğinde karmaşık 3D yapılar oluşturma yeteneğine sahip yükselen bir teknolojidir. AM, seçici lazer eritme ve elektron ışını eritmesinin çoğunlukla yaygın olduğu, katman katman üretim süreçleri grubudur. AM prosedürü, bilgisayar destekli tasarım yoluyla 3D nesne modelinin oluşturulmasıyla başlar. Bu 3D model dosyası, standart bir üçgen dil (stereolitografi, STL) formatı olarak kaydedilir ve bir dilimleme algoritması kullanılarak üretim platformuna paralel 2D katmanlara dilimlenir. Son olarak, ince bir metalik toz katmanı, güçlü enerji (farklı tekniklere göre lazer ışını veya elektron ışını) ile eritilecek ve STL dosyalarının ardından katman katman bir işleme 3 boyutlu bir yapıya dönüştürülecektir. AM'nin avantajları aşağıdaki gibidir: (a) bu teknoloji teorik olarak, toz halinde mevcut olduğu sürece işlenmesi zor olan herhangi bir malzeme ile ilgilenebilir; (b) AM, bireysel bir hasta için özelleştirilmiş, karmaşık ve kesin şekiller oluşturabilir; (c) tasarımdan imalata kadar karmaşık olmayan bir süreçtir enerji ve malzeme israfını azaltabilir. Slots vd. implantların klinik olarak ilgili mekanik mukavemete ve saf

kimyasal karaktere sahip hızlı bir AM geçirdiğini kanıtladılar (Slots ve diğerleri, 2017). Bu arada, MSC'lerin yapışmasına, kollajen birikmesine ve alkalın fosfataz (ALP) salgılanmasına katkıda bulundular.

2.7.1.3. Plazma püskürtme

Plazma püskürtme (PS), erimiş malzemelerin bir yüzey üzerine kaplandığı termal püskürtme tekniklerinden biridir. Püskürtme işlemi sırasında malzemeler bir plazma püskürtücüsüne yüklenir ve yaklaşık 1.000 C sıcaklıkta eritilir. Daha sonra erimiş malzemeler vakum altında, düşürülmüş veya atmosferik basınç altında bir plazma torçundan (şalomasından) çıkar ve son olarak hızla katılaştır ve bir tortu oluşturur. PS, geniş bir kalınlık aralığında kaplama oluşturabilir (nanometreden birkaç milimetreye kadar). Bu teknoloji ekonomik ve güvenli bir yöntemdir ve kimyasal bileşimler imalat sırasında yüzeyde neredeyse hiç kalmaz (Coelho ve diğerleri, 2012). Birkaç çalışma, PS kaplamaların implantların biyouyumluluğunu artırabileceğini ve osseoentegrasyonu destekleyebileceğini göstermiştir (Stewart, Welter ve Goldberg, 2004; Veerachamy, Hameed, Sen, Dash ve Manivasagam, 2018). Hidroksiapatit (HA) genellikle PS işlemlerinde uygulanır. Vahabzadeh vd. hem stabilitenin hem de kimyanın, Ti implantları üzerindeki plazma püskürtmeli HA kaplamalarıyla in vivo (yaşayan organizma) ve in vitro (canlı olmayan deney ortamında) olarak önemli ölçüde etkilenebileceğini doğruladılar. (Vahabzadeh, Roy, Bandyopadhyay ve Bose, 2015). Ancak püskürtme sırasında HA'nın kristallik kaybı göz ardı edilemez ve daha ileri araştırma çalışmalarını gerektirir (Zyman, Cao ve Zhang, 1993).

2.7.1.4. Fiziksel buhar biriktirme

Fiziksel buhar biriktirme (PVD), buharlaştırıcı malzemeler üreten ve bunları alt tabakaların üzerine kaplayan bir vakum biriktirme stratejileri kategorisini temsil eder. Bu prosedürde malzemeler yoğunlaştırılmış durumdan buhar durumuna dönüştürülür ve sonunda yüzeyde yoğunlaşmış durum biçiminde birikir. Püskürtme, biriktirme, ortopedik ve diş implantlarında en yaygın kullanılan PVD teknolojilerinden biridir. Püskürtme işlemi sırasında iyon bombardımanı, yerel substrat iyonlarını yüzeyden uzaklaştırır ve kaplamalar için yer açar (Feddes ve diğerleri, 2004). PVD, her tür inorganik materyali ve bazı organik materyalleri kullanma yeteneğine sahiptir. Kaplamaların yüzeye kuvvetli yapışması bu yöntemin bir diğer öne çıkan özelliğidir. Shevtsov vd. PVD gümüş kaplamanın gözenekli implantlar üzerindeki etkisini değerlendirir. İn vitro bir çalışma,

gümüş kaplı implantların bakteri büyümesine karşı koruma sağladığını ve kontrol grubuna kıyasla daha fazla anjiyogenezin gözlemlenebileceğini göstermiştir (Shevtsov ve diğerleri, 2019). Zykova vd. magnetronla püskürtülmüş alümina bağ kaplamalarının varlığında Ti alaşımı üzerindeki HA kaplamalarının daha yüksek korozyon direnci ve daha iyi biyouyumluluk sergilediğini kabul etmiştir (Zykova ve diğerleri, 2015).

2.7.2. Kimyasal teknikler

Kimyasal yüzey modifikasyonunun arkasındaki hipotez, kemiğin kendisi ile yabancı madde arasındaki kimyasal benzerlikler nedeniyle kaplama ile kemik arasında kimyasal bir bağ kurma olasılığıdır. (Albrektsson ve Wennerberg, 2019). Kimyasal yüzey modifikasyonu, oksidasyon, karbonizasyon veya nitrürasyon gibi çeşitli kimyasal reaksiyonlarla implant yüzeyinin değişmesine neden olabilir. Gelişmiş kimyasal yüzey modifikasyon teknikleri arasında anodik oksidasyon, asit ve alkali muamelesi, kimyasal buhar biriktirme ve sol-jel biriktirme bulunur.

2.7.2.1. Anodik oksidasyon

Anodik oksidasyon (anodizasyon), bir elektrolit banyosuna daldırılırken anot metal implantların yüzeyine oksit filminin uygulandığı hızlandırılmış bir elektrokimyasal işlemdir. Anodik oksidasyon, vidalı implantların korozyon direncini arttırmak için bir tür teknolojidir. Bununla birlikte, gelişmiş voltaj, konsantrasyon ve sıcaklık kontrolü sayesinde, artık normalde TiO₂ katmanının kalınlığını artırmak ve titanyum implant yüzeylerinde kontrol edilebilir nano yapılar üretmek için kullanılmaktadır. Anodik oksidasyon ile oluşturulan yüzeylerin nanometre özellikleri, biyoaktiviteyi önemli ölçüde iyileştirir ve Ti implantlarının osseoentegrasyonunu destekler (Hall ve diğerleri, 2017). Ti implantların anodik oksidasyonu, oksit filmin kristal yapısını ve kimyasal bileşimini değiştirerek implantlara hücre yanıtını büyük ölçüde etkiler (Krasicka-Cydzik, 2004). Wang vd. Ti alaşımlarının farklı voltajlarda (60 V'ta sarı ve 65 V'de pembe) anotlandığında farklı renkler sergilediğini ve bu teknolojinin tane oluşumunu, pürüzlülüğü ve hidrofiliği artırdığını bildirmişlerdir (Wang vd., 2019). Yamada vd. Ti yüzeyini değiştirmek için anodik oksidasyon ve kumlamayı birleştirdi ve erken evre osseoentegrasyonun gücünü artırdığını gösterdi (Yamada ve diğerleri, 2013).

2.7.2.2. Sol-jel

Sol-jel, çözelti-jelleştirme ve ısıtma işlemiyle bir oksit veya katı bileşik oluşturan bir teknolojiyi ifade eder. Bu prosedürde, organik veya inorganik bileşikler hidroliz polimerizasyonuna tabi tutulur ve kademeli olarak jel benzeri bir difazik sisteme dönüşen bir koloidal çözeltiye (sol) dönüşür. Daha sonra kalan sıvı, yapıyı küçültecek bir kurutma işlemiyle uzaklaştırılır. Daha sonra, polikondensasyonu desteklemek ve mekanik özellikleri geliştirmek için bir ısıtma işlemi kullanılır. Çözüm, farklı manipülasyonlara bağlı olarak bir seramik veya aerojele dönüştürülebilir. Yaklaşımın avantajlarından biri, kaplamaların kimyasal bileşiminin mükemmel kontrolüne izin veren düşük sıcaklıkta bir teknik olmasıdır. Sol-jel tekniğinin bir diğer önemli özelliği de kaplamaların ilaçlardan oluşabilmesi ve ilaçların kontrollü bir hızla salınmasıdır. Adams vd. öngörülebilir salım kinetiği sergileyen ve bir fare osteomyelit modelinde bakteriyel enfeksiyonu başarıyla tedavi eden Ti alaşımı üzerinde vankomisin içeren bir sol-jel filmi üretti (Adams ve diğerleri, 2009). Ek olarak, farklı kaplama süreçleriyle birleştirilen sol-jel yöntemi, kemik yapısına karşılık gelen çok katmanlı bir hiyerarşiye sahip biyoaktif kaplamalar oluşturabilir (Zemtsova vd., 2017).

2.7.2.3. Kimyasal buhar birikimi

Kimyasal buhar biriktirme (CVD), gaz halindeki öncüllerin ısıtılmış bir yüzeyde kimyasal reaksiyona girdiği ve ince bir katı film oluşturduğu süreçleri ifade eder. PVD'ye benzer olan CVD, buharlaşan malzemelerin biriktirilmesi ve yoğunlaştırılması prosedürünü de içerir. Bununla birlikte, CVD kaplamaları kimyasal bağ ile kaplarken, PVD fiziksel kuvvetlere dayanır. Düzenli olarak, kimyasal reaksiyonun eşlik ettiği yan ürünler, reaksiyon haznesinden gaz akışı ile uzaklaştırılabilir. Bu teknoloji, yarı iletken endüstrisinde ince filmler üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. CVD işleme, hem homojen hem de hiyerarşik yapıda ve kontrol edilebilir kompozisyonda filmler oluşturabilir (Li ve diğerleri, 2013). Son zamanlarda CVD teknolojisi, önemli fiziksel özellikler ve osseoentegrasyon potansiyeli gösteren ucuz, yüksek kaliteli elmas ince filmin üretimini gerçekleştirdi (Metzler vd., 2013; Nistor & May, 2017). Park vd. artan protein adsorpsiyonu, daha yüksek ALP aktiviteleri ve daha yüksek kalsiyum birikimi sergileyen başlatılan CVD yoluyla Ti implant yüzeyinde işlevselleştirilmiş bir polimer nanol tabakası elde etti (Park ve diğerleri, 2015). Biyolojik teknikler dolaylı osteojenez

