T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİTANYUM YÜZEYLERE FARKLI YÖNTEMLERLE PROTEİN VE ANTİBİYOTİK YÜKLENMESİ, YÖNTEMLERİN ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Betül PARMAKSIZ GÜNGÖR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Programı

Danışman
Doç. Dr. Sakip ÖNDER

Ağustos, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİTANYUM YÜZEYLERE FARKLI YÖNTEMLERLE PROTEİN VE ANTİBİYOTİK YÜKLENMESİ, YÖNTEMLERİN ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Betül PARMAKSIZ GÜNGÖR tarafından hazırlanan tez çalışması 01.08.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliğiyle Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sakip ÖNDER
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Sakip ÖNDER, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Görke GÜREL PEKÖZER, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Hasan KAHRAMAN, Üye

İstanbul Atlas Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Sakip ÖNDER sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Titanyum Yüzeylere Farklı Yöntemlerle Protein Ve Antibiyotik Yüklenmesi, Yöntemlerin Etkinliklerinin Karşılaştırılması" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Betül PARMAKSIZ GÜNGÖR

İmza

Aileme

ve

eşime

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında bilgi, tecrübe ve yönlendirmeleriyle bana rehberlik eden, bilimsel bakış açımı geliştirmeme katkıda bulunan değerli danışmanım Doç. Dr. Sakip ÖNDER'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca laboratuvar olanaklarını kullanmamı sağlayan, destek ve ilgisini esirgemeyen Arş. Gör. Burcu DOYMUŞ'a ve Arş. Gör. Güleycan DEDECENGİZ'e bana desteklerinden ve yardımlarından ötürü teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yüksek lisans sürecimde birlikte çalıştığım, deneylerim sırasında bana yardımcı olan tüm laboratuvar arkadaşlarıma destekleri için minnettarım. Bu süreçte bana her koşulda sabırla destek olan, anlayışlarıyla yanımda olan aileme, özellikle de bana her zaman inanan ve moral veren Mustafa Ali GÜNGÖR'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Son olarak, akademik hayatım boyunca bana ışık tutan tüm hocalarıma ve bu süreçte emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Betül PARMAKSIZ GÜNGÖR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1 GİRİŞ 1
1.1 Biyomalzemeler ve Tıbbi Kullanım Alanları……2
1.1.1 Biyoseramik Biyomalzemeler……4
1.1.2 Polimerik Biyomalzemeler……..4
1.1.3 Metalik Biyomalzemeler……5
1.1.4 Kompozit Biyomalzemeler……..6
1.2 Titanyum Malzemeler Hakkında Bilgiler……7
1.2.1 Titanyum Malzemelerin Başarısını Etkileyen Faktörler……7
1.3 Biyomalzemeler İçin Yüzey Modifikasyon Teknikleri…… 8
1.3.1 Mekanik Yüzey Modifikasyon Yöntemleri…… 9
1.3.2. Fiziksel Yüzey Modifikasyon Yöntemleri…… 9
1.3.3. Kimyasal Yüzey Modifikasyon Yöntemleri……10
1.3.4. Elektrokimyasal Yüzey Modifikasyon Yöntemleri…… 12
1.4 Elektroforetik Kaplama Yöntemi……13
1.5 İlaç Salım Sistemleri……... 14
1.5.1 Polimer Bazlı Kontrollü Salım Sistemleri……15
1.6 İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler…….....16

1.6.1 Doğal Polimerler……... 17

1.6.2 Sentetik Polimerler……18

1.7 Lokal İlaç Salım Sistemleri……19

1.8 İmplant İlişkili Enfeksiyonlar……..... 21

1.9 Çalışmanın Amacı……...21

2 MATERYAL VE METOT 23

2.1 Materyal…….. 23

2.2 Kaplanacak Titanyum Malzemelerin Hazırlanması……23

2.3. Kitosan Kaplama Solüsyonun Hazırlanması……..24

2.4. Titanyum Yüzeylerin Elektroforetik Kaplama Yöntemi İle Kaplanması ve Karakterizasyonu……24

2.5 Antibiyotik Yükleme ve Salım Çalışmaları……25

2.5.1 Kaplanmış Ti Yüzeylere Antibiyotik Yükleme ve Salım Çalışmaları……. 25

2.5.2 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Antibiyotik Yükleme ve Salım Çalışmaları……. 28

2.6 Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları……...28

2.6.1 Kaplanmış Ti Yüzeylere Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları….28

2.6.2 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları……. 30

2.7 Antibiyotik ve Proteinin Birlikte Yüklenmesi Çalışmaları…….31

2.7.1 Kaplanmış Ti Yüzeylere Antibiyotik & Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları……. 31

2.7.2 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Antibiyotik & Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları……... 33

3 BULGULAR VE TARTIŞMA 35

3.1 Kaplanmış Ti Yüzeylerin Karakterizasyon Sonuçları…….35

3.2 Kaplanmış Ti Yüzeylerin SEM Analizleri…….....39

3.3 Yüzey Pürüzlülük Analizleri…….. 40

3.4 Antibiyotik ve BSA Yüklenmiş Yüzeylerin FTIR Analizi……..…...41

3.5 Kaplanmış Ti Yüzeylere Antibiyotik Yükleme Ve Salım Çalışmalarının Sonuçları…… 42

3.6 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Antibiyotik Yükleme ve Salım Çalışmaları……45

3.7 Kaplanmış Ti Yüzeylere Protein Yükleme ve Salım Çalışmalarının Sonuçları…… 47

3.8 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları……49

3.9 Kaplanmış Ti Yüzeylere Antibiyotik & Protein Yükleme ve Salım Çalışmalarının Sonuçları……51

3.10 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Antibiyotik & Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları……..... 56

4 SONUÇ **63**

KAYNAKÇA **65**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **72**

SİMGE LİSTESİ

cm^{-1}	Dalga sayısı
dk	Dakika
µg	Mikrogram
µg/ml	Konsantrasyon
ml	Mililitre
nm	Nanometre
Ra	Ortalama pürüzlülük
V	Voltaj
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Bovin Serum Albümin
dH_2O	Deiyonize Su
EPD	Elekroforetik kaplama
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HF	Hidrojen florür
HNO_3	Nitrik asit
M	Molar
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PLGA	Poli laktik-ko-glikolik asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Ti	Titanyum
UV Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Medikal uygulamalarda kullanılan malzemeler [16].....3
Şekil 1.2 Elektroforetik kaplama yönteminin elemanları. 13
Şekil 1.3 İlaç salım sistemlerinde kullanılan polimerler [68].....16
Şekil 1.4 Kitosan kimyasal yapısı [72]. 18
Şekil 2.1 Titanyum plakaların temizlenme aşamaları 24
Şekil 2.2 Elektrik alan altında (a) ve difüzyon yöntemleriyle (b) kaplanmış yüzeylere antibiyotik yükleme ve salım işlemlerinin aşamaları 27
Şekil 2.3 Kaplama işlemi sırasında antibiyotik yükleme ve salım çalışmasının aşamaları 28
Şekil 2.4 Kaplama işlemi sonrasında elektrik alan varlığında (a) ve difüzyon yöntemleriyle (b) protein yükleme ve salım çalışmalarının aşamaları 30
Şekil 2.5 Kaplama işlemi sırasında protein yükleme çalışmasının aşamaları 31
Şekil 2.6 Kaplama işlemi sonrası ciprofloxacin ve BSA'nın birlikte yüklenmesi ve salım çalışmalarının aşamaları 32
Şekil 2.7 Kaplama işlemi sırasında ciprofloxacin ve BSA yükleme ve salım çalışmalarının aşamaları.....34
Şekil 3.1 Kaplama süresinin sabit tutulduğu (3 dakika) ve voltajın değiştirildiği koşullarda elde edilen titanyum yüzey görüntüleri: **(a)** 3V, **(b)** 5V, **(c)** 7V.....35
Şekil 3.2 Kaplama voltajının sabit tutulduğu (5V) ve sürenin değiştirildiği koşullarda elde edilen titanyum yüzey görüntüleri: (a) 1 dakika, (b) 3 dakika, (c) 5 dakika. 37
Şekil 3.3 EPD yöntemiyle kaplanan titanyum yüzeylerde elde edilen kaplama kalınlıklarının süre ve voltaj parametrelerine göre değişimi. **(a)** 5 V sabit voltaj altında farklı kaplama sürelerinde (1, 3 ve 5 dakika) elde edilen kaplama kalınlıkları. **(b)** 3 dakika sabit süreyle farklı voltaj seviyelerinde (3 V ve 5 V) gerçekleştirilen kaplamalara ait kalınlık değerleri. 37
Şekil 3.4 Farklı süre ve voltajlarda kaplanmış titanyum yüzeylerin SEM görüntüleri. 5V (a: 1 dk , b: 3 dk, c: 5 dk) , 3V (3dk) (d) ve kaplanmamış Ti (e).....39
Şekil 3.5 Kitosan, kitosan + ciprofloxacin ve kitosan + BSA kaplamalarına ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.....41
Şekil 3.6 Ciproflaxocin ilacının kalibrasyon grafiği 42
Şekil 3.7 Ciprofloxacin'in farklı yükleme yöntemleriyle hazırlanmış Ti yüzeylerden salım profilleri: (a) Kümülatif salım miktarları (µg/ml), (b) Kümülatif salım miktarları (%).....44
Şekil 3.8 Elektrik alan varlığında uygulanan iki farklı ciprofloxacin yükleme stratejisinin salım profillerinin karşılaştırılması 46
Şekil 3.9 BSA kalibrasyon grafiği. 47

Şekil 3.10 BSA'nın farklı yükleme yöntemleriyle hazırlanmış Ti yüzeylerden salım profilleri: (a) Kümülatif salım miktarları (µg/ml), (b) Kümülatif salım miktarları (%). 48
Şekil 3.11 EPD yöntemiyle uygulanan iki farklı BSA yükleme stratejisinin salım profillerinin karşılaştırılması: (i) kaplama çözeltisiyle birlikte eşzamanlı yükleme ve (ii) kaplama sonrası yüzeye yükleme. 50
Şekil 3.12 Ciproflaxin (C) yükleme işlemi sırasında farklı sürelerde ortama BSA (B) eklenmesi durumunda elde edilen salım grafikleri. C: B (3 (dk) :1(dk)), C: B (3(dk): 2 (dk)), sadece C (3 dk), (B:C (3 dk: 1 dk)), (B:C (3 dk: 2 dk)) (Difüzyon (24 saat) ile sadece C (tek başına ciproflaxacin) karşılaştırma için konulmuştur.) 52
Şekil 3.13 BSA (B) yükleme işlemi sırasında farklı sürelerde ortama ciproflaxcin eklenmesi durumunda elde edilen salım grafikleri. B:C (3 (dk) :1(dk)), B:C (3(dk): 2 (dk)), sadece B (3 dk) (C: B (3 dk: 1 dk)), (C: B (3 dk: 2 dk)) (Difüzyon (24 saat) ile sadece B (tek başına BSA)karşılaştırma için konulmuştur.)) 54
Şekil 3.14 Ciproflaxin (C) yükleme işlemi sırasında farklı sürelerde ortama BSA (B) eklenmesi durumunda elde edilen salım grafikleri. C: B (3 (dk) :1(dk)), C: B (3(dk): 2 (dk)), sadece C (tek başına ciprofloxacin, 3 dk) (B:C (3 dk: 1 dk)), (B:C (3 dk: 2 dk)) 57
Şekil 3.15 BSA (B) yükleme işlemi sırasında farklı sürelerde ortama ciproflaxcin eklenmesi durumunda elde edilen salım grafikleri. B:C (3 (dk) :1(dk)), B:C (3(dk): 2 (dk)), sadece B (tek başına BSA, 3 dk) (C: B (3 dk : 1 dk)), (C:B (3 dk : 2 dk)) 60

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Ti malzemelerin yüzey modifikasyonunda kullanılan yaygın yöntemler 9

ÖZET

Titanyum Yüzeylere Farklı Yöntemlerle Protein Ve Antibiyotik Yüklenmesi, Yöntemlerin Etkinliklerinin Karşılaştırılması

Betül PARMAKSIZ GÜNGÖR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sakip ÖNDER

Bu çalışmada, titanyum (Ti) yüzeylerin antibakteriyel ve biyoaktif özelliklerle fonksiyonelleştirilmesi amacıyla, kitosan esaslı polimerik kaplamalar elektroforetik biriktirme (EPD) yöntemiyle hazırlanmıştır. Kaplama süreci sırasında ve sonrasında antibiyotik (ciprofloxacin) ile model protein (bovin serum albümini, BSA) yüklemeleri gerçekleştirilmiştir. Yükleme işlemleri için EPD ve difüzyon olmak üzere iki farklı strateji karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Kaplama parametreleri olarak 3–7 V voltaj aralığı ve 1–5 dakika süre aralığı test edilmiş; 5 V ve 3 dakika koşullarının homojen ve sürekli kaplama elde edilmesi açısından en uygun parametreler olduğu belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen kaplamaların kalınlığı ortalama 1.1 ± 0.5 µm, yüzey pürüzlülüğü ise 0.082 ± 0.094 µm olarak ölçülmüştür. SEM analizleri, kaplamaların homojen, çatlak içermeyen bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. FTIR analizleri ise kitosan matrisine yüklenen ciprofloxacin ve BSA'nın fiziksel olarak bağlandığını ortaya koymuştur. Yükleme verimliliği açısından incelendiğinde, ciprofloxacin için EPD yöntemiyle

%49, difüzyon yöntemiyle %43; BSA için ise sırasıyla %47 ve %49 verim elde edilmiştir. 240 saate kadar izlenen salım analizleri, ciprofloxacin'in EPD yöntemiyle yüklenen örneklerinde daha yavaş ve kontrollü bir salım profili sunduğunu; BSA'nın ise difüzyon yöntemiyle yüklendiği örneklerde daha hızlı ve yüksek oranda salındığını ortaya koymuştur. Ayrıca, kaplama sırasında antibiyotik ve proteinin birlikte yüklenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, yükleme sırası ve süresinin salım kinetikleri üzerinde önemli etkiler yarattığı belirlenmiştir. Özellikle, ciprofloxacin'in sonradan yüklenmesi protein salımını artırırken, BSA'nın önce yüklenmesi antibiyotik salım hızını yükseltmiştir.

Elde edilen bulgular, titanyum yüzeylere aynı anda farklı moleküllerin (ilaç ve protein) EPD yöntemiyle entegre edilebileceğini ve yükleme sırası ile parametrelerinin kontrollü salım üzerinde belirleyici rol oynadığını göstermektedir. Bu bağlamda, çift molekül yükleme stratejilerinin, çok işlevli, uzun süreli ve dengeli salım sağlayan biyofonksiyonel titanyum yüzeylerin geliştirilmesinde önemli bir potansiyel sunduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, Ciprofloxacin, BSA, Elektroforetik Kaplama

ABSTRACT

Loading of Protein and Antibiotic Onto Titanium Surfaces By Different Methods and Comparison of Their Effectiveness

Betül PARMAKSIZ GÜNGÖR

Department of Biotechnology

Master of Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sakip ÖNDER

In this study, chitosan-based polymeric coatings were prepared on titanium (Ti) surfaces via electrophoretic deposition (EPD) to impart antibacterial and bioactive properties. During and after the coating process, loading of an antibiotic (ciprofloxacin) and a model protein (bovine serum albumin, BSA) was performed. Two different loading strategies—EPD and diffusion—were comparatively evaluated.

Coating parameters in the range of 3–7 V and 1–5 minutes were tested, and the condition of 5 V for 3 minutes was found to be optimal for achieving homogeneous and continuous coatings. Under these conditions, the coating thickness was measured as 1.1 ± 0.5 μm on average, and the surface roughness was 0.082 ± 0.094 μm. SEM analysis confirmed a uniform and crack-free surface morphology. FTIR analysis revealed that both ciprofloxacin and BSA were physically bound within the chitosan matrix. In terms of loading efficiency, 49% was achieved for ciprofloxacin using the EPD method and 43% via diffusion; for BSA, the respective efficiencies were 47% and 49%. Release studies conducted over a period of up to

240 hours indicated that ciprofloxacin exhibited a slower and more controlled release profile when loaded via EPD, while BSA showed a faster and higher release when loaded by diffusion. Furthermore, in co-loading studies involving both the antibiotic and protein, it was determined that the order and timing of loading significantly affected the release kinetics. Notably, loading ciprofloxacin after the protein increased protein release, while loading BSA prior to the antibiotic accelerated ciprofloxacin release.

These findings demonstrate that it is possible to simultaneously load different molecules (drug and protein) onto titanium surfaces via EPD and that the sequence and conditions of loading play a critical role in shaping the controlled release profile. Therefore, dual-molecule loading strategies offer significant potential in the development of multifunctional, long-term, and balanced-release biofunctional titanium surfaces.

Keywords: Chitosan, Ciprofloxacin, BSA, Electrophoretic Deposition

1
GİRİŞ

Sağlık teknolojisindeki ilerlemeler, hastalık yapıcı unsurlarla mücadele konusunda farklı yöntemlerin geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu yöntemlerden tamamen yeni ilaçların veya mevcut ilaçların geliştirilmesi ile hedefli ilaç taşınım sistemlerinin geliştirilmesi şeklinde olabilir. İlaçların formülasyonları ve hedefleme mekanizmalarında yapılacak değişikliklerle tedavi etkinliğini artırabilir ve yan etkileri azaltabilir. Bu bağlamda, ilaçların hedefe yönelik biyomalzeme yüzeylerinden lokal salımı oldukça faydalı ve kullanışlı bir yöntemdir. Lokal ilaç salımı, ilacın doğrudan hastalıklı bölgeye uygulanmasını sağlayarak sistemik yan etkileri azaltır ve tedavi sürecini optimize eder. Lokal ilaç salımı sitemlerinin geliştirilmesinde farklı yöntemler olmakla birlikte en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi olan elektroforetik kaplama (EPD) yöntemi ile ilaç içeren partiküllerin veya materyallerin doğrudan hedeflenen bölgeye uygulanması mümkündür.

EPD, basitliği ve düşük maliyeti nedeniyle şu anda mevcut en etkili kaplama yöntemlerinden biridir [1, 2]. Yüksek kaplama homojenliği, kontrol edilebilir kaplama kalınlığı, karmaşık şekillerin kaplanabilmesi ve ticari olarak erişilebilirlik gibi avantajlara sahiptir [3, 4]. Kaplamalar ilaçları veya protein moleküllerini içerecek şekilde hazırlandığında, biyomalzemelerin terapötik potansiyeli önemli ölçüde artırılabilir. Bu nedenle, lokal salım çalışmalarında kullanılabilecek ilaç veya protein yüklü kaplamaların geliştirilmesi için farklı yöntem mevcuttur [5, 6]. Genel olarak bu moleküller kaplama oluşturulduktan sonra kaplama içerisine difüzyon gibi bir yöntemle veya kaplamanın oluşturulması sırasında ortama eklenerek biyomalzeme yüzeylerinde konumlandırılırlar. EPD yöntemi ile hazırlanacak kaplamalara bu molekülleri belirtilen iki şekilde de yüklemek mümkündür. Örneğin; EPD yöntemi ile hazırlanan kaplamalara enfeksiyonlara karşı mücadele amaçlı antibiyotik veya implant doku arakesitte hücre aktivitesini

kontrol etmek üzere bir proteinin her iki ilaç yükleme yönteminin kullanılarak yüklendiği çalışmalar mevcuttur [7,8] Fakat EPD yöntemi ile hem bir antimikrobiyal ajanın hem de bir proteinin birlikte biyomalzeme yüzeylerinde kaplama oluşumu sırasında yüklendiği bir çalışma mevcut değildir. Ayrıca EPD kaplama sırasında kullanılan potansiyel fark, kaplama süresi gibi unsurların da bu moleküllerin yüklenmesi ve salım profilleri üzerine etkileri detaylı bir şekilde incelenmemiştir.

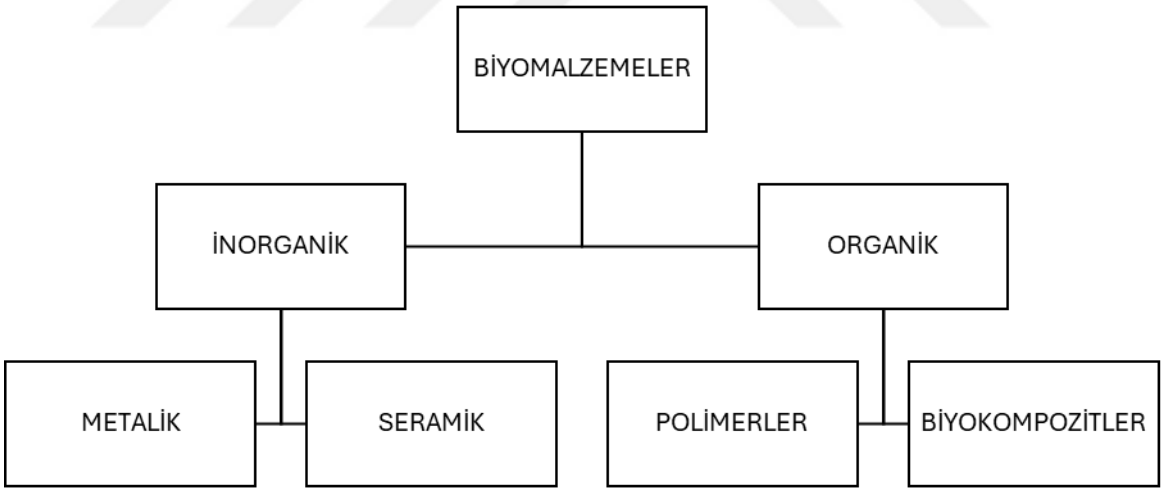
Titanyum (Ti) malzemelerin başarısını etkileyen unsurların başında bu malzemelerin yüzey ve antimikrobiyal özellikleri gelmektedir. Bu bağlamda yüzeylerin biyouyumluluğunun arttırılmasında hem biyoaktif hem de antimikrobiyal kaplamalar önemli bir yer tutmaktadır. Bu kaplamaların oluşturulmasın özellikle doğal kökenli biyouyumlu ve parçalanabilir polimerler literatürde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [9]. Kitosan yenilenebilir, biyobozunur, düşük maliyet, yüksek miktarda bulunma gibi özelliklerinden dolayı [10] Ti esaslı malzemeler için kaplama oluşturma ve ilaç salım sistemi olarak kullanılmaktadır [11]. Kitosanın EPD yöntemi ile Ti yüzeylere kaplama olarak uygulanası, farklı moleküllerin bu polimer içerisine ayrı ayrı yüklenmesine dair çalışmalarda vardır. Fakat yukarıda da belirtildiği üzere, EPD yöntemi ile farklı iki ajanın özellikle bir antibiyotik ve proteinin aynı anda yüklendiği ve kaplama süresi, EPD sırasında oluşan elektrik alanın bu moleküllerin ajan yükleme verimlilikleri ve salım profilleri üzerine etkileri yeterince incelenmemiştir. Bu sebeple tez kapsamında Ti malzemeler için doğal polimer kitosanın EPD yöntemi ile kaplanması üzerine çalışmalar yapılmış, antimikrobiyal ajan ve protein gibi iki farklı molekül aynı anda bu kaplamalara farklı yöntemler ile tutuklanmış, bu farklı metotlarının, elektrik alan varlığının ajanların yükleme ve salım profilleri üzerine etkileri incelenmiştir.

1.1 Biyomalzemeler ve Tıbbi Kullanım Alanları

Biyomalzemelerin kullanımı antik medeniyetlere kadar uzanmaktadır. Yapay gözler, kulaklar, dişler ve burunlar Mısır mumyalarında bulunmuştur [12]. Çinliler ve Hintliler, vücudun eksik veya kusurlu kısımlarını yeniden inşa etmek için mumlar, yapıştırıcılar ve dokular kullanmışlardır. Yüzyıllar boyunca, sentetik malzemelerdeki, cerrahi tekniklerdeki ve sterilizasyon yöntemlerindeki gelişmeler,

biyomalzemelerin farklı şekillerde kullanımına izin vermiştir [13]. Günümüzde tıbbi uygulamalarda çok sayıda farklı biyomalzemeler kullanmaktadır. İmplantlar (dikişler, kemik plakaları, eklem replasmanları, bağlar, damar greftleri, kalp kapakçıkları, göz içi lensler, diş implantları, vb.) ve tıbbi cihazlar (kalp pilleri, biyosensörler, yapay kalpler, kan tüpleri, vb.), travmatize olmuş veya dejenere olmuş dokuların veya organların işlevini değiştirmek ve/veya geri kazandırmak, iyileşmeye yardımcı olmak, işlevi iyileştirmek, anormallikleri düzeltmek ve böylece hastaların yaşam kalitesini iyileştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [14].

Biyomalzemeler, canlı dokularla yakın temas halinde çalışarak, vücut işlevini artırmak, onarmak veya eski haline getirmek amacıyla onları destekler veya onların yerini alabilirler. Biyomalzemeler doğal veya sentetik polimerler, metaller, seramik gibi malzemelerden veya bunların birleşimi hibrit malzemelerin kullanımı ile ihtiyaca yönelik olarak üretilirler. İhtiyaç duyulan durumlar ise, hücreler üzerinde toksik etki göstermemesi, belirli bir mekanik dayanımın olması, hücre büyümesini, farklılaşmasını teşvik etmesi veya antimikrobiyal özellik taşıması olabilir [15].



Şekil 1.1 Medikal uygulamalarda kullanılan malzemeler [16].

Biyomalzemeler, kullanım alanlarına göre (ortopedik, kardiyovasküler gibi) veya malzeme özelliklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir [17]. Biyomedikal uygulamalar için farklı malzemelerden üretilmiş ve yaygın olarak kullanılan biyomalzemelerin bir bölümü Şekil 1.1 de [16] verilmiştir.

1.1.1 Biyoseramik Biyomalzemeler

Biyoseramik biyomalzemeler, metalik ve metalik olmayan elementlerin kovalent ve/veya iyonik bağlarla bir arada tutulmasıyla üretilen malzemelerdir [18]. Alüminyum oksit (Al_2O_3), magnezyum oksit (MgO) ve silisyum dioksit (SiO_2) gibi oksitler hem metalik hem de metalik olmayan bileşenler içerirken, ZnS, CsCl ve NaCl gibi iyonik tuzlar polikristalin agregalar oluşturabilir. Ayrıca, elmas ve karbon bazlı yapılar genellikle kovalent bağlarla oluşan seramik malzemeler arasındadır. Seramikler arasındaki güçlü kovalent ve iyonik bağlar, bu malzemeleri sert ve dayanıklı kılarken aynı zamanda kırılgan hale getirmektedir [19].

Gelişen bilim ve teknoloji sayesinde seramikler, vücudun çeşitli, bölgelerini onarmak veya geliştirmek amacıyla tıbbi cihaz ve implant üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalça protezleri, kemik greftleri ve yapay tendonlar gibi birçok biyoseramik cihaz, medikal uygulamalar için geliştirilmiştir. Biyoseramiklerin biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmesi için, diğer implant malzemelerinde olduğu gibi biyouyumlu ve toksik olmayan yapıda olmalarının yanı sıra; sert, aşınmaya dayanıklı, kemik dokusuyla etkileşime girebilen ve genellikle osteointegrasyonu destekleyen özelliklere sahip olmaları gerekmektedir [20].

