

**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMALZEMELERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİ**  
**DEĞERLENDİRMEK İÇİN İN VİTRO YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMALI**  
**İNCELENMESİ**



**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ÇAĞDAŞ ÖZDEMİR**

**EYLÜL 2022**



**ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMALZEMELERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİ**  
**DEĞERLENDİRMEK İÇİN İN VİTRO YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMALI**  
**İNCELENMESİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Çağdaş ÖZDEMİR**

**DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Arzu EROL**

**ZONGULDAK**

**EYLÜL 2022**



**KABUL:**

Çağdaş ÖZDEMİR tarafından hazırlanan “Biyomalzemelerin Antimikrobiyal Aktivitesini Değerlendirmek İçin İn Vitro Yöntemlerin Karşılaştırılmalı İncelenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 23 /09/ 2022

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi Arzu EROL .....  
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**Üye:** Prof. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL .....  
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Beyza Servet GÖNCÜ .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

---

**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

/09/2022

Prof. Dr. Fikret GÖLGELEYEN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü





*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*

Çağdaş ÖZDEMİR





## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **BİYOMALZEMELERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİ DEĞERLENDİRMEK İÇİN İN VİTRO YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMALI İNCELENMESİ**

**Çağdaş ÖZDEMİR**

**Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Arzu EROL**

**Eylül 2022, 85 Sayfa**

Son yıllarda, biyomalzemelerin mikrobiyal etkinliğinin araştırılması ve geliştirilmesi konusunda artan bir ilgi vardır. Biyomalzemelerin mikrobiyal etkinliğini sıklıkla değerlendirilen bir parametredir. Öte yandan mikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesinde kullanılan antimikrobiyal etkinlik testleri mevcuttur. Bu nedenle, antimikrobiyal aktivite tarama ve değerlendirme yöntemlerine daha fazla dikkat edilmelidir.

Biyomalzemenin türüne göre (metal, polimer, seramik kaplama), kimyasal formuna göre (sıvı, katı) mikrobiyal etkinlik testlerinin seçilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada; biyomalzemenin türüne ve kimyasal formuna göre en uygun mikrobiyal etkinlik testinin tercih edilebilmesi için gerekli olan karşılaştırmalar yapılmak istenmektedir. Çalışmada metal (Titanyum, çinko, demir), alaşım (Ti6Al4V, demir mangan), polimer (polimetilmetakrilat, polihidroksi bütirat, Polikaprolakton, polilaktikasit), Seramik (Hidroksiapatit, titayumdioksit, çinkooksit) ve kompozit (Çinkotitanyumoksit) materyalleri üzerinde, gram pozitif özellikli *Staphylococcus*

## Özet (devam ediyor)

*aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, gram negatif özellikli; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* ve fungus türü olan *Candida albican* kullanılarak, 1-Difüzyon yöntemleri ( Agar disk difüzyon yöntemi, 2 - Antimikrobiyal gradyan yöntemi (Etest) , 3- Seri dilüsyon, 4-Time-Kill testi (zaman öldürme eğrisi), 5- Plak sayma metodu yöntemleri için mikrobiyal etkinlik testlerinin avantajları ve sınırlamaları hakkında ayrıntılı bir değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda antimikrobiyal aktivite yöntemlerinin kendi aralarında ve yöntem için avantaj dezavantaj durumu belirlenmiştir. Plak sayma ve time-kill testi yöntemlerinin diğer yöntemler ile doğrusal bir korelasyon oluşturması sonucunda maddelerin testlere elverişli olma özelliklerinin geniş bir yelpazede değerlendirilmesi yapılmıştır. Özellikle çinko temelli kompozit malzemelerinde, PHB, R - PLA ve PHB-V'nin ve metal tabanlı biyomalzemelerin birden fazla test yönteminde beklenen etkin sonuçlar gözlemlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyomalzemeler, nanomalzemeler, antimikrobiyal aktivite