ile uyarılan yöntemlerin (fiziksel ve kimyasal) aksine, hücre tohumlama ve biyolojik kaplamalar dahil biyolojik teknikler, osteoblast bağlanmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını doğrudan destekler. Fiziksel ve kimyasal teknikler önemli sonuçlar gösterdiğinden, biyolojik teknikler sıklıkla osseoentegrasyonu artırmak için tamamlayıcı bir strateji olarak kullanılır. Gözenekli implant yüzeyine çeşitli hücreler ve proteinler ekilmiştir: kemik iliğinden türetilmiş kök hücreler (BMSC'ler), MSC'ler, embriyonik kök hücreler, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve benzeri (de Peppo ve diğerleri, 2012; Gafni ve diğerleri, 2004; Huang, Kaigler, Rice, Krebsbach ve Mooney, 2005). Biyolojik tekniklerin etkileri, tohumlanan hücrelerin yoğunluğu, konumu, farklılaşma potansiyeli ve alt katman (kaplama ana malzemesi) tasarımı açısından farklılık gösterir (Heng vd., 2011; Schipper, Marra, Zhang, Donnenberg ve Rubin, 2008). Günümüzde, biyolojik tekniklerin sonuçlarını doğrulayan artan sayıda in vivo ve in vitro deneyler yapılmaktadır. Vandrovcova vd. laktoferrin, kolajen tip I fibrillerin yapay hücre dışı matrislerine (ECM'ler) dahil ettiler ve kolajen ve laktoferrin fibrillerini poli (laktik glikolik asit) yüzey üzerine kapladı. Sonuçlar, bu kaplama bileşeninin Saos-2 hücrelerinin yapışmasını, büyümesini ve osteojenik farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir (Vandrovcova ve diğerleri, 2015). Zhang vd. iskeleyi otolog MSC'ler ile tohumladı ve MSC'lerin uygulanmasının, hücresiz iskelelere kıyasla deney grubunda kemik oluşumunu ve mineralizasyonu artırdığını bildirdi (Zhang, Zhang, Wang, Lyu ve Wu, 2017). Biyolojik tekniklerin heyecan verici etkinliğine rağmen, hala çözülmesi gereken bazı sorunlar vardır. Ayrılan hücreler ve proteinler ortam dokusuna veya boşluğa girebilir ve bu da beklenmedik yan etkilere ve lifli zar oluşumuna neden olabilir (Pallu ve diğerleri, 2009). Dahası, biyolojik teknolojilerin birkaç uzun vadeli in vivo denemesi vardır. Eklem üzerine tohumlanan hücrelerin uzun vadeli etkileri ve dönüşüm süreci, özellikle yüksek yük taşıyıcı ortamlarda, daha fazla keşif gerektirir.

2.8. Amaç

İmplant, tıpta pek çok alanda kullanımı olan, vücut içerisine kemik ve eklemler düzeyinde yerleştirilmiş ayrıca vücut içerisinde erimeden kalabilen ve vücut dokularıyla uyumluluk gösteren her türlü malzemeye yapılan genel bir tanımlamadır (plak, vida, endoprotez, çivi, tel, omurga enstrmanı vb.). Biyomalzemeler ise, implant yapımında kullanılan, eksik veya hastalıklı biyolojik yapıların işlev ve eksikliklerini tamamlamak için kullanılan doğal ya da yapay malzemelerdir. Biyomalzeme bilminde çok büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, günümüzde medikal uygulamalarda halen

aşılammış sorunlar vardır. Kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler oluşturmeyen, yani biyouyumlu doğal veya sentetik biyomalzeme temelli implant malzemelerine gereksinim büyüktür. Genellikle implant malzemesi olarak metalik titanyum malzemeler tercih edilmektedir. Titanyum (Ti) implant malzemeleri, vücut içerisinde istenilen mekanik özellikleri karşılayabilmektedirler. Ancak implant kaynaklı enfeksiyon oluşumu ve implant malzemesinin kemikle bütünleşmemesi (Osseoentegrasyon) gibi implant ve canlı doku arasında birtakım uyumsuzluklar oluşması, Ti implantların önemli dezavantajları arasındadır. **“Osseoentegrasyon ve Antibakteriyel Özellikleri Artırılmış Titanyum İmplantların Üretilmesi”** başlıklı çalışmamız; mevcut titanyum ve titanyum alaşımlı kaplamalardaki sorunların çözümü için güçlü bir alternatif oluşturmak, yara iyileşmesi, kemik doku oluşumu ve osseoentegrasyon sürecine katkı sağlamak amacı ile planlanmıştır. Bu plan dahilinde; kondroitin sülfat, mikrobiyal kaynaklı olarak genetik mühendislik yöntemleri kullanılarak üretildi. Altlık malzemesi olarak sert doku implant malzemelerinin üretiminde kullanılan Ti₆Al₄V alloy tercih edildi. Hem vidalı kemik çivilerine hem de 1.0 çaplı Ti₆Al₄V silindirik çubuk üzerine sol-jel tekniği kullanılarak kondroitin sülfatlı kaplamalar yapıldı. Antibakteriyel özelliği artırılmış implant yüzeylerinin implant kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlar ile mücadelede kullanılabileceği ve aynı zamanda mevcut sert dokularla da daha hızlı ve sağlam bağlar kurduğu yapılan *in vivo* deneysel çalışmalarla belirlendi. Çalışma kapsamında; elde edilen anti bakteriyel, biyouyumlu, biyoaktif titanyum implantların biyomedikal diş ve ortopedik implant sektöründe alternatif yeni bir ürün olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar

Kondriotin sülfat yapısı ve yüzey kaplamalarının kimyasal yapısının karakterizasyonu FTIR spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Infrared spektrum analizleri 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında Perkin Elmer marka FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Kondriotin sülfat yapısının saflığının belirlenmesinde Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrumu kullanılmıştır. NMR analizleri Bruker marka 300 mHz NMR spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir.

Kaplanmış ve kaplanmamış Ti alaşım implant yüzey yapıları ve kaplamaların morfolojileri Leo EVO40 marka SEM cihazı ile belirlendi. Yüzeylerin elemental yapısı ve yüzey element haritaları Enerji Dağılım X-Rays (EDX) analizi ile belirlenmiştir. Titanyum implantların yüzey morfolojilerini değerlendirmede ayrıca Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM, XE-100E; Park Systems Corp.) kullanılmıştır. Aynı zamanda implant yüzeyinde kaplama yapısı yüksek duyarlılıktaki optik mikroskop (M-Shot Metallurgical Microscopes) kullanılarak detaylı olarak araştırılmıştır. KS/Sol-Jel kaplı titanyum implant yüzeylerinin sıvı temas açıları SEO – Phoenix 300 Touch Automatic Contact Angle marka analizör ile belirlenmiştir.

3.2. Kondroitin Sülfat Üretimi ve Saflaştırma İşlemleri

Çalışmada kullanılan kondroitin sülfat, mikrobiyal kaynaklı organik bir materyal olup Genetik Mühendislik Yöntemleri kullanılarak üretildi. Kondroitin sülfat üretimi için besiyeri olarak büyüme ve çoğalma evrelerinde, LB (Laura Broth) kullanıldı. 80 mg/L amfisilin içeren agar plağa ekilmiş stoklardan gece kültürü yapılarak çoğaltıldı. Numuneler optik yoğunluk (OD)~0.05 olacak şekilde seyreltilip 80 mg/mL içeren LB besiyerinde 125 mL'lik erlenlere aktarılarak, etüvde 37 °C de ve 220 rpm de 18-24 saat boyunca inkübe edildi. Çalışmanın saflaştırma aşaması, literatüre göre gerçekleştirildi [33]. Takip edilen yöntemde göre elde edilen hücre peleti ve süpernatant hem hücre içinde kalan hem de hücre dışına salınan kondroitinin elde edilebilmesi için kondroitin kaynağı olarak değerlendirildi. Hücre peleti su içine süspansiyon edildikten sonra 15 dk. otoklavlandı ve santrifüjlendi. İşlem sonrasında, her ikisinde %80'lik soğuk etanol de çöktürülerek ve -20 °C de stoklandı. Yönteme göre çöktürme ile elde edilen pelet, tamponda yeniden

süspanse edilerek, yöntemde belirtilen enzimlerle muamele edilip, ikinci bir etanol çöktürmesini takiben filtrasyona tabi tutularak kondroitin eldesi sağlandı. İşlemin devamında elde edilen numuneler, kimyasal yapısının tespiti için, 0,5 mL D₂O (Döteryum oksit)'te çözüldü ve 600 MHz ¹H-NMR'da, 12,3 kHz ve 25 °C koşullarında, referansa karşı (*E.coli* K4 suşundan elde edilen kondroitin) NMR analizi yapıldı. Kondroitin ileri düzeyde saflaştırılmasında HPLC-MS kullanıldı. HPLC-MS işleminden önce kondroitin, pH 7.5, 50 mM amonyum asetat, 2 mM kalsiyum asetatın oluşan tampon içinde çözdürüldü ve kondroitinaz ABC, (25 mM Tris, 500 mM NaCl, 300 mM imidazol tamponundan (pH 7.4) oluşan çözeltinin 5 µL'si içine 20 mU enzim eklenerek oluşturuldu) ile 10 saat boyunca 35 °C'de inkübe edildi. Daha sonra bu karışım, donduruldu. Sonrasında asetik asit ve dimetil sülfoksitin (85:15, v/v) oranında karışımı ile hazırlanan solüsyonun 10 µL'si ile 5 dk. vortekslenildi ve 1 M NaBH₃CN' den 10 µL reaksiyon karışımına eklendi ve 4 saat boyunca 45 °C'de inkübe edildi. HPLC-MS öncesi, yarı yarıya sulandırılmış DMSO kullanılarak, numuneler 0.5-50 ng aralığında farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak analiz edildi. Rekombinant bakteriden KS eldesi ve saflaştırılma işlemi literatüre uygun olarak gerçekleştirildi [52]. Yönteme göre, kondroitin, yeterli miktarda su içinde çözdürüldü ve tamamen çözüldükten sonra, katyon-değiştirme reçinesi ile dolu bir kolona aktarıldı. Kolondan pH 1.5-4.0 aralığında elüsyona tabi tutularak toplandı ve sulu çözeltiye, pH değeri 6.5-7.0 aralığına ulaşmaya kadar tetrametil ilave edildi. Çözelti daha sonra, tuz elde etmek için donduruldu ve yaklaşık 0.76 gram ürün için şu işlem takip edildi: 46 mL dimetil formamid ile 30 °C'de 10 dk. karıştırıldı ve daha sonra 0.72 gr sülfür trioksit pridinyum eklendi ve 30 °C'de 10 dk. reaksiyona tabi tutuldu. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Daha sonra çözelti 30 °C'de 1 saat inkübe edildi. NaHCO₃, %10 ilavesi yapılan çözelti kuruyana kadar 10 mbar vakumlama uygulandı ve NaCl de eritildikten sonra ultrafiltrasyona tabi tutuldu. Çözelti pH'sı 6.7'ye ayarlandıktan sonra diyalize tabi tutuldu ve vakumla 10 mbar'da 45 °C de kurutuldu. Elde edilen ürün 0.2 N NaOH de eritildi ve 2 saat boyunca 40 °C'de karıştırıldı. 0.6 M NaCl ile seyreltilen ürün, önce ultrafiltrasyona sonrasında demineralize su ile diyalize tabi tutuldu. Sentezlenen KS'in analizi HPLC-MS ile yapıldı.