İmplant üretiminde üç temel biyoseramik türü kullanılmaktadır: (i) kalsiyum fosfat ve kalsiyum alüminat gibi emilebilir veya biyolojik olarak parçalanabilir seramikler, (ii) cam seramikler ve gibi yüzey reaktif veya biyoaktif seramikler ve (iii) alümina, zirkonyum ve karbon bazlı malzemeler gibi emilemeyen seramikler. Biyoseramikler, yüksek basınç mukavemetine sahip olmaları ve korozyona karşı direnç göstermeleri gibi önemli avantajlar sunar. Özellikle yük ve sürtünmeye maruz kalan eklemli yüzeylerde biyouyumlu ve dayanıklı bir seçenek olarak öne çıkarlar. Ancak, düşük kırılma tokluğu ve gerilim mukavemetine sahip olmaları, yüksek kuvvet altında çatlama veya parçalanma riskini beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, biyoseramiklerin mekanik dayanıklılığını artırmaya yönelik araştırmalar büyük önem taşımaktadır [21].

1.1.2 Polimerik Biyomalzemeler

Biyomalzemelerde kullanılan polimerler, biyolojik olarak parçalanabilir veya parçalanmayan doğal ve sentetik polimerleri içermektedir. Nişasta, kolajen ve kitin

gibi doğal olarak oluşan polimerler, biyolojik olarak parçalanabilir olmaları ve kolayca elde edilebilmeleri nedeniyle yaygın olarak biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Buna karşılık, sentetik polimerler, protez malzemeleri, diş malzemeleri, tek kullanımlık tıbbi ürünler ve tıbbi implantlar gibi birçok alanda tercih edilen ana akım biyomalzemelerdir. Günümüzde birçok tıbbi uygulamada polipropilen, polietilen, polimetilmetakrilat, polietilen tereftalat ve poliüretan gibi çeşitli sentetik polimerik malzemeler yaygın olarak kullanılmaktadır [22].

Polimerlerin lifler, filmler, levhalar ve sentetik lateks gibi çeşitli formlarda üretilebilmesi, onları metaller ve seramiklerden daha avantajlı hale getirmektedir. Ayrıca, kolay işlenebilir olmaları, uygun maliyetli üretim süreçleri ve istenilen fiziksel ve mekanik özelliklere sahip olmaları, polimerik biyomalzemelerin tercih edilme sebepleri arasındadır [23]. Ancak, polimerlerin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. İnsan vücudundaki suyu ve proteinleri emme eğilimleri, yüzeylerinin kolay kirlenmesi, sterilizasyonlarının zor olması ve zamanla aşınma veya bozulmaya uğramaları, bu dezavantajlardan bazılarıdır. Ayrıca, biyolojik olarak parçalanmayan polimerlerin aşırı kullanımı, çevre kirliliği ve atık yönetimi gibi ekolojik sorunlara yol açabilmektedir [24, 25].

1.1.3 Metalik Biyomalzemeler

Metaller, üstün termal ve elektriksel iletkenlikleri sayesinde biyomalzemeler arasında önemli bir yer tutmaktadır [26]. Kalp pili kabloları, vasküler stentler ve yapay kalp kapakçıkları gibi tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar [26, 27]. Bunun yanı sıra, kalça ve diz protezleri gibi yük taşıyan implantlar, yüksek korozyon dirençleri ve üstün mekanik özellikleri nedeniyle büyük ölçüde metalik biyomalzemelerden üretilmektedir [28].

Saf metallerin ötesinde, iki veya daha fazla element içeren metal alaşımları da biyomalzeme üretiminde yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu alaşımlar, yüzey modifikasyonu teknikleriyle biyoaktif seramikler ve polimerik ince filmler ile kaplanarak korozyon dirençleri artırılmakta ve mekanik dayanımları iyileştirilmektedir. Günümüzde, metalik biyomalzemeler üç ana grupta sınıflandırılmaktadır: saf titanyum (Ti) ve Ti-6Al-4V gibi titanyum alaşımları, paslanmaz çelik ve kobalt-krom (Co-Cr) alaşımları [26, 29]. Tıbbi uygulamalarda

metal ve alaşımların biyomalzeme olarak seçimi; biyouyumluluk, uygun fiziksel ve mekanik özellikler, korozyon direnci ve maliyet gibi temel parametrelere bağlıdır [30].

Metaller, yüksek mekanik dayanım, aşınma ve korozyon direnci gibi avantajları nedeniyle biyomalzemeler olarak önemli bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca, sterilizasyon kolaylığı, üretim süreçlerindeki esneklik ve şekil hafızası özellikleri, tıbbi uygulamalarda metal bazlı biyomalzemelerin tercih edilme nedenleri arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, yüksek elastisite modülü, olası sitotoksisite, korozyona duyarlılık ve metal iyonlarına bağlı biyouyumluluk sorunları, bu malzemelerin biyomedikal uygulamalardaki kullanımını kısıtlayan başlıca faktörlerdir [28].

1.1.4 Kompozit Biyomalzemeler

Kompozit biyomalzemeler, farklı fiziksel veya kimyasal özelliklere sahip iki ya da daha fazla fazın bir araya getirilmesiyle oluşturulan çok bileşenli sistemlerdir. Genellikle bir matris fazı (polimer, seramik veya metal) ile takviye edici faz (lif, parçacık, nanoyapı vb.) içerirler. Bu yapı sayesinde, tek bir malzemenin sağlayamayacağı mekanik dayanım, biyouyumluluk, kontrollü degradasyon ve hedefe yönelik biyolojik işlevler gibi özellikler kombine şekilde elde edilebilir [31].

Örneğin, polilaktik asit (PLA) matrisine bağlanan edilen hidroksiapatit (HA) partikülleriyle elde edilen kompozitler, kemik rejenerasyonu için hem mekanik destek sağlar hem de kemik hücresi büyümesini teşvik eder. Ayrıca karbon nanotüpler veya grafen oksit gibi nanomalzemelerle desteklenen kompozitler, antibakteriyel özellik ve elektriksel iletkenlik gibi fonksiyonel katkılar sunabilir. Bu yönüyle kompozit biyomalzemeler, özellikle ortopedik implantlar, doku mühendisliği iskeleleri ve ilaç taşıma sistemlerinde geniş uygulama alanına sahiptir [31].

1.2 Titanyum Esaslı Malzemeler Hakkında Bilgiler

Elementel metal titanyum (Ti), 1790 yılında William Gregor tarafından keşfedilmiş ve 1795 yılında Klaproth tarafından titanyum adı verilmiştir. Ti ve alaşımlarının biyomalzeme olarak artan kullanımı, düşük yoğunluk, yüksek mukavemet/ağırlık oranı, biyouyumluluk, korozyon direnci ve mükemmel mekanik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Ti, kemiklerle benzer mekanik özellikler sergileyerek biyolojik ortamlarda avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, hafif, güçlü ve biyolojik olarak uyumlu olan Ti, insan vücuduna implantasyon için gerekli olan temel özellikleri karşılayan birkaç malzemeden biridir. Bu özellikleri nedeniyle Ti ve alaşımları, biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomedikal alanda kullanılan başlıca Ti malzemeleri ticari olarak saf titanyum (cp Ti, sınıf 2) ve Ti-6Al-4V (sınıf 5) alaşımlarıdır. Bu alaşımlar, yapay kemik, eklem ve diş implantlarında yaygın olarak kullanılır [32].

Ti ve alaşımlarının biyouyumluluğu, yüzeylerinde kendiliğinden oluşan koruyucu Ti oksit film tabakasına dayanır. Bu ince oksit film, Ti biyouyumluluğunu ve korozyon direncini artıran önemli bir faktördür [32]. Ti ve alaşımlarının biyomedikal uygulamalarda başarılı olmasının bir diğer nedeni, biyolojik yükler altında uzun süre biyolojik dokularla temasta olsalar dahi olumsuz reaksiyon riskini minimuma indirmeleridir [33]. Ayrıca, Ti alaşımları zamanla osseointegrasyon sağlayarak ek destek ve stabilite sunabilmektedir [34].

1.2.1 Titanyum Malzemelerin Başarısını Etkileyen Faktörler

Ortopedik cerrahi implantlar, uzun ömürlü ve biyouyumlu malzemeler gerektirirken, Ti implantlar bazı temel zorluklarla karşı karşıyadır. Ti'nin doğal biyolojik eylemsizliği (biyoinert), implantın kemik dokusuna zayıf bağlanmasına neden olabilir, bu da uzun vadede mekanik stabiliteyi olumsuz etkileyerek aşınma ve ağrıya yol açabilir [35]. Ayrıca, Ti alaşımlarında bulunan vanadyum (V) ve alüminyum (Al) gibi elementlerin toksik etkiler gösterebileceği ve potansiyel kanserojen risk taşıdığı bilinmektedir [36, 37]. Ti yüzeylerinin düşük antimikrobiyal özellikleri, implantasyon sonrası bakteriyel kolonizasyona ve bunun sonucunda doku nekrozu ve ikincil cerrahi müdahale gereksinimlerine yol açabilir [37, 5].

İmplantın yüzey morfolojisi ve kimyasal bileşimi, kemik-implant arayüzündeki osseointegrasyon gibi biyolojik süreçleri doğrudan etkiler. Ancak, Ti implantlarının biyouyumluluğu ve mekanik uyumu her zaman ideal değildir. Özellikle, stres kalkanı etkisi nedeniyle implant çevresindeki kemikte yeniden şekillenme görülebilir, bu da implant başarısızlığına yol açabilir. İmplantın başarısı, kemik matrisinin proliferasyonu ve çevre dokuyla entegrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, implantların in vivo bütünleşmesi, tıp ve doku mühendisliği alanlarında önemli bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir [38].

Doku mühendisliği çalışmalarında, özellikle kemik-implant arayüzünün optimizasyonuna odaklanılmaktadır. İmplant yüzey yapısının biyolojik ve mekanik özellikler üzerindeki etkilerini anlamak için kapsamlı in vitro ve in vivo analizler gereklidir. Yüzey pürüzlülüğü ve gözenekliliği gibi fiziksel özellikler, sertlik ve korozyon direnci gibi mekanik faktörler, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenez gibi biyolojik süreçler ile bakteriyel tutunmanın azaltılması gibi antimikrobiyal özellikler, implant tasarımında kritik rol oynar [38].

Uygun yüzey modifikasyonları, implantların kemik matrisine entegrasyonunu artırarak biyouyumluluğu iyileştirir ve implant ile yeni kemik oluşumu arasındaki uzun vadeli stabiliteyi sağlar. Ayrıca, antimikrobiyal kaplamalar, post-operatif enfeksiyon riskini azaltarak iyileşme sürecine katkı sağlar. Bu tür modifikasyonlar, implantların uzun vadeli başarısını artırırken, hastaların yaşam kalitesini de iyileştirebilir [38].

1.3 Biyomalzemeler İçin Yüzey Modifikasyon Teknikleri

Ti ve Ti alaşımlarının mekanik ve biyolojik özelliklerini optimize etmek ve ortopedik implantların klinik performansını artırmak amacıyla yüzey modifikasyonu kritik bir gerekliliktir. Biyomedikal uygulamalara uygun malzemeler elde etmek için gerçekleştirilen bu modifikasyonlarda kullanılan yöntemler dört ana kategoriye ayrılmaktadır: Mekanik, fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal ve bu yöntemler tablo 1'de gösterilmiştir [38].

Tablo 1.1 Ti malzemelerin yüzey modifikasyonunda kullanılan yaygın yöntemler

Yüzey Modifikasyon Yöntemleri	Alt Yöntemler
Mekanik	Parlatma, taşlama ve kumlama
Fiziksel	Termal püskürtme, fiziksel buhar biriktirme(PVD) ve iyon implantasyon
Kimyasal	Kimyasal arıtma, sol-jel yöntemi, kimyasal buhar biriktirme, anodik oksidasyon ve mikro ark oksidasyon (MAO)
Elektrokimyasal	Elektroparlatma, elektrokimyasal biriktirme ve elektroforetik kaplama yöntemi (EPD)

1.3.1 Mekanik Yüzey Modifikasyon Yöntemleri

Mekanik yöntemler, malzeme yüzeyinin orijinal yapısını ve kimyasal bileşimini doğrudan değiştirerek yüzey morfolojisini modifiye eder. Bu sayede, Ti ve alaşımlarının biyolojik ortamlarla etkileşimi iyileştirilir ve kemik dokusu ile entegrasyonu desteklenir. Başlıca mekanik yüzey modifikasyon yöntemleri parlatma, taşlama ve kumlamadır. Bu gibi mekanik yöntemler, malzeme yüzeyini şekillendirerek mekanik özellikleri iyileştiren temel modifikasyon teknikleridir. Genellikle diğer yüzey modifikasyon yöntemleriyle kombinleyerek uygulanırlar ve biyomedikal implantların performansını artırmada önemli rol oynarlar [38, 41].

1.3.2. Fiziksel Yüzey Modifikasyon Yöntemleri

Fiziksel yüzey modifikasyonu, malzemenin yüzeyinde kimyasal reaksiyon içermeyen ve genellikle kaplama veya yüzey biriktirme yoluyla gerçekleştirilen bir işlemdir. Bu yöntemler, malzemenin biyouyumluluğunu ve antibakteriyel özelliklerini iyileştirerek mekanik ve biyolojik performansını artırmaktadır [38]. Biyomalzemelerin yüzeylerinin değiştirilmesinde yaygın olarak kullanılan başlıca fiziksel yöntmeler şu şekildedir:

- **Termal Püskürtme:** Termal püskürtme, metal, seramik ve polimer gibi malzemelerin bir ısı kaynağı ile eritilip, yüksek hızlı bir gaz akımı aracılığıyla yüzeye püskürtülmesi esasına dayanan bir kaplama yöntemidir. Bu teknik, yüzeylerde aşınma, korozyon ve oksidasyona karşı dayanıklılığı artırarak Ti ve alaşımlarının biyomedikal uygulamalardaki performansını geliştirmektedir. Ayrıca, kaplanan yüzeylerde mekanik dayanım ve biyouyumluluk gibi özelliklerin iyileştirilmesine de katkı sağlar [42].
- **Fiziksel Buhar Biriktirme (PVD):** PVD, vakum ortamında kaplama malzemesinin fiziksel yöntemlerle buharlaştırılarak yüzeye ince film halinde biriktirilmesini sağlayan bir kaplama tekniğidir. Bu yöntem, özellikle Ti ve alaşımlarında, yüzey özelliklerini geliştirerek biyomedikal uygulamalarda önemli avantajlar sunmaktadır [43].
- **İyon Kaplama:** İyon kaplama yöntemi, kaplama malzemesinin iyonlaştırılarak yüzeye biriktirilmesini içerir. İyon kaplama sayesinde, Ti implantların aşınma ve korozyon direnci artırılırken, aynı zamanda yüzey biyouyumluluğu da geliştirilmektedir [44].
- **Püskürtme Kaplama:** Püskürtme kaplama, genellikle asal gaz iyonlarının (örneğin argon iyonlarının) yüksek enerjili bir hedef malzemeye çarptırılmasıyla atomların serbest bırakılması ve bu atomların vakum ortamında hedef yüzeye birikmesi prensibine dayanır. Bu yöntemle üretilen kaplamalar, implantların mekanik dayanımını ve biyouyumluluğunu artırmaktadır [38].
- **İyon İmplantasyonu:** İyon implantasyonu, bir iyon kaynağı tarafından üretilen iyonların yüksek enerjiyle malzeme yüzeyine çarptırılması sonucu, atomların içeriye itilmesiyle özel yüzey özelliklerine sahip bir implantasyon tabakası oluşturulmasını sağlayan bir tekniktir [39, 40].

1.3.3. Kimyasal Yüzey Modifikasyon Yöntemleri

Kimyasal yüzey modifikasyonu, Ti ve alaşımlarının biyouyumluluğunu ve antimikrobiyal özelliklerini iyileştiren önemli bir tekniktir. Bu yöntemler, malzemenin kimyasal özelliklerini değiştirerek, hücreler ve bakterilerle etkileşimini artırır ve yüzeyde redoks reaksiyonları yoluyla biyouyumluluğu iyileştirir. Ti alaşımlarında yüzey modifikasyon katmanları oluşturarak implant

yüzeylerinin biyolojik özellikleri geliştirilir [38]. Yaygın olarak kullanılan başlıca kimyasal yüzey modifikasyon yöntemleri şu şekildedir:

- **Kimyasal arıtma yöntemleri:** Ti ve alaşımlarının yüzey özelliklerini geliştirmek için yaygın olarak kullanılan tekniklerdir. Bu işlemler, asit arıtma, alkali arıtma ve hidrojen peroksit arıtmayı içerir. Asit yıkama, malzeme yüzeyinin pürüzlülüğünü arttırırken, alkali işlem ve H_2O_2 işlemi, alkali apatit üretimini teşvik ederek malzemenin biyouyumluluğunu iyileştirir. [38].
- **Sol-jel yöntemi:** Sol-jel yöntemi, kolloid kimyası prensiplerine dayanarak yüzey kaplaması veya modifikasyonu sağlamak amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, öncül maddeler hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonlarıyla bir çözelti oluşturur; bu çözelti zamanla jel hâline gelir ve yüzeye kaplanarak ısıl işlem ile stabil bir seramik tabakaya dönüştürülür. Bu yöntemle hazırlanan jeller, yüksek gözeneklilik yapısına sahip olup uzun süreli işlem gerektirir ve kullanılan bazı organik bileşenler sağlık açısından risk oluşturabilir [38].
- **Kimyasal buhar biriktirme (CVD):** Kimyasal buhar biriktirme (CVD), gaz fazındaki reaktif maddelerin yüzeyde kimyasal reaksiyona girerek ince bir film oluşturduğu bir kaplama yöntemidir. Bu teknik, Ti ve alaşımlarının yüzeyine sertlik, aşınma direnci ve biyouyumluluk gibi özellikler kazandırmak için yaygın olarak kullanılır. CVD ile elde edilen kaplamalar genellikle homojen ve dayanıklıdır. Ancak yüksek işlem sıcaklıkları, toksik gaz kullanımı ve çevresel etkiler, yöntemin bazı dezavantajları arasında yer alır [38].
- **Anodik oksidasyon:** Ti malzemenin yüzeyinde oksit filmler oluşturur, ve bu film yüzeyin sertliğini, aşınma direncini ve biyolojik aktivitesini artırır [45]. Ayrıca voltaj ayarlanarak oksit filmlerinin alt tabakaya bağlanma yeteneği iyileştirilebilir [46]. Özellikle belirli elektrolit ortamlarında uygulandığında titanyum yüzeylerinde düzenli gözenekli yapılar (örneğin nanotüpler) oluşturarak biyouyumluluğu ve hücre tutunmasını artırmaktadır [45, 46].
- **Mikro ark oksidasyon (MAO)**: Mikro ark oksidasyonu (MAO), yüksek voltaj altında elektrolit ortamında oluşan ark deşarjları sayesinde titanyum gibi metallerin yüzeyinde seramik özellikli oksit tabakaları oluşturan bir yüzey modifikasyon yöntemidir. Bu işlem sırasında oluşan plazma arkları, yüzeyde mikro yapılar oluşturarak malzemenin mekanik dayanımını ve yüzey

fonksiyonlarını artırır. Elektrolit bileşimi, voltaj ve akım gibi parametreler ayarlanarak kaplama yapısı ve özellikleri kontrol edilebilir. Çevre dostu olması ve uzun ömürlü yüzeyler oluşturması nedeniyle biyomalzeme uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [38].

1.3.4. Elektrokimyasal Yüzey Modifikasyon Yöntemleri

Kimyasal işleme benzer şekilde, elektrokimyasal işleme de Ti ve Ti alaşımlarının yüzeyinde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlara dayanır. Bu süreçler, voltaj, akım ve sıcaklık gibi elektrolit ve işlem parametreleri tarafından kontrol edilir. Elektrokimyasal işleme yöntemleri temel olarak elektroparlatma, elektrokimyasal biriktirme ve elektroforetik kaplama tekniklerini içerir [38].

Elektroparlatma, metal yüzeylerinin mikro pürüzlerini gidererek daha düzgün ve parlak bir yapı elde etmeyi amaçlayan yaygın bir tekniktir. Bu işlem, yüksek akım kullanımıyla yüzeyin kimyasal olarak aşındırılmasını sağlar. Fakat elektroparlatma titanyumun sertliğini ve aşınma direncini artırmada sınırlı bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, biyomedikal uygulamalarda mekanik dayanımı artırmak amacıyla ek yüzey modifikasyon işlemlerinin uygulanması gerekebilir [38].

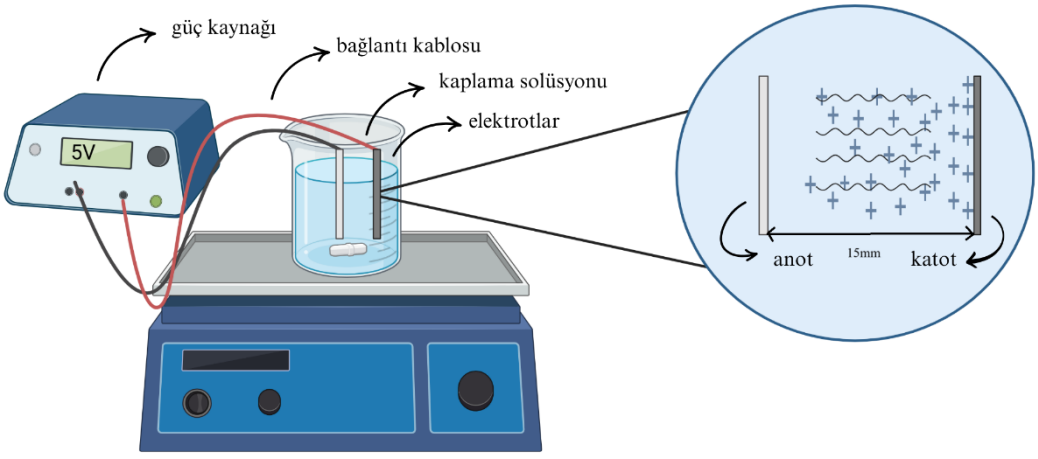
Elektrokimyasal biriktirme, Ti ve Ti alaşımlarının metalik veya metalik olmayan filmlerle kaplanmasını sağlayarak, yüzeyin sertlik, aşınma direnci ve biyoaktivite gibi özelliklerini geliştirir. Yapılan bir çalışmada, aşındırılmış Ti alt tabakalar üzerine hidroksiapatit (HAp) hibrit kaplamalar biriktirerek, BMP-2'nin kontrollü salınımını sağlamış ve bu kaplamaların hücre proliferasyonunu artırarak osseointegrasyonu desteklediğini göstermiştir [47]. Elektrokimyasal biriktirme, düzensiz şekilli yüzeylerde homojen kaplama elde edilmesine olanak tanıyan etkili bir yöntemdir. Elektrolit bileşimi, potansiyel, akım yoğunluğu ve sıcaklık gibi parametrelerin optimize edilmesi, kaplama kalitesini ve biyolojik performansı doğrudan etkiler. Bu tekniklerin sunduğu kullanım kolaylığı ve çok yönlülük, biyomedikal implantların geliştirilmesinde elektrokimyasal yöntemlerin önemini giderek artırmaktadır [38].

1.4 Elektroforetik Kaplama Yöntemi

Elektroforetik kaplama (EPD), yüklü partiküllerin bir sıvı ortamda elektrik alanı etkisiyle hareket ettirilerek iletken bir yüzeye birikmesini sağlayan bir yüzey kaplama yöntemidir ve şekil 1.2'de EPD yönteminin elemanları kaplama yöntemi gösterilmiştir. Seramikler, metal oksitler, polimerler ve kompozit malzemeler gibi farklı yapılarla uygulanabilen bu yöntem, kontrollü kalınlıkta, homojen ve yoğun kaplamaların elde edilmesine olanak tanır [48- 50].

EPD'nin temelleri 1800'lü yıllarda atılmış olup, zamanla gelişerek biyomalzeme, elektronik, enerji ve nanoteknoloji gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle tıbbi implantların biyouyumlu kaplamalarla modifikasyonu, mikroelektronik cihazlar, katı oksit yakıt hücreleri ve aşınmaya dayanıklı yüzeylerin oluşturulmasında önemli rol oynar [48 – 52].

Bu yöntemin temel prensibi, sıvı içerisinde süspanse edilmiş yüklü partiküllerin uygulanan doğru akım (DC) elektrik alanı altında zıt yüklü elektrota yönelerek yüzeye birikmesine dayanır. Elektroforez aşamasında, partiküller yük polaritesine göre katot veya anoda göç eder ve ardından elektrostatik çekimle yüzeye bağlanarak stabil bir kaplama oluştururlar [50, 51].



Şekil 1.2 Elektroforetik kaplama yönteminin elemanları.

EPD'nin avantajları arasında; işlem süresinin kısa olması, düşük sıcaklıklarda uygulanabilirliği, farklı geometrilere sahip yüzeylerin rahatlıkla kaplanabilmesi ve

basit ekipman gerektirmesi yer alır. Ayrıca, uygulanan potansiyel ve süre gibi parametreler kontrol edilerek kaplama kalınlığı ve yüzey morfolojisi kolaylıkla optimize edilebilir. Elektrot tasarımındaki ufak değişikliklerle kaplamanın homojenliği artırılabilir, bu da yöntemin esnekliğini ve çok yönlülüğünü güçlendirir [49, 50].

Bununla birlikte, yöntemin bazı sınırlamaları da vardır. Kullanılan çözücülerin ve partiküllerin elektriksel iletkenlik ve çözünürlük gibi özellikler açısından belirli kriterleri karşılaması gerekir. Ayrıca EPD genellikle tek katmanlı sistemler için daha uygundur ve çok katmanlı yapılarda ek işlem adımları gerekebilir. Endüstriyel uygulamalarda yüksek güçlü akım kaynakları ve kurutma sistemleri ihtiyacı, maliyet açısından dikkat edilmesi gereken unsurlardır [50, 53- 56].

Sonuç olarak, elektroforetik kaplama yöntemi; düşük maliyet, yüksek verimlilik, geniş malzeme uyumluluğu ve homojen kaplama kalitesiyle biyomedikal yüzey modifikasyonları ve ileri malzeme mühendisliğinde önemli bir yere sahiptir [48-56].

1.5 İlaç Salım Sistemleri

Kontrollü ilaç salım sistemleri, geleneksel yöntemlerin sınırlamalarını aşarak ilaçların doğru zamanda, doğru yerde ve doğru dozda verilmesini sağlayan yenilikçi yaklaşımlar sunmaktadır. Geleneksel ilaç uygulama yöntemleri hap, intravenöz infüzyon veya aerosol gibi formlar kontrolsüz dağılım ve hızlı metabolizma nedeniyle istenmeyen sistemik etkiler ve toksisite risklerini artırmaktadır. Bu yöntemlerde, ilacın uygulandığı andaki hızlı konsantrasyon artışı, ardından metabolizma ve atılım süreçleriyle düşüşü, terapötik etkinliği sürdürebilmek için tekrarlayan doz ihtiyacını doğurmaktadır. Bu durum, yalnızca tedavi maliyetlerini artırmakla kalmaz, aynı zamanda hastaların tedaviye uyumunu zorlaştırarak istenmeyen yan etkilere yol açabilir. Bu nedenle, kontrollü ve hedefli salım sağlayan modern ilaç taşıma teknolojileri geliştirilmiştir [57].Bu sistemlerin temel amacı, ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik profillerini optimize ederek hedef dokuya seçici taşınmasını sağlamak, toksisiteyi azaltmak ve terapötik etkinliği artırmaktır. Terapötik pencere adı verilen optimum ilaç konsantrasyonu aralığının korunmasını sağlayan bu sistemler, tek bir uygulama ile uzun süreli ve

kontrollü salım sunarak hasta konforunu ve tedavi başarısını artırmaktadır [58, 59]. Özellikle anti-inflamatuar ajanlar, antibiyotikler, kemoterapi ilaçları ve aşılar gibi birçok farmasötik ajan için bu yöntemler klinik kullanıma girmiştir.