**Bilim Kodu:** 401.02.00

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **COMPARATIVE EXAMINATION OF IN VITRO METHODS TO EVALUATE THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BIOMATERIALS**

**Çağdaş ÖZDEMİR**

**Zonguldak Bülent Ecevit University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology**

**Thesis Advisor: Assist. Prof. Dr. Arzu EROL**

**September 2022, 85 pages**

In recent years, there has been an increasing interest in the research and development of the microbial activity of biomaterials. Microbial efficiency of biomaterials is a parameter that is frequently evaluated. On the other hand, there are antimicrobial activity tests used to evaluate microbial activity. Therefore, more attention should be paid to antimicrobial activity screening and evaluation methods. Microbial activity tests should be selected according to the type of biomaterial (metal, polymer, ceramic coating), chemical form (liquid, solid). In this study; It is desired to make the necessary comparisons in order to choose the most suitable microbial activity test according to the type and chemical form of the biomaterial. In the study, material was used on metal (Titanium, zinc, iron), alloy (Ti6Al4V, iron manganese), polymer (polymethylmethacrylate, polyhydroxy butyrate, Polycaprolactone, polylactic acid), Ceramic (Hydroxyapatite, titanium dioxide, zinc oxide) and composite (Zincotitanium oxide) materials gram-positive; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, gram-negative; Using *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and the fungus *Candida albican*, 1-Diffusion

## **ABSTRACT (continued)**

methods (Agar disc diffusion method, 2- Antimicrobial gradient method (Etest), 3- Serial dilution, 4-Time killing test (time) killing curve), 5- A detailed evaluation was made about the advantages and limitations of microbial activity tests for the plaque counting method methods. As a result of this evaluation, the advantage and disadvantage of the antimicrobial activity methods were determined among themselves and for the method. As a result of establishing a correlation, a wide range of evaluation of the properties of the materials for suitability for tests was made. Expected effective results were observed in more than one test method of especially zinc-based composite materials, PHB, R - PLA and PHB-V, and metal-based biomaterials.

**Keywords:** Biomaterials, nanomaterials, antimicrobial activity

**Science Code:** 401.02.00

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez danışmanlığımı üstlenen, bilgisini, sabrını ve insani ilgisini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Arzu EROL'a,

Tez çalışmam sırasında anlayış ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım, Prof. Dr. Baki HAZERE'e, Doç. Dr. Barış AVAR'a ve Araş. Gör. İlker Emin DAĞ'a,

Deneylerimin gerçekleştirilmesinde emekleri geçen, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü yüksek lisans öğrencileri ve değerli arkadaşlarım Bengisu YÖNEY ve Emine DERİN'e,

Yüksek lisans eğitimim sürecinde, bana her zaman moral veren ve destek olan kız arkadaşım Derya KONAR'a,

Hayatım boyunca attığım her adımda olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de maddi, manevi desteklerini hep arkamda hissettiğim, bugünlere gelmem de en büyük pay sahibi olan annem Gülbahar ÖZDEMİR, babam Niyazi ÖZDEMİR ve canım abim Ümit ÖZDEMİR'e,

Sonsuz teşekkürlerimi saygıyla sunarım.