3.3. Titanyum Yüzeylerin Hazırlanması

Altlık malzemesi olarak sert doku implant malzemelerinin üretiminde kullanılan Ti₆Al₄V alloy tercih edildi. Hem vidalı kemik çivilerine hem de 1.0 çaplı Ti₆Al₄V

silindirik çubuk üzerine kaplama yapıldı. Kaplama yapılmadan önce numuneler su, alkol ve aseton ile temizlendi.



Şekil 3.1.: Çalışma kapsamında kullanılan Ti₆Al₄V implant yapıları

3.4. Kondroitin sülfat Yüklü Mikro Kürelerin Üretimi, Karakterizasyonu

Mikroküre üretiminde emülsiyon çapraz bağlama yöntemi kullanıldı. İlk önce 50 mL mineral yağ içerisine 500 µL span 80 eklenerek oda sıcaklığında mekanik karıştırıcı ile 10 dakika boyunca karıştırma işlemi yapıldı. Şırınga yardımıyla hazırlanan polimer/ilâç solüsyonu sabit bir hızda yağ karışımına damlama yöntemi ile eklenmeye başlandı ve 30 dakika boyunca karıştırılarak ilâç yüklü kürelerin üretilmesi sağlandı. Hem oluşan kürelerin mekanik özellikleri arttırmak hem de yüzeylerde -COOH gruplarının oluşturulması sağlamak üzere ortama 125 µL gluteraldehit (GTA) (%25) eklendi. GTA ortalama eklendikten sonra karıştırma işlemine 2 saat devam edildi ve kondroitin sülfat eklenerek karışım 60 °C etüv içerisinde 2 saat tutularak çözücünün ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Kürelerden yağın uzaklaştırılması için küreler hegzan ile 4000 rpm değerinde 3 defa 5 dk lık sürelerde yıkandı ve oda sıcaklığında kuruma işlemine bırakıldı. Mikrokürelerin üretilmesi ve ilâçla yüklenmesi aşamasında küre boyutları ve ilâç yükleme kapasiteleri üzerine optimizasyon çalışmaları da yapıldı.

Bu amaçla;

1. Yağ/sıvı karışımı farklı karıştırma hızlarında (200-600 rpm) karıştırıldı ve karıştırma hızının küre boyutu üzerine etkisi ortaya konuldu. Küre boyutlarının belirlenmesinde ışık mikroskobu kullanıldı.

2. Farklı kondroitin sülfat konsantrasyonları kullanılarak kürelerin maksimum ilaç yükleme kapasiteleri ve tutuklama verimliliği aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak ve kürelere en fazla yüklenebilecek miktar belirlendi. Bunun için yıkama sonrası sıvılar toplandı, 278 nm de UV-VIS spektrofotometre ile okuma yapılacak ve enkapsüle edilemeyen toplam ilaç miktarı yine kalibrasyon eğrisinin yardımı ile hesaplandı. Hesaplanan ilaç miktarı polimer solüsyonuna eklenen toplam ilaç miktarından çıkarılarak ve kürelere yüklenen toplam ilaç miktarı hesaplandı. Toplam mikro küre ağırlığının hesaplanması ise; yıkama sonrası mikro küreler oda sıcaklığında kuruma işlemine maruz bırakıldı ve kuru ağırlıkları hassas terazi kullanılarak belirlendi.

3.5. Kürelerin Titanyum Yüzeyle Tutunması, Nano-Hidroksiapatit Yapıları ile Kaplanması ve Karakterizasyonu

3.5.1. Kürelerin titanyum yüzeylere tutunması:

Kalsiyum biriktirilmiş titanyum altlık malzemeleri öncelikle beher iç yüzeylerine askıda kalacak şekilde yerleştirildi. Daha sonra ilaç yüklü küreler PBS (0.1 M) içerisinde behere eklenerek ve birlikte inkübasyona bırakıldı. Yüzeyle bağlanan küre miktarını arttırmak ve bağlanmayı kuvvetlendirmek için titanyum plakalar ve küreler farklı süreler boyunca inkübe edildi optimizasyon çalışmaları yapıldı. Yüzeyle bağlanan mikro küreleri tespit edebilmek için inkübasyon sonrası taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile yüzey görüntüleri alındı.

3.5.2. Yüzeylelerin nano-hidroksiapatit yapıları ile kaplanması:

Mikro küreler yüzeylere tutuklandıktan sonra ortamdaki PBS uzaklaştırıldı, yerine oda sıcaklığında CaCl_2 (0.1-1M) çözeltisi konularak mikro kürelerin titanyum altlık malzemelerle temas etmeyen yüzeylerindeki $-\text{COOH}$ gruplarına Ca^{2+} birikmesi sağlandı. CaCl_2 çözeltisi düşük karıştırma hızlarında sürekli olarak manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra K_2HPO_4 (0.1-1M) damlama yöntemi ile eklenerek ve farklı süreler boyunca düşük karıştırma hızlarında karıştırıldı. Ortama eklenecek olan CaCl_2 ve K_2HPO_4 çözeltileri ile de optimizasyon çalışmaları yapıldı ve ortamdaki Ca/P oranının 1.67 olması sağlandı. Tüm işlemlerden sonra örnekler 37°C

de bir gece boyunca inkübe edildi, sonrasında yıkanıp oda sıcaklığında kuruma işlemine bırakıldı.

3.5.3. Karakterizasyon çalışmaları:

Yüzeylerde oluşacak olan nano-hidroksiapatit yapıların tespitine yönelik karakterizasyon çalışmaları ise aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

- ✓ *Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM):* Titanyum altlık malzemelere tutuklanmış mikro kürelerin yüzeylerinde nano hidroksiapatit (nHA) oluşumu gözlemek üzere kullanıldı. Kontrol grubu olarak mikro kürelerin tutuklandığı fakat CaCl_2 ve K_2HPO_4 çözeltileriyle muamele edilmemiş titanyum örnekler kullanıldı.
- ✓ *FTIR Analizleri:* Yüzeylerde nHA yapılarının varlığını tespit etmek üzere FTIR analizleri yapıldı ve HA pikleri analizlendi. Kontrol grubu olarak ise mikro kürelerin tutuklandığı fakat CaCl_2 ve K_2HPO_4 çözeltileriyle muamele edilmemiş titanyum örnekler kullanıldı.
- ✓ *X-Işınları Analizi:* Yüzeylerde oluşacak hidroksiapatitin kristal yapısı hakkında bilgi sahibi olmak için XRD analizleri yapıldı. Kontrol grubu olarak yine mikro kürelerin tutuklandığı fakat CaCl_2 ve K_2HPO_4 çözeltileriyle muamele edilmemiş titanyum örnekler kullanıldı.

Her bir numunenin yüzey ve kesit alan morfolojileri SEM vasıtasıyla ayrıntılı olarak incelendi ve kaplamaların morfolojisi, yoğunluğu ve homojenitesi gibi mikro yapısal bilgiler ve yüzey üzerindeki gözenekli yapının boyutu ve dağılımı hakkında fikir sahibi olundu. Ayrıca SEM'e adapte edilmiş EDX vasıtasıyla kaplamaların elementel yapısı; yüzey EDX-Mapping (haritalama) ve kesit alan çizgisel tarama ile tespit edilerek yüzey boyunca elementel dağılım ve elementel homojenite incelendi. Sonraki aşamada ise yüzey profilometresi kullanılarak kaplamaların ortalama yüzey pürüzlülükleri ve yüzey yapısı belirlendi. İmplant amaçlı kaplamaların yüzey haritası çıkarıldı ve yüzey üzerindeki gözeneklerin süreklilikleri ve dağılımları incelenerek

yüzey yapısı belirlendi. Vücut sıcaklığı ve yapay vücut sıvısı (SBF) ortamında vücut şartları simüle edilerek, implant amaçlı kaplamaların yüzeyinde kemiğin yapısında yüksek oranda bulunan apatit yapısının oluşumu vücut sıvısının yüzeyi ıslatma yeteneğine bağlı olduğu için, SBF ortamında kaplama yüzeylerinin ıslatılabilirliği ve yüzey kuvvetleri incelendi ve belirlendi. Kaplamaların SBF ortamında ve 36,5°C’de vücut şartları simüle edilerek uzun dönem korozyon testleri yapıldı ve implantın korozyon miktarına bakılarak ortalama korozyon miktarı ve dolayısıyla vücut şartlarında korozyon direnci belirlendi. Bunun için Tafel ekstrapolasyon ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemleri kullanıldı.

3.6. Mikrobiyal KS + Sol-Jel Matriksin In Vitro Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Mikrobiyal KS + Sol-Jel Matriks için antimikrobiyal aktivite implant enfeksiyonlarına en çok neden olan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC:29213) bakterisine karşı değerlendirildi. Aktivite tayininde broth mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Broth mikrodilüsyon yöntemi için Muller Hinton Broth (MHB) besiyeri kullanıldı. Broth mikrodilüsyon yöntemi two-fold (iki katlı) dilüsyonlar yapılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan Mikrobiyal KS+ Sol-Jel Matriks kullanılarak yapıldı. Sırasıyla %10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019, 0.0097, 0.0049 (v/v) olacak şekilde 12 farklı konsantrasyonda mikrobiyal KS+Sol-Jel Matriks hazırlandı.

S. aureus’un Muller Hinton Agar yüzeyine subkültürü yapıldı, distile su içerisinde bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland’a göre (1×10^6 cfu/mL) ayarlanarak hazırlandı. Hazırlan *S. aureus* bakteri süspansiyonundan 10 µl alınarak mikropak içerisindeki farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan Mikrobiyal KS + Sol-Jel Matriksler üzerine inoküle edildi. 37°C’de 1 gece bekletilerek inkübasyon sağlandı. Ertesi gün üremenin gerçekleşip gerçekleşmediği her bir kuyucuya %0.15 (v/w) olarak hazırlanmış rezazurinden 10’ar µl eklenmesi ile gözlemlendi. Mikrobiyal KS + Sol-Jel Matriksin antimikrobiyal aktivitesi kuyucuklardaki en düşük madde konsantrasyonu olan Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirildi.

3.7. Hazırlanan Yüzeylerin Biyoyumluluk Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Örneklerin sitotoksitelerini belirlemek için ISO 10993-5'e göre indirekt sitotoksite testi gerçekleştirilmiştir. Test için örnekler 0,1 g tartılarak 1 ml DMEM besiyerine konulmuş ve 72 saat 37 °C'de %5'lik CO₂ etüvünde inkübe edilmiştir. Fare fibroblast (L-929) hücreleri DMEM besiyerinde %80 konfluent olana kadar çoğaltılmış ve ardından 96'lık well platalere 10⁴ hücre/well olacak şekilde ekilmiş ve aynı koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler üzerindeki DMEM kaldırılarak örneklere maruz bırakılmış solüsyonlar 100 µL/well olacak şekilde kuyulara eklenmiştir. 24 saat daha aynı koşullarda inkübe edildikten sonra besiyeri hücreler üzerinden kaldırılmış ve 10 µL MTT solüsyonu (5 mg/ml PBS'de) ve 90 µL DMEM hücrelere eklenerek karanlıkta 4 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyular boşaltılarak 100 µL DMSO eklenmiş ve 550 nm'de Elisa mikroplate okuyucuda absorbansları alınmıştır. Kontrol kuyuları %100 canlı olarak kabul edilmiş ve bu sayede örneklerin oluşturduğu % canlılıklar hesaplanmıştır.