İlaç verme sistemleri, ilaç salınımını kontrol eden mekanizmaya göre sınıflandırılabilir [60]. Difüzyon kontrollü sistemlerde, ilaç polimer matris içinde pasif difüzyonla salınır. Bu sistemler, rezervuar (membran sistemleri) ve matris (monolitik sistemler) olarak ikiye ayrılır. Rezervuar sistemlerinde ilaç, geçirgen bir zarla çevrilidir; matris sistemlerinde ise ilaç doğrudan matrisin içinde dağılmıştır. Difüzyon hızını, matrisin geçirgenliği ve kalınlığı etkiler [61].Kimyasal kontrollü sistemlerde ise ilaç salımı, polimerin hidroliz veya enzimatik parçalanmasıyla sağlanır. Bu sistemler, biyoerozyona uğrayabilen ve biyolojik olarak parçalanabilen sistemler ile sarkık zincir sistemleri olarak iki alt gruba ayrılır. Biyobozunur sistemlerde, ilaç taşıyıcının bozunmasıyla serbest kalırken, polimer zincirine kimyasal olarak bağlanmış ilaçlar uygun çevresel koşullarda koparak salınır [61].Çözücüyle aktive edilen sistemler arasında ozmotik kontrollü sistemler ve şişme kontrollü sistemler bulunur. Şişme kontrollü sistemlerde, polimer çevresel faktörlere bağlı olarak şişer ve bu fiziksel değişim ilacın difüzyonunu kolaylaştırır. Özellikle hidrojellerde bu mekanizma sıkça kullanılır [61].Modülasyonlu salınım sistemleri, ışık, manyetik alan veya elektrik gibi dışsal uyarıcılarla tetiklenebilir. Bu sayede daha kontrollü ve zamanlanabilir bir salım profili elde edilir [61].

Bunların yanı sıra, çevreye duyarlı ilaç taşıma sistemleri de geliştirilmiştir. Bu sistemler, pH, sıcaklık, redoks potansiyeli veya enzim konsantrasyonu gibi çevresel faktörlerdeki değişikliklere yanıt vererek ilacı kontrollü şekilde serbest bırakır. Örneğin, tümör mikroçevresindeki düşük pH, pH-duyarlı polimerlerle tasarlanmış taşıyıcılardan ilacın salımını tetikleyebilir [62].

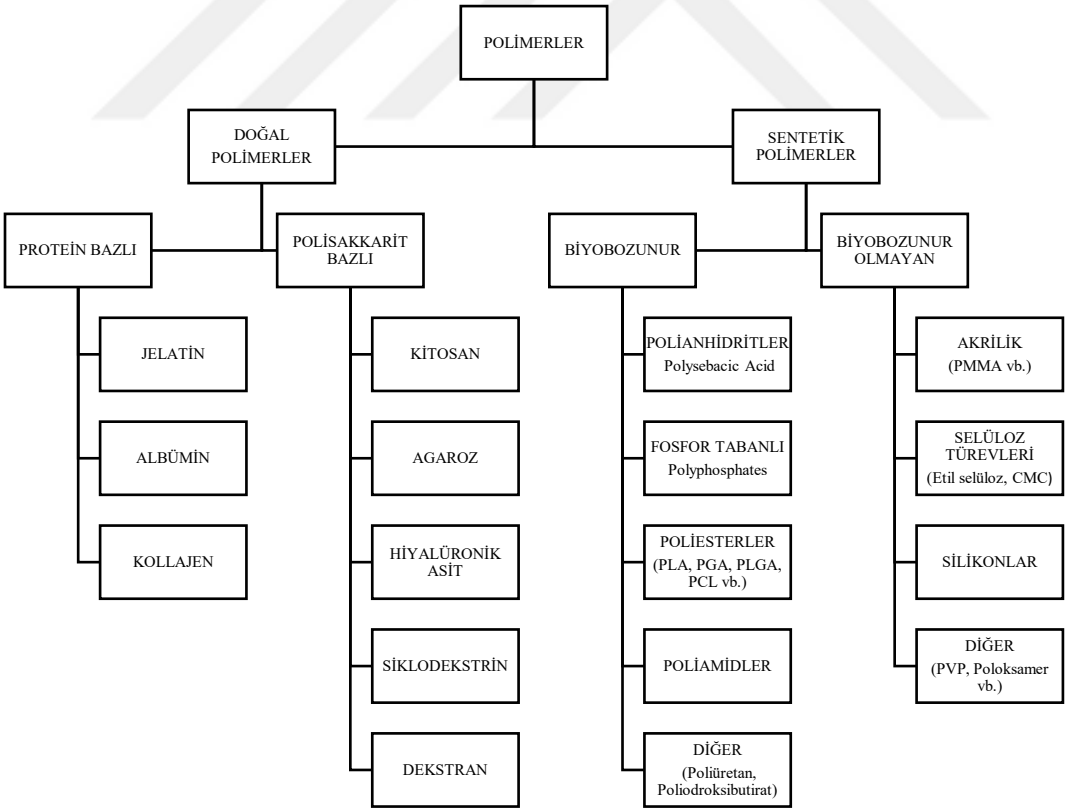
1.5.1 Polimer Bazlı Kontrollü Salım Sistemleri

Polimer bazlı ilaç taşıma sistemleri, geleneksel yöntemlere kıyasla daha hassas doz kontrolü, uzun süreli etkinlik ve hedefe yönelik dağılım avantajları sunmaktadır. Polimerler, ilaçları kimyasal bağlarla ya da fiziksel olarak matris içinde tutarak kontrollü salım kinetiği sağlarlar. Bu sayede; plazma ilaç seviyeleri optimum terapötik aralıkta tutulur, yan etkiler ve sistemik toksisite azaltılır, kısa yarı ömürlü

ilaçların uygulanması kolaylaşır, daha düşük dozlarla daha etkili tedavi sağlanır, ilaç israfı azalır ve maliyetler düşer [63, 64].Biyobozunur polimerler, ilaç taşıma sistemlerinde büyük bir öneme sahiptir. Örneğin, poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) gibi biyobozunur polimerler, ilaçları taşıyıcı matris içinde fiziksel olarak tutarak enjeksiyon sonrası biyolojik olarak parçalanır. PLGA bazlı sistemler, özellikle beyin tümörü tedavisi ve protein transferinde başarılı sonuçlar vermiştir [65, 66].

1.6 İlaç Salım Sistemlerinde Yaygın Olarak Kullanılan Polimerler

Polimerler, kökenlerine bağlı olarak doğal ve sentetik olmak üzere iki ana gruba ayrılan, tekrarlayan yapı birimlerinden oluşan büyük moleküllerdir ve yaygın olarak kullanılan polimerin bir kısmı şekil 1.3'te [68] verilmiştir. Bu polimerler, ilaç taşıma sistemlerinde kontrollü salım, hedeflenmiş ilaç iletimi ve biyouyumluluk gibi kritik özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır [67].



Şekil 1.3 İlaç salım sistemlerinde kullanılan polimerler [68].

1.6.1 Doğal Polimerler

Doğal polimerler, mikroorganizmalar, bitkiler veya hayvanlardan elde edilen biyopolimerlerdir. Bu polimerler, biyobozunur ve biyouyumlu yapıları sayesinde farmasötik uygulamalarda önemli bir yere sahiptir. İlaç taşıma, doku mühendisliği, biyosensörler ve biyomedikal görüntüleme gibi alanlarda kullanılırlar [69]. Bu tür uygulamalarda kullanılan bazı doğal polimerler şunlardır:

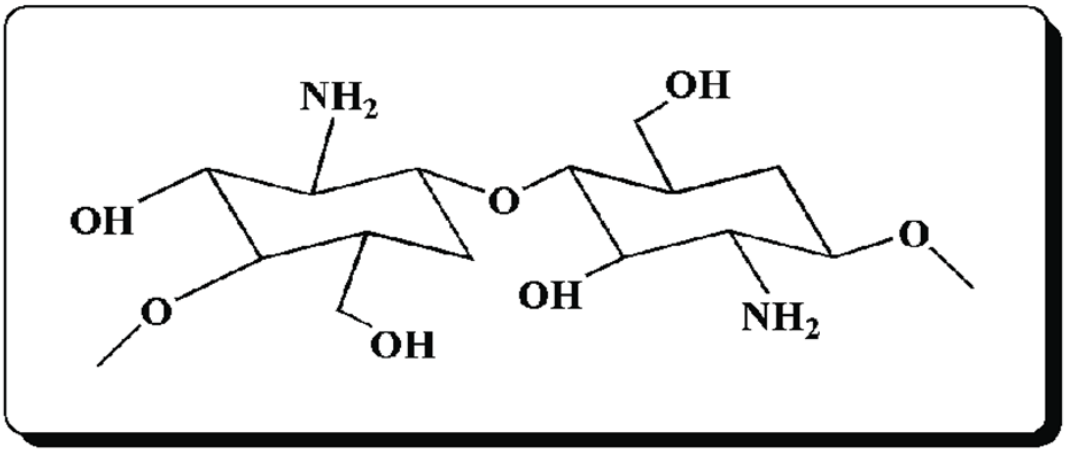
- **Arjinin**

Arjinin, protein biyosentezinde görev alan bir α-amino asittir. Yapısında bulunan guanidinyum grubu, pH bağımsız olarak protonlanmış olduğundan hidrojen bağları kurma kapasitesine sahiptir. Bu özellik, arjininin biyopolimer yapılarla etkileşerek ilaç taşıyıcı sistemlerde stabiliteyi artırmasını sağlar [70].

- **Kitosan**

Kitosan, %20 ila %30 kitin içeren yengeç ve karides gibi kabuklu deniz hayvanlarından üretilir. Kitosanın oluşumunda deproteinizasyon, demineralizasyon, renk giderme ve deasetilasyon gibi dört adım yer alır [71].

Kitosan, kitinden türetilmiş katyonik bir polisakkarit olup, ilaç salım sistemlerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir ve kimyasal yapısı şekil 1.5'te gösterilmiştir [72]. Biyobozunur, biyouyumlu ve toksik olmayan yapısı sayesinde: Mukoadezif (mukoza ile etkileşebilen) özelliğiyle burun, göz ve cilt gibi çeşitli uygulama bölgelerinde ilaç iletimini destekler. Nanopartikül, hidrojel ve mikroküre gibi formlarda ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilir. Transdermal (ciltten emilen) ilaç taşıma sistemlerinde etkilidir.



Şekil 1.4 Kitosan kimyasal yapısı [72].

- **Siklodekstrinler**

Siklodekstrinler, glukopiranoz birimlerinin oluşturduğu halkalı oligosakkaritlerdir. Üç ana tipi bulunur bu tipler α-siklodekstrin, β-siklodekstrin ve γ-siklodekstrin. Özellikle β-siklodekstrin, uygun boşluk çapı ve yüksek kompleksleme kapasitesi nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde sıkça tercih edilir [73]. Hidrofobik ilaçları çözerek biyoyararlanımı artırabilir ve ilaç stabilitesini iyileştirebilir [74].

- **Hyaluronik Asit**

Hyaluronik asit, mukopolisakkarit yapısında doğal bir biyopolimer olup, vücutta özellikle eklem sıvısı, göz, deri ve bağ dokularında bulunur. Bu madde, yüksek su tutma kapasitesine sahip olması sayesinde doku yenilenmesini destekler ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılır [75]. Osteoartrit tedavisinde, eklem sıvısının viskozitesini koruyarak eklem sağlığını iyileştirmeye yardımcı olur. Estetik uygulamalarda, cilt nemlendirici ve dolgu maddesi olarak tercih edilir. İlaç salım sistemlerinde, biyobozunur ve biyouyumlu özellikleri ile taşıyıcı olarak kullanımı yaygındır [75].

1.6.2 Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler, kimyasal yollarla üretilen ve biyobozunur veya biyostabil olarak tasarlanabilen polimerlerdir. Termal, kimyasal veya enzimatik yollarla kontrollü bozunma mekanizmalarıyla ilaç salımını düzenleyebilirler [76]. Bu tür uygulamalarda kullanılan bazı sentetik polimerler şunlardır:

- **Polietilen Glikol (PEG)**

Polietilen glikol (PEG), biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanılan hidrofilik polimerlerden biridir ve FDA tarafından onaylanmıştır. PEG, ilaç taşıma sistemlerinde su çözünürlüğünü artırmak ve immünojeniteyi azaltmak amacıyla kullanılır. Pegilasyon, terapötik proteinlerin vücutta kalış süresini uzatarak farmakokinetik profili iyileştirir. Düşük toksisite ve biyouyumluluk avantajlarıyla birçok biyofarmasötik ilaç taşıma sisteminde kullanılmaktadır [77].

- **Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)**

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), biyobozunur poliesterler sınıfına girer ve FDA onaylıdır. PLGA, hidroliz yoluyla biyolojik olarak parçalanarak ilaçların kontrollü salımını sağlar. PLA ve PGA'nın farklı oranlarda kombinasyonlarıyla biyobozunma süresi ayarlanabilir. Kemoterapi ilaçları, antibiyotikler ve protein bazlı ilaçlar için taşıyıcı sistem olarak kullanılır [7]. Ancak, PLGA'nın düşük ilaç yükleme kapasitesi ve başlangıçtaki yüksek salım oranı (burst release) gibi dezavantajları bulunur. Bu sorunları aşmak için PEG ile kopolimerizasyonu yapılmış triblok kopolimerler geliştirilmiştir [78].

- **Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAM)**

Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAM), sıcaklıkla duyarlı bir polimer olup, belirli bir sıcaklıkta faz değiştirerek ilaç salımını kontrollü bir şekilde gerçekleştirir. Ancak, biyobozunur olmaması ve trombositleri aktive etme potansiyeli nedeniyle klinik uygulamalarda sınırlamalar vardır [79].

Sonuç olarak hem doğal hem de sentetik polimerler, ilaç taşıma sistemlerinde kritik roller üstlenmektedir. Biyobozunurluk, biyouyumluluk ve ilaç yükleme kapasitesi, polimer seçiminde belirleyici faktörlerdir. Doğal polimerler genellikle daha iyi biyouyumluluk sunarken, sentetik polimerler kontrollü salım profili ve stabilite açısından avantajlıdır. Bu polimerler sayesinde hedefe yönelik, yan etkileri azaltılmış ve etkinliği artırılmış ilaç taşıma sistemleri geliştirilmektedir.

1.7 Lokal İlaç Salım Sistemleri

Klinik ilaçların yaklaşık %90'ı hidrofobik olup suda çözünmez[80]. Aynı zamanda, gastrointestinal sistem, böbrekler ve karaciğer gibi organlar tarafından metabolize

edilerek uzaklaştırılması sonucu, sistemik olarak uygulanan ilacın yalnızca %1'i hedef bölgeye ulaşmaktadır [80]. Hedef bölgede yeterli ilaç konsantrasyonuna ulaşabilmek için daha yüksek doz uygulanması gerekmekte olup, bu durum doku toksisitesi, düşük çözünürlük, zayıf seçicilik ve farmakodinamik kısıtlamalar gibi önemli sorunlara yol açmaktadır [81]. Bu sorunların üstesinden gelmek amacıyla, son yıllarda sistemik ilaç dağıtım sistemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldıracak daha etkili lokal ilaç salım sistemleri geliştirilmiştir [82].

Lokal ilaç salım sistemleri, farmakoloji ve metal malzeme teknolojisinin bir kombinasyonu olarak implant kaplamaları, nanotüp yapıları ve kovalent aşılama gibi yöntemlerle ilaç yüklenmesini sağlar. Bu sistemler, ilacın hedef bölgeye lokal olarak salınmasıyla daha etkili terapötik sonuçlar elde edilmesine olanak tanır. Sistemik ilaç dağıtım yöntemleriyle karşılaştırıldığında, Ti implantlar üzerindeki lokal ilaç salım sistemlerinin başlıca avantajları şunlardır: Özellikle, kemik mikroçevresinde yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaşılabilmekte ve bu sayede terapötik etkinlik lokal düzeyde maksimize edilebilmektedir [83]. Bunun yanı sıra, ilacın gastrointestinal bariyerlerden geçerken veya hepatik metabolizma sırasında etkinliğini yitirmesi gibi sistemik sınırlamalar ortadan kaldırılarak, biyoyararlanım düzeyi önemli ölçüde artırılmaktadır [84]. Ayrıca, yüklenen ilacın tipi ve salım profili hastalığın niteliğine ve bireysel gereksinimlere göre optimize edilebildiğinden, kişiselleştirilmiş ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin uygulanmasına imkân sunmaktadır [85].

Lokal salım sistemleri farklı amaçlarla Ti malzemelerin yüzeylerinde de kullanılmaktadır. Ti implantlar, bireysel gereksinimlere göre düzenlenebilir olup, metal işleme teknolojileri ile ilaç salımı ve depolanması kontrol edilebilmektedir [86]. Ti implantlar üzerindeki lokal ilaç salım sistemleri, ortopedi alanında giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu sistemler, Ti implantların terapötik etkilerini artırmanın yanı sıra, yüzey modifikasyonu, organik/inorganik kaplamalar ve fiziksel yüzey özellikleri (pürüzlülük, gözeneklilik vb.) aracılığıyla ilaç depolama ve salım mekanizmalarını iyileştirebilmektedir [82].

Ayrıca, osseointegrasyon oranının ilaç salım zamanlaması ile uyumu, tedavi etkinliğini artırarak implant tedavisinde tamamlayıcı bir rol oynamaktadır. Bu

bağlamda, lokal ilaç salım sistemleri, ortopedi cerrahisinde önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir [82].

1.8 İmplant İlişkili Enfeksiyonlar

İmplant ilişkili bakteriyel enfeksiyonlar, modern tıp uygulamalarında önemli bir klinik sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Cerrahi tekniklerdeki ilerlemelere rağmen, özellikle ortopedik, dental ve kardiyovasküler implantlarda görülen bu enfeksiyonlar, tedavi başarısını olumsuz etkilemektedir [87].

Enfeksiyon gelişimi üç aşamalı bir süreç izlemektedir. İlk aşamada, implant yerleştirilir yerleştirilmez serum proteinleri yüzeyi kaplar ve bu protein tabakası bakterilerin tutunmasını kolaylaştırır [88]. İkinci aşamada, tutunan bakteriler çoğalarak ekstrasellüler polimerik maddeler salgılar ve biyofilm adı verilen koruyucu bir yapı oluştururlar. Bu yapılar, bakterileri hem antibiyotiklerden hem de bağışıklık sistemi hücrelerinden koruyarak tedaviyi zorlaştırır [89]. Son aşamada ise biyofilm içindeki bakteriler, konak immün yanıtını modüle ederek kronik inflamasyona neden olur ve bu durum çevre dokulara yayılım gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilir [90, 91].

Bu enfeksiyonların önlenmesine yönelik olarak geliştirilen stratejiler arasında en etkili yöntemlerden biri, antibakteriyel ilaçlar ve biyopolimerler içeren fonksiyonel yüzey kaplamalarının kullanılmasıdır. Bu kaplamalar, bakteriyel yapışmayı engellemenin yanı sıra kontrollü ilaç salınımı sağlayarak hem enfeksiyon riskini azaltmayı hem de doku iyileşmesini desteklemeyi amaçlamaktadır [92].

1.9 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın temel amacı, Ti yüzeylere doğal ve biyobozunur bir polimer olan kitosan aracılığıyla EPD yöntemi kullanılarak hem antimikrobiyal bir ajan (örneğin antibiyotik) hem de biyolojik işlevselliği artırabilecek bir protein molekülünün aynı anda yüklenmesini sağlamaktır. Bu kapsamda, iki farklı molekülün EPD yöntemi ile kaplama sırasında birlikte yüklenmesinin mümkün olup olmadığının araştırılması ve bu yükleme yöntemlerinin verimliliği ile elde edilen kaplamaların ilaç salım profilleri üzerindeki etkilerinin detaylı olarak incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, EPD sırasında kullanılan potansiyel farkı ve kaplama süresi gibi işlem

parametrelerinin ajan yükleme etkinliği ve kontrollü salım üzerindeki etkileri değerlendirilerek, lokal ilaç salımı açısından optimize edilmiş bir kaplama stratejisi geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede hem enfeksiyon riskini azaltan hem de hücresel uyumluluğu artıran işlevsel kaplamaların geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmektedir.

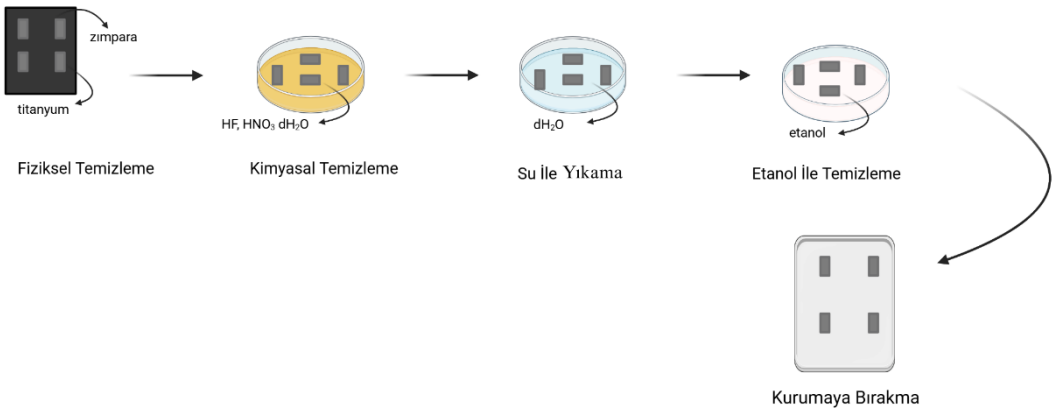
2
MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar, çözücüler ve diğer malzemeler şu şekildedir: Kitosan (Chitosan from shrimp shells, low viscosity, product No: 50494), ciprofloxacin (product No: 17850), Bovine Serum Albumin (BSA) (product No: A9647), potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) (product No: P5379), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) (product No: 255793), sodium chloride (NaCl) (product No: 969.033.1000), potassium chloride (KCl) (product No: 960.036.0500) ve hidroflorik asit (HF) (product No: 695068) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. %96'lık etanol (C_2H_5OH) (product No: 32205), asetik asit (CAS:64 19-7) ve hidroklorik asit (HCl, %37) (product No: 932.1062501-2.5L) ISOLAB firmasından sağlanmıştır. Grade 2 titanyum plakalar kullanılmıştır.. Tüm çözeltiler, distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

2.2 Kaplanacak Titanyum Malzemelerin Hazırlanması

İmplant materyali olarak, yüksek biyouyumluluğu, üstün korozyon direnci ve uygun mekanik özellikleri nedeniyle literatürde yaygın olarak tercih edilen Grade 2 ticari saf titanyum kullanıldı. Kaplama işlemine hazırlık amacıyla, 3.5 × 1.5 cm^2 boyutlarındaki titanyum plakaların yüzeyleri öncelikle zımpara kâğıdı kullanılarak fiziksel olarak temizlendi (Şekil 2.1). Bunu takiben, yüzeydeki inorganik ve organik kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla plakalar, HF, HNO_3 ve deiyonize sudan (dH_2O) oluşan kimyasal çözeltiye daldırılarak kimyasal temizlikten geçirildi. Ardından, olası kalıntıların giderilmesi için plakalar saf su (dH_2O) ile yıkandı. Son aşamada, %70 etanol çözeltisine aktarılıp dezenfekte edilen plakalar, uygun koşullarda kurutulmak üzere bekletildi.



Şekil 2.1 Titanyum plakaların temizlenme aşamaları

2.3. Kitosan Kaplama Solüsyonun Hazırlanması

Kitosan çözeltisini hazırlamak amacıyla, %1 (v/v) asetik asit içeren 100 mL deiyonize suya (dH_2O) 2 g kitosan eklendi. Elde edilen karışım, manyetik karıştırıcı üzerinde, oda sıcaklığında ve 500 rpm hızında 24 saat süreyle sürekli karıştırıldı. Karıştırma işleminin ardından, çözeltinin pH'ı 1 M NaOH kullanılarak 4.5'e ayarlandı. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra, kaplama işlemlerinde kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında saklandı.

2.4. Titanyum Yüzeylerin Elektroforetik Kaplama Yöntemi İle Kaplanması ve Karakterizasyonu

İlk olarak, %2'lik kitosan çözeltisinden 5 mL alınarak bir behere aktarıldı ve kitosan yoğunluğunu %0.5'e düşürmek amacıyla 15 mL %70 (v/v) etanol ilave edildi. Ortamın pH'ı 4.5 olarak ayarlandı. Hazırlanan karışım, ağzı kapalı şekilde manyetik karıştırıcı üzerinde homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve elektro-kimyasal kaplama işlemi için kullanıma hazırlandı. Kaplama işlemleri, önceden temizlenmiş titanyum plakalar üzerinde gerçekleştirildi. Bu aşamada, işlem parametrelerinin optimizasyonu amacıyla plakalar sırasıyla 3 dakika süreyle 3 V, 5 V ve 7 V potansiyel farkları altında katotik kaplama yapıldı. Ardından, kaplama süresinin kaplama kalitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla sabit potansiyel altında 1 dakika ve 5 dakika süreli uygulamalar yapıldı. Kaplama işlemi sonrasında elde edilen örneklerin kaplama kalınlıkları optik profilometre ile ölçülmüş; yüzey

morfolojileri ise Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile detaylı olarak analiz edildi. Yüzeylerin homojen şekilde kaplandığı işlem parametreleri, çalışmanın ilerleyen aşamalarında numune hazırlığı için kullanıldı.

Hazırlanan örneklerin kaplama kalınlığı, yüzey morfolojisi, yüzey pürüzlülüğü, kimyasal yapısı ve salım profilleri, ilgili analiz teknikleri kullanılarak değerlendirilmiş ve aşağıda açıklanmıştır.

- **Kaplama Kalınlığı Ölçümü:** Kaplama kalınlıkları, mekanik profilometre kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler, her bir numunenin üç farklı bölgesinden alınarak ortalama değer hesaplanmıştır. Bu veriler, kaplamanın homojenliği ve bütünlüğü hakkında bilgi vermek amacıyla değerlendirilmiştir.
- **Yüzey Pürüzlülüğü Ölçümü:** Kaplanan yüzeylerin pürüzlülük değerleri, mekanik profilometre ile analiz edilmiştir. Elde edilen Ra (ortalama yüzey pürüzlülüğü) değerleri, kaplama kalitesinin ve yüzeyin hücresel etkileşimler için uygunluğunun değerlendirilmesinde kullanılmıştır.
- **Yüzey Morfolojisi (SEM Analizi):** Kaplamaların yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Bu analiz ile kaplamanın homojenliği, sürekliliği ve yapısal bütünlüğü değerlendirilmiştir.
- **Kimyasal Yapı Analizi (FTIR):** Kaplama bileşenleri arasındaki kimyasal etkileşimler, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile analiz edilmiştir. Elde edilen spektrumlar, karakteristik bant kaymaları üzerinden yorumlanarak moleküller arası bağlanmalar değerlendirilmiştir.
- **İlaç ve Protein Salım Analizi (UV-Vis):** Ciprofloxacin ve BSA salım profilleri, UV-görünür bölge spektrofotometresi (UV-Vis) ile takip edilmiştir. Ölçümler, farklı zaman noktalarında alınan örneklerin absorbans değerlerine göre kalibrasyon eğrileri üzerinden hesaplanmıştır.