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL.....                                                                           | ii   |
| ÖZET .....                                                                           | iii  |
| ABSTRACT.....                                                                        | v    |
| TEŞEKKÜR.....                                                                        | vii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                    | ix   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                | xiii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                                               | xv   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                 | xvii |
| BÖLÜM 1 GİRİŞ .....                                                                  | 1    |
| 1.1 MALZEME TANIMI.....                                                              | 1    |
| 1.2 BİYOMALZEMELERİN TANIMI VE TARİHÇESİ .....                                       | 1    |
| 1.3 BİYOMALZEMELERDE OLMASI GEREKEN ÖZELLİKLER .....                                 | 3    |
| 1.3.1 Biyouyumluluk .....                                                            | 4    |
| 1.3.2 Korozyon Direnci.....                                                          | 5    |
| 1.3.3 Biyoaktivite.....                                                              | 6    |
| 1.3.4 Aşınma Direnci .....                                                           | 6    |
| 1.3.5 Osseointegrasyon .....                                                         | 7    |
| 1.4 BİYOMALZEMELERİN SINIFLANDIRILMASI .....                                         | 7    |
| 1.4.1 Metalik Biyomalzemeler .....                                                   | 8    |
| 1.4.2 Polimerik Biyomalzemeler .....                                                 | 10   |
| 1.4.3 Kompozit Biyomalzemeler.....                                                   | 13   |
| 1.4.4 Seramik Biyomalzemeler .....                                                   | 15   |
| 1.5 NANOTEKNOLOJİ VE NANOMALZEMELER .....                                            | 17   |
| 1.6 ANTİMİKROBİYAL MADDE TANIMI VE MADDENİN ETKİNLİĞİNİ<br>BELİRLEYEN FAKTÖRLER..... | 18   |
| 1.7 MİKROBİYAL ETKİNLİKLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN<br>AKTİVİTE YÖNTEMLERİ ..... | 19   |
| 1.7.1 Antibakteriyel Aktivite.....                                                   | 19   |
| 1.7.2 Antifungal Aktivite .....                                                      | 19   |
| 1.7.3 Antiviral Aktivite .....                                                       | 20   |

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.8 MİKROBİYAL ETKİNLİKLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR .....                     | 20 |
| 1.8.1 Gram Pozitif Bakteriler .....                                                                 | 20 |
| 1.8.2 Gram Negatif Bakteriler .....                                                                 | 22 |
| 1.8.3 Fungus .....                                                                                  | 24 |
| 1.9 ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE YÖNTEMLERİNİN SEÇİLMESİ VE UYGULANMASINDAKİ BELİRLEYİCİ FAKTÖRLER ..... | 24 |
| BÖLÜM 2 DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....                                                                   | 27 |
| 2.1 MATERYAL .....                                                                                  | 27 |
| 2.1.1 Biyomalzemeler .....                                                                          | 27 |
| 2.1.2 Mikroorganizmalar.....                                                                        | 27 |
| 2.1.3 Mikroorganizmaların Canlandırılmasında Kullanılan Kimyasallar ve Sarflar.....                 | 28 |
| 2.2 METOD.....                                                                                      | 28 |
| 2.2.1 Test Mikroorganizmalarının Canlandırılması ve Yoğunluk Optimizasyonu .....                    | 28 |
| 2.2.2 Sterilizasyon.....                                                                            | 32 |
| 2.2.3 Antibiyotik Diskler.....                                                                      | 32 |
| 2.2.4 Antimikrobiyal Aktivite Yöntemlerinde Pozitif ve Negatif Kontrol Seçimleri ...                | 33 |
| 2.2.5 Antimikrobiyal Aktivite Yöntemleri.....                                                       | 33 |
| BÖLÜM 3 BULGULAR .....                                                                              | 41 |
| 3.1 AGAR DİSK DİFÜZYON .....                                                                        | 41 |
| 3.1.1 Polimerik ve Kompozit Polimerik Biyomalzemeler .....                                          | 42 |
| 3.1.2 Metal ve Metal Alaşım Biyomalzemeler.....                                                     | 44 |
| 3.1.3 Seramik Biyomalzemeler .....                                                                  | 45 |
| 3.1.4 Kompozit Biyomalzemeler.....                                                                  | 46 |
| 3.2 MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ İÇİN ANALİZ YÖNTEMLERİ .....                  | 49 |
| 3.2.1 E Test.....                                                                                   | 49 |
| 3.2.2 Minumum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....                                        | 51 |
| 3.3 ZAMANA BAĞLI ÖLÜM TESTİ (TİME-KİLL METODU).....                                                 | 54 |
| 3.3.1 Polimerik ve Kompozit Polimerik Biyomalzemeler .....                                          | 54 |
| 3.4 PLAK SAYMA DENEYİ.....                                                                          | 63 |
| 3.4.1 Polimer ve Kompozit Polimer Biyomalzemeler .....                                              | 64 |



## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

|                        |                                                              |    |
|------------------------|--------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.2                  | Metal ve Metal Alaşım Biyomalzemeler.....                    | 66 |
| 3.4.3                  | Kompozit Biyomalzemeler.....                                 | 67 |
| BÖLÜM 4 TARTIŞMA ..... |                                                              | 71 |
| 4.1                    | STERİLİZASYON .....                                          | 71 |
| 4.2                    | ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE YÖNTEMİ TEMELLİ ANALİZ .....         | 72 |
| 4.2.1                  | Agar Disk Difüzyon Metodu .....                              | 72 |
| 4.2.2                  | Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirleme Yöntemleri ..... | 73 |
| 4.2.3                  | Zamana Bağlı Ölüm Testi (Time-Kill Yöntemi) .....            | 75 |
| 4.2.4                  | Plak Sayma Metodu .....                                      | 76 |
| KAYNAKLAR .....        |                                                              | 77 |
| ÖZGEÇMİŞ .....         |                                                              | 85 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

| No                                                                                                                                                                                     | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.1Biyomalzemelerde bulunması gereken özellikler.....                                                                                                                            | 4     |
| Şekil 1.2 Biyomalzemelerin malzeme türüne göre sınıflandırılması. ....                                                                                                                 | 7     |
| Şekil 2.1 Thoma Lamı .....                                                                                                                                                             | 30    |
| Şekil 2.2 E Test Metodu .....                                                                                                                                                          | 36    |
| Şekil 2.3 Spektrofotometre Cihazı .....                                                                                                                                                | 39    |
| Şekil 3.1 Polimerik biyomalzemelerin agar disk difüzyon deneyi.....                                                                                                                    | 43    |
| Şekil 3.2 Ko-polimerik biyomalzemelerin agar disk difüzyon deneyi.....                                                                                                                 | 43    |
| Şekil 3.3 Metal ve metal alaşım olan biyomalzemelerin agar disk difüzyon deneyi. ....                                                                                                  | 44    |
| Şekil 3.4 Seramik biyomalzemelerin agar disk difüzyon deneyi. ....                                                                                                                     | 45    |
| Şekil 3.5 Kompozit yapıli biyomalzemelerin ve çinko metalinin agar disk difüzyon deneyi.....                                                                                           | 47    |
| Şekil 3.6 Polimerler ve ko-polimer biyomalzemelerin E Test deneyi <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1: 50mg/ml - 2: 25 mg/ml - 3: 12,5 mg/ml - 4: 6 mg/ml K: Kontrol ...               | 50    |
| Şekil 3.7 <i>Staphylococcus epidermidis</i> bakterisine karşı C-PLA, PHB-V ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 50mg/ml konsantrasyona ait logaritmik değer grafiğı .      | 56    |
| Şekil 3.8 <i>Staphylococcus epidermidis</i> bakterisine karşı PHB ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 25mg/ml konsatrasyona ait logaritmik değer grafiğı.....             | 57    |
| Şekil 3.9 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterisine karşı PMMA, C-PLA, R-PLA ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 50mg/ml konsatrasyona ait logaritmik değer grafiğı ..... | 59    |
| Şekil 3.10 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterisine karşı PCL ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 50mg/ml konsatrasyona ait logaritmik değer grafiğı.....                | 60    |
| Şekil 3.11 <i>Staphylococcus aureus</i> bakterisine karşı C-PLA, PHB-V ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 50mg/ml konsantrasyona ait logaritmik değer grafiğı .          | 62    |
| Şekil 3.12 Polimer biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi: <i>Enterococcus faecalis</i> . ....                                                                                      | 64    |
| Şekil 3.13 Polimer biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi: <i>Salmonella tyhpriium</i> . ....                                                                                       | 64    |
| Şekil 3.14 Polimer biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi: <i>Staphylococcus epidermidis</i> . ....                                                                                 | 65    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.15 Metal ve metal alaşım biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi      |    |
| <i>Enterococcus faecalis</i> .....                                              | 66 |
| Şekil 3.16 Metal ve metal alaşım biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi      |    |