3.8. Deneysel Hayvan Çalışmaları, Makroskobik İnceleme, Histolojik Analizler

İmplant kaplama ve modellemesi üzerine yapılan bir araştırmada [66] in-vitro hücre kültürünün osseoentegrasyonu modellemek üzere kullanılamayacağını zira substrat içindeki hücre oluşumu ile vücuttakinin farklı olduğunu belirmiş, bu konudaki değerlendirmeler rapor edilmiştir. Bu durumda çalışmamızda 4 farklı deney grubu oluşturulmuş ve her grupta 9 rat ile çalışılmıştır. Toplam 36 rat ile deney gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılacak deney hayvanları, Üniversitemiz Deney Hayvanları üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş olup, yöntemde belirtilen uygulamalar sorumlu araştırmacılarımız tarafından bu merkezde gerçekleştirildi ve deney hayvanları süreç boyunca, bu merkezde bakım ve gözetim altında tutuldu. Çalışmada kullanılmak üzere, 2.5 cm uzunluğunda ve 0.2 cm çapında 36 adet Ti₆Al₄V implantlara özel şekil verilerek basit bir diz protezine benzetildi. Şekillendirilen 36 adet Ti₆Al₄V implant 4 farklı şekilde gruplanarak; kontrol grubu için kaplanmamış 9 adet Ti₆Al₄V implant, HAP kaplanmış 9 adet Ti₆Al₄V implant grubu, KS ile kaplanmış 9 adet Ti₆Al₄V implant grubu ve HAP+KS ile yüzeyi kaplanmış 9 adet Ti₆Al₄V implant grubu hazırlandı.

- Grup1: Kaplanmamış implant
Grup2: HAP ile kaplanmış implant
Grup3: KS ile kaplanmış implant
Grup4: HAP + KS ile kaplanmış implant

Her grupta 9'ar olmak üzere toplam 36 rat çalışmaya dahil edildi. Ratlara intramusküler ksilazin hidroklorid (Ronpun® 0.2 mg/kg) ve subkutan ketamin hidroklorür (Ketalar ® 10 mg/kg) ile anestezi sağlandı ve sonra ratların sol dizleri traşlanarak ve yıkandı. Betadin ile boyandıktan sonra delikli kompres ile örtülerek drape yapıştırıldı. Patella üzerinden 3 cm lik longitudinal insizyonla girilerek cilt altı geçildikten sonra medial parapatellar insizyonla eklem açıldı, patella laterale devrilerek femoral çentiğe ulaşıldı, 2mm lik K teli ile femoral kanal açıldı, 2.5 mm lik dril ile genişletildi. İntramedüller kanaldaki kan enjektör ile aspire edildi ve implant femoral medüller kanala çakılarak patella redükte edilip katlar usulüne uygun kapatıldı. Postoperatif dönemde ratlar günlük olarak izlendi. Altıncı haftada intrakardiyak 3 cc tiopental sodyum verilerek ratlar sakrifiye edildi. Bacaklar kalçadan dezartiküle edilerek diz yan grafileri 26 çekildi, implant çevresinde osteoliz olup olmadığına bakıldı. Bacaklar boyanarak steril şekilde örtüldükten sonra diz eski insizyon yerinden açılarak implanta ulaşıldı, implant steril şekilde çıkarılarak vida kapaklı steril tüplere, implanttan ve medülladan alınan sürüntü örnekleri'de eküvyonlu transport besiyerine (Copan/İtalya) alındı steril ronger yardımıyla kemik örneği de alınarak vida kapaklı steril kaplara konuldu ayrıca 3 cm lik femoral bölge kesilerek formaldehite konularak ve inceleme laboratuvarına iletildi.

Histoloji laboratuvarında inceleme ve analizler esnasında aşağıda belirtilen yöntem takip edildi: Getirilen kemik dokusu örnekleri histolojik izlem için %10'luk formalin fiksatifine alınacak, gerekli küçültme işlemlerinin ardından kemik dokusu örnekleri 5 gün boyunca %10'luk formalinde fiksatif günlük olarak değiştirilerek tespit edildi. Daha sonra kemik dokusunun dekalsifikasyon işlemine geçildi. Bu aşama için 5cc formik asit ve 95cc distile su içeren dekalsifikasyon solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon ara sıra yenilenerek kemiğin 10 gün yumuşaması sağlandı. Yumuşayan kemikler 24 saat çeşme suyunda yıkandıktan sonra, 80 derece alkolde 12 saat bekletildi. Kemik dokusunun takibine, 96 derece alkolde kurumamasına dikkat edilerek devam edildi. Alkol takibinin ardından ksilol aşamasına alınan kemiğin şeffaflığı kontrol edildi. Şeffaflaşan kemik dokusu örnekleri ksilol aşamasının ardından parafine alındı, 4 defa değiştirilen ve her bir

parafinde 1 saat bekletilen örnekler parafine gömüldü. Gömme işleminin ardından ışık mikroskopik incelemeler için kemik dokusu örneklerinden 5 mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilin-Eozin boyası ile boyanarak ve ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapılan preparatların Olympus DP-70 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi. Bu şekilde implant çevresindeki inflamatuvar yanıt ve kaplama malzemelerinin (Hidroksiapatit ve KS) toksik yanıtları da değerlendirildi.

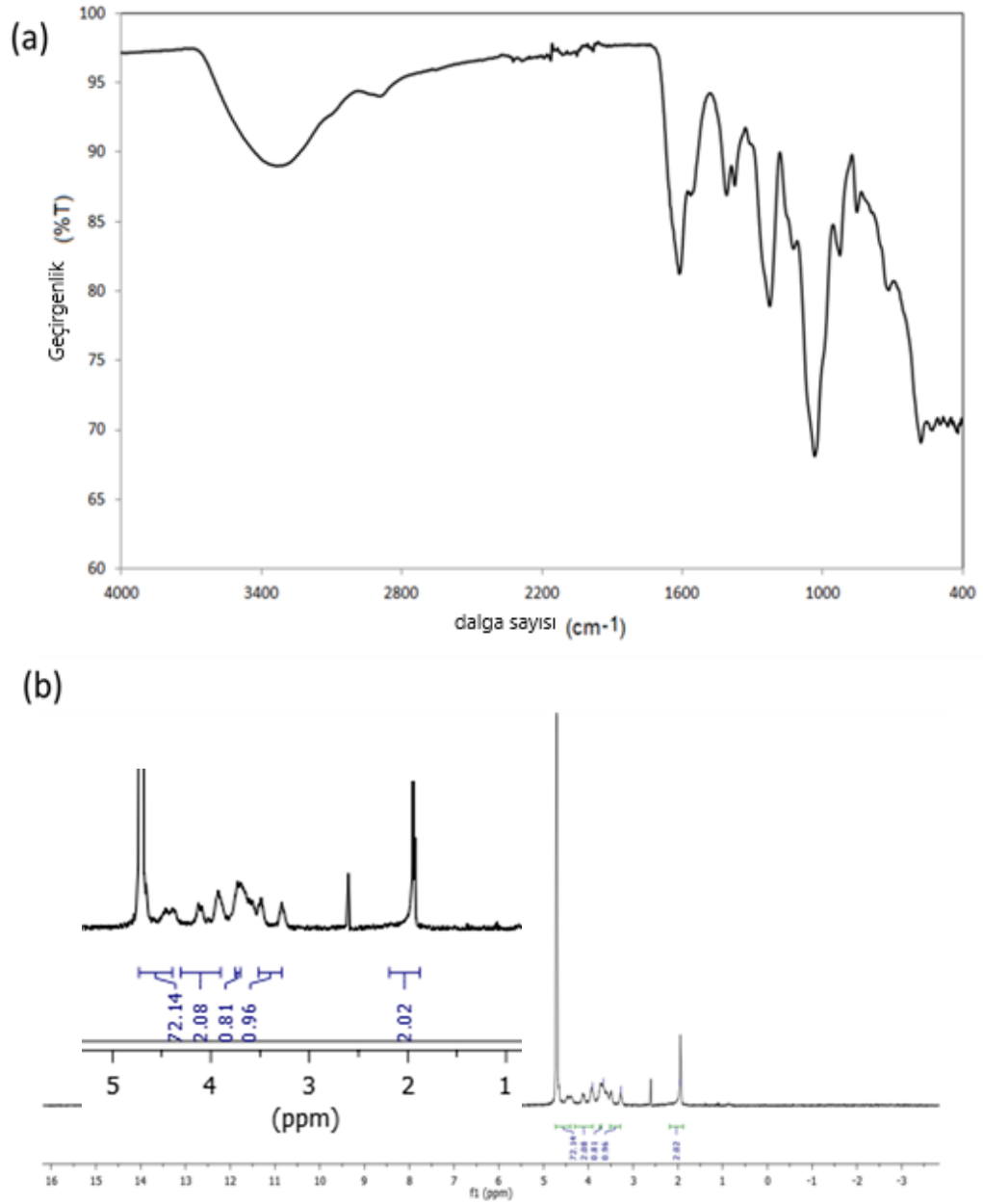


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışma kapsamında öncelikle mikrobiyal kondroitin sülfat sentezi ve yapısal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu KS yapısı Sol-jel matris ile birlikte titanyum implant yüzeyine kaplanmıştır. Gerçekleştirilen kaplamaların yüzey ve kimyasal karakterizasyonları gerçekleştirildi. KS/sol-jel yapıların antibakteriyel, biyouyumluluk ve histopatolojik özellikleri ayrıca belirlenmiştir.