2.5 Antibiyotik Yükleme ve Salım Çalışmaları

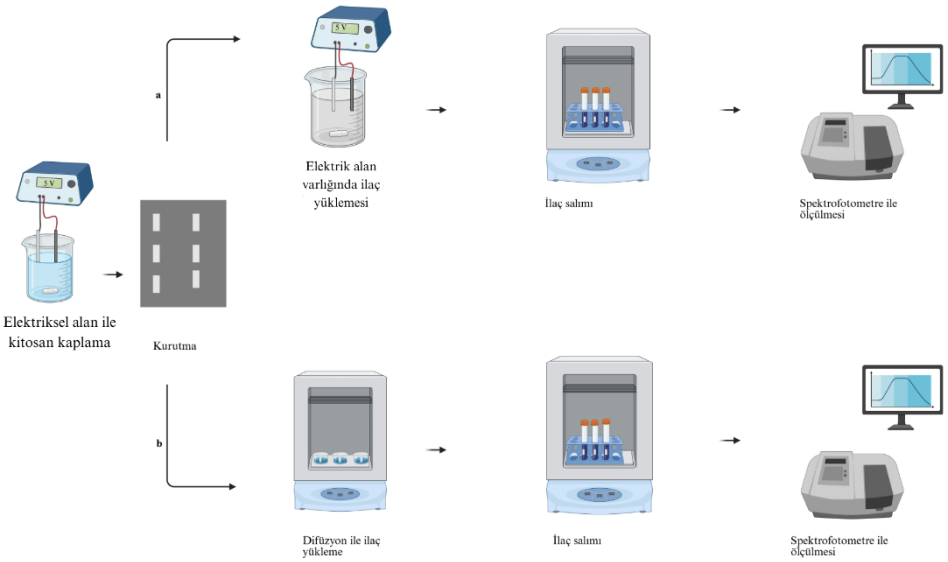
2.5.1 Kaplanmış Ti Yüzeylere Antibiyotik Yükleme ve Salım Çalışmaları

Bu çalışmada, biyomalzeme yüzeylerine antibiyotik yükleme uygulamaları kapsamında model antibiyotik olarak ciprofloxacin tercih edildi. Ciprofloxacin'in seçilme nedeni, geniş spektrumlu antimikrobiyal etkinliği ve literatürde model antibiyotik olarak yaygın biçimde kullanılmasıdır. Yükleme çalışmaları için

50 µg/ml ciprofloxacin konsantrasyonu tercih edilmiştir. Antibiyotik yükleme işlemleri, kaplanmış titanyum (Ti) örnekleri üzerine iki farklı yöntem aracılığıyla gerçekleştirildi: elektrik alan (EA) varlığında ve difüzyon.

Birinci yöntemde, Şekil 2.2a'da gösterildiği üzere, EPD tekniği kapsamında oluşturulan elektrik alan yardımıyla ciprofloxacin, kitosan kaplı Ti plakaların yüzeyine yüklendi. Bu işlem için, %70 etanol içeren ve pH değeri 9'a ayarlanan 20 ml'lik çözelti içinde ciprofloxacin çözüldü; ardından Ti plakalar bu çözeltiye daldırılarak belirli süre ve voltaj değerlerinde elektrik alan altında kaplama gerçekleştirildi. Çözeltinin pH'ının yaklaşık 9 olması nedeniyle, ciprofloxacin molekülleri karboksil gruplarının deprotonasyonu sonucu net negatif yük kazanır [50, 93]. EPD sürecinde Ti numuneleri anot olarak bağlanmış, negatif yüklü ciprofloxacin molekülleri elektrik alanla yüzeye taşındı. Bu yöntemin uygulanmasındaki temel amaç, elektroforetik kuvvetlerin antibiyotik yükleme verimliliği üzerindeki etkisinin değerlendirilmesidir.

İkinci yöntemde ise, Şekil 2.2b'de gösterildiği gibi, difüzyon temelli bir yükleme süreci uygulandı. Kitosan kaplı Ti plakalar, pH 7.4'e ayarlanan fosfat tamponlu salin (PBS) içeren 20 ml'lik çözeltiye yerleştirildi ve çözeltiye ciprofloxacin eklendi. Örnekler, fizyolojik koşulları taklit edecek şekilde 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm hızında orbital çalkalayıcıda 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, yükleme verimliliği analiz edilmek üzere örnekler ortamdan alındı.



Şekil 2.2 Elektrik alan altında (a) ve difüzyon yöntemleriyle (b) kaplanmış yüzeylere antibiyotik yükleme ve salım işlemlerinin aşamaları

Her iki yönteme ait ölçüm sonuçları, önceden oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak konsantrasyona dönüştürüldü. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında, 277 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri temel alındı ve 2, 4, 6, 8 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan ciprofloxacin çözeltileri değerlendirildi. Elde edilen absorbans-konsantrasyon verileri doğrusal bir ilişki göstermiş ve bu doğrusal grafik, tüm analizlerde referans olarak kullanılmıştır. Başlangıç çözeltisindeki ciprofloxacin konsantrasyonu ile yükleme işlemi sonrasında ortamda kalan serbest ciprofloxacin miktarı arasındaki fark hesaplanarak yüzeye bağlanan ilaç miktarı belirlendi. Bu değere dayanarak, ilaç yükleme verimliliği yüzde cinsinden aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$Yükleme\ Verimliliği\ (\%) = \left(\frac{Başlangıç\ Miktarı - Çözeltide\ Kalan\ Miktar}{Başlangıç\ Miktarı}\right) X\ 100 \quad (2.1)$$

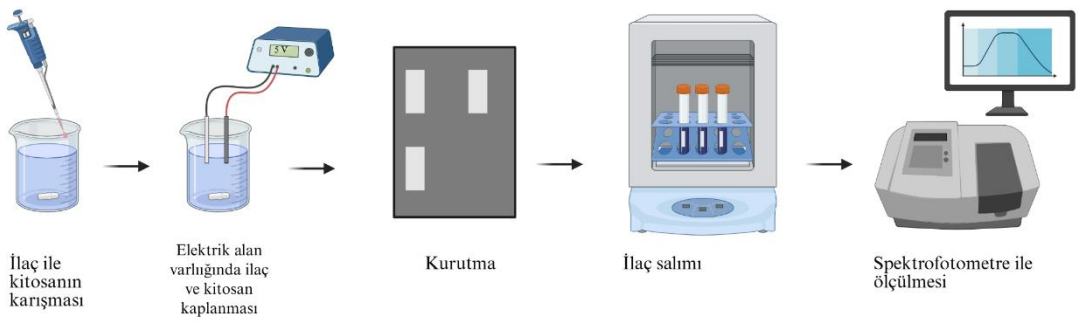
Kaplama işlemleri sonrasında, ciprofloxacin'in salım kinetiklerini belirlemek amacıyla salım çalışmaları gerçekleştirildi. Kaplanan örneknekler 3 ml PBS çözeltisine yerleştirildi ve 37 °C'de, 100 rpm'de orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra belirlenen sürelerde (4-240 saat) 1.5 ml'lik örnek alınarak aynı hacimde taze PBS ile eklendi. Salım ortamından alınan örneklerdeki ciprofloxacin miktarı, UV-Vis spektrofotometre ile 277 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen absorbanslar,

önceden hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile konsantrasyona dönüştürüldü ve zamana bağlı kümülatif salım profilleri oluşturuldu.

2.5.2 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Antibiyotik Yükleme ve Salım Çalışmaları

EPD yöntemiyle gerçekleştirilen kaplama süreci Şekil 2.3'de sunulmuştur. Bu bölümde, EPD işlemi sırasında antibiyotik yükleme zamanlamasının salım özellikleri üzerindeki etkisi incelendi. İlk olarak, ciprofloxacin doğrudan pH 4.5'e ayarlanmış 20 ml'lik kitosan kaplama çözeltisine ilave edilmiş ve EPD işlemi sırasında antibiyotik ile polimer eşzamanlı olarak titanyum yüzeyine kaplandı. Bu yöntemle, antibiyotiğin polimer matrisi içerisinde homojen şekilde dağılması sağlanarak daha kontrollü ve uzun süreli bir salım profili elde edilmesi amaçlandı. Bu yaklaşım, kaplama işlemi tamamlandıktan sonra ciprofloxacin'in polimer yüzeyine EPD yüklendiği alternatif yöntemle karşılaştırıldı.

Kaplama işlemlerinden sonra ilaç salım çalışmaları bölüm 2.4.1 de belirtiği şekilde tekrarlandı.



Şekil 2.3 Kaplama işlemi sırasında antibiyotik yükleme ve salım çalışmasının aşamaları

2.6 Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları

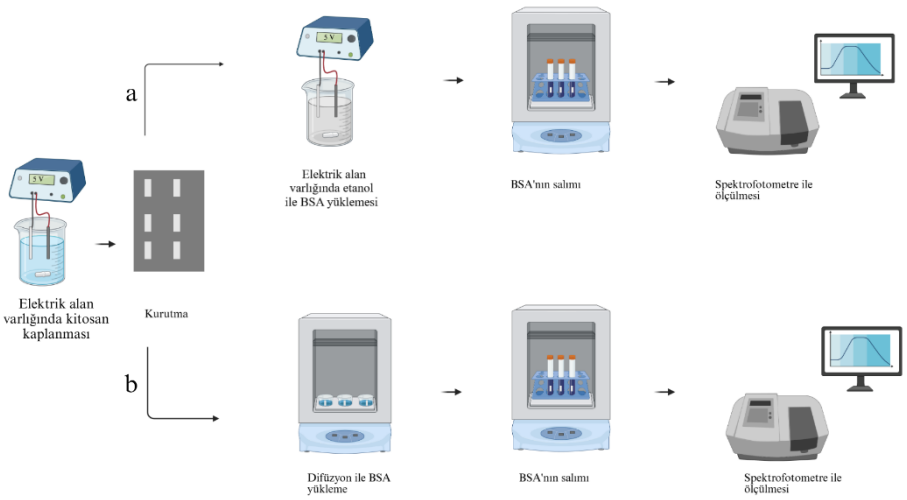
2.6.1 Kaplanmış Ti Yüzeylere Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları

Kitosanla kaplanmış titanyum yüzeylere protein yükleme işlemi, antibiyotik yükleme çalışmalarında belirtildiği şekilde (Bölüm 2.4.1) iki farklı yöntemle gerçekleştirildi ve uygulanan elektriksel alanın protein yükleme verimliliği üzerindeki etkisi değerlendirildi. Model protein olarak, biyolojik uyumluluğu

yüksek ve literatürde iyi karakterize edilmiş olması nedeniyle bovin serum albümini (BSA) tercih edildi. Bu çalışmada kullanılan BSA konsantrasyonu 100 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Birinci yöntemde, Şekil 2.4a'da gösterildiği üzere, elektroforetik birikim (EPD) tekniği kullanılarak kitosanla kaplanmış titanyum plakaların yüzeyine BSA yüklemesi yapıldı. Bu işlemde, %70 etanol içeren ve pH değeri 9'a ayarlanan 20 ml'lik çözelti içerisine titanyum plakalar daldırılmış ve belirli voltaj ve süre parametreleri altında EPD işlemi uygulandı. Uygulanan bu pH koşulunda, BSA molekülleri karboksil gruplarının deprotonasyonu sonucu net negatif yük taşımaktadır [94]. EPD işlemi sırasında titanyum numuneleri anot (pozitif elektrot) olarak bağlandığından, negatif yüklü BSA molekülleri elektrik alan etkisiyle pozitif yüklü yüzeye doğru elektroforetik hareket sergilendi [50]. Bu yöntemin temel amacı, elektroforetik kuvvetlerin protein yükleme verimliliği üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır.

İkinci yöntemde ise, yine Şekil 2.4b'de gösterildiği gibi, difüzyon temelli bir yükleme süreci uygulandı. Kitosanla kaplanmış titanyum plakalar, pH 7.4'e ayarlanmış fosfat tamponlu salin (PBS) içeren 20 ml'lik çözeltiye yerleştirildi ve ortama BSA eklendi. Örnekler, fizyolojik koşulları taklit edecek şekilde 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm hızında çalışan orbital çalkalayıcıda 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ortamdan alınan örnekler kullanılarak yükleme verimliliği analiz edildi. Kitosanla kaplanan titanyum yüzeylerden BSA salım özelliklerini değerlendirmek amacıyla in vitro salım testleri gerçekleştirildi. Bu testler aynı yine bölüm 1.4.1 de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Yükleme verimliliğinin ve salınan BSA miktarının belirlenmesinde UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır. Bu amaçla 2, 6, 8, 10 ve 12 µg/ml gibi farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltileri hazırlanarak 288 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve bu verilere dayanarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Salım deneylerinden elde edilen absorbans değerleri, bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak protein miktarına dönüştürüldü ve analizler gerçekleştirildi.

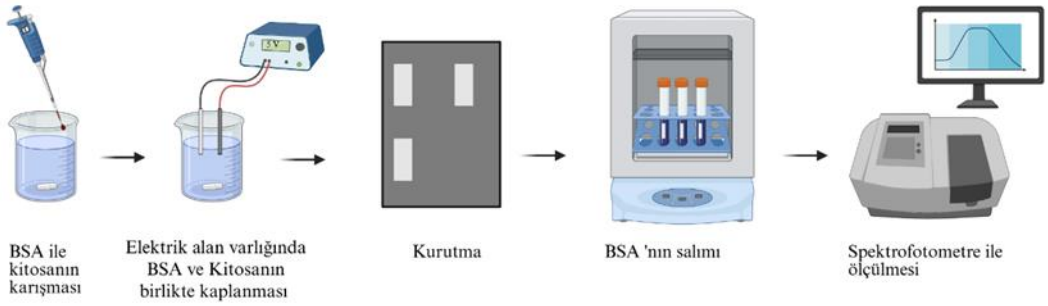


Şekil 2.4 Kaplama işlemi sonrasında elektrik alan varlığında (a) ve difüzyon yöntemleriyle (b) protein yükleme ve salım çalışmalarının aşamaları

2.6.2 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları

EPD yöntemi kapsamında, BSA yükleme zamanlamasının salım karakteristikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. İlk yöntemde, Şekil 2.5'de gösterildiği üzere, BSA, pH değeri 4.5'e ayarlandı 20 ml'lik kitosan çözeltisine doğrudan eklendi. Elde edilen bu proteinli kaplama çözeltisi, EPD tekniği kullanılarak titanyum yüzeylere uygulandı. Bu yaklaşım ile proteinin polimer matrisi içerisinde homojen olarak dağılması hedeflendi; böylece daha kontrollü ve uzun süreli bir salım profili elde edilip edilemeyeceği incelendi. Söz konusu yöntem, kaplama işlemi sonrasında BSA'nın polimer yüzeyine yüklenmesine dayanan alternatif bir yöntem ile karşılaştırıldı.

Salım işlemleri ve salımı gerçekleşen miktarların tespiti yine bölüm 2.4.1 de anlatıldığı şekilde yapıldı.



Şekil 2.5 Kaplama işlemi sırasında protein yükleme çalışmasının aşamaları

2.7 Antibiyotik ve Proteinin Birlikte Yüklenmesi Çalışmaları

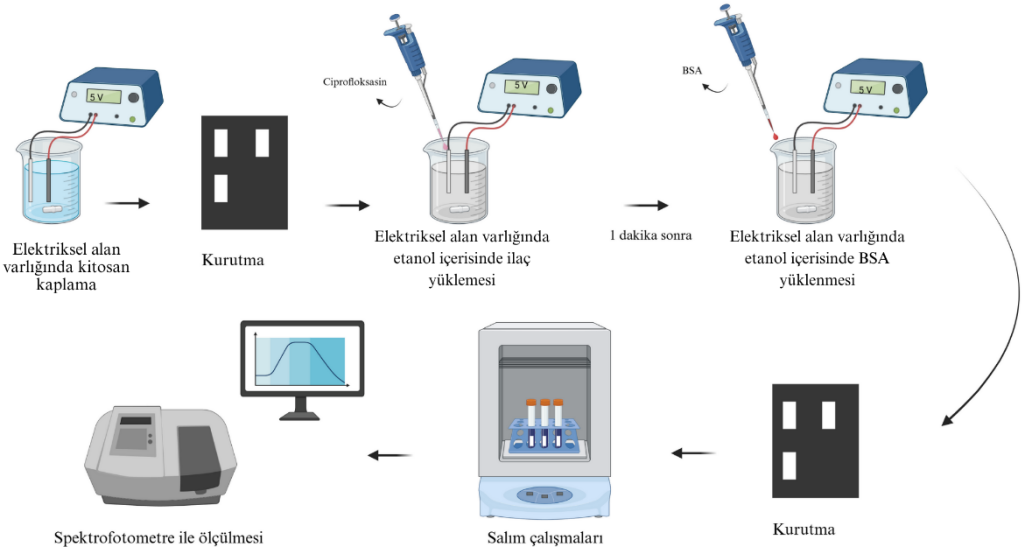
2.7.1 Kaplanmış Ti Yüzeylere Antibiyotik & Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları

Bu bölümde, antimikrobiyal özellik taşıyan ciprofloxacin ile biyolojik işlevselliği yüksek bir model protein olan bovin serum albümininin (BSA) aynı sistemde ardışık olarak yüklenmesi amaçlandı. Bu kapsamda, kitosan ile kaplanmış titanyum yüzeyler üzerine EPD yönteminde oluşturulan elektrik alan kullanılarak iki farklı molekül sıralı şekilde yüklendi ve bu yükleme stratejisinin salım profilleri üzerindeki etkileri değerlendirildi. Deneysel çalışmalarda, %80 etanol içeren ve pH değeri 9'a ayarlanan 20 ml'lik çözelti içerisinde yer alan kitosan kaplı Ti plakalar üzerine ardışık EPD işlemleri uygulandı. Uygulanan yükleme protokolleri şu şekilde dört grupta sınıflandırıldı:

1. Grup: Toplam 3 dakika kaplama süresi boyunca:
   – 3 dakika ciprofloxacin,
   – Son 2 dakikada BSA yüklenmiştir.
2. Grup: Toplam 3 dakika kaplama süresi boyunca:
   – 3 dakika ciprofloxacin,
   – Son 1 dakika BSA yüklenmiştir.
3. Grup: Toplam 3 dakika kaplama süresi boyunca:
   – 3 dakika BSA,
   – Son 2 dakikada ciprofloxacin yüklenmiştir.

4. Grup: Toplam 3 dakika kaplama süresi boyunca:
   – 3 dakika BSA,
   – Son 1 dakika ciprofloxacin yüklenmiştir.

Bu gruplandırma içerisinde yer alan "3 dakika ciprofloxacin, son 2 dakika BSA" protokolüne ait deney düzeneği Şekil 2.6'da şematik olarak sunuldu.



Şekil 2.6 Kaplama işlemi sonrası ciprofloxacin ve BSA'nın birlikte yüklenmesi ve salım çalışmalarının aşamaları

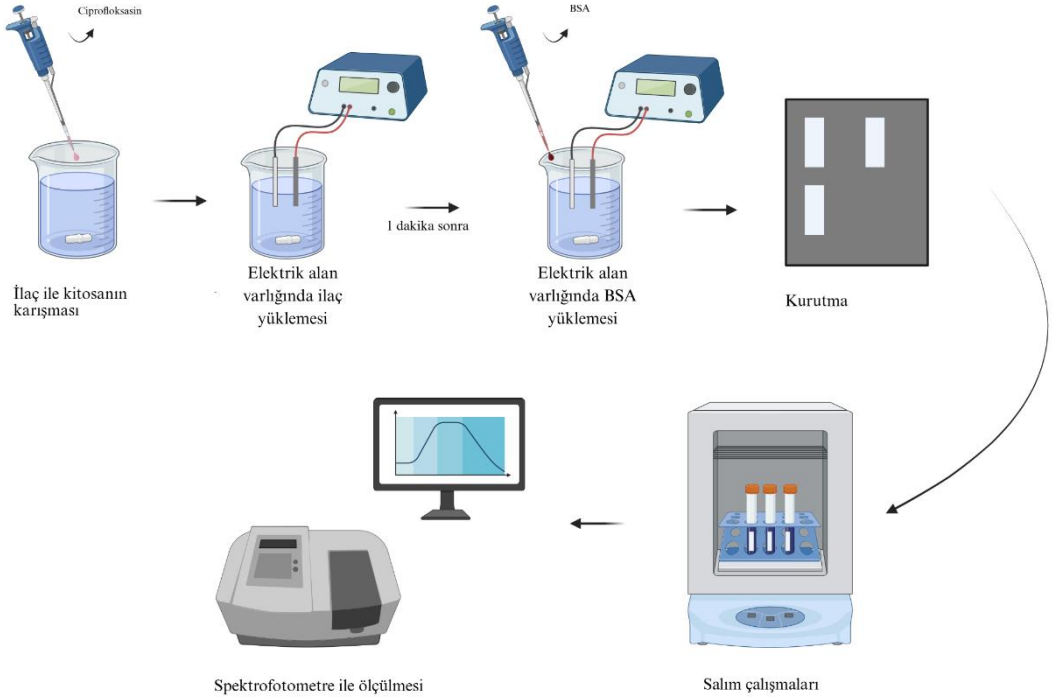
Ardışık yükleme işlemlerinin ardından, her iki molekülün salım davranışlarını değerlendirmek amacıyla in vitro salım analizleri gerçekleştirildi. Bu analizlerde, kitosan kaplı ve çift molekül yüklenen Ti örnekleri, 3 ml fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7.4) içerisine yerleştirilen ve 37 °C'de, 100 rpm'de orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Belirlenen zaman aralıklarında (örneğin 4-240 saat) 1.5 ml'lik örnek alınarak aynı hacimde taze PBS ile değiştirildi. Ciprofloxacin miktarının belirlenmesi için UV-Vis spektrofotometre ile 277 nm dalga boyunda, BSA için ise 288 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçülen absorbans değerleri, önceden oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak konsantrasyonlara dönüştürüldü ve her iki molekül için zamana bağlı kümülatif salım profilleri oluşturularak nicel analizler yapıldı.

2.7.2 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Antibiyotik & Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları

EPD işlemi Ti tüzeylerde kaplama oluşumu sırasında, ciprofloxacin ve BSA moleküllerinin aynı kaplama çözeltisi içerisinde birlikte yüklenmesi hedeflendi. Bu strateji ile iki farklı biyomolekülün polimer matrisi içerisinde eşzamanlı olarak yerleştirildi edilme potansiyeli değerlendirildi ve bu sayede tek adımda çok işlevli yüzeyler elde edilip edilemeyeceği araştırıldı. Bu doğrultuda, kitosan çözeltisine sırasıyla ciprofloxacin ve ardından BSA eklendi; elde edilen bu kombinasyon çözeltisi, elektroforetik birikim (EPD) yöntemiyle titanyum yüzeylere uygulandı. Uygulanan ardışık yükleme sürelerine göre deney grupları şu şekilde belirlendi:

1. Grup: Toplam 3 dakika kaplama süresi boyunca:
   –3 dakika ciprofloxacin,
   – Son 2 dakika BSA yüklenmiştir.
2. Grup: Toplam 3 dakika kaplama süresi boyunca:
   – 3 dakika ciprofloxacin,
   – Son 1 dakika BSA yüklenmiştir.
3. Grup: Toplam 3 dakika kaplama süresi boyunca:
   – 3 dakika BSA,
   – Son 2 dakika ciprofloxacin yüklenmiştir.
4. Grup: Toplam 3 dakika kaplama süresi boyunca:
   – 3 dakika BSA,
   – Son 1 dakika ciprofloxacin yüklenmiştir.

Bu gruplama kapsamında, “ 3 dakika ciprofloxacin, son 2 dakika BSA” protokolüne ait deney düzeneği Şekil 2.7’de şematik olarak sunuldu.



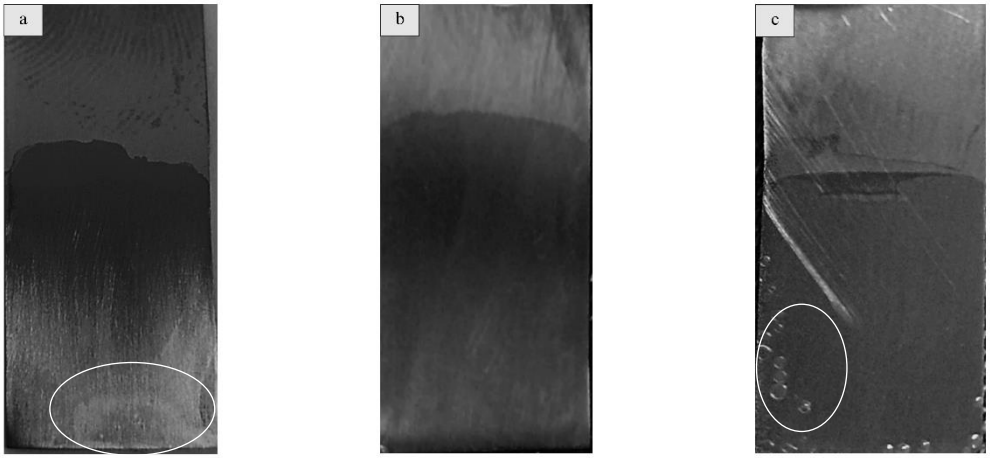
Şekil 2.7 Kaplama işlemi sırasında ciprofloxacin ve BSA yükleme ve salım çalışmalarının aşamaları.

Titanyum yüzeylere eşzamanlı olarak yüklenen ciprofloxacin ve BSA'nın, zamana bağlı olarak ortama salınım miktarlarının belirlenmesi amacıyla in vitro salım testleri gerçekleştirildi. Her bir kaplı örnek, 3 mL fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7.4) içerisine yerleştirildi ve 37 °C sıcaklıkta, 100 rpm'de orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Belirlenen zaman aralıklarında (4- 240 saat) 1.5 ml'lik örnek alınarak aynı hacimde taze PBS ile değiştirildi. Salım ortamından alınan örneklerdeki ciprofloxacin ve BSA konsantrasyonları, UV-Vis spektrofotometre ile sırasıyla 277 nm ve 288 nm dalga boylarında ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri, önceden oluşturulan kalibrasyon eğrileri yardımıyla konsantrasyon birimlerine çevrildi; böylece her iki molekül için zamana bağlı kümülatif salım profilleri hesaplandı.

3
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Kaplanmış Ti Yüzeylerin Karakterizasyon Sonuçları

Farklı süre ve voltaj kombinasyonlarının uygulanmasıyla Ti yüzeylerde oluşturulan kaplamaların yüzey görüntüleri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 sunuldu. Şekil 3.1'de sunulan kaplama görüntüleri, voltajın sabit süreli uygulamada kaplama morfolojisi üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır.



Şekil 3.1 Kaplama süresinin sabit tutulduğu (3 dakika) ve voltajın değiştirildiği koşullarda elde edilen titanyum yüzey görüntüleri: **(a)** 3V, **(b)** 5V, **(c)** 7V.