| <i>Salmonella typhirium</i> .....                                               | 66 |
| Şekil 3.17 Metal ve metal alaşım biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi      |    |
| <i>Escherichia coli</i> .....                                                   | 66 |
| Şekil 3.18 Kompozit ve çinko metali biyomalzemelerinin plak sayma metodu deneyi |    |
| <i>Salmonella typhirium</i> .....                                               | 67 |
| Şekil 3.19 Kompozit ve çinko metali biyomalzemelerinin plak sayma metodu deneyi |    |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....                                         | 68 |
| Şekil 3.20 Kompozit ve çinko metali biyomalzemelerinin plak sayma metodu deneyi |    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                                             | 68 |
| Şekil 3.21 Kompozit ve çinko metali biyomalzemelerinin plak sayma metodu deneyi |    |
| <i>Escherichia coli</i> .....                                                   | 68 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>No</u>                                                                                                                                                    | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Çizelge 1.1Biyomalzemelerin Kısa Tarihçesi.....                                                                                                              | 3            |
| Çizelge 1.2 Canlı vücudunda kullanılan biyomalzeme türleri ve özellikleri.....                                                                               | 8            |
| Çizelge 1.3 Metalik yapıdaki biyomalzemelerin karşılaştırılmalı özellikleri Ti-6Al-4V. ....                                                                  | 9            |
| Çizelge 1.4 Üretilen çeşitli polimerik biyomalzemeler .....                                                                                                  | 11           |
| Çizelge 1.5 Kompozit yapıdaki biyomalzemelerin kullanım yeri ve entegre edilen matrisler .....                                                               | 14           |
| Çizelge 1.6 Biyoseramik türlerinin özellikleri.....                                                                                                          | 15           |
| Çizelge 1.7 Antimikrobiyal katkı türleri.....                                                                                                                | 18           |
| Çizelge 2.1 CLSI tarafından önerilen antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri .....                                                                         | 29           |
| Çizelge 2.2 Antimikrobiyal aktivite yöntemlerindeki pozitif ve negatif kontrol grupları.....                                                                 | 33           |
| Çizelge 2.3 Antimikrobiyal aktivite çalışmaları ve kullanılan malzemeler .....                                                                               | 40           |
| Çizelge 3.1 Kompozit malzemelerin ve çinko metalinin verdikleri zon çapları.....                                                                             | 48           |
| Çizelge 3.2 Spektrofotometrik sonuçlar, Staphylococcus epidermidis HS: Hücre sayısı CFU/ml $\times 10^6$ , İnkübasyon süresi: 24 sa, Absorbans: 625 nm ..... | 52           |
| Çizelge 3.3 Spektrofotometrik sonuçlar, Staphylococcus aureus HS: Hücre sayısı CFU/ml $\times 10^6$ , İnkübasyon süresi: 24 sa, Absorbans: 625 nm .....      | 53           |
| Çizelge 3.4 Time-Kill analiz yöntemi için pozitif kontrol ekstinksiyon katsayısı sonucu.....                                                                 | 54           |
| Çizelge 3.5 Ölüm Zamanı Analizi için Spektrofotometrik sonuçlar, Staphylococcus epidermidis HS: Hücre sayısı CFU/ml $\times 10^3$ .....                      | 55           |
| Çizelge 3.6 Şekil 3.7’de log10 değerlerinin çizelge üzerinde gösterimi.....                                                                                  | 56           |
| Çizelge 3.7 Şekil 3.8’de ki log10 değerlerinin çizelge üzerinde gösterimi .....                                                                              | 57           |
| Çizelge 3.8 Ölüm Zamanı Analizi için Spektrofotometrik sonuçlar, Pseudomonas aeruginosa HS: Hücre sayısı CFU/ml $\times 10^3$ .....                          | 58           |
| Çizelge 3.9 Şekil 3.9’da log10 değerlerinin çizelge üzerinde gösterimi.....                                                                                  | 59           |
| Çizelge 3.10 Şekil 3.10’da log10 değerlerinin çizelge üzerinde gösterimi .....                                                                               | 60           |
| Çizelge 3.11 Ölüm Zamanı Analizi için Spektrofotometrik sonuçlar, Staphylococcus aureus HS: Hücre sayısı CFU/ml $\times 10^3$ .....                          | 61           |
| Çizelge 3.12 Şekil 3.11’de log10 ki değerlerin çizelge üzerinde gösterimi .....                                                                              | 62           |
| Çizelge 3.13 Plak Sayma metodu, Polimerik malzemelerin koloni sayıları.....                                                                                  | 65           |
| Çizelge 3.14 Plak Sayma metodu, Metal ve Metal alaşım malzemelerin koloni sayıları. ....                                                                     | 67           |
| Çizelge 3.15 Plak sayma metodu sonucunda kompozit malzemelerin ve çinko metalinin petri kabındaki koloni sayıları. ....                                      | 69           |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