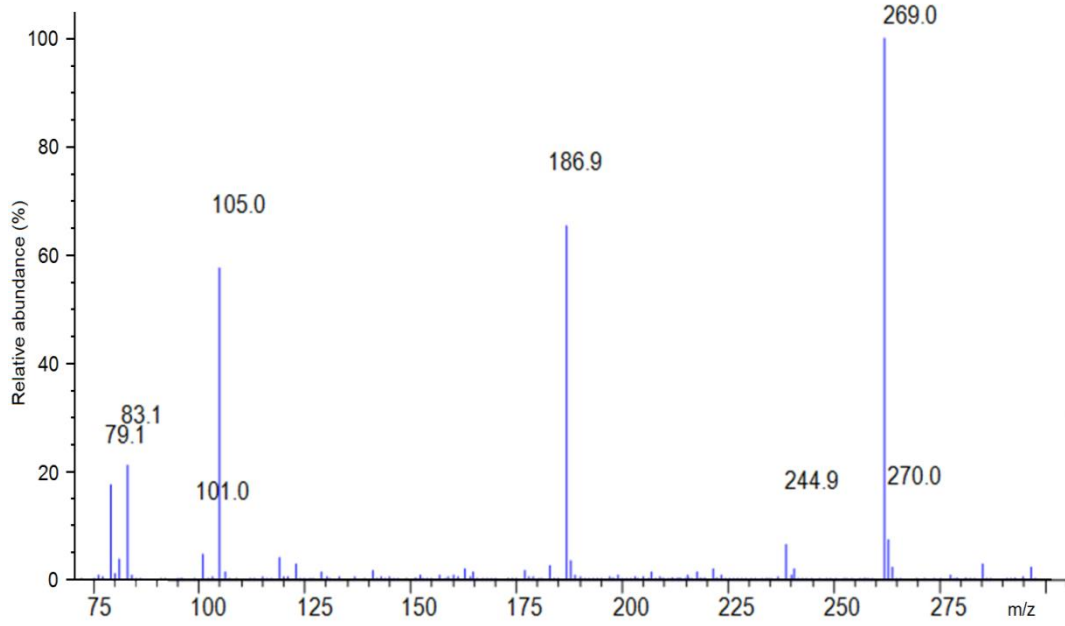
4.1. Mikrobiyal KS Yapısal Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında rekombinant bakteriden üretilen ve saflaştırılan KS yapısının karakterizasyonu FTIR ve NMR spektrumları ile gerçekleştirildi. Üretilen kondroitin sülfat yapısına ait FTIR ve NMR spektrumları Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekil 4.1(a)’daki FTIR spektrumunda KS yapısında bulunan OH gruplarına ait H-bağı gerilme titreşimi 3000 cm^{-1} ve 3600 cm^{-1} ’de geniş bir band olarak görülmektedir. 2800 cm^{-1} ve 2930 cm^{-1} ’de alifatik C-H gerilme titreşimi ve 1660 cm^{-1} ’de $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimleri bulunmaktadır. Ayrıca 3100 cm^{-1} (N-H stretching), 1560 cm^{-1} (N-H bending vibration), ve 1240 cm^{-1} ($\text{R-OSO}_2\text{-O}^-$) titreşimleri yapıyı doğrulamaktadır. Diğer bir önemli pik ise yaklaşık 1030 cm^{-1} ’de bulunan C-O-C eterik gerilme titreşimidir. Sonuç olarak sentezlenen mikrobiyal KS yapısı literatüre uygun olarak görülmüştür. Şekil 1(b)’deki NMR spektrumu da KS yapısını doğrulamaktadır. δ 4.98, 4.89, 3.81 ve 2.02’de tespit edilen sinyaller, bu örnekte kondroitin sülfatın varlığını göstermiştir.



Şekil 4.1.: Sentezlenen mikrobiyal kondriotin sülfat yapısına ait FTIR (a) ve NMR (b) spektrumları.

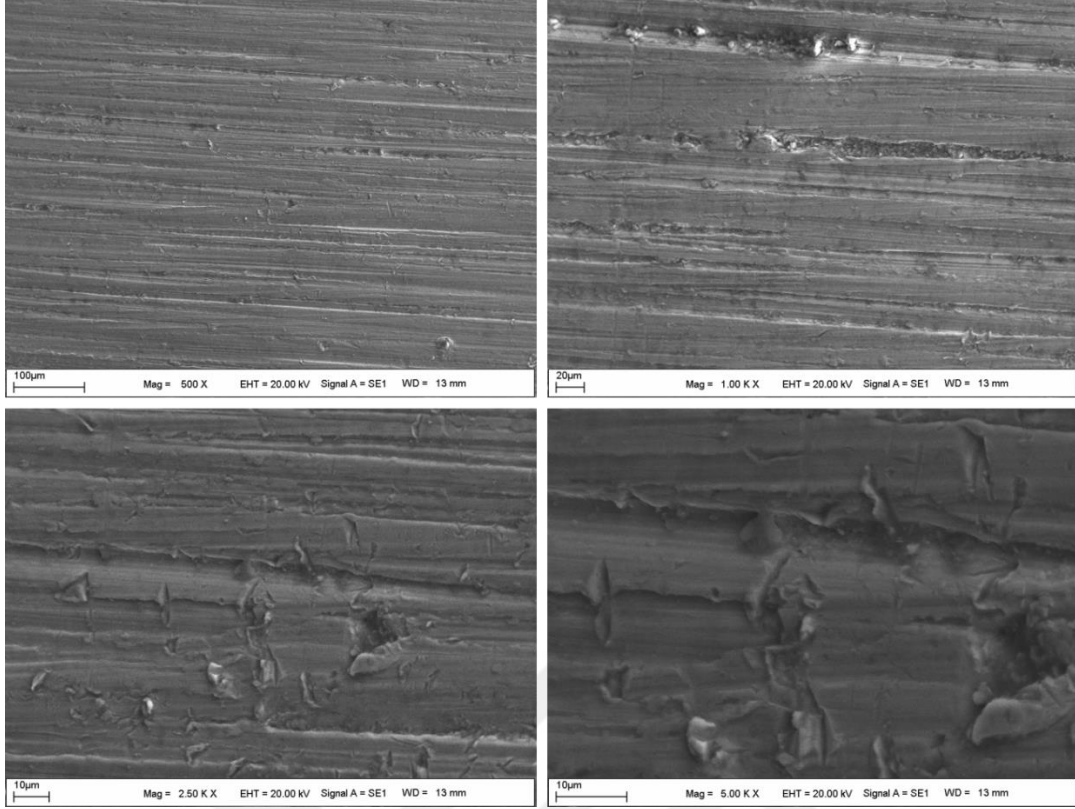
Çalışma kapsamında elde edilen KS yapısının net molekül kütlesi ve yapısı HPLC-MS tekniği ile doğrulandı. KS yapısına ait HPLC-MS kromatogram sonucu Şekil 4.2’de verilmiştir.



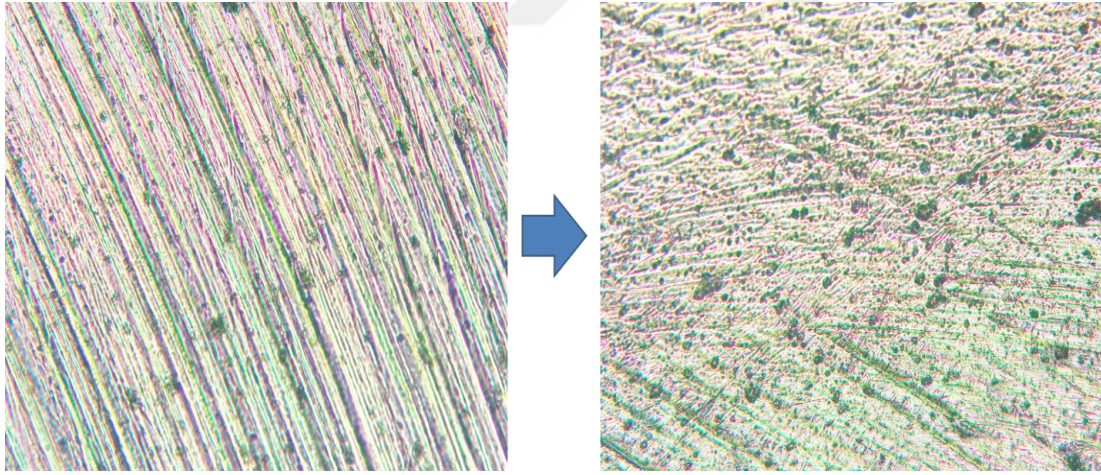
Şekil 4.2.: Mikrobiyal KS yapısına ait HPLC-MS kromatogramı.

4.2. KS/sol-jel kaplanmış Titanyum implant yapıların yüzey karakterizasyonu

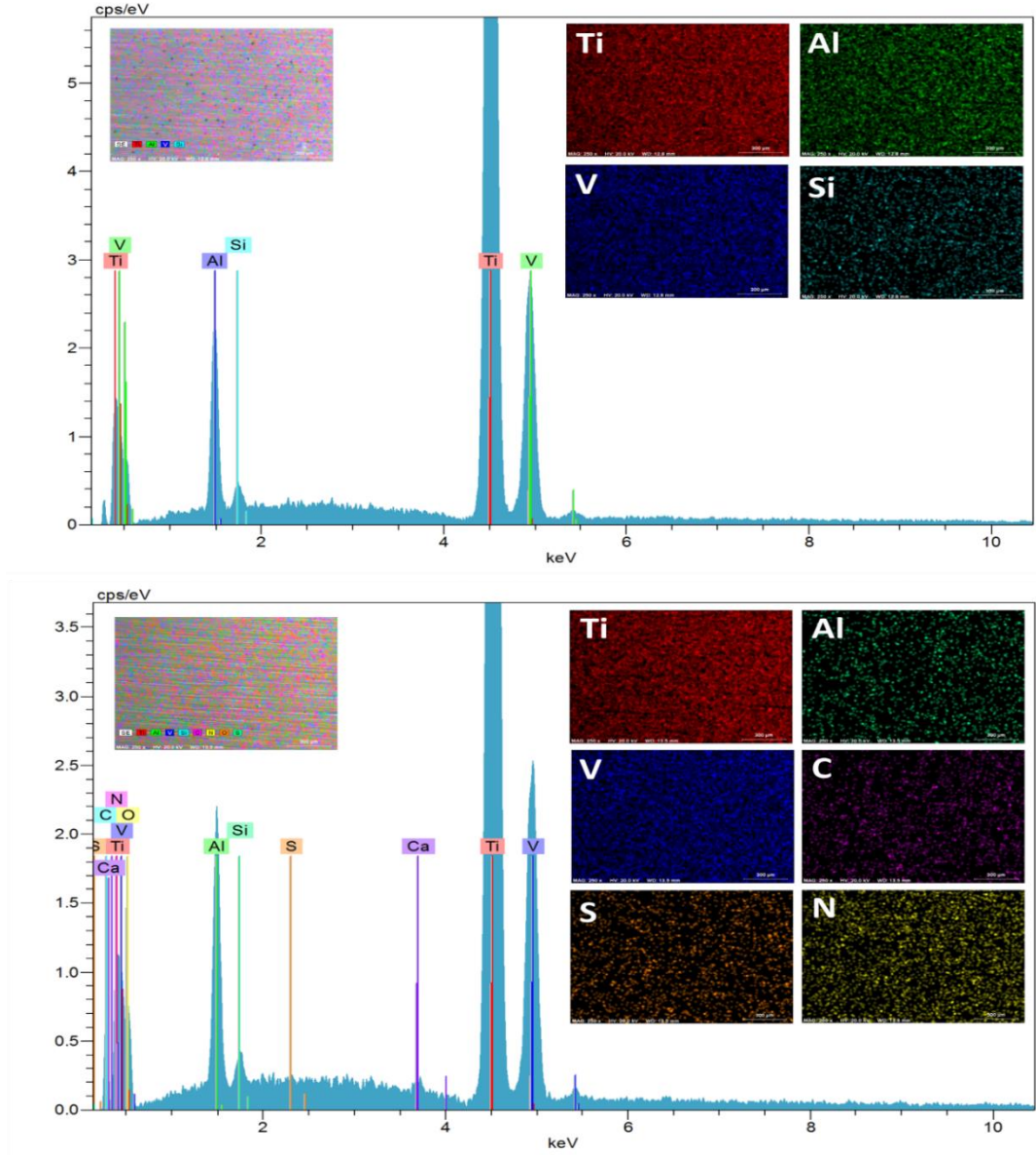
Deep coating metodu ile KS/Sol-gel yapılar öncelikle saf Ti_6V_4Al yapılara kaplandı. Bu kaplama saf ve düz yüzeylerde KS/Sol-gel materyalin tutunma davranışının görülmesi açısından önemlidir. Kaplanmış yüzeylere ait SEM görüntüleri Şekil 4.3' de verilmiştir. Şekil 4.3'e göre KS yapısı metal yüzeyine düzgün ve homojen olarak kaplanmıştır. Metalin işleme ve kesim boşluklarını doldurmuştur. Yer yer partiküler olarak kaplanmış olup pürüzlü bir yüzey oluşturmuştur. Bu pürüzlü yüzey kemik implantlarda implantın kemik yapısına tutunması açısından önemli bir avantaj ortaya koymaktadır. Özellikle kaplanmış ve kaplanmamış yüzeylerin detaylı görüntülenmesi Şekil 4.4'te verilen optik mikroskop görüntüleri ile doğrulanmıştır. Bu görüntülerde Şekil 4.4(a)'da kaplanmamış metal yüzeyin optik mikroskop görüntüsü görülmektedir. Yüzey oldukça düz ve tek düze gözükmektedir. Şekil 4.4(b)'de ise farklı büyütme ölçeklerinde KS/Sol-gel kaplı yüzey gözükmektedir. Bu yüz üzerinde KS partiküler yapısı net olarak görülmektedir.