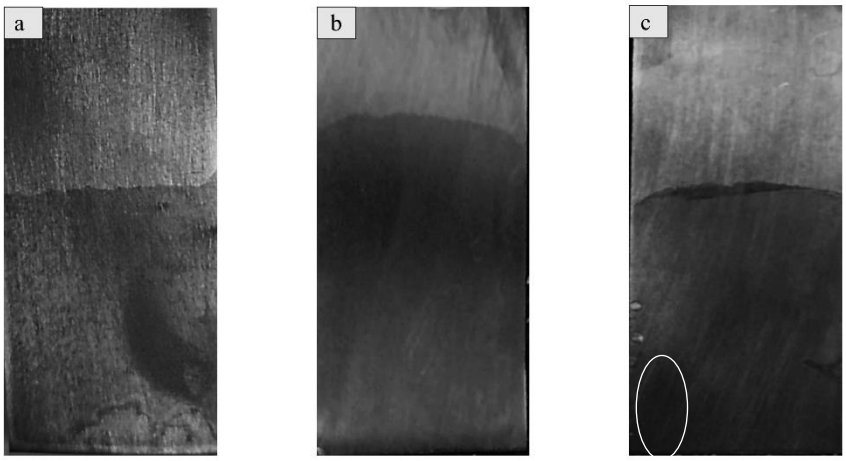
3 V uygulamasıyla elde edilen kaplama yüzeyinde düzensiz ve dağınık bir morfoloji gözlemlendi (Şekil 3.1a). Bu durum, düşük voltaj seviyesinin çözeltideki yüklü partiküllerin yüzeye etkin şekilde taşınmasını sağlayamadığını ve dolayısıyla kaplama tabakasının homojen bir biçimde oluşamadığını göstermektedir. Buna karşılık, 5 V uygulandığında elde edilen yüzeyin daha düzenli, kompakt ve homojen bir yapıya sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.1b). Bu gözlem, partiküllerin yüzeye daha kontrollü şekilde yönlendiğini ve kaplama sürecinin daha başarılı gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Ancak, voltajın 7 V seviyesine çıkarılması durumunda (Şekil 3.1c), çözeltide gaz kabarcıkları oluştu ve bu durum yüzeyde çeşitli düzensizliklere yol açtı. Söz konusu gaz kabarcıkları, yüksek voltaj etkisiyle çözeltide bulunan suyun elektroliz yoluyla hidrojen ve oksijen gazlarına ayrışmasından kaynaklanmaktadır. Bu kabarcıklar, elektrot yüzeyinde akım yoğunluğunun dengesiz dağılmasına neden olmakta ve partikül birikimini olumsuz etkileyerek kaplama tabakasında boşluklar, çatlaklar ve morfolojik bozulmaların oluşmasına yol açmaktadır. Literatürde de belirtildiği üzere, yüksek elektrik alan altında ortaya çıkan elektrohidrodinamik etkiler, partiküllerin doğrudan elektroda yönelmesini engelleyebilmekte; bu da akış sapmalarına, girdap oluşumuna ve düzensiz birikim bölgelerine neden olmaktadır [3,50].Elde edilen bu bulgular doğrultusunda, hem homojen kaplama sağlayan hem de gaz kabarcığı oluşumuna neden olmayan 5 V potansiyel farkın, sonraki numune hazırlama süreçlerinde kullanılmasına karar verilmiştir.

Şekil 3.2'de, voltaj sabit tutularak (5 V), kaplama süresinin kaplama morfolojisi üzerindeki etkisi incelenmiştir. 1 dakikalık kaplama süresiyle elde edilen yüzeyde (Şekil 2a), homojen olmayan bir yapı oluştuğu ve kaplama tabakasının oldukça ince kaldığı tespit edilmiştir. Kaplama süresinin 3 dakikaya çıkarılması durumunda ise (Şekil 2b), yüzeye iyi tutunmuş, yoğun ve homojen bir kaplama elde edilmiştir. Bu koşul, düzenli yüzey morfoljisi bakımından en uygun sonuçları vermiştir.

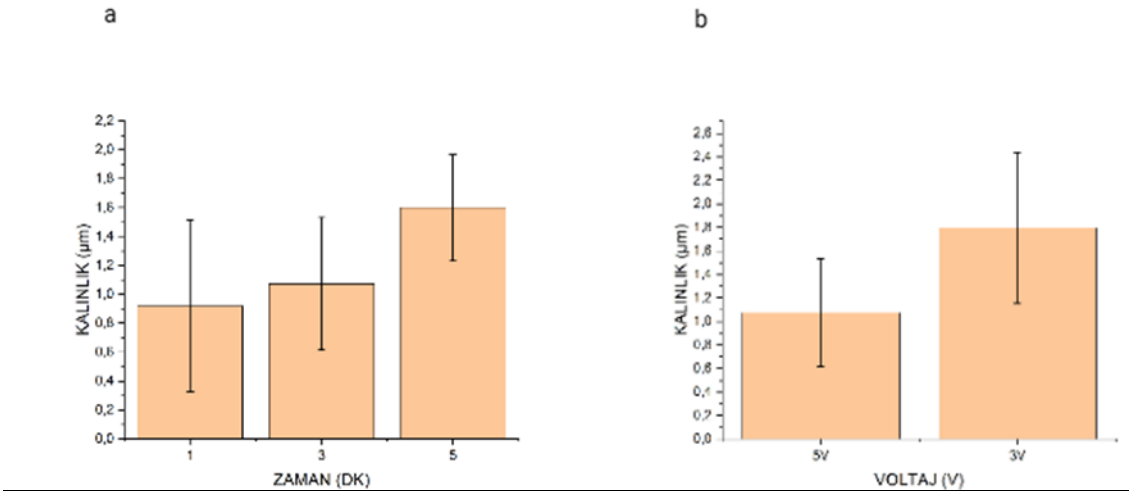
Ancak kaplama süresi 5 dakikaya uzatıldığında (Şekil 2c), yüzeyde bazı bölgelerde partikül birikintileri ve gaz kabarcıkları gözlemlenmiş; buna bağlı olarak morfolojik düzensizlikler ortaya çıkmıştır. Bu bulgular, kaplama süresinin artmasının kaplama kalitesini olumsuz yönde etkileyebileceğini göstermektedir. Literatürde de ifade edildiği üzere, uzun süreli elektroforetik biriktirme (EPD) işlemleri sonucunda yüzeye taşınan partikül miktarının artması, kalın kaplama tabakalarının oluşmasına neden olmakta; bu da kuruma esnasında gelişen iç gerilmelerle birlikte çatlak oluşumu ve yapısal bütünlüğün bozulması riskini artırmaktadır [48, 50]. Ayrıca, biriken partiküllerin çözeltideki gaz kabarcıklarıyla birleşerek yüzeyde düzensiz morfolojilere yol açtığı da rapor edilmiştir [3].

Tüm bu değerlendirmeler ışığında, homojen yapı ve yüzey bütünlüğü açısından en uygun kaplama süresi 3 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2 Kaplama voltajının sabit tutulduğu (5V) ve sürenin değiştirildiği koşullarda elde edilen titanyum yüzey görüntüleri: (a) 1 dakika, (b) 3 dakika, (c) 5 dakika.

Ti yüzeylerinde oluşan kaplamalara ait kalınlık ölçümleri, voltaj ve süre parametreleri ayrı ayrı değerlendirilerek analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.3'te sunuldu. Şekil 3.3a'da yer alan birinci analiz grubunda, voltaj sabit tutulmuş (5V) ve süre değişken olarak alınmıştır (1, 3 ve 5 dakika). Buna karşılık, Şekil 3.3b'deki ikinci analiz grubunda süre sabit tutuldu (3 dakika) ve voltaj farklı seviyelerde uygulandı (3V ve 5V).



Şekil 3.3 EPD yöntemiyle kaplanan titanyum yüzeylerde elde edilen kaplama kalınlıklarının süre ve voltaj parametrelerine göre değişimi. **(a)** 5 V sabit voltaj altında farklı kaplama sürelerinde (1, 3 ve 5 dakika) elde edilen kaplama kalınlıkları. **(b)** 3 dakika sabit süreyle farklı voltaj seviyelerinde (3 V ve 5 V) gerçekleştirilen kaplamalara ait kalınlık değerleri.

Süre sabit tutularak gerçekleştirilen voltaj değişimlerinde (3 dakika), kaplama kalınlığının en yüksek olduğu koşul 3V olarak belirlendi (1.8 ± 0.6 µm) (Şekil

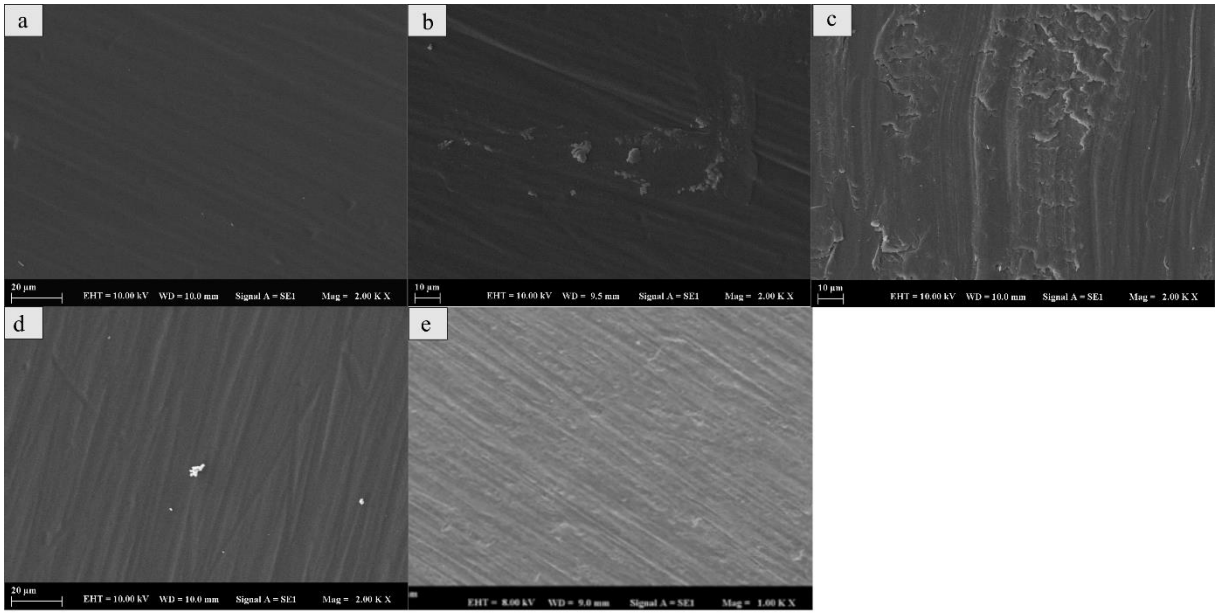
3.3b). Ancak, bu koşulda elde edilen kaplamalarda (daha önceki morfolojik analizlerde de vurgulandığı üzere) yüzey homojenliği istenen düzeyde değildir. 5V uygulandığında kaplama kalınlığı yaklaşık 1.1 ± 0.5 µm olarak ölçülmüş olup, bu voltaj seviyesinde yüzey morfolojisinin daha dengeli ve homojen bir yapı sunduğu gözlemlendi. Öte yandan, 7V uygulamasında ise kaplama yüzeyinde yoğun kabarcık oluşumu ve belirgin düzensizlikler nedeniyle güvenilir bir kalınlık ölçümü gerçekleştirilemedi. Literatürde genellikle uygulanan potansiyel fark arttıkça kaplanan partikül miktarının ve dolayısıyla kaplama kalınlığının da arttığı bildirilmektedir [50]. Ancak bu çalışmada, uygulanan voltaj arttıkça elde edilen kaplama kalınlığında beklenen oranda bir artış gözlenmedi; 5 V koşulunda daha düşük kalınlık değeri elde edildi. Bu durumun olası nedenlerinden biri, yüksek voltaj değerlerinde sistemde oluşan güçlü elektrokinetik kuvvetlerin, partiküllerin hızını artırarak süspansiyon içerisinde türbülans oluşturmuş olabileceğidir. Bu türbülans, partiküllerin hedef yüzeye kontrollü bir şekilde tutunmasını engelleyerek, bazı partiküllerin yüzeye ulaşamadan geri itilmesine ya da birikmeden yeniden süspansiyona karışmasına neden olabilir. Diğer bir faktör ise kalınlığın artmasıyla yüzeyde kaplamanın atmasından kaynaklanıyor olabilir.

Diğer yandan, 5V sabit voltaj altında gerçekleştirilen kaplamalarda, uygulama süresinin artmasıyla kaplama kalınlığında kademeli bir artış gözlemlendi (Şekil 3.3a). Örneğin, 1 dakikalık uygulamada kaplama kalınlığı 0.9 ± 0.6 µm olarak ölçülürken, bu değer 3 dakikada 1.1 ± 0.5 µm'ye ve 5 dakikada 1.6 ± 0.37 µm'ye yükselmiştir. Bu artış, sürenin uzamasıyla birlikte elektroda daha fazla partikül taşındığını ve bunun sonucunda kaplama kalınlığın arttığını göstermektedir.

Sonuç olarak, tüm parametreler dikkate alındığında, 5V – 3 dakika koşulu homojen bir yüzey kaplaması sunması açısından optimum kaplama şartı olarak öne çıkmaktadır. Bu koşul, düşük voltajın sağladığı kontrollü partikül birikimi ile sürenin getirdiği stabilizasyonu dengeli biçimde bir araya getirmektedir. Bu nedenle, tez kapsamında yürütülen tüm sonraki kaplama ve ajan yükleme deneylerinde 5V – 3 dakika parametresi tercih edildi.

3.2 Kaplanmış Ti Yüzeylerin SEM Analizleri

Farklı voltaj ve sürelerde kaplanan titanyum yüzeylerinin morfolojik özellikleri, Tarama Elektron Mikroskobu (SEM) ile de incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.4'te sunulmuştur. SEM görüntüleri, resimlerde elde edilen görüntülere (şekil 3.1, şekil 3.2) benzer şekilde, kaplama parametrelerinin yüzey homojenliği ve kaplama bütünlüğü üzerinde belirgin etkiler yarattığını ortaya koymaktadır.



Şekil 3.4 Farklı süre ve voltajlarda kaplanmış titanyum yüzeylerin SEM görüntüleri. 5V (a: 1 dk , b: 3 dk, c: 5 dk) , 3V (3dk) (d) ve kaplanmamış Ti (e)

5V – 1 dakika koşulunda elde edilen yüzeyde oldukça ince bir kaplama oluştuğu gözlemlenmiş olup kaplama varlığı çok belirgin değildir (Şekil 3.4a). Literatürde de benzer şekilde, kısa süreli EPD uygulamalarında tanecik taşınımının sınırlı kaldığı ve bunun ince kaplamalara yol açtığı bildirilmektedir [50]. 5V – 3 dakika koşulunda (Şekil 3.4b) yüzeyde belirgin bir polimer kaplama varlığı tespit edilmiştir. Bazı bölgelerde lokal yoğunlaşmalar gözlemlenmesine rağmen yüzeylerde genel olarak homojen bir kaplama gözlemlenmiştir. Ayrıca 1dk durumu ile kıyaslandığında yüzeyde kaplamanın kalınlığının artmaya başladığı da görülmüştür. EPD ile yapılan çalışmalarda da düzgün morfolojilerin genellikle orta düzey voltaj 5–20 V aralığında uygulanan voltajlar ve 1–3 dakika arasında tutulan süreler gibi orta düzey işlem parametrelerinde elde edildiği belirtilmektedir [3].

Buna karşılık, 5V – 5 dakika süresince yapılan kaplamada (Şekil 3.4c) yüzeyde daha yoğun lokal kalın kaplamalar, ve çatlaklar oluşmuştur. Bu durum, uzun süreli birikim sırasında yüzeyde yüksek polimer birikiminin oluşması ve buna bağlı gelişen mekanik gerilimlerin çatlak oluşumunu tetiklemesiyle açıklanabilir. Literatürde de, uzun süreli EPD uygulamalarında kaplama kalınlığı arttıkça çatlak oluşumu riskinin yükseldiği ifade edilmektedir [49].3V – 3 dakika koşulunda elde edilen kaplama ise yüzeylerde belirgin bir şekilde görüntülendi (Şekil 3.4 d). Kalınlık ölçümlerinde en yüksek değer bu grupta elde edilmesine rağmen, yüzey görüntülerinde (Şekil 3.1a) kaplamanın tüm yüzeye homojen olarak yayılmadığı gözlendi. Bu durum, malzemenin belirli bölgelerde yoğunlaşarak lokal kalınlık artışlarına yol açtığını gösterdi.

Tüm bu değerlendirmeler ışığında, homojen yapı ve yüzey bütünlüğü açısından en uygun kaplama parametreleri olan 5V 3 dakika SEM analizleri ile de desteklenmiş oldu.

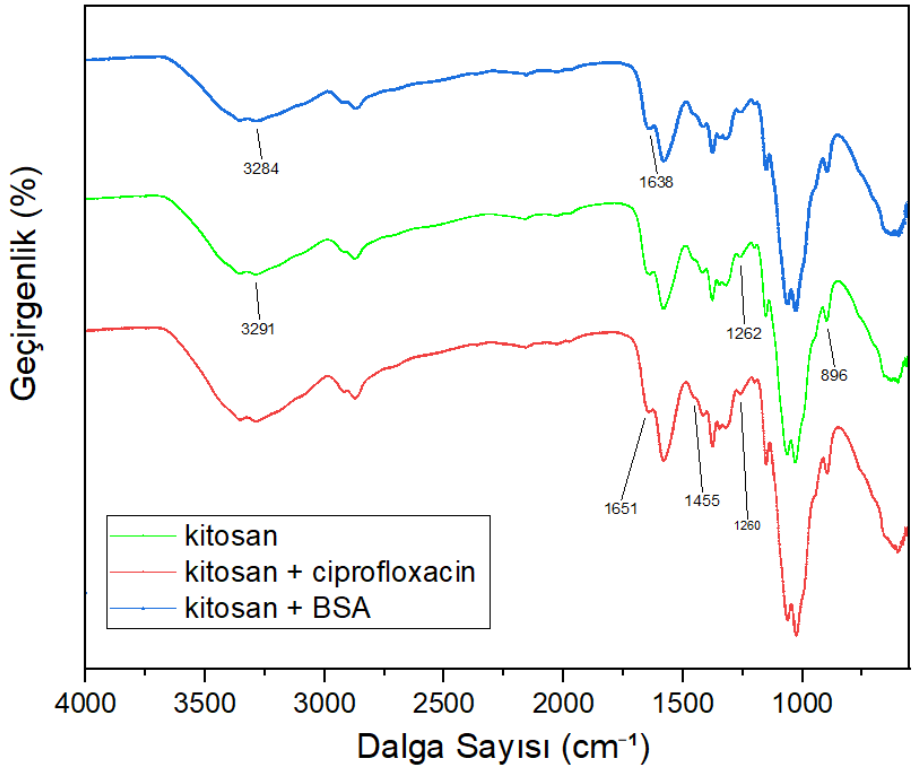
3.3 Yüzey Pürüzlülük Analizleri

Optimize kaplama parametreleri (5V – 3 dakika) ile hazırlanmış Ti yüzeylerin yüzey pürüzlülüğü, optik profilometre belirlenmiştir. Ölçümler sonucunda yüzey pürüzlülüğü 0.082 ± 0.094 µm olarak belirlenmiştir. Yüzey pürüzlülüğü, biyomalzemelerin biyouyumluluğu ve hücresel etkileşimleri açısından kritik bir parametredir. Özellikle implant yüzeylerinde, uygun düzeyde pürüzlülük; hücrelerin tutunması, proliferasyonu ve doku entegrasyonu üzerinde olumlu etkiler yaratır. Literatürde, yüzey pürüzlülüğünün 0.05–0.2 µm aralığında olması, osteoblast aktivitesini destekleyen ideal değerler arasında gösterilmektedir [95].

Bu çalışma kapsamında elde edilen 0.082 µm'lik yüzey pürüzlülük değeri, bu ideal aralık içerisinde yer almakta olup, kaplamalı yüzeyin hem morfolojik açıdan düzgün hem de biyolojik olarak uygun özelliklere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, literatürde kitosan kaplamalı titanyum yüzeylerde pürüzlülük değerinin 70–150 nm arasında değiştiği bildirilmiş olup, bu çalışmada elde edilen sonuç söz konusu literatürle de uyumluluk göstermektedir [96].

3.4 Antibiyotik ve BSA Yüklenmiş Yüzeylerin FTIR Analizi

Kitosan, kitosan + BSA ve kitosan + ciprofloxacin kaplanmış yüzeylere ait FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 3.5'te sunuldu.



Şekil 3.5 Kitosan, kitosan + ciprofloxacin ve kitosan + BSA kaplamalarına ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması.

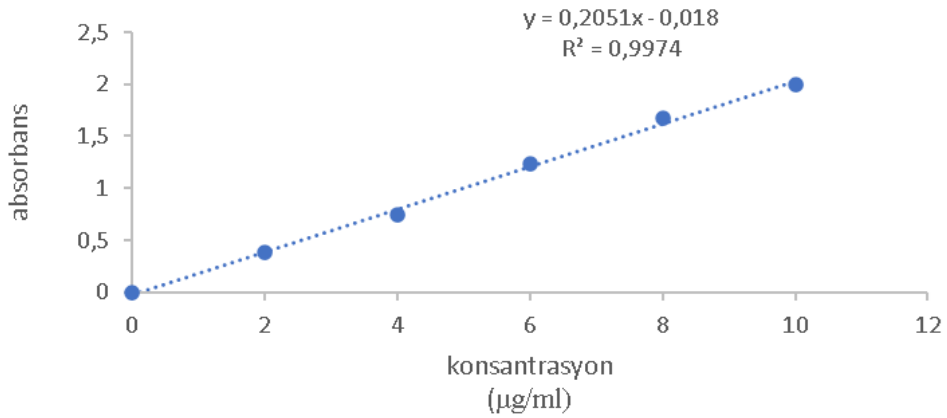
Kitosan spektrumunda 3291 cm^{-1}'de gözlemlenen bant, –OH ve $–NH_2$ gruplarının gerilme titreşimlerine karşılık gelmekte olup, kitosanın hidrojen bağı oluşturma kapasitesini ortaya koymaktadır. Ayrıca 1262 cm^{-1}'deki pik, C–N veya C–O gerilme titreşimlerini, 896 cm^{-1}'deki pik ise halkasal yapıya sahip CH salınımlarını temsil etmektedir [97].

Kitosan ve BSA birlikte kullanıldığında, 3291 cm^{-1} bandının 3284 cm^{-1}'e kayması, sistemde hidrojen bağlarının oluştuğunu ve BSA'nın yapıya bağlandığını göstermektedir. Buna ek olarak, kitosana ait 1645 cm^{-1}'lik bandın, kitosan+BSA spektrumunda 1638 cm^{-1}'ye kayması, BSA'nın Amide I grubuna işaret etmekte ve bu grubun kitosan matrisiyle etkileşime girdiğini doğrulamaktadır [98, 99].

Kitosan ve ciprofloxacin içeren sistemde ise –OH ve –NH_2 gruplarına karşılık gelen gerilme titreşim bandı 3282 cm^{-1}'de gözlemlenmiş olup, bu bant daha dar bir profile sahiptir. Bu durum, kitosan ve ciprofloxacin arasında daha sınırlı sayıda ve daha lokalize hidrojen bağı etkileşimlerinin bulunduğuna işaret etmektedir. 1651 cm^{-1} bölgesindeki pik, ciprofloxacin'in yapısında yer alan kinolon halkasına ait C=O ve C=C gerilme titreşimleriyle ilişkilendirildi. Ayrıca 1455 cm^{-1}'de gözlenen bant, ciprofloxacin'in aromatik halkasına ait karakteristik titreşim olarak değerlendirilmektedir. 1260 cm^{-1} civarında gözlemlenen bandın korunması ise, hem kitosan'ın C–O–C titreşimlerinden hem de ciprofloxacin'in yapısal katkısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çakışma, her iki molekülün bu bölgede spektral olarak katkı sağladığını, yapının genel olarak stabil kaldığını ancak etkileşimlerin zayıf ve fiziksel nitelikte olduğunu göstermektedir [100, 101].

3.5 Kaplanmış Ti Yüzeylere Antibiyotik Yükleme Ve Salım Çalışmalarının Sonuçları

Antibiyotiğin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 277nm'de absorbanslarının okunmasıyla çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 3.6'da gösterildi.



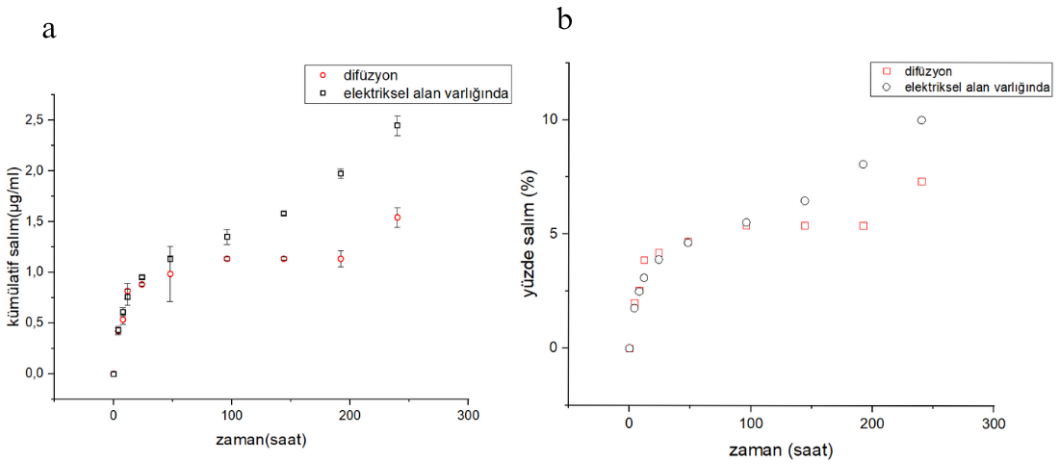
Şekil 3.6 Ciproflaxocin ilacının kalibrasyon grafiği

Kaplanmış örneklerin elektrik alan varlığında ve difüzyon ile ilaç yüklenmesi işlemlerinde sonra yükleme sıvısının içerisinde sırasıyla 25.5µg ve 28.5µg İlaç kalmıştır. Dolasıyla yüzeye yüklenen ilaç miktarı sırasıyla 24.5µg ve 21.5µg

olarak ölçüldü. Bu verilere göre kaplanmış Ti yüzeyleri için elektrik alan varlığında yükleme verimliliği %49, difüzyon ile yükleme durumunda ise %43 olarak hesaplandı. Elektrik alan varlığında yükleme verimliliğinin daha yüksek olduğu bulundu.

Kaplama işlemi sırasında kullanılan çözeltinin pH'ı 9 olduğundan [93], bu ortamda ciprofloxacin molekülleri karboksil grubunun deprotonasyonu sonucu [50] negatif yük kazanır. Bu sebeple EPD sürecinde Ti numuneleri anot (pozitif elektrot) olarak konumlandırılmıştır. Elektrik alan varlığında uygulanan elektriksel alan sayesinde yüklü ilaç molekülleri, zıt yüklü elektrota doğru hızlı ve yönlendirilmiş bir şekilde hareket eder [49]. Moleküllerin yüksek konsantrasyonlu bölgeden düşük konsantrasyonlu bölgeye taşındığı difüzon ile kıyasla, bu süreç çok daha kısa sürede gerçekleşir. Gerçekleştirilen çalışmada, elektrik alan varlığında yalnızca 3 dakikalık bir uygulama ile yüksek oranda ilaç yüklemesi elde edilirken, difüzyon yönteminde benzer yükleme için 24 saate yapıldı.