- A** : Absorbans  
**°C** : Sıcaklık  
**C** : 1 ml'deki hücre sayısı  
 **$\ell$**  : 1 mililitrelik küvet birimi-yol uzunluğu  
 **$\varepsilon$**  : Ekstinksyon katsayısı

### KISALTMALAR

- A** : Absorbans  
**ATP** : Adenozin TriFosfat  
**B.S** : *Bacillus Subtilis*  
**C.A** : *Canida Albicans*  
**CFU** : Koloni Formasyon Birimi  
**C-PLA** : Cagill Polilaktikasit  
**E. coli** : *Escherichia coli*  
**E.F** : *Enterococcus Faecalis*  
**FE** : Demir  
**HA** : Hidroksiapatit  
**g** : Gram  
**I** : Litre  
**K.P** : *Ksibella Pneumoniae*  
**P.A** : *Psuedomanas Augreniosa*  
**PCL** : Polikaprolakton  
**PHB** : Polihidroksibütirat

## SİMGELER VE KISALTMALAR (devam ediyor)

|                        |                                          |
|------------------------|------------------------------------------|
| <b>PHB-V</b>           | : Polihidroksivalorat                    |
| <b>PHB-PLA</b>         | : Polihidroksibütirat-Polilaktikasit     |
| <b>PMMA</b>            | : Polimetilmetakrilat                    |
| <b>S.A</b>             | : <i>Staphylococcus Aureus</i>           |
| <b>S.E</b>             | : <i>Staphylococcus Epidermidis</i>      |
| <b>S.T</b>             | : <i>Salmonella Typhimurium</i>          |
| <b>STEM</b>            | : Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu |
| <b>TSA</b>             | : TrypticSoyAgar                         |
| <b>TSB</b>             | : TrypticSoyBroth                        |
| <b>ml</b>              | : Mililitre                              |
| <b>Mn</b>              | : Mangan                                 |
| <b>M-HA</b>            | : Mikro Hidroksiapatit                   |
| <b>N-HA</b>            | : Nano Hidroksiapatit                    |
| <b>Nm</b>              | : Nanometre                              |
| <b>O</b>               | : Oksijen                                |
| <b>R-PLA</b>           | : Resinex Polilaktikasit                 |
| <b>sn</b>              | : Saniye                                 |
| <b>µl</b>              | : Mikrolitre                             |
| <b>UV</b>              | : Ultraviole                             |
| <b>Ti</b>              | : Titanyum                               |
| <b>TiO</b>             | : Titanyum oksit                         |
| <b>TiO<sub>2</sub></b> | : Titanyumdioksit                        |
| <b>Ti6Al4V</b>         | : Titanyum6Alüminyum4Vanadyum            |
| <b>Zn</b>              | : Çinko                                  |
| <b>ZnO</b>             | : Çinko oksit                            |