Şekil 4.3.: KS/Sol-gel kaplı Ti₆V₄Al yüzeylere ait SEM görüntüleri

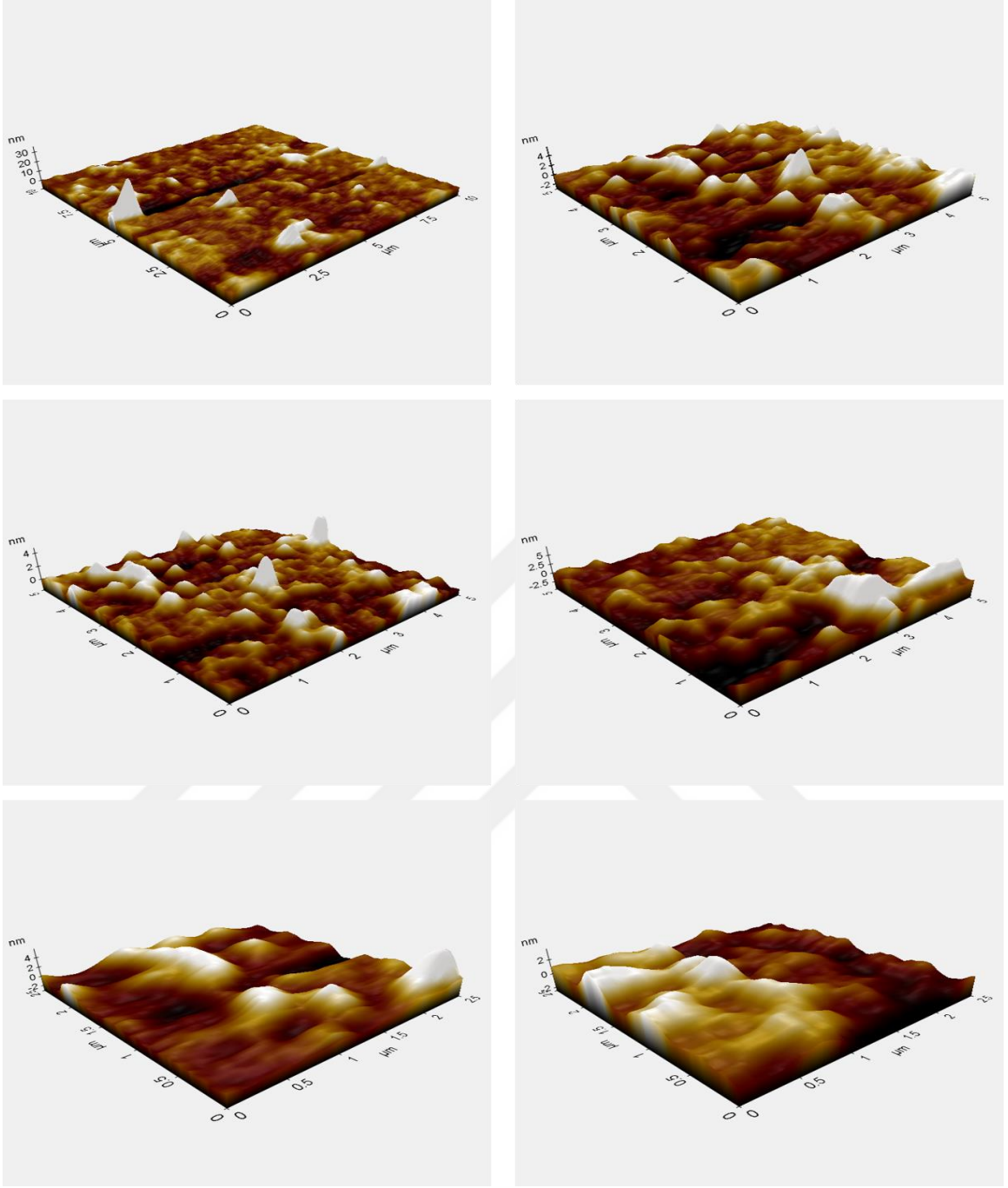


Şekil 4.4.: Saf Ti₆Al₄V yüzeyi ve KS/Sol-gel kaplı Ti₆V₄Al yüzeyine ait optik mikroskop görüntüleri

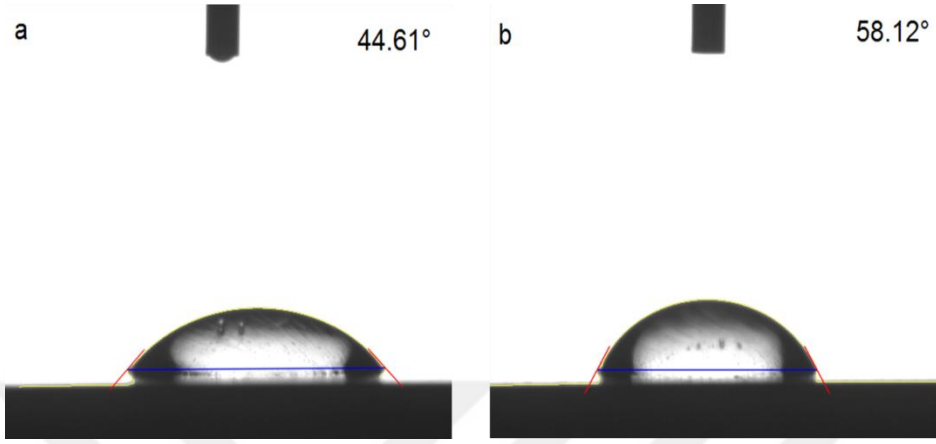


Şekil 4.5.:Saf Ti₆Al₄V yüzeyi ve KS/Sol-gel kaplı Ti₆V₄Al yüzeyine ait EDX spektrumları ve yüzeylerin elementel haritaları.

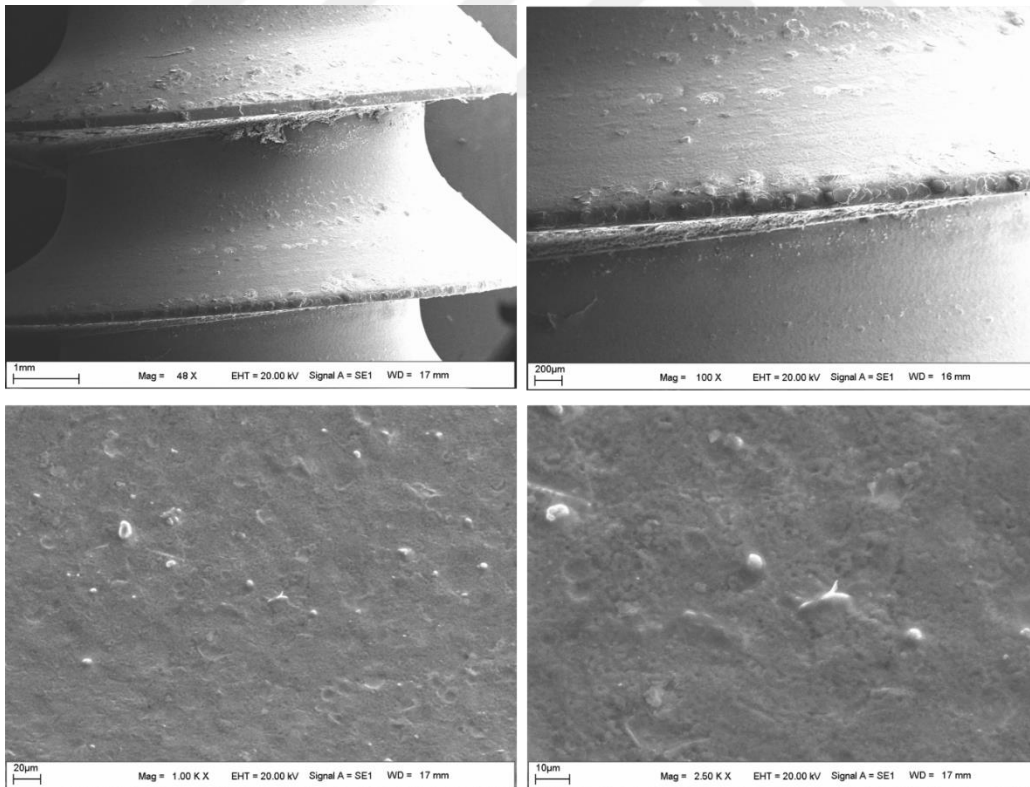
Şekil 4.5’ de Saf Ti₆Al₄V yüzeyi ve KS/Sol-gel kaplı Ti₆V₄Al yüzeyine ait EDX spektrumları ve yüzeylerin elementel haritaları verilmiştir. Saf Ti₆Al₄V yüzeyine ait EDX spektrumunda sadece Ti, Al ve V elementlerine ait pikler görülmektedir. Çok az miktarda olmak koşulu ile Si elementi de bulunmaktadır.



Şekil 4.6.: KS/Sol-gel kaplı Ti₆V₄Al yüzeyine ait farklı büyütmelerdeki AFM yüzey görüntüleri.