Her iki yönteme ait ciprofloxacin salım profilleri şekil 3.7a ve şekil 3.7b'de karşılaştırmalı olarak sunuldu. Başlangıçtaki salım miktarları benzerlik göstermesine rağmen, elektrik alan varlığında yüklenmiş örneklerde daha kontrollü bir salım profili gözlemlendi. Dördüncü saatte ölçülen 0.43 µg/ml'lik salım, ilacın başlangıçta belirgin ancak dengeli bir şekilde serbest bırakıldığını ortaya koymaktadır. 24. Saatte 0.95 µg/ml'ye ulaştı ve salım sürecinin ilerlemesiyle birlikte 96. saatte 1.34 µg/ml'ye ulaşan toplam salım miktarı, bu noktadan sonra yavaşlayarak 240. saatte 2.44 µg/ml seviyesine çıktı. 240. Saatin sonunda yüzeye yüklenen ilacın sadece %10'nun salımı gerçekleşti.



Şekil 3.7 Ciprofloxacin'in farklı yükleme yöntemleriyle hazırlanmış Ti yüzeylerden salım profilleri: (a) Kümülatif salım miktarları (µg/ml), (b) Kümülatif salım miktarları (%).

Difüzyon yöntemiyle hazırlanan sistemlerde ise farklı bir salım profili gözlendi. 4. saatte gerçekleşen ilk salım miktarının 0.42µg/ml olması, benzer bir başlangıç salımı verdi. 24. Saatte 0.88 µg/ml'ye ulaşan salım miktarı, 96. Saate gelindiğinde toplam salım 1.13 µg/ml (şekil 3.7 a) ulaşmış, bu noktadan sonra ise salım hızı durağan bir faza geçmiştir. Ancak bu noktadan itibaren salım hızı durma noktasına gelmiş ve yalnızca 240. saatte küçük bir artış gözlemlenerek 1.54µg/ml ulaşmıştır. 240 saatin sonunda yüklenen ilacın sadece %7,3(şekil 7b) salımı gerçekleşti. Bu durum, difüzyona dayalı sistemlerin daha sınırlı salım kapasitesine sahip olduğunu ve salım hızlarının erken dönemde azalarak sistemin etkinliğini düşürdüğünü göstermektedir. Yapılan bir çalışmada benzer şekilde pasif yüklenen sistemlerin ilk hızlı salım sonrası durağan bir profile geçtiğini belirtmiştir [102]. Bu farkın temel nedenlerinden biri, yükleme işlemi sırasında kullanılan ortam pH'ıdır. Difüzyonla yüklemede kullanılan pH 7.4 ortamında ciprofloxacin molekülleri, karboksil grubunun deprotonlaşması ve amin grubunun kısmen protonlanması nedeniyle çoğunlukla nötr veya zwitteryonik formdadır. Bu durumda yüzeye tutunma, yalnızca zayıf fiziksel adsorpsiyonla sınırlı kalmakta; bu da ilacın erken saatlerde hızla çözünmesine ve kısa süreli bir salıma yol açmaktadır. Buna karşılık, pH 9 ortamında ciprofloxacin negatif yük kazanırken, kitosan bu pH değerinde protonlanma düzeyini kaybederek pozitif yükünü büyük ölçüde yitirir. Dolayısıyla, elektrostatik etkileşimlerin etkisi sınırlı olup, yükleme sürecinde ciprofloxacin'in

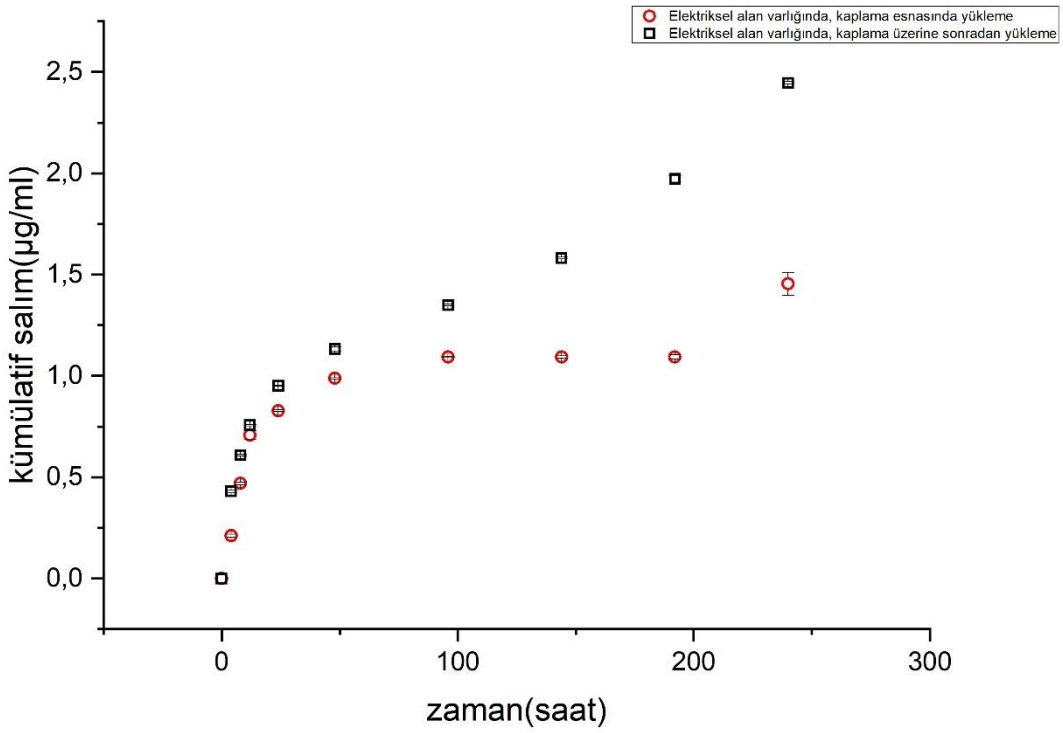
yönlendirilmiş hareketi esas olarak uygulanan elektrik alanın etkisiyle gerçekleşmiştir.

Bu durum, ilacın kaplama içerisine daha derin yerleşmesini sağlamakta ve salımın daha kontrollü ve uzun süreli gerçekleşmesine katkıda bulunmaktadır.

3.6 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Antibiyotik Yükleme ve Salım Çalışmaları

Kaplama işlemi sırasında kullanılan çözeltinin pH değeri yaklaşık 4.5 olup, bu asidik ortamda ciprofloxacin moleküllerinin karboksil grupları protonlanmakta ve molekül net pozitif yük kazanmaktadır [103]. Kaplama sırasında Ti numuneleri katot (negatif elektrot) olarak bağlandı. Bu durumda, pozitif yüke sahip ciprofloxacin molekülleri, elektrik alan etkisiyle çözelti içerisinde hareket ederek Ti yüzeyine yönelerek kaplama oluşumu ile birlikte yüzeye tutunmuştur. Kitosan kaplaması sırasında uygulanan ilaç yükleme yöntemiyle elde edilen salım profiline (şekil 3.8) bakıldığında, ilaç salımının ilk saatlerde oldukça sınırlı gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum, ilacın büyük oranda kaplama matrisinin iç kısımlarında dağılmış olmasından kaynaklanabilir. İlk 4 saat içerisinde salınan ilaç miktarı yalnızca 0.21 µg/ml olup, bu değer yüzeye yakın bölgelerde bulunan ilaç miktarının sınırlı olduğunu göstermektedir.

Salım süresi 24 saate ulaştığında, toplam ilaç salımı 0.83 µg/ml seviyesine çıktı, ancak bu noktadan sonra salım hızında belirgin bir yavaşlama gözlendi. Bu durum, ilacın matrisin daha derin katmanlarına gömülü olması nedeniyle çözünme ve difüzyon süreçlerinin zamanla sınırlı şekilde ilerlemesine bağlanabilir. Bununla birlikte, 240. saatte gözlemlenen ani artışla birlikte salım miktarı 1.45 µg/ml'ye ulaşmıştır. Bu artış, kaplama yapısına daha sıkı şekilde bağlı olan ilaç moleküllerinin zamanla çözünerek gecikmeli salım gerçekleştirmesi ile açıklanabilir [104].



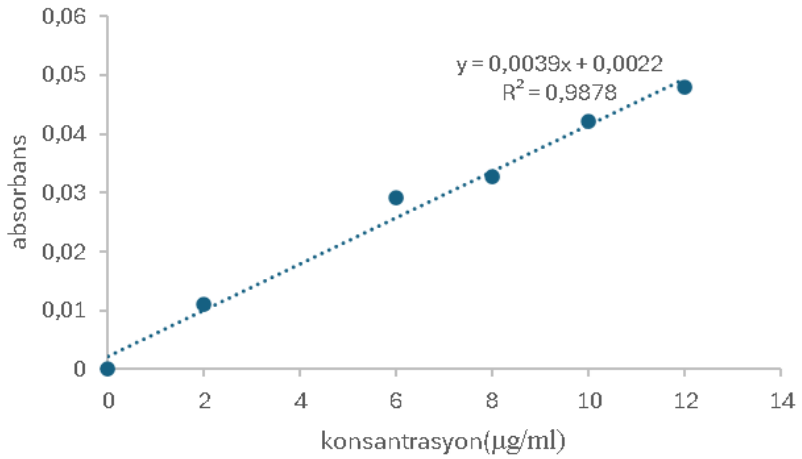
Şekil 3.8 Elektrik alan varlığında uygulanan iki farklı ciprofloxacin yükleme stratejisinin salım profillerinin karşılaştırılması

Kaplama esnasında ilaç yükleme yöntemi ile kaplama üzerine sonradan elektrik alan varlığında ilaç yükleme yöntemi karşılaştırıldığında, kaplama üzerine ilaç yüklemesinde belirgin şekilde daha yüksek salım miktarlarına ulaştığı görülmektedir. Özellikle 240. saatte, kaplama üzerine sonradan yüklenen ilaçta salımı gerçekleşen miktar yaklaşık 2.44 µg/ml çıkarken; kaplama esnasında yükleme yapılan grupta ise bu değer 1,45 µg/ml civarında kalmıştır. Bu fark, sonradan yükleme yönteminde ilacın daha çok yüzeye yakın veya kaplama dışına yakın konumlanması nedeniyle daha hızlı ve yoğun salım gerçekleşmesiyle ilişkilendirilebilir [105].

Bununla birlikte, kaplama esnasında yükleme yönteminde daha düşük ve sabit bir salım profili elde edildiği görülmektedir. Özellikle 100 ile 200 saat arasında salım miktarı neredeyse sabit kalarak durağan yapı göstermiştir. Ancak 240. saatte gözlenen belirgin artış, bu yöntemde kaplama matrisi içinde daha derinlerde hapsolmuş ilacın geç salımını işaret edebilir.

3.7 Kaplanmış Ti Yüzeylere Protein Yükleme ve Salım Çalışmalarının Sonuçları

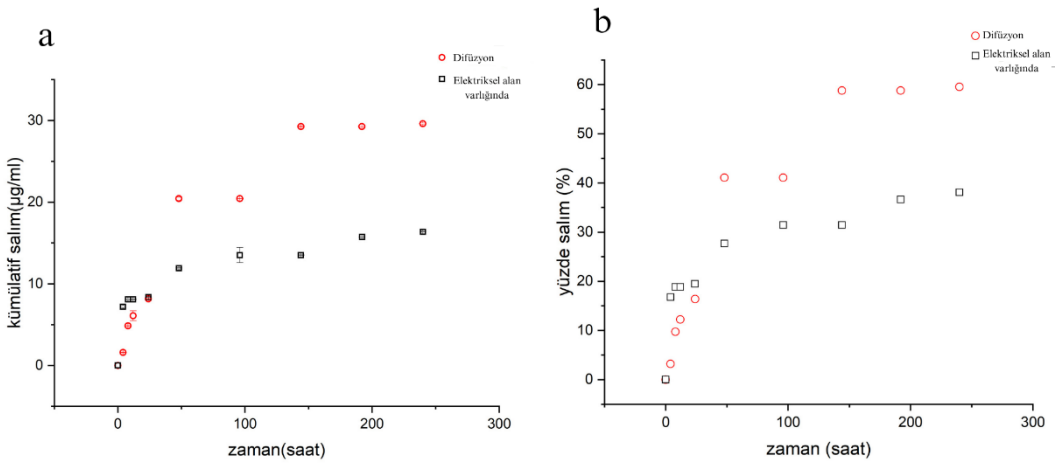
Farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinin 288 nm dalga boyunda absorbanslarının ölçülmesiyle kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (şekil 3.9).



Şekil 3.9 BSA kalibrasyon grafiği.

Kaplanmış örneklerde, elektrik alan varlığında ve difüzyon yöntemleriyle gerçekleştirilen yükleme işlemleri sonrasında, yükleme çözeltisinde sırasıyla 53 µg (elektrik alan varlığında) ve 49 µg (difüzyon) protein kalmıştır. Bu verilere göre, yüzeye bağlanan BSA miktarları sırasıyla 47 µg ve 43 µg olarak hesaplanmış; buna bağlı olarak yükleme verimliliği elektrik alan varlığında %47, difüzyon yöntemi için ise %49 olarak belirlenmiştir.

Protein kaplama işlemi sırasında kullanılan çözeltinin pH'sı yaklaşık 9 olduğundan, bu alkali ortamda BSA molekülleri karboksil gruplarının deprotonasyonu sonucu net negatif yük taşımaktadır [94]. Elektriksel alan varlığında uygulama yapılırken Ti numuneler anot (pozitif elektrot) olarak bağlandı. Bu durumda, negatif yüklü BSA molekülleri elektrik alan etkisiyle pozitif yüklü Ti yüzeyine doğru elektroforetik hareket sergiler [50].



Şekil 3.10 BSA'nın farklı yükleme yöntemleriyle hazırlanmış Ti yüzeylerden salım profilleri: (a) Kümülatif salım miktarları (µg/ml), (b) Kümülatif salım miktarları (%).

Her iki yönteme ait BSA salım profilleri Şekil 3.10a ve 3.10b'de karşılaştırmalı olarak sunuldu. Elektrik alan varlığında yüklenen örneklerde, 4. saatte 7.2 µg/ml, , 24. saatte 8.36 µg/ml, 96. saatte 13.51 µg/ml ve 240. saatte 16.37 µg/ml protein salımı gerçekleşmiştir (Şekil 10a). Bu miktarlar üzerinden yapılan hesaplamalar sonucunda, 4. saatte yüklemenin %16.5'inin, 24. saatte %19.45'nin ve 240. saatin sonunda ise yaklaşık %38'inin salındığı belirlenmiştir (Şekil 10b). Elde edilen bu salım profili, ilk saatlerde hızlı başlayan bir salım eğiliminin zamanla yavaşladığını ve sistemin daha durağan bir faza geçtiğini göstermektedir. Başlangıçta gözlenen yüksek salım, kaplama yüzeyine daha yakın konumlanmış ve matrise tam olarak bağlanamayan BSA moleküllerinin çözeltideki ortamla daha hızlı etkileşime girmesinden kaynaklanabilir. Bu durum, literatürde proteinlerin yüzeye yakın konumlandığında daha hızlı çözünme eğilimi gösterdiğini bildiren çalışmalarla da örtüşmektedir [106]. Özellikle 12. saatten sonra protein salımındaki artışın yavaşlaması, BSA'nın kaplama yapısı içinde daha homojen dağılmış olması ve polimer matrisiyle daha güçlü fiziksel etkileşimler kurmasıyla ilişkili olabilir. Kitosan matrisi, ortamın pH'sına bağlı olarak kısmi pozitif yüklü amino gruplarına sahiptir. BSA ise bu pH koşullarında net negatif yüke sahiptir. Bu yük farkı, protein ve polimer arasında elektrostatik çekim oluşmasına neden olur. Ayrıca hem BSA'nın hem de kitosanın yapısında bulunan fonksiyonel gruplar ($–NH_2$, –OH, –COOH) arasında hidrojen bağları oluşabilir. Bu etkileşimler, BSA'nın kaplama içinde daha sıkı tutulmasını sağlayarak salımını geciktirir ve kontrollü hâle getirir.

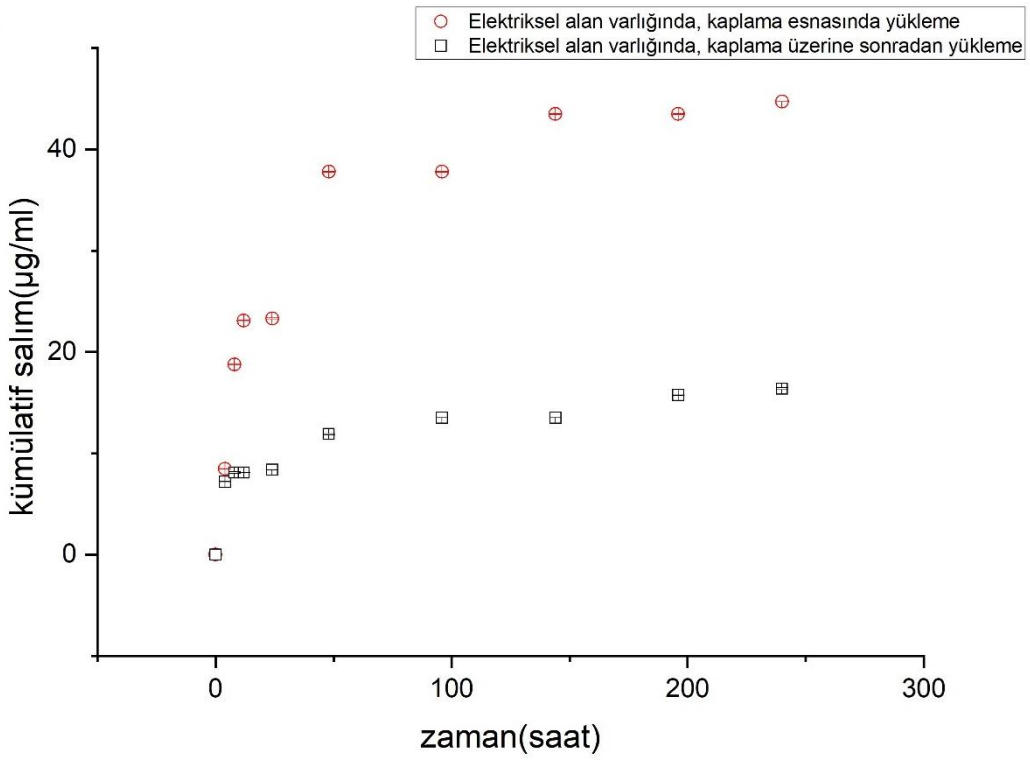
Difüzyon yöntemiyle yüklenen örneklerin EPD sisteminden farklılık göstererek, 4. saatte yapılan ilk ölçümlerinde salınan BSA miktarının 1.5µg/ml olduğu hesaplandı. Salımın özellikle 24. saat ile 48. saat arasında belirgin şekilde hızlandığı ve bu süreçte %16,40 salımdan %41'e (şekil 10b) yükselmiştir. Bu 2.5 katlık bir artış ile 20,44 µg/ml gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu salım davranışı, protein moleküllerinin kaplama matrisi içerisindeki difüzyonuna bağlı olarak zamanla artan bir çözünme profili, yani proteinlerin matriste tutunma kuvvetine ve konumuna bağlı olarak kademeli şekilde çözünüp ortama geçmesi şeklinde açıklanabilir. Başlangıçta yüzeye daha yakın olan proteinler hızla çözünürken, matrise daha sıkı tutunan veya daha derin yerleşmiş proteinlerin daha geç salındığı gözlemlenmiştir [107]. 144. saate gelindiğinde, salım miktarı yaklaşık 29 µg/ml'e ulaşmış ve bu noktadan sonra sabitlenerek bir durağan bir yapı oluşturmuştur. 240. saatte ölçülen maksimum salım miktarı 29.6 µg/ml olup, bu değer yüklenen toplam proteinin yaklaşık %60'ına (şekil 10b) karşılık gelmektedir. Bu hızlı salım davranışı, BSA'nın büyük ve globüler yapısı nedeniyle kaplama sırasında polimer matrisinin daha derin bölgelerine penetre olamaması ve çoğunlukla yüzeye yakın bölgelerde birikmesiyle açıklanabilir. Bu konumlanma, ortamla temas eden proteinlerin daha hızlı çözünerek erken salınmasına neden olmuştur.

3.8 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları

Kaplama işlemi sırasında kullanılan çözeltinin pH değeri yaklaşık 4.5 olduğundan, bu asidik ortamda BSA molekülleri karboksil gruplarının protonlanması sonucu pozitif yük taşımaktadır. Kitosan da bu pH'ta yüksek oranda protonlanmış olduğundan pozitif yüklüdür. EPD sürecinde Ti numuneleri katot (negatif elektrot) olarak konumlandırılmıştır. Bu durumda, pozitif yüklü BSA molekülleri elektrik alan etkisiyle çözelti içerisinde hareket ederek Ti yüzeyine yönelmiş ve kaplama içerisinde konumlanmıştır.

Kaplama sırasında yüklenen BSA'nın salım profili incelendiğinde (Şekil 3.11), 4. saatte yaklaşık 8.4 µg/ml protein salındığı gözlemlenmiştir. BSA'nın kaplama çözeltisinde kitosan ile birlikte yüklenmesi sırasında, her iki molekülün pH 4.5'te benzer pozitif yük taşıması, elektrostatik itici etkileşimlere neden olmuş olabilir.

Bu durum, BSA'nın polimer matrise daha zayıf bağlarla tutunmasına ve yüzeye yakın konumlanmasına yol açarak, özellikle erken saatlerde hızlı bir salım profili oluşturmasına katkı sağlamış olabilir. Literatürde de benzer şekilde, polimer matrise tam olarak bağlanamayan proteinlerin, yükleme anında eşzamanlı eklendiklerinde daha erken salındığı bildirilmiştir [108]. 48. saate gelindiğinde, kümülatif salım miktarı 37 µg/ml'ye ulaşmış ve bu noktadan itibaren sistemin salım profili durağan bir faza geçmiştir. 240. saat sonunda ulaşılan maksimum kümülatif salım miktarı ise 44.71 µg/ml olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, BSA'nın büyük oranda ilk 48 saat içinde salındığını ve geri kalan kısmın daha yavaş bir hızla ortama geçtiğini göstermektedir.



Şekil 3.11 EPD yöntemiyle uygulanan iki farklı BSA yükleme stratejisinin salım profillerinin karşılaştırılması: (i) kaplama çözeltisiyle birlikte eşzamanlı yükleme ve (ii) kaplama sonrası yüzeye yükleme.

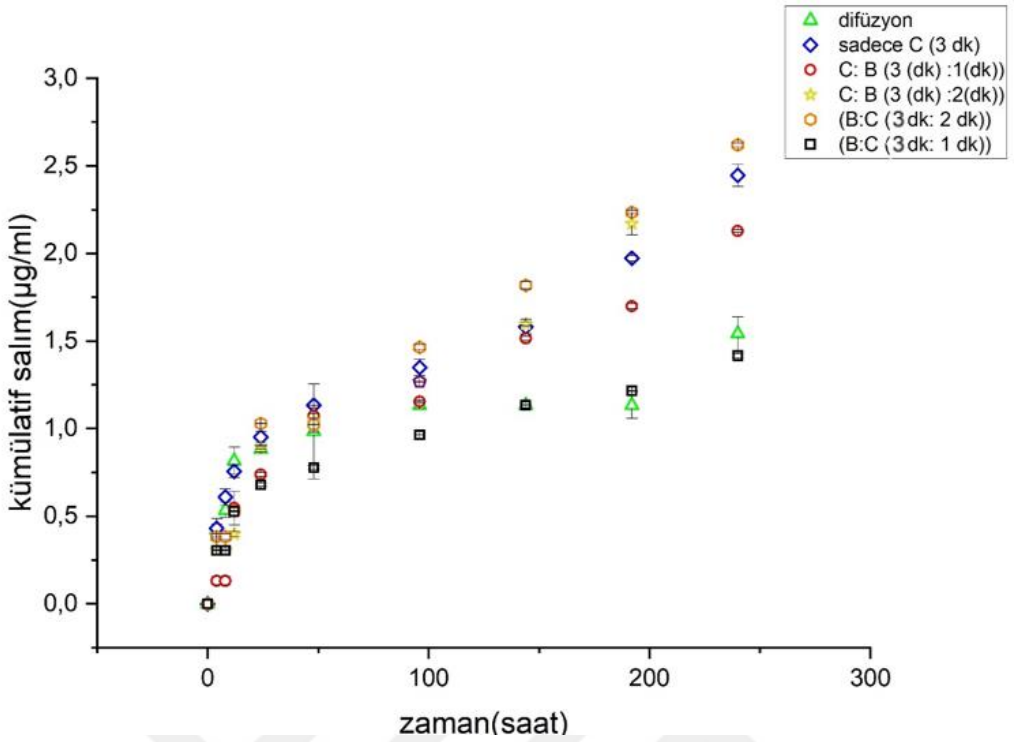
Buna karşılık, kaplama tamamlandıktan sonra elektrik alan varlığında yüklenen BSA örneklerinde, salım 4. saatte 7.2 µg/ml olup, 240. saatin sonunda yalnızca 16.37 µg/ml'ye ulaşmıştır. Bu düşük salım miktarının bazı olası sebepleri vardır. Bu yöntemde EPD işlemi pH 9'da gerçekleştirilmiştir. Bu pH seviyesinde BSA, karboksil gruplarının deprotonlaşmasıyla net negatif yüke sahiptir. Kitosan ise bu pH'ta kısmen protonlanmış hâlde olup, pozitif yükünü kısmen korumaktadır. Bu

koşullarda BSA ve kitosan arasında güçlü elektrostatik çekim kuvvetleri oluşarak proteinlerin matrise daha sıkı bağlanmasına neden olmuş olabilir. Ancak önemli bir diğer nokta, pH 9 ortamının BSA'nın doğal yapısını bozma potansiyelidir. Albumin molekülleri yüksek pH'a karşı hassas olduğundan, bu koşullarda denatürasyon veya agregasyon meydana gelebilir. Bu da proteinlerin kaplama matrisi içinde düzensiz yerleşmesine, çözünürlüklerinin azalmasına ve salım hızlarının düşmesine yol açmış olabilir. Bu koşullar birlikte değerlendirildiğinde, yükleme çözeltisinin pH'sı, elektrostatik bağ kuvvetleri, protein stabilitesi ve elektrik alan yönü, salım davranışı üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada, EPD yöntemiyle hazırlanan kitosan–albumin filmlerinde kullanılan pH koşullarının, protein yapısı üzerinde doğrudan etkili olduğu belirtilmiştir. Özellikle yüksek pH'da, albumin moleküllerinin yapısal bütünlüğünün bozulabileceği; bunun da kaplama içinde düzensiz yerleşime ve sınırlı salıma yol açabileceği rapor edilmiştir [109].

3.9 Kaplanmış Ti Yüzeylere Antibiyotik & Protein Yükleme ve Salım Çalışmalarının Sonuçları

İlaç ve proteinin kaplama işlemi sırasında çözeltinin, pH 9 olduğu için ciprofloxacin ve BSA negatif yüke sahiptir. EPD sırasında Ti numuneler anot (pozitif elektrot) olarak bağlanmıştır. Bu durumda, negatif yüklü ciprofloxacin ve BSA molekülleri elektrik alan etkisiyle pozitif yüklü Ti yüzeyine doğru elektroforetik hareket göstermiştir.