## BÖLÜM I

### GİRİŞ

*“Etrafımız malzemelerle çevrili; gördüğümüz ve dokunduğumuz her şeye özünü veren malzemedir. Türümüz - homo sapiens - diğer türlerden belki de en çok tasarlama, malzemelerden şeyler üretme ve dışsal formlarının ötesinde anlamlar atfedebilme becerisiyle ayrılıyor’ Mike Ashby’ (Mike ve Kara 2002)*

#### 1.1 MALZEME TANIMI

En uygun tanım olarak malzeme günümüz zamanında en geniş perspektifte mühendislik, mimarlık alanlarında, sanatın icra edildiği her türlü çalışmalarda, tasarımda ürünü meydana getiren veya bu fikrin hayata geçmesine katkısı olan nesne olarak tanımlanabilir. İnsanlık için malzeme ilk çağlardan gelerek insan yaşamının gelişmesi ve ilerlemesine katkısı göz ardı edilemeyecek derecede fazla olan nesneler bütünüdür. İlk zamanlarda bir işlem yapılmaksızın doğal ve saf olarak kullanılmaktayken, insan ihtiyaçlarının artması ve ilerlemesi etkin biçimde hızlanan teknolojiyle birlikte gün geçtikçe yapısal ve fiziksel özellikleri açısından bir amaç ve bir hizmet için üretilmeye, hatta değişiklikler göstererek yeni tasarımlar bile yapılmaya başlamıştır (Sönmez 2009).

#### 1.2 BİYOMALZEMELERİN TANIMI VE TARİHÇESİ

Tedavi ya da teşhis amacıyla kullanılan kan ve doku sıvıları dahil olmak üzere vücut içerisindeki sıvılar ile entegre ve temas halinde olan yapay dokularda veya işlevsel organlardaki hücrelere yapısal işlev bazında destek sağlayan, canlıya herhangi bir olumsuz etkide bulunmayan doğal veya sentetik madde ve karışımlara biyomalzeme denir (Gümüşderelioğlu 2002). Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü’nün kabul gördüğü tanımlama ise; insanda ya da hayvanda bir hastalığı teşhis, tedavi, yatıştırma veya önleme amaçlı, canlı vücudundaki herhangi bir fonksiyonu ya da yapıyı değiştirme amaçlı, birincil amacına kimyasal

yolla veya metabolize olarak ulaşmayan bir alet, düzenek, makina, donanım veya icat olarak vücuda konulan madde, in vitro reaktif, veya benzeri ürün olarak tanımlanır (Ezgi 2014; Fratzi 2007)

Biyomalzemelerin yapısına, türüne ve kullanım alanına bağlı olarak çeşitli sınıflandırılmalar yapmak mümkündür. Bu sınıflandırma ile ilgili detaylı bilgiler bölüm 2.4 'de yer almaktadır. Biyolojik olan yapılar teknolojik gelişmenin olduğu her zaman diliminde mimari açıdan mühendislik ve malzeme bilimindeki meydana gelebilecek teknik açıdan zorluklara çözüm olması ile her daim ilham kaynağı olmuştur (Fratzi 2007). Bilimsel anlamda çok da eski olmayan bir kavram olmasına rağmen, uygulama alanında kullanılan biyomalzemeleri öğrenmek için tarihte epeyce bir geriye bakış atmak gerekmektedir (Yetim 2009). Tarihteki ilk örnekleri Mısır ve Romalılarda görmektediriz. Mısır mumyalarında bulunan yapay göz, burun ve dişler bunun en güzel kanıtlarından birkaçıdır (Kel 2012). Romalılarda ise fildişinden ve altından üretim sağlanarak kafatasındaki hasar onarımları yapılmaya çalışılmıştır (Ezgi 2014).