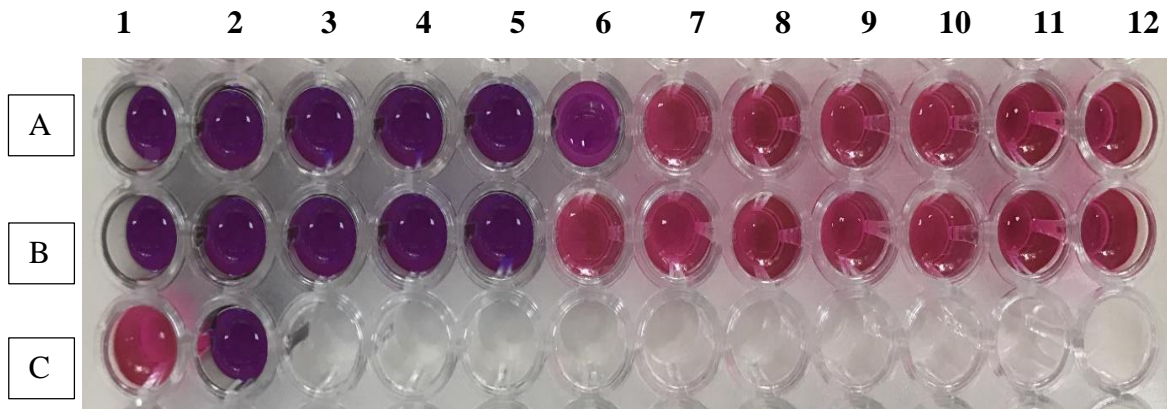
Şekil 4.7. : Saf Ti_6Al_4V (a) yüzeyi ve KS/Sol-gel kaplı Ti_6V_4Al (b) yüzeyine ait sıvı temas açısı ölçüm sonuçları



Şekil 4.8.: KS/Sol-gel kaplı Ti_6V_4Al implant yüzeyine ait farklı büyütmelelerdeki SEM yüzey görüntüleri.

4.3. Mikrobiyal KS + Sol-Jel Matriksin In Vitro Antimikrobiyal Aktivitesi

In Vitro antimikrobiyal aktivite broth mikrodilüsyon yöntemine göre (Şekil 4.9) *S. aureus* bakterisi için değerlendirildi. Yönteme göre antimikrobiyal aktivite sonuçları iki gruba göre (Mikrobiyal KS+ Sol-Jel Matriks ve Mikrobiyal KS' siz Sol-Jel Matriks) MİK değerleri cinsinden kıyaslandı. MİK değerinde bizler bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden değerlendiririz.

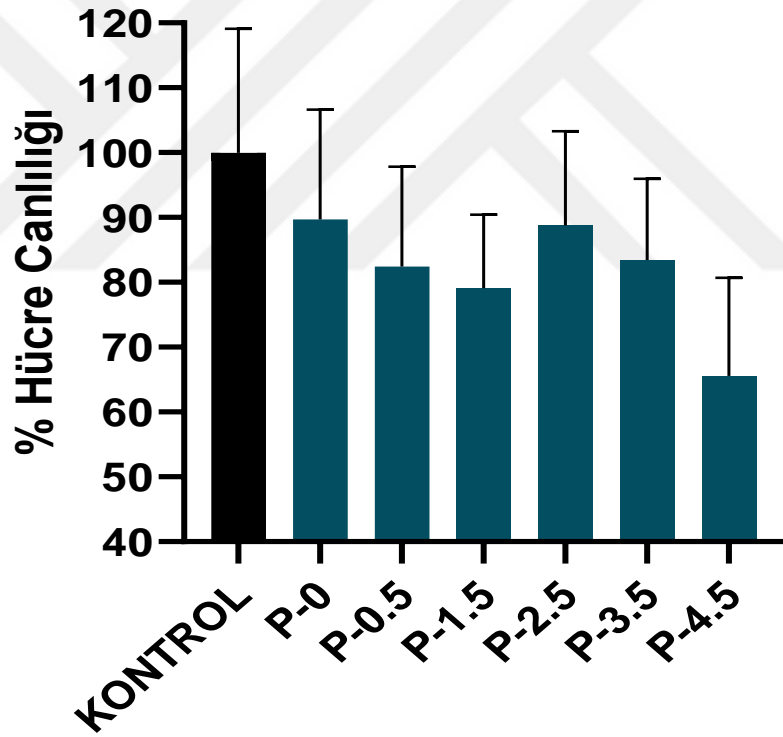


Şekil 4.9. :*Staphylococcus aureus* 'a karşı MIC değerinin belirlenmesi. Kuyucuklardan A 1-12: Sırasıyla %10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019, 0.0097, 0.0049 (v/v) olacak şekilde 12 farklı konsantrasyonda Mikrobiyal KS+Sol-Jel Matriksin *S. aureus* üzerindeki inhibisyon etkisinin mikropalak görüntüsü. B:1-12 Sırasıyla %10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019, 0.0097, 0.0049 (v/v) olacak şekilde 12 farklı konsantrasyonda Sol-gel matriksin *S. aureus* üzerindeki inhibisyon etkisinin mikropalak görüntüsü. C:1: Pozitif kontrol C:2: Negatif kontrol.

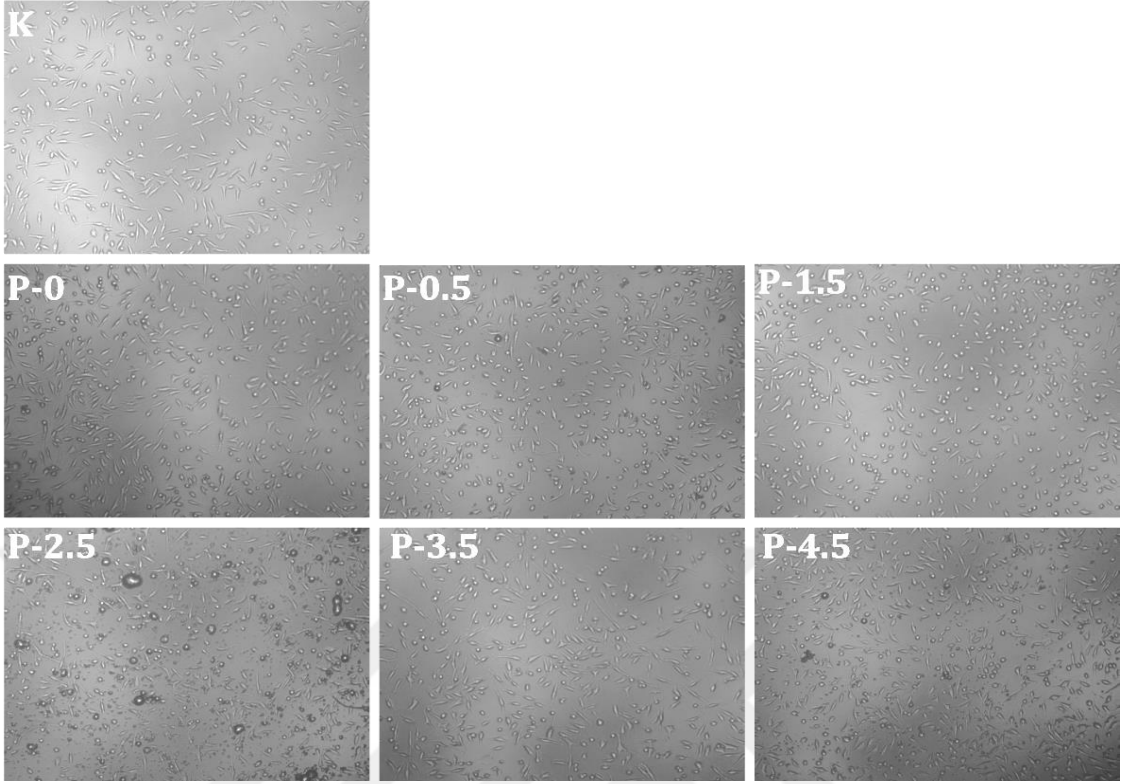
Bakterinin üremesini önleyen, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak değerlendirilir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi mikropalate üzerinde yer alan A sırasındaki 6. kuyucuk ve B sırasındaki 5. kuyucuk bulanıklığın gözlenmediği son konsantrasyon değeri olduğundan MIC değerini bize verir. Buna göre Mikrobiyal KS + Sol-Jel Matriks için %0.312 (3.12 mg/mL); Mikrobiyal KS' siz Sol-Jel Matriks için ise %0.625 (6.25 mg/mL) olarak belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda kondroitin sülfat içeren sol-jel matriks yapının antimikrobiyal aktivitesinin, içermeyen matriks yapısına kıyasla 2 kat daha yüksek oranda antibakteriyel aktivite gösterdiğini söyleyebiliriz.

4.4. Biyouyumluluk

Çalışmada farklı oranlarda kondroitin sülfat katkılanmasıyla elde edilmiş kaplama malzemelerinin L-929 hücreleri üzerindeki canlılık oranları Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’ te verilmiştir. Şekil10’a göre P-2.5 örneği %89 ve P-3.5 örneği %84 canlılık gösterirken özellikle P-4.5 örneğinde hücre canlılığı %66 oranına kadar düşmüştür. Bu da kondroitin sülfat miktarının %3.5 oranına kadar kabul edilebilir oranda biyouyumluluk gösterdiği ancak bu oranın üzerinde toksisite oluşturmaya başladığını göstermektedir. Ayrıca saf polimere göre kondroitin sülfat katkılanması anlamlı bir canlılık artışına sebep olmamıştır. Bu veri osseoentegrasyon çalışmalarında kondroitin sülfatın %3.5 oranına kadar sorunsuz bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.10. :Farklı oranlarda kondroitin sülfat katkılanmış polimerlerin % canlılık oranları



Şekil 4.11.: Farklı oranlarda kondroitin sülfat katkılanmış polimerlerin hücre morfolojileri üzerindeki etkisi