Çift molekül yükleme sistemlerinde, BSA ve ciprofloxacin'in birlikte yüklenmesinin salım kinetiği üzerindeki etkileri Şekil 3.12 ve 3.13'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



Şekil 3.12 Ciproflaxin (C) yükleme işlemi sırasında farklı sürelerde ortama BSA (B) eklenmesi durumunda elde edilen salım grafikleri. C: B (3 (dk) :1(dk)), C: B (3(dk): 2 (dk)), sadece C (3 dk), (B:C (3 dk: 1 dk)), (B:C (3 dk: 2 dk)) (Difüzyon (24 saat) ile sadece C (tek başına ciproflaxacin) karşılaştırma için konulmuştur.)

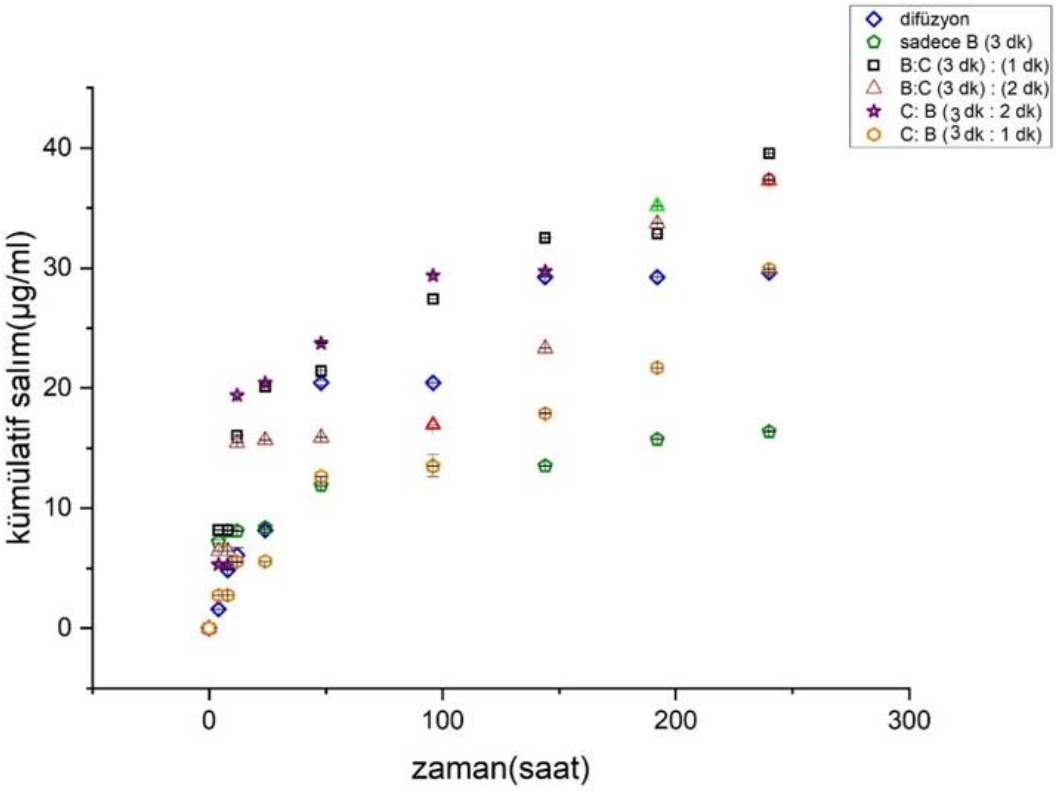
Ciprofloxacin'in (Şekil 3.12) 4. saatteki salım miktarları, yükleme sırası ve süresine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Başta ciprofloxacin yüklenen gruplardan C:B (3 dk : 1 dk) grubunda salım 0.13 µg/ml, C:B (3 dk : 2 dk) grubunda ise 0.30 µg/ml olarak gerçekleşmiştir. Her iki grupta toplam kaplama süresi aynı olmasına rağmen, salım miktarındaki fark, BSA'nın ikinci sırada yüklenme süresine bağlı olarak oluşmuştur. BSA'nın büyük moleküler yapısı nedeniyle, ikinci sırada kaplamaya dahil olduğunda, yüzeyde daha fazla yer kaplamış ve mevcut kitosan matrisi içinde ciprofloxacin'in derine bağlanmasını fiziksel engelleme (sterik bariyer) yoluyla sınırlamış olabilir. Ayrıca, BSA'nın yüzeyde yoğun olarak birikmesi, yüksek negatif yüzey potansiyeli oluşturarak, negatif yüklü ciprofloxacin ile arasında elektrostatik itici etkileşim doğurmuş olabilir. Bu iki etki ilacın yüzeye daha yakın konumlanmasına neden olmuş, bu da daha hızlı salımı beraberinde getirmiştir. Ciprofloxacin'in sonradan yüklendiği gruplarda ise, B:C (3 dk : 1 dk) grubunda salım 0.30 µg/ml, B:C (3 dk : 2 dk) grubunda ise 0.38 µg/ml olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, yükleme süresi uzadıkça ilacın kaplama yapısına daha etkin şekilde

tutunabildiğini ve dolayısıyla salım miktarının arttığını göstermektedir. Ayrıca, ciprofloxacin'in son sırada yüklenmesi, ilacın daha yüzeye yakın konumlanmasını ve salım ortamıyla daha erken etkileşime girmesini kolaylaştırarak salımı hızlandırmış olabilir. Özellikle BSA'nın yükleme sıralamasında ilk sırada kaplamaya dahil edildiği gruplarda, protein moleküllerinin yüzeyde daha yoğun bir şekilde yerleşerek negatif yüzey potansiyelini artırdığı düşünülmektedir. Bu durum, negatif yüklü ciprofloxacin ile BSA arasında elektrostatik itici kuvvetler oluşmasına neden olarak, ilacın kaplama yapısındaki bağlanma verimini sınırlamış ve salım hızını artırmış olabilir.24. saatte salım değerleri artış gösterdi. C: B (3 (dk) :1(dk)) grubunda 0.73 µg/ml, C: B (3 (dk) :2(dk))'de 0.89 µg/ml salım gerçekleşirken, 1 dakika (B:C (3 dk: 1 dk)) yüklemede 0.95 µg/ml, 2 dakika (B:C (3 dk: 2 dk)) yüklemede ise 1.02 µg/ml değerlerine ulaşıldı. Bu artışlar, yükleme süresinin ve sırasının salım kinetiğini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

144. saate gelindiğinde, C: B (3 (dk) :1(dk)) ve C: B (3 (dk) :2(dk)) grupları sırasıyla 1.51 ve 1.59 µg/ml salım sergiledi. 2 dakika (B:C (3 dk: 2 dk)) yükleme yapılan grup 1.81 µg/ml ile en yüksek değere ulaşırken, 1 dakika (B:C (3 dk: 1 dk)) yüklenen grup 1.13 µg/ml'de kaldı. Bu sonuçlar, salım miktarının yalnızca yükleme süresine değil, aynı zamanda yükleme sırasına da bağlı olarak değiştiğini; özellikle ciprofloxacin'in ikinci sırada yüklendiği gruplarda daha yüksek salım elde edildiğini göstermektedir. Bu durum, ilk sırada yüklenen BSA moleküllerinin kaplama yüzeyinde yoğun şekilde yerleşerek negatif yüzey potansiyeli oluşturduğu ve ardından yüklenen negatif yüklü ciprofloxacin ile elektrostatik itici etkileşimlere girdiği şeklinde açıklanabilir. Bu itici kuvvetler, ciprofloxacin'in kaplama matrisine daha zayıf bağlanmasına ve salım ortamıyla daha kolay etkileşime geçmesine neden olmuş olabilir.

240. saate gelindiğinde, tüm gruplarda salım değerlerinin artmaya devam ettiği ve özellikle daha uzun yükleme süresi uygulanan gruplarda salımın belirgin şekilde yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Başta ciprofloxacin yüklenen gruplardan C:B (3 dk : 2 dk) ve C:B (3 dk : 1 dk) grupları sırasıyla 2.62 µg/ml ve 2.13 µg/ml salım sergilemiştir. Sonradan ciprofloxacin yüklenen gruplarda ise, 2 dakika (B:C (3 dk: 2 dk)) grubunda 2.62 µg/ml ile eşdeğer düzeyde salım gerçekleşirken, 1 dakika (B:C (3 dk: 1 dk)) grubunda 1.42 µg/ml ile daha düşük bir değere ulaşılmıştır. Bu sonuçlar, yükleme süresinin uzamasının, ciprofloxacin'in kaplama matrisiyle daha

etkili fiziksel bağlar kurmasına ve yapıya daha derin yerleşmesine katkı sağladığını; böylece uzun vadeli ve kontrollü salımı desteklediğini göstermektedir. Yapıya eklenen BSA'nın kaplama süresi uzadıkça, ciprofloxacin'in yüzeye daha yakın konumlandığı ve bu nedenle daha yüksek miktarda salındığı gözlemlenmiştir. BSA'nın büyük moleküler yapısı ve kaplama çözeltisinde daha uzun süre bulunması, yüzeyde yoğun bir protein tabakası oluşmasına neden olmuş; bu tabaka, fiziksel olarak ciprofloxacin'in daha derin katmanlara ilerlemesini engellemiş olabilir. Ayrıca, BSA ve ciprofloxacin'in her ikisinin de negatif yüke sahip olması, aralarında elektrostatik itici kuvvetler oluşmasına yol açarak ciprofloxacin'in matrise gömülmesini zorlaştırmış ve yüzeyde kalma eğilimini artırmış olabilir. Bu iki mekanizma birlikte değerlendirildiğinde, ciprofloxacin'in daha hızlı ve yüksek oranda salınması, yapıya ilk eklenen BSA'nın oluşturduğu fiziksel ve elektrostatik bariyerlerle ilişkilendirilebilir.



Şekil 3.13 BSA (B) yükleme işlemi sırasında farklı sürelerde ortama ciproflaxcin eklenmesi durumunda elde edilen salım grafikleri. B:C (3 (dk) :1(dk)), B:C (3(dk): 2 (dk)), sadece B (3 dk) (C: B (3 dk: 1 dk)), (C: B (3 dk: 2 dk)) (Difüzyon (24 saat) ile sadece B (tek başına BSA)karşılaştırma için konulmuştur.))

Benzer şekilde, BSA salım verileri de (şekil 3.13) 4. saatte belirgin farklar gösterdi. BSA'nın ilk sırada kaplamaya dahil edildiği gruplardan B:C (3 (dk) :1(dk)) 'de 8.17 µg/ml, B:C (3(dk): 2(dk))'de 6.43 µg/ml salım gerçekleşti. Bu erken saat salımları, protein moleküllerinin doğrudan kaplama matrisine bağlandığı yapılarda daha yüksek düzeyde olmuştur. Buna karşın, sonradan BSA yüklenen gruplarda 2 dakika (C:B (3 dk : 2 dk)), yükleme süresine sahip sistemde 5.30 µg/ml, 1 dakika (C: B (3 dk: 1 dk)) yüklemede ise 2.75 µg/ml salım elde edildi. Yükleme süresi kısa tutulduğunda, proteinlerin yüzeyle yeterli etkileşim kuramaması salım performansını sınırladı.

24. saatte salımlar tüm gruplarda arttı. B:C (3 (dk) :1(dk)) grubunda 20.12 µg/ml, (B:C (3(dk): 2(dk)), 'de 15.67 µg/ml salım gerçekleşti. Özellikle 2 dakika (C: B (3 dk: 2 dk)) yükleme yapılan sonradan BSA yüklenen grupta 20.42 µg/ml salım değeriyle B:C (3 (dk) :1(dk))'e benzer bir düzeye ulaşıldı. Buna karşın, 1 dakika (C:B (3 dk: 1 dk)) yükleme yapılan grup yalnızca 5.55 µg/ml salım gösterdi.

144. saatte gruplar arasındaki farklar daha belirgin hâle geldi. B:C (3 (dk) :1(dk)), grubu 32.50 µg/ml ile en yüksek salımı gösterirken, B:C (3 (dk) :2(dk)), grubu 23.31 µg/ml değerinde kaldı. Sonradan yüklenen gruplarda ise 2 dakika (C: B (3 dk: 2 dk)) yükleme yapılan grupta 29.73 µg/ml, 1 dakika (C: B (3 dk: 1 dk)) yüklemede 17.87 µg/ml salım gözlemlendi. BSA'nın ikinci sırada yüklendiği gruplarda, yükleme süresinin artması protein salım miktarının yükselmesine neden olmuştur. Buna karşılık, BSA'nın kaplamaya ilk sırada eklendiği gruplarda, ciprofloxacin'in yükleme süresinin uzaması BSA salım düzeylerinde azalma ile sonuçlanmıştır. Bu durum, ikinci sırada yüklenen molekülün, kaplama matrisinin fiziksel yapısını ve moleküller arası etkileşim ortamını değiştirerek; önceden yüklenen molekülün matrise tutunma biçimini, dağılımını ve salım davranışını etkileyebileceğini göstermektedir. Özellikle moleküller arasında oluşabilecek elektrostatik etkileşimler ya da yapısal yer değiştirmeler gibi faktörler, bu karşılıklı etkileşimin altında yatan mekanizmalar arasında değerlendirilebilir.

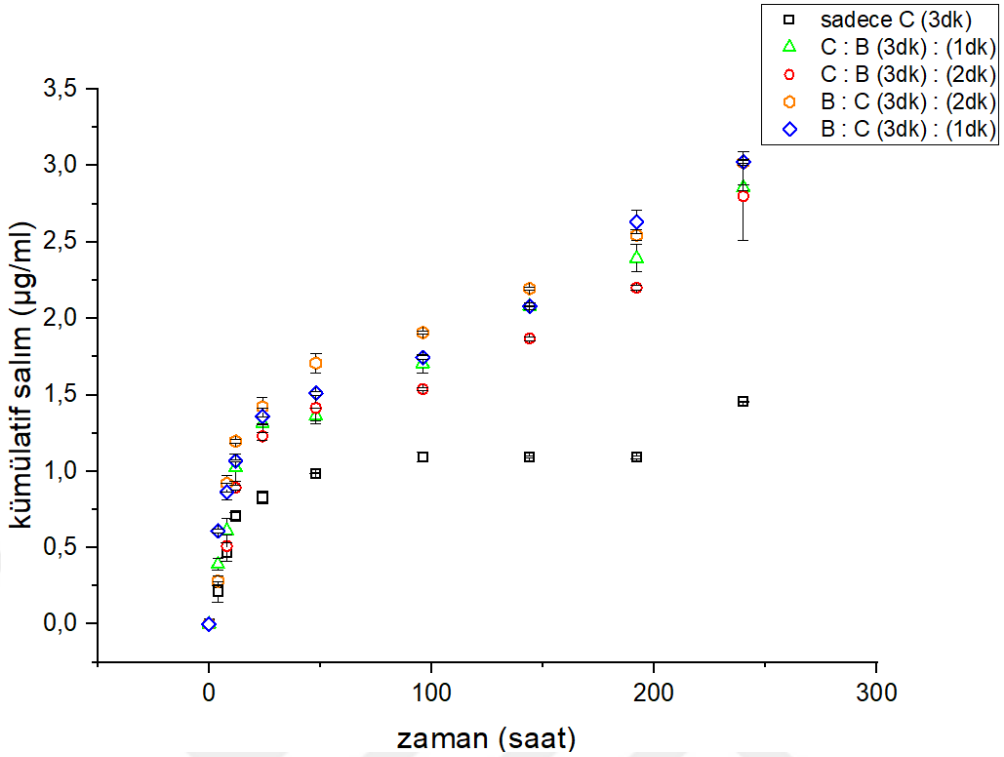
240. saat verilerine göre, B:C (3 (dk) :1(dk)) grubunda 39.54 µg/ml ile en yüksek BSA salımı ölçülmüş, bunu B:C (3 (dk) :2(dk)) 37.28 µg/ml ve sonradan yüklenen 2 dakikalık (C: B (3 dk: 2 dk)) grup 36.50 µg/ml ve 1 dakika (C: B (3 dk: 1 dk)) yüklemede 29.91 µg/ml izlendi. Bu bulgular, yapıya ilacın eklenmesiyle birlikte

proteinin salım miktarının arttığını ve kaplama geçirgenliği ile yükleme stratejisinin uzun vadeli salım performansı üzerinde belirleyici rol oynadığını göstermektedir. Bu sonuç, çift molekül yüklemesinin kaplama yapısında bozulma yaratmadan sürdürülebilir salım sağladığını desteklemektedir.

3.10 Kaplama Sırasında Ti Yüzeylere Antibiyotik & Protein Yükleme ve Salım Çalışmaları

İlaç ve proteinin kaplama işlemi sırasında çözeltinin pH'ı 4.5 olduğundan, ciprofloxacin ve BSA pozitif yüke sahiptir. EPD sırasında Ti numuneler katot (negatif elektrot) olarak bağlandı. Bu durumda, pozitif yüklü ciprofloxacin ve BSA molekülleri elektrik alan etkisiyle negatif yüklü Ti yüzeyine doğru elektroforetik hareket gösterdi.

Çift molekül yükleme sistemlerinde, BSA ve ciprofloxacin'in birlikte yüklenmesinin salım kinetiği üzerindeki etkileri şekil 3.14 ve şekil 3.15'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Yapıya BSA eklenmesiyle ciprofloxacin salımında belirgin artış gözlenirken, bunun tersine ciprofloxacin varlığının BSA salımını baskıladığı tespit edildi.



Şekil 3.14 Ciproflaxin (C) yükleme işlemi sırasında farklı sürelerde ortama BSA (B) eklenmesi durumunda elde edilen salım grafikleri. C: B (3 (dk) :1(dk)), C: B (3(dk): 2 (dk)), sadece C (tek başına ciprofloxacin, 3 dk) (B:C (3 dk: 1 dk)), (B:C (3 dk: 2 dk))

Kaplama polimeriyle (şekil 3.14) birlikte titanyum yüzeylere çift molekül yükleme çalışmalarında, özellikle antibiyotik olan ciprofloxacin'in salım profili üzerinde BSA'nın varlığının belirgin etkileri gözlemlendi. Farklı gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda, yapıya BSA eklenmesiyle birlikte ciprofloxacin salımında, kaplama süresinden bağımsız olarak miktar artışı gerçekleştiği görüldü.

İlk 4 saatlik zaman diliminde, tüm gruplarda hızlı bir başlangıç salımı gözlenmiştir. Bu durum, özellikle BSA'nın önceden eklendiği kısa süreli ciprofloxacin yüklemelerinde daha belirgin hale gelmiştir. 1 dakika (B:C (3 dk: 1 dk)) yükleme yapılan grupta 0,608 µg/ml, 2 dakika (B:C (3 dk: 2 dk)) yükleme yapılan grupta 0,281 µg/ml, C: B (3 (dk) :1(dk)), grubunda 0,39 µg/ml, C: B (3(dk): 2 (dk)), grubunda ise 0,28 µg/ml salım elde edildi. Bu veriler, BSA'nın kaplama sürecinde ilk olarak sisteme dahil edildiği gruplarda, protein moleküllerinin matris içerisinde yoğun bir şekilde konumlanmasının, ciprofloxacin'in kaplama matrisiyle yeterli düzeyde etkileşime girememesine ve bu nedenle ilacın erken dönemde daha hızlı salınmasına neden olabileceğini göstermektedir. Bu durum BSA varlığının ilacın

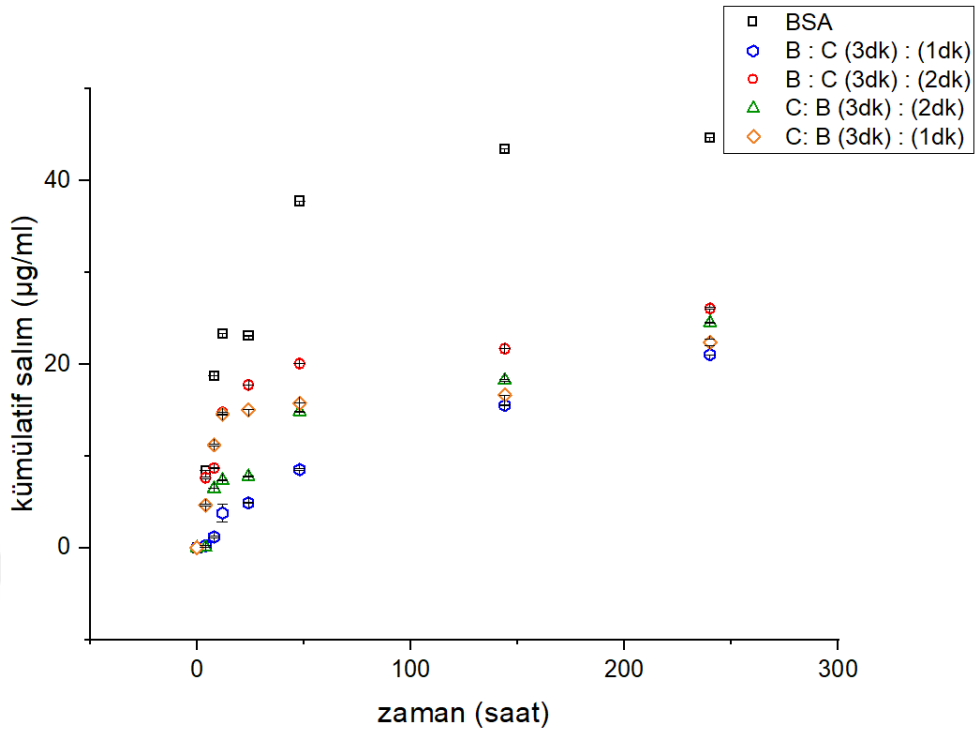
kitosanla oluşturabileceği hidrojen bağları veya elektrostatik etkileşimlerin sınırlanmasıyla ilişkilendirilebilir. Literatürde de ciprofloxacin'in BSA ile hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler yoluyla zayıf şekilde bağlandığı ve bu bağlanmanın ilacın daha kolay serbest kalmasına neden olabileceği belirtilmiştir [110].

İlerleyen salım saatlerinde, özellikle 24. saatte, tüm gruplarda gözle görülür bir artış kaydedildi. C: B (3 (dk) :1(dk)), grubunda 1,31 µg/ml, C: B (3(dk): 2 (dk)), grubunda 1,22 µg/ml salım gerçekleşti. Bu iki grup arasında fark azalırken, salımın düzenli biçimde ilerlediği görülmektedir. Ciprofloxacin'in BSA'dan sonra yüklendiği gruplarda ise, 2 dakika (B:C (3 dk: 2 dk)) yükleme yapılan grupta 1,42 µg/ml, 1 dakika yükleme (B:C (3 dk: 1 dk)) yapılan grupta 1,35 µg/ml salım elde edildi. Bu veriler, 24. saat itibarıyla gruplar arasındaki farkların genel olarak korunduğunu, ancak salım profillerinin birbirine yaklaşmaya başladığını göstermektedir. Özellikle ciprofloxacin'in BSA'dan sonra yüklendiği gruplarda, yükleme süresi uzadıkça salım miktarında artış gözlemlenmiştir. Bu durum, ilacın yalnızca yüzeye tutunmasıyla değil, aynı zamanda kaplama matrisi içerisine daha etkili şekilde dağılmasıyla da ilişkilendirilebilir. Yükleme süresinin uzaması, elektroforetik kuvvetlerin etkisiyle ilacın matris içerisinde daha derin bölgelere ilerlemesini ve böylece daha fazla miktarda ilacın sisteme dahil olmasını sağlamış olabilir. Bu da toplam salım kapasitesini artırarak salım performansını olumlu yönde etkilemiştir.

144. saatte salım profilleri daha netleşmiş ve gruplar arası farklar belirginleşti. C: B (3(dk): 1 (dk)) grubunda salım miktarı 2,08 µg/ml, C: B (3(dk): 2 (dk)), grubunda 1,86 µg/ml olurken; 2 dakika (B:C (3 dk: 2 dk)) yükleme yapılan grupta 2,19 µg/ml, 1 dakika (B:C (3 dk: 1 dk)) yükleme yapılan grupta ise 2,08 µg/ml salım elde edildi. Bu veriler, yükleme süresi arttıkça ilacın kaplama içinde daha fazla yüklenebildiğini ve buna bağlı olarak salımın daha fazla gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak, kısa süreyle yüklenen ciprofloxacin'in dahi C:B (3 dk : 2 dk) grubundaki değerin üzerine çıkması, sadece süre değil, yükleme sırasının da belirleyici bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. BSA'nın kaplamaya ilk sırada dahil olduğu bu sistemlerde, proteinlerin kaplama içinde daha önce yerleşmiş olması, ciprofloxacin'in kitosanla kuracağı etkileşimleri fiziksel olarak engellemiş olabilir. Ayrıca, her iki molekülün pozitif yüklü olması, aralarında elektrostatik itici

kuvvetler oluşturmuş ve bu durum ciprofloxacin'in matrise nüfuzunu ve bağlanmasını sınırlamış olabilir.

240. saat sonunda, tüm gruplarda salım miktarları maksimum seviyelere ulaştı. C: B (3 (dk) :1(dk) grubunda 2,85 µg/ml, C: B (3 (dk) :2 (dk)) grubunda 2,80 µg/ml, 2 dakika (B:C (3 dk: 2 dk)) yükleme yapılan grupta 3,02 µg/ml, 1 dakika (B:C (3 dk: 1 dk)) yükleme yapılan grupta da 3,02 µg/ml ciprofloxacin salımı ölçüldü. Bu noktada, özellikle BSA'nın sonradan eklendiği gruplarda elde edilen yüksek salım değerleri, yeterli yükleme süresinin sistemin toplam salım kapasitesi üzerinde pozitif etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca, C: B (3(dk): 1 (dk)), ve C: B (3(dk): 2 (dk)), gruplarında da salımın zamanla dengeli bir şekilde artarak 240. saate kadar sürdüğü görüldü. Bu bulgular, BSA'nın oluşturduğu protein tabakasının ciprofloxacin'in çözünmesini yavaşlatarak daha kontrollü ve uzun süreli bir salım sağladığını göstermekte, çift molekül yüklemeli sistemlerin dengeli ve sürdürülebilir salım sağlama potansiyelini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde hidroksiapatit bazlı yapılarda yapılan çalışmalar da protein salımının yükleme sırasına ve katman yapısına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir [111].



Şekil 3.15 BSA (B) yükleme işlemi sırasında farklı sürelerde ortama ciproflaxcin eklenmesi durumunda elde edilen salım grafikleri. B:C (3 (dk) :1(dk)), B:C (3(dk): 2 (dk)), sadece B (tek başına BSA, 3 dk) (C: B (3 dk : 1 dk)), (C:B (3 dk : 2 dk))

Ciprofloxacin salımına ilişkin değerlendirmeleri takiben, aynı örnek gruplarında BSA'ya ait salım profili incelendiğinde (şekil 3.15), yükleme sırası ve süresinin protein salımı üzerinde de belirleyici rol oynadığı görülmektedir.

4. saatte, başta BSA yüklemesi yapılan gruplar olan B:C (3 (dk) :1(dk)) ve B:C (3(dk): 2 (dk)için salım miktarları sırasıyla 0,24 µg/ml ve 7,62 µg/ml olarak ölçüldü. Bu fark, protein moleküllerinin kaplama sırasında yüzeye yerleşme yoğunluğuna ve kaplama yapısındaki geçirgenliğe bağlı olabilir. Ciprofloxacin'in başta yüklendiği gruplarda ise, 1 dakika (C:B (3 dk : 1 dk)) yükleme yapılan grupta 4,65 µg/ml, 2 dakika (C:B (3 dk : 2 dk)) yükleme yapılan grupta 0,06 µg/ml salım gerçekleşti. Bu veriler, yükleme süresi ve sırasının, proteinlerin kaplama matrisiyle kurduğu etkileşimleri ve yerleşim derinliğini doğrudan etkilediğini göstermektedir. Matrise daha yüzeysel yerleşen proteinler çevre ortamla daha hızlı etkileşime girerek erken saatlerde yüksek salım sergileyebilirken; daha derin veya sıkı yerleşimli proteinler, sınırlı difüzyon nedeniyle daha düşük salım göstermektedir.