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Osseoentegrasyon, bağışıklık sisteminin hayati bir rol oynadığı çetrefilli ve karmaşık bir süreçtir. Protezin kemik dokusuna yerleştirilmesinin immün (duyarsız, bağışık) reaksiyona neden olması kaçınılmazdır. Komplement sistemi, implantasyondan sonra hızla aktive olur ve bağışıklık ve iskelet sistemleri sinyal yollarını paylaştığı ve yakın etkileşime girdiği için kemik oluşumunu ve kemik erimesini büyük ölçüde etkiler (Greenblatt & Shim, 2013; Modinger ve diğerleri, 2018). Bir tür mononükleer fagosit olan makrofajlar, osteoimmünoloji alanında büyük ilgi gören osteoklastların öncüleridir. Kemik ve kemik iliğinde bulunan makrofajlar, kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında osteoklastlara farklılaşabilir (Chen ve diğerleri, 2016). Dahası, osteoblastların oluşumuna katkıda bulunurlar ve kemik anabolizması için trofik destek sağlarlar (Batoon, Millard, Raggatt ve Pettit, 2017). Gümüşle kaplama gibi halihazırda kullanılan antibakteriyel yüzeylere sahip çeşitli ortopedik implantlar da daha iyi osseoentegrasyon potansiyeli göstermiştir (Orapiriyakul, Young, Damiati ve Tsimbouri, 2018). Bununla birlikte, osseoentegrasyon sürecinin hayvanlardan ve insandan farklı olabileceğini ve bu nedenle klinik uygulamaya başvururken dikkatlice düşünülmesi gerektiğini hatırlatmaktadır (Abrahamsson, Berglundh, Linder, Lang ve Lindhe, 2004; Bosshardt ve ark., 2011). Ek olarak, implantların farklı pozisyonları, bireysel osseoentegrasyon sürecinden geçebilir. Huja vd. uyluk kemik oluşum oranının mandibula ve maksilladan çok daha yüksek olduğunu göstermiştir (Huja ve Beck, 2008). Yük taşıyan kemiğin yeniden şekillenerek basınca uyum sağlayacağı ve böylece osseoentegrasyonu kolaylaştıracağı doğrulanmıştır (Barak, Lieberman ve Hublin, 2011). Bu tür durumlarda, uygun bir şekilde TJR'den sonra erken ağırlık taşıma rasyonel ve önemsizdir. Malzemeler, implantların temel özelliklerini belirledikleri için en önemli bileşenlerdir. Nitelikli malzemeler aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır: (a) basıncı ve darbeyi sürdürmek için yeterli mekanik mukavemet; (b) aşınmayı önlemek için yüksek korozyon direnci; (c) güçlü plastiklik, karmaşık şekillerde imal edilebilmelerini sağlar; (d) biyolojik uyumluluk sağlanmalı ve alerji veya immünolojiye neden olmayacaklardır. Şu anda Ti, en yaygın kullanılan implant materyalidir. Bununla birlikte, Ti'ye karşı vücut alerjik reaksiyonları konusunda endişeler olmuştur (Goutam, Giriya pura, Mishra ve Gupta, 2014; Olmedo, Paparella, Brandizzi ve Cabrini, 2010). Olmedo vd. Ti partiküllerinin ortopedik implantlardan yayılmasının karaciğeri, akciğerleri ve dalağı istila edeceğini bildirmiştir (Olmedo, Guglielmotti ve Cabrini,

2002). Bu hipotez sadece izole vakaya dayansa ve titanyumun hastalarda konakçı reaksiyonunun bir nedeni olduğu kanıtlanamamış olsa da, Ti partiküllerinin salınımı ile aşırı duyarlılık arasındaki ilişki göz ardı edilemez (Javed, alHezaimi, Almas ve Romanos, 2013). İmplantların yüzeyinde çeşitli tekniklerle bir oksit tabakası oluşturmak, korozyon direncini artırmak ve biyouyumluluğu artırmak için sıklıkla kullanılır (Jiang, Zhang, Zhou, Lin ve Liu, 2018). Polimer bazlı malzemeler, neredeyse alerjik reaksiyonlara neden olmadıkları için PEEK, PMMA ve PE gibi metallerin yerini almanın bir alternatifi olarak kabul edilmiştir. Carpenter vd. Gözenekli PEEK yapılarının, gözenekli 3D yazıcı Ti'ye göre omurga yükü büyüklükleri altında kemik oluşumu ve bakımı için daha uygun bir mekanik ortam sağladığını öne sürmüştür (Carpenter ve diğerleri, 2018). Öte yandan, değiştirilmemiş PEEK, Ti'den daha az osteokondüktif ve biyoaktiftir (Najeeb ve diğerleri, 2016). Bu nedenle, bu katkıları en iyi şekilde entegre eden hibrit malzemeler, implantların tasarımını optimize etmede yeni bir trend olacaktır. Nanosilver / polimer kaplı Ti implantı, Zeng ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. ve mükemmel antibakteriyel ve osteoindüktif aktiviteler sergilemiştir (Zeng ve diğerleri, 2019). İmplant yüzeyinin topografisinin, implantların mekanik özelliklerini değiştirerek ve hücre yanıtlarını etkileyerek osseoentegrasyonu büyük ölçüde etkileyebileceğine dair kesin kanıtlar ortaya çıkmaktadır. Fibroblastlar pürüzsüz yüzeylere daha güçlü yapışırken, pürüzlü yüzeyler osteoblastların yapışmasını ve çoğalmasını kolaylaştırır, bu da farklı hücre türlerinin çeşitli mikro ortamları tercih ettiğini gösterir (Cochran, Schenk, Lussi, Higginbottom ve Buser, 1998). Gözenekli implantların katı implantlardan çok osseoentegrasyon için uygun olduğuna inanılmaktadır. Gözeneklerin boyutunun, hücrelerin yapışması, çoğalması ve farklılaşmasında anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Daha küçük gözenekler hücre infiltrasyonunu önleyebilir ve daha fazla hücreyi barındıracak yeterli alan olmadığından hücreler arasındaki etkileşimi engelleyebilir (Oh, Kim, Im, & Lee, 2010; Oh, Park, Kim ve Lee, 2007). Bununla birlikte, çok büyük gözenek boyutu, infiltrasyonu çok fazla hızlandırırken implantlara hücre yapışmasını engelleyecektir (Lee, Ahn, Kim, & Cho, 2010). Dahası, daha büyük gözenekler mekanik özellikleri azaltabilir ve daha fazla yorgunluk çatlakları başlatabilir, bu da klinik bir başarısızlığa yol açar (Dewidar & Lim, 2008; Ishihara ve diğerleri, 2000). Gözenek boyutu ile ilgili bir diğer ikilem de bunların dağılımıdır. Homojen gözenek boyutunun heterojen gözenek boyutundan daha iyi performans gösterip göstermediği hala belirsizdir. Gözenek geometrisinin osseoentegrasyon üzerindeki etkisi, artık imalat tekniklerinin geliştirilmesiyle birlikte hassas geometride mevcut olduğundan daha fazla dikkat çekmektedir. Geometrinin

osseoentegrasyonu nasıl etkilediğinin potansiyel mekanizması, farklı geometrilerin, yapışma ve proliferasyon için önemli olan hücreler için farklı ankrajlar sağladığı gerçeğine hipotez edilir (Perez ve Mestres, 2016). Ayrıca, gözeneklerin geometrisi, hücresel davranışı etkileyebileceği bilinen dikmelerin birbirine bağlanabilirliğinin açılarını değiştirecektir (Kemppainen & Hollister, 2010). Uygun olmayan şekiller ve açılar implantasyonu gerçekleştirirken kesme mukavemetini artırabilir ve osteositleri dilimleyebilir, bu da osseoentegrasyon için elverişsizdir. Ek olarak, kemiklerin özellikleri ve hücre yanıtları yaş, cinsiyet grupları ve implantların yerlerinden farklı olabilir. Gözenekli yapı tasarlanırken böyle bir fark dikkate alınmalıdır.

Çalışmamız kapsamında ürettiğimiz nano gözenekli kaplamaların fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra topografilerinden dolayı da osteojenik aktiviteye etkileri olduğu görülmüştür. Yüzeylerin sol-jel tekniği kullanılarak kaplanabilmesi için ardışık olarak ortama titanyum izopropoksit ve su buharının verilerek, saf titanın tek veya çoklu katmanlar halinde pek çok yüzeye kontrollü bir şekilde kaplanabilmesi sağlandı. Bu çalışma kapsamında geliştirilen biyouyumlu, antibakteriyel ve osseoentegrasyon özelliği artırılmış yüzeylerin; implant kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlar ile mücadelede kullanılabileceği ve aynı zamanda mevcut sert dokularla da daha hızlı ve sağlam bağlar kurmasını sağlayacağı söylenebilir. Proje kapsamında tasarlanan bu titanyum implant yüzeylerin, biyomedikal ortopedik ve diş implant sektöründe alternatif yeni bir ürün olarak kullanılabilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Lidgren, L. 2003. "The Bone and Joint Decade 2000-2010", Bulletin of the World Health Organization, 81, 629-629.
- [2] Conaghan, P.G. and Brooks, P. 2008. "How to manage musculoskeletal conditions" Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 22, (3), 387-394.
- [3] TÜİK. 2011. "Sağlık Sorunları ve Faaliyet Güçlükleri Yaşayanların İşgücü Durumu Araştırma Sonuçları", 09.04.2012, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=13125>).
- [4] Niinomi, M. 2008. "Metallic biomaterials", Journal of Artificial Organs, 11, (2), 105-110.
- [5] Hanawa, T. 2006. "Recent development of new alloys for biomedical use", Material Science Forum, 512, 243-248.
- [6] Long, M Rack, H.J. 1998. "Titanium alloys in total joint replacement-a materials science perspective", Biomaterials, 19, 1621-1639.
- [7] Bai, Z. and Gilbert, E.L. 2006. Corrosion performance of stainless steels, cobalt, and titanium alloys in biomedical applications, S.D. and B.S. eds. In Cramer. ASM Handbook, Corrosion: Environments and Industries, ASM International, 837-853.
- [8] Gotoh, E. and Okazaki, Y. 2006. "Corrosion resistance, mechanical properties, fatigue properties, and tissue response of Ti- 15Zr-4Nb-4Ta alloy", Journal of ASTM International, 2, (9), 15.
- [9] Temenoff, J.S. and Mikos, A.G. 2008. Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science. Upper Saddle River, NJ, USA : Pearson/Prentice Hall, 235-258.
- [10] Long, M., Rack, H.J. 1998. "Titanium alloys in total joint replacement, A materials science perspective", Biomaterials, 19, 1621-1639.

- [11] Lütjering, G. and Williams, J.C. 2003. Titanium, 2nd ed. Berlin, Germany, Springer, 20-22.
- [12] Bothe, R.T., Beaton, L.E. 1940. "Davenport, HA. Reaction of bone to multiple metallic implants" The Journal of surgery, gynecology and obstetrics, 71, 598-602.
- [13] Bannon, B.P. and Mild, E.E. 1983. Titanium Alloys for Biomaterial Application: An Overview, Titanium Alloys in Surgical, Implants. Philadelphia, PA, USA, ASTM,7-15.
- [14] Oliveira, V., Chaves, R.R., Bertazzoli, R., Caram, R. 1998. "Preparation and characterization of Ti-Al-Nb alloys for orthopedic implants", Brazilian Journal of Chemical Engineering, 17, 326-333.
- [15] Zwicker, U., Buhler, K., Muller, R., Beck, H., Schmid, H.J., Ferstl, J. 1980. Mechanical Properties and Tissue Reactions of a Titanium Alloy for Implant Material, In Titanium'80, Science and Technology, Kimura, I. Ed., Metallurgical Society of AIME, New York, USA, 1, 505-514.
- [16] Niinomi, M. 2002. "Recent metallic materials for biomedical applications", Metallurgical and Materials Transactions A, 33, 477- 486.
- [17] Lindahl, O. and Lindgren, A.G. 1967. "Cortical bone in man II. Variation in tensile strength with age and sex", Acta Orthopaedica Scandinavica, 38, 141-147.
- [18] Evans, F.G. 1976. "Mechanical properties and histology of cortical bone from younger and older men", The Anatomical Record,185, 1-11.
- [19] Rho, J.Y., Tsui, T.Y. and Pharr, G.M. 1997. "Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation", Biomaterials,18,1325–1330.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : H. Turgut DURMAZ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2005, İnönü Ün. Fe-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2021, İnönü Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM:

- 2011-..... Tekno Bağlantı Elemanları San.Tic. A.Ş. (Çetin Civata Şirketler grubu)