24. saatte, tüm gruplarda artış gözlemlendi. Başta BSA yüklemesi yapılan B:C (3 (dk) :1(dk)) ve B:C (3 (dk) :2(dk)) gruplarında sırasıyla 4,89 µg/ml ve 17,75 µg/ml salım gerçekleşti. Bu veriler, BSA'nın yükleme süresi sabit olmasına rağmen, sonradan yüklenen ciprofloxacin'in süresine bağlı olarak protein salımının önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir. Özellikle 2 dakika ciprofloxacin yüklemesi yapılan grupta yüksek BSA salımı dikkat çekicidir. Bu durum, sisteme giren ciprofloxacin miktarının artmasıyla birlikte, kaplama yapısındaki elektrostatik denge ve moleküller arası etkileşimlerin değiştiğini düşündürmektedir. Her iki molekül de pozitif yüke sahip olduğundan, artan ciprofloxacin yüklemesi ile proteinler arasında oluşabilecek elektrostatik itici kuvvetlerin, BSA'nın matrise sıkı şekilde tutunmasını engelleyerek daha zayıf bir yerleşime neden olmuş olması mümkündür. Bu da proteinlerin çevre ortamla daha kolay etkileşime girmesine ve salım miktarının artmasına yol açmış olabilir. Başta ciprofloxacin yüklenen sistemlerde ise, 1 dakika (C:B (3 dk:1 dk)) yükleme ile 15,04 µg/ml, 2 dakika (C: B (3 dk : 2 dk)) yükleme ile 7,76 µg/ml salım ölçüldü. Bu veriler, yükleme süresinin protein moleküllerinin kaplama içerisindeki konumunu etkilediğini göstermektedir. 1 dakika yükleme yapılan grupta BSA yüzeye daha yakın konumlandığı için daha hızlı ve yüksek oranda salım gözlemlenmiştir. Buna karşılık, 2 dakika yüklemede proteinler kaplama yapısı içinde daha derin bölgelere yerleşmiş, bu da salım miktarının daha düşük olmasına neden olmuştur. Bu durum, kaplama sırasında proteinlerin yerleşim derinliğinin salım kinetiği üzerinde doğrudan etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

144. saatte, salım düzeyleri daha da belirginleşmiş, başta BSA yüklenen gruplarda B:C (3 (dk) :1(dk)) için 15,52 µg/ml, B:C (3 (dk) :2(dk)) için 21,59 µg/ml seviyelerine ulaşıldı. Başta ciprofloxacin yüklemesi yapılan örneklerde ise 2 dakika (C:B (3 dk: 2 dk)) yükleme ile 18,27 µg/ml, 1 dakika (C:B (3 dk : 1 dk)) yükleme ile 16,62 µg/ml salım gerçekleşti.

240. saat sonunda, sistemlerin maksimum salım düzeylerine ulaştığı görüldü. B:C (3 (dk) :1(dk)) grubunda 21,04 µg/ml, B:C (3 (dk) :2(dk)), grubunda 26,08 µg/ml salım elde edilirken, başta ciprofloxacin yüklenen gruplardan 2 dakika (C: B (3dk: 2 dk)) yükleme yapılan sistemde 24,51 µg/ml, 1 dakika (C:B (3 dk : 1 dk)) yükleme yapılan sistemde ise 22,38 µg/ml protein salımı gerçekleşti. Bu durum, proteinlerin

kaplama içindeki yerleşimi ve yüzeye olan bağlanma şeklinin uzun vadeli salım kapasitesi üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

4
SONUÇ

Bu çalışmada, Ti yüzeylere doğal polimer kitosan aracılığıyla elektroforetik kaplama (EPD) yöntemi ile hem antibiyotik (ciprofloxacin) hem de protein (BSA) moleküllerinin farklı yükleme stratejileri kullanılarak birlikte ve ayrı ayrı yüklenmesi incelenmiştir. Yapılan analizler, yükleme sırası, yükleme süresi ve işlem ortamının pH'ı gibi parametrelerin, hem yükleme verimliliği hem de salım profilleri üzerinde belirleyici etkiler yarattığını ortaya koymuştur.

Ciprofloxacin için sonuçlar değerlendirildiğinde, kaplama sonrası elektrik alan varlığında yükleme ile kaplama esnasında yükleme karşılaştırılmış, elektrik alan destekli yükleme yönteminde daha yüksek bir yükleme verimliliği (%49) ve daha kontrollü bir salım profili elde edilmiştir. Kaplama sırasında yüklenen ciprofloxacin'in ise daha yavaş fakat uzun süreli bir salım eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, molekülün polimer matrisi içinde daha derinlere entegre olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

BSA için elde edilen veriler, elektrik alan altında yüklemenin daha düşük salım düzeyi sağladığını, ancak daha kontrollü bir kinetik ile uzun vadeli bir profil sunduğunu göstermiştir. Kaplama esnasında yükleme yapılan örneklerde ise, protein matrise tam bağlanmadan yüzeye daha yakın konumlandığı için ilk saatlerde hızlı bir salım gerçekleşmiş ve sonrasında durağan bir faza geçilmiştir.

Çift moleküllü sistemlerde, yükleme sırası önemli bir değişken olarak öne çıkmıştır. Protein önceden yüklendiğinde, ciprofloxacin'in kaplama matrisinde daha yüzeysel yerleştiği ve bunun erken dönem salımı artırdığı gözlemlenmiştir. Tersine, ciprofloxacin'in önceden yüklenmesi durumunda protein salımı daha geç ve düzenli gerçekleşmiştir. Bu bulgu, moleküller arası rekabetin ve polimer-molekül etkileşimlerinin kaplama yapısında yerleşim ve salım dinamikleri üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yükleme süresinin artırılması, her iki molekül için de toplam yüklenen miktarın ve salımın zaman içinde sürdürülebilirliğinin artırılmasında pozitif etki yaratmıştır. Özellikle 2 dakika

süreyle yüklenen gruplarda, hem antibiyotik hem de protein için daha yüksek ve dengeli salım değerleri elde edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma, elektroforetik kaplama yöntemi ile Ti yüzeylere hem antibiyotik hem de protein moleküllerinin aynı anda ve etkili bir şekilde yüklenebileceğini, ayrıca salım davranışlarının istenilen şekilde düzenlenebileceğini göstermektedir. Kaplama sırasında yükleme stratejileri kullanılarak geliştirilen sistemlerin, hem enfeksiyon riskinin azaltılması hem de doku iyileşmesinin desteklenmesi açısından önemli potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu bulgular, implant yüzeylerinde çok işlevli kaplama tasarımlarına yönelik gelecek çalışmalar için güçlü bir temel oluşturmaktadır.

KAYNAKÇA

[1] H. Matsuno, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, T. Kawasaki, Biomaterials 22 (2001) 1253–1262

[2] M.D. Pulido, A.R. Parrish, Mutat. Res. 533 (2003) 227–241

[3] A.R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky, J. R. Soc. Interface. 7 (2010) S581–S613.

[4] A.R. Boccaccini, J.H. Dickerson, J. Phys. Chem. B 117 (2013) 1501-1501.

[5] L. Zhao, P.K. Chu, et al. Antibacterial coatings on titanium implants J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater., 91B (2009), pp. 470-480, 10.1002/jbm.b.31463

[6] A. Simchi, E. Tamjid, F. Pishbin, A.R. Boccaccini, Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 7(2011) 22–39.

[7] K.D. Patel, A. El-Fiqi, H.Y. Lee, R.K. Singh, D.A. Kim, H.H. Lee, H.W. Kim, J. Mater. Chem. 22 (2012) 24945–24956.

[8] F. Pishbin, V. Mourino, J.B. Gilchrist, S. Kreppel, V. Salih, M.P. Ryan, A.R. Boccaccini,Acta Biomater. 9 (2013) 7469–7479.

[9] T. Yoshioka, A. Chavez-Valdez, J.A. Roether, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, J. Colloid Interface Sci. 392 (2013) 167–171.

[10] Çankaya, N., & Sökmen, Ö. (2017). Biyopolimerler ve Montmorillonit Kil Nanokompozitleri. Politeknik Dergisi, 20(3), 663–673.

[11] Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, S.V. Madihally, Biomaterials 26 (2005) 7616–7627.

[12] D.F Williams, J Cunningham Materials in Clinical Dentistry Oxford University Press, Oxford, UK (1979)

[13] J.B Park Biomaterials Science and Engineering Plenum Press, New York (1984)

[14] J Black Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility Marcel Dekker, New York (1992)

[15] Bhat, S., & Kumar, A. (2013). Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. Biomatter, 3(3), e24717

[16] Saravanan, S., Anusuya, T., Ramachandran, C., & Sastry, T. P. (2022). Recent progress in development and applications of biomaterials. Materials Today: Proceedings, 65, 2556–2561.

[17] Arjunan A, Baroutaji A, Preveen AS, Robinson J, Wang C. Classification of biomaterial functionality. Encycl Smart Mater 2022;1:86-102. [doi: 10.1016/b978-0-12-815732-9.00027-9]

[18] Subedi MM. Ceramics and its importance. Himal Phys 2013;4:80-2. [doi: 10.3126/hj.v4i0.9433]

[19] Jodati H, Yilmaz B, Evis Z. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: effects of structural features. Ceram Int 2020; 46:15725-39. [doi: 10.1016/j.ceramint.2020.03.192]

[20] Shekhawat D, Singh A, Banerjee MK, Singh T, Patnaik A. Bioceramic composites for orthopaedic applications: a comprehensive review of

mechanical, biological, and microstructural properties. Ceram Int 2021;47:3013-30. [doi: 10.1016/j.ceramint.2020.09.214]
[21] Kumar P, Dehiya BS, Sindhu A. Bioceramics for hard tissue engineering applications: a review. Int J Appl Eng Res 2018;13:2744-52.
[22] Shirvan AR, Nouri A, Wen C. Structural polymer biomaterials. In: Wen C, editor. Structural biomaterials: properties, characteristics and selection. Amsterdam: Elsevier B.V.; 2021. pp. 395-439
[23] Parida P, Behera A, Mishra SC. Classification of biomaterials used in medicine. Int J Advances in Appl Sci 2012;1:31-5. [doi: 10.11591/ijaas.v1i3.882]
[24] Zhang S, Wang J, Yan P, Hao X, Xu B, et al. Non-biodegradable microplastics in soil: a brief review and challenge. J Hazard Mater 2021;409:124525.
[25] Morganti P, Morganti G. Surgical & beauty facial masks: the new waste problem of post covid-19. Biomed J Sci Tech Res 2020;29:22945-50. [doi: 10.26717/BJSTR.2020.29.004878]
[26] Pilliar RM. Metallic biomaterials. In: Narayan R, editor. Biomedical materials. New York: Springer, Cham.; 2021. pp. 1–47.
[27] Pandey A, Awasthi A, Saxena K. Metallic implants with properties and latest production techniques: a review. Adv Mater Process Technol 2020;6:405-40.
[28] Chong, E. T. J., Ng, J. W., and Lee, P.-C., "Classification and medical applications of biomaterials–A mini review," *Journal of Biomedical and Clinical Sciences*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2022.
[29] Morsiya C. A review on parameters affecting properties of biomaterial SS 316L. Aust J Mech Eng 2020; Epub ahead of print [doi: 10.1080/14484846.2020.1752975]
[30] Prasad K, Bazaka O, Chua M, Rochford M, Fedrick L, et al. Metallic biomaterials: current challenges and opportunities. Materials 2017;10:884.
[31] Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. (2004). Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier.
[32] Sáenz de Viteri, V., & Fuentes, E. (2013). Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials. In IntechOpen.
[33] Sidambe, A.T. Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants—A review. Materials 2014, 7, 8168–8188.
[34] Parithimarkalaignan, S.; Padmanabhan, T.V. Osseointegration: An update. J. Indian Prosthodont. Soc. 2013, 13, 2–6
[35] S. Spriano, S. Yamaguchi, et al.A critical review of multifunctional titanium surfaces: new frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination Acta Biomater., 79 (2018), pp. 1-22, 10.1016/j.actbio.2018.08.013
[36] A. Ungersboeck, V. Geret, et al. Tissue reaction to bone plates made of pure titanium: a prospective, quantitative clinical study J. Mater. Sci.: Mater. Med, 6 (4) (1995), pp. 223-229, 10.1007/bf00146860
[37] M. Özcan, C. Hämmerle Titanium as a reconstruction and implant material in dentistry: advantages and pitfalls Materials, 5 (2012), pp. 1528-1545, 10.3390/ma5091528
[38] Han, Xiao, et al. "Surface Modification Techniques of Titanium and Titanium Alloys for Biomedical Orthopaedics Applications: A Review." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 230, 2023, p. 113339

[39] Pluhator-Murton, M.M.; Fedorak, R.N.; Audette, R.J.; Marriage, B.J.; Yatscoff, R.W.; Gramlich, L.M. Trace Element Contamination of Total Parenteral Nutrition. 1. Contribution of Component Solutions. JPEN J. Parenter. Enteral Nutr. 1999, 23, 222–227.
[40] Dean, J.A. Lange's Handbook of Chemistry; Translated by V. Glyanchenko Tl; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 1979.
[41] L.C. Zhang, L.Y. Chen, et al. Surface modification of titanium and titanium alloys: technologies, developments, and future interests Adv. Eng. Mater., 22 (2020), p. 1901258, 10.1002/adem.201901258
[42] Pawlowski, L. (2008). The Science and Engineering of Thermal Spray Coatings. Wiley.
[43] Ohring, M. (2001). Materials Science of Thin Films. Academic Press.
[44] Matthews, A. (1989). Ion Plating and Allied Techniques. Chapman and Hall.
[45] S. Ibasco, F. Tamimi, et al. Magnesium-sputtered titanium for the formation of bioactive coatings Acta Biomater., 5 (2009), pp. 2338-2347, 10.1016/j.actbio.2009.03.006
[46] G. Jin, H. Qin, et al. Synergistic effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium Biomaterials, 35 (2014), pp. 7699-7713, 10.1016/j.biomaterials.2014.05.074
[47] H.Y. Huang, Y.B. Manga, et al. Effect of hydroxyapatite formation on titanium surface with bone morphogenetic protein-2 loading through electrochemical deposition on MG-63 cells Materials, 11 (2018), pp. 2-11, 10.3390/ma11101897
[48] Sarkar, P., & Nicholson, P. S. (1996). Electrophoretic deposition (EPD): mechanisms, kinetics, and application to ceramics. Journal of the American Ceramic Society, 79(8), 1987-2002.
[49] Kaya, C., Kaya, F., Atiq, S., & Boccaccini, A. R. (2002). Electrophoretic deposition of ceramic coatings on ceramic composite substrates. *Key Engineering Materials, 206-213*, 193-196.
[50] Besra, L., & Liu, M. (2007). A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD). Progress in Materials Science, 52(1), 1-61.
[51] Zhitomirsky, I. (2002). Electrophoretic deposition of organic-inorganic nanocomposites for functional applications: A review. Advanced Colloid and Interface Science, 97(1-3), 279-317.
[52] Ferrari, B., & Moreno, R. (1997). EPD kinetics: A review. Journal of the European Ceramic Society, 17(2-3), 549-569.
[53] Van der Biest O.O., Vandeperre L.J. Electrophoretic deposition of materials. Annu. Rev. Mater. Sci. 1999;29:327–352. doi: 10.1146/annurev.matsci.29.1.327.
[54] Babaei N., Yeganeh H., Gharibi R. Anticorrosive and self-healing waterborne poly(urethane-triazole) coatings made through a combination of click polymerization and cathodic electrophoretic deposition. Eur. Polym. J. 2019;112:636–647.
[55] Fukada Y., Nagarajan N., Mekky W., Bao Y., Kim H.S., Nicholson P.S. Electrophoretic deposition – mechanisms, myths and materials. J. Mater. Sci. 2004;39:787–801. doi: 10.1023/B:JMSC.0000012906.70457.df.

[56] Almeida E., Alves I., Brites C., Fedrizzi L. Cataphoretic and autophoretic automotive primers: A comparative study. Prog. Org. Coat. 2003;46:8–20. doi: 10.1016/S0300-9440(02)00144-3.
[57] Lynch, I., & Dawson, K. A. (2004). Release of model compounds from “plum-pudding”-type gels composed of microgel particles randomly dispersed in a gel matrix. Journal of Controlled Release, 99(1), 57-68.
[58] Langer, R. (1990). Drug delivery and targeting. Nature, 392(6679), 5-10.
[59] Kalala, P., et al. (1996). Controlled release technologies. Journal of Controlled Release, 42(1-2), 1-10.
[60] N.A. Peppas, A.R. Khare Preparation, structure and diffusional behaviour of hydrogels in controlled release Adv Drug Delivery Rev, 11 (1993), pp. 1-35
[61] N.B. Graham Polyethylene glycol chemistry J.M. Harris (Ed.), Biotechnical and biomedical application, Plenum Press, New York (1992), pp. 1-13
[62] Bae, Y., Park, K. (2011). Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. Journal of Controlled Release, 153(3), 198–205.
[63] Paolino, D., Fresta, M., Sinha, R., & Ferrari, M. (2006). Polymeric nanocarriers for drug delivery. Current Drug Delivery, 3(4), 367-379.
[64] Kost, J., & Langer, R. (2012). Responsive polymeric delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews, 64(Supp.), 327-341.
[65] Gutman, M., Grossman, S. A., & Yung, W. K. A. (2000). Advances in the treatment of brain tumors. Journal of Clinical Oncology, 18(3), 387-400.
[66] Raiche, A. T., & Puleo, D. A. (2003). Microencapsulation for the controlled release of bioactive agents. Biomaterials, 24(6), 941-952.
[67] S.R. Gomes, G. Rodrigues, G.G. Martins, M.A. Roberto, M. Mafra, C.M.R. Henriques, J.C. Silva In vitro and in vivo evaluation of electrospunnanofibers of PCL, chitosan and gelatin: a comparative study Mater. Sci. Eng., 46 (2015), pp. 348-358, 10.1016/j.msec.2014.10.051
[68] Abbasov, I. B. (2021). Biodegradable Polymer Materials in Medicine. Journal of Composites and Biodegradable Polymers, 9(1), 1–6.
[69] Puertas-Bartolomé M., Mora-Boza A., García-Fernández L. Emerging Biofabrication Techniques: A Review on Natural Polymers for Biomedical Applications. Polymers. 2021;13:1209. doi: 10.3390/polym13081209.
[70] Liu, Y., et al. (2017). "Arginine-based drug delivery systems for biomedical applications." Pharmaceutical Research, 34(1), 90–101.
[71] H.M. Ibrahim, E.M.R. El-Zairy Chitosan as a biomaterial — structure, properties, and electrospun nanofibers Concepts, Compd. Altern. Antibacterials (2015), 10.5772/61300.
[72] Jain, A., Gulbake, A., Shilpi, S., & Jain, S. K. (2013). A new horizon in modifications of chitosan: Syntheses and applications. International Journal of Biological Macromolecules, 55, 1–12.
[73] Loftsson, T., Brewster, M.E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences, 85(10), 1017–1025.
[74] Wang S, Tan M, Zhong Z, Chen M, Wang Y. Nanotechnologies for curcumin: An ancient puzzler meets modern solutions. J Nanomater. 2011;2011:1–8.
[75] Smith, R., et al. (2015). "Hyaluronic acid: A promising candidate for biomedical applications." Journal of Biomedical Materials Research Part A, 103(2), 743–752.

[76] V. Siracusa Microbial degradation of synthetic biopolymer waste Polymer (Basel), 11 (6) (2019), pp. 1066-1084.
[77] McBride, C., et al. (2014). "Polyethylene glycol in pharmaceutical applications." Journal of Controlled Release, 181, 34-47.
[78] Chen, X., et al. (2015). "Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based drug delivery systems." Biomaterials, 36, 157-168.
[79] Wang, Z., et al. (2017). "Poly(N-isopropylacrylamide) for controlled drug delivery systems." Polymer Chemistry, 8, 1685-1696.
[80] Apostu, D.; Lucaciu, O.; Lucaciu, G.D.O.; Crisan, B.; Crisan, L.; Baciut, M.; Onisor, F.; Baciut, G.; Câmpian, R.S.; Bran, S. Systemic drugs that influence titanium implant osseointegration. Drug Metab. Rev. 2016, 49, 92–104.
[81] Rahman, S.; Gulati, K.; Kogawa, M.; Atkins, G.J.; Pivonka, P.; Findlay, D.M.; Losic, D. Drug diffusion, integration, and stability of nanoengineered drug-releasing implants in bone ex-vivo. J. Biomed. Mater. Res. Part A 2015, 104, 714–725.
[82] Ma, X., Gao, Y., Zhao, D., Zhang, W., Zhao, W., Wu, M., Cui, Y., Li, Q., Zhang, Z., & Ma, C. (2022). Titanium implants and local drug delivery systems become mutual promoters in orthopedic clinics. Nanomaterials, 12(1), 47.
[83] Maher, S.; Mazinani, A.; Barati, M.R.; Losic, D. Engineered titanium implants for localized drug delivery: Recent advances and perspectives of Titania nanotubes arrays. Expert Opin. Drug Deliv. 2018, 15, 1021–1037.
[84] Losic, D.; Gulati, K.; Aw, M.S. Nanoengineered drug-releasing Ti wires as an alternative for local delivery of chemotherapeutics in the brain. Int. J. Nanomed. 2012, 7, 2069–2076.
[85] Lai, Y.-K.; Wang, Q.; Huang, J.-Y.; Li, H.-Q.; Chen, Z.; Zhao, A.Z.-J.; Wang, Y.; Zhang, K.-Q.; Sun, H.-T.; Al-Deyab, S.S. TiO2 nanotube platforms for smart drug delivery: A review. Int. J. Nanomed. 2016, 11, 4819–4834.
[86] Andersen, O.Z.; Offermanns, V.; Sillassen, M.; Almtoft, K.P.; Andersen, I.H.; Sørensen, S.; Jeppesen, C.S.; Kraft, D.C.; Bøttiger, J.; Rasse, M.; et al. Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants. Biomaterials 2013, 34, 5883–5890.
[87] An, Y. H., & Friedman, R. J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. Journal of Biomedical Materials Research, 43(3), 338-348.
[88] Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. Biomaterials, 34(34), 8533-8554.
[89] Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284(5418), 1318-1322.
[90] Gristina, A. G. (1987). Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. Science, 237(4822), 1588-1595.
[91] Zimmerli, W., Trampuz, A., & Ochsner, P. E. (2004). Prosthetic-joint infections. The New England Journal of Medicine, 351(16), 1645-1654.
[92] Zimmerli, W., & Sendi, P. (2011). Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. Seminars in Immunopathology, 33(3), 295-306.

[93] Babić, S., Horvat, A. J. M., Pavlović, D. M., & Kaštelan-Macan, M. (2007). Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 26(11), 1043–1061.
[94] Scopes RK. Protein Purification: Principles and Practice. New York: Springer; 1987.
[95] Gassman, K. I., Hill, S. G., Smith, N. D., Kennedy, M. S., Tzeng, T.-R., Behbahani, S. B., Helms, S. M., O'Neill, L., & DesJardins, J. D. (2022). The effect of surface roughness and chitosan deposition volume on microbial growth in biofilm involving titanium surfaces for orthopaedic applications. Materialia, 24, 10148.
[96] Porter, B. D., Lin, A. S. P., Peister, A., Hutmacher, D., & Guldberg, R. E. (2007). Noninvasive image analysis of 3D construct mineralization in a perfusion bioreactor. Biomaterials, 28(15), 2525–2533.
[97] Queiroz, M. F., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sassaki, G. L., & Rocha, H. A. O. (2015). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? Marine Drugs, 13(1), 141–158.
[98] Büyük, N. İ., Arayıcı, P. P., Derman, S., Mustafaeva, Z., & Yücel, S. (2020). An optimization study for chitosan nanoparticles: Synthesis and characterization. Celal Bayar University Journal of Science, 16(3).
[99] Asadi, S., Mortezagholi, B., Hadizadeh, A., Borisov, V., Ansari, M. J., Shaker Majdi, H., Nishonova, A., Adelnia, H., Farasati Far, B., & Chaiyasut, C. (2022). Ciprofloxacin-loaded titanium nanotubes coated with chitosan: A promising formulation with sustained release and enhanced antibacterial properties. Pharmaceutics, 14(7), 1359.
[100] Sahoo, S., Chakraborti, C. K., & Mishra, S. C. (2011). Qualitative analysis of controlled release ciprofloxacin/carbopol 934 mucoadhesive suspension. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 2(3), 195-204.
[101] Sharma, P. C., Jain, A., & Jain, S. (2009). Ciprofloxacin: Review on developments in synthetic, analytical and medicinal aspects**.** Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 1(1), 14-24.
[102] Zhang, Y. et al. (2020). Sustained release characteristics of antibiotic-loaded polymeric coatings. International Journal of Pharmaceutics, 589, 119794.
[103] Sivakumar, R., Lee, M., & Kim, Y. K. (2015). pH-Dependent behavior of ciprofloxacin: solubility, dissolution rate and pKa determination. Journal of Pharmaceutical Investigation, 45(6), 605–613.
[104] Arcos, D. & Vallet-Regí, M. (2020). Drug delivery from porous materials in bone regeneration. Advanced Drug Delivery Reviews, 174, 113–132.
[105] Wang, Q. et al. (2017). Surface modification strategies to enhance antibacterial and osteogenic properties of biomaterials. Materials Science and Engineering: C, 70, 1182–1193.
[106] Yeh, M.-K., & Chiang, C.-H. (2006). Chitosan microspheres prepared by spray drying method: Effects of cross-linking agent and dosage form. Journal of Microencapsulation, 23(2), 203–212.
[107] Heller, J., & Hoffman, A. S. (2003). Controlled Drug Delivery Systems. In Biopolymers II (Advances in Polymer Science, vol. 160). Springer.
[108] Akbuga, J., & Bergisadi, N. (1999). Effect of formulation variables on drug release from chitosan microspheres. Journal of Microencapsulation, 16(6), 687–696.

[109] Ma, R., & Zhitomirsky, I. (2010). Electrophoretic deposition of chitosan–albumin films. Surface Engineering, 26(3), 168–173.
[110] Das, S., Islam, M. M., Jana, G. C., Patra, A., Jha, P. K., & Hossain, M. (2017). Binding of ciprofloxacin to bovine serum albumin. Journal of Molecular Recognition, 30(7), e2609.
[111] Bobrowska, K., Sadowska, K., Golec, P., Bilewicz, R., & Stolarczyk, K. (2023). Bovine Serum Albumin–Hydroxyapatite Nanoflowers as Potential Local Drug Delivery System of Ciprofloxacin. International Journal of Nanomedicine, 18, 6449–6467.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Parmaksız, B., & Önder, S. (2025, Şubat 21–23). Elektroforetik yöntem ile titanyum yüzeyleri için ciprofloxacin ve BSA yüklü kitosan kaplamaların hazırlanması ve karakterizasyonu. 20. Uluslararası İstanbul Fen, Mühendislik, Mimarlık ve Matematik Bilimlerinde Bilimsel Araştırmalar Kongresi, İstanbul, Türkiye.