Günümüzde ise başta bilim dallarının en çok çalışma yapılan alanları olan tıp, mühendislik ve eczacılık olmak üzere oldukça çeşitli bilim dallarında kullanılan biyomalzemelerin, etken madde salınım sistemleri, biyoçipler, hücre yenilemesi ve hücre transplantasyonunda uygulamaları gibi birçok farklı çalışmalar yürütülmektedir (Gümüşderelioğlu 2002). Biyomalzemeler yalnızca implant olarak değil, ekstra korporeal cihazlarda (vücut dışına yerleştirilen ama vücutla etkileşim halindeki cihazlar) diyaliz cihazları gibi, çeşitli eczacılık ürünlerinde, teşhis kitlerinde de yaygın olarak kullanılmakta olup, günümüzde, yüzlerce firma tarafından çok sayıda biyomalzeme üretilmektedir (Kel 2012).

Tarihsel süreç ve günümüzdeki çalışmalar baz alındığında, biyomalzemelerin tarihini alt sınıflara ayıracak olursak; Tarih öncesi dönemi, cerrahi buluş aşamaları, mühendislik dönemi ve modern yaklaşımlar olarak kategorize etmek uygun bir tanımlama olacaktır. Biyomalzemelerin özet halinde, yakın tarihindeki gelişmeleri Çizelge 1.1'de gösterilmektedir.

### Çizelge 1.1Biyomalzemelerin Kısa Tarihçesi

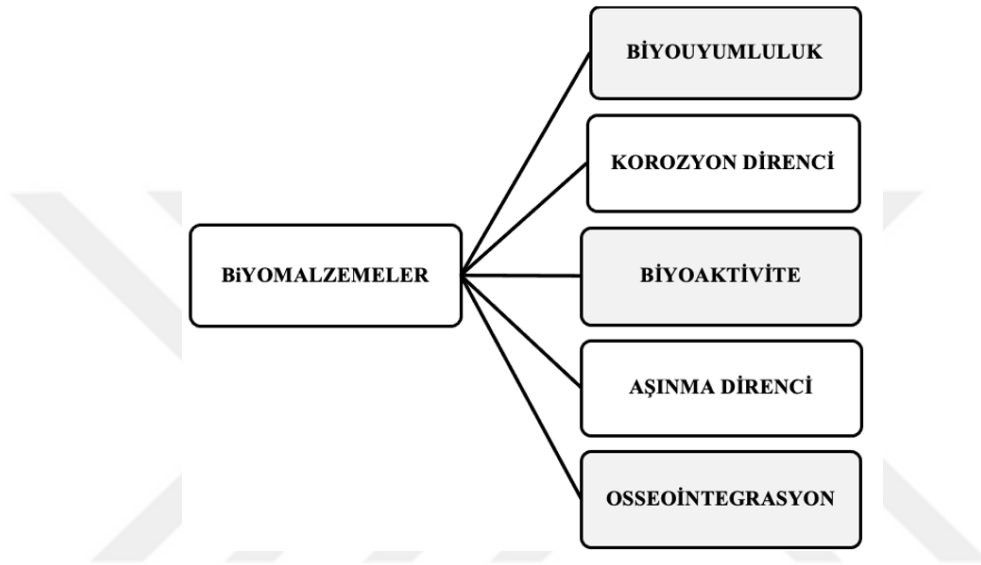
| Yıllar    | Kullanım Alanları                                                                    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 18.19. yy | Kırıkları sabitlemek amacı ile çeşitli metal ve çivilerin kullanımı (Fe, Au, Pt, Ag) |
| 1893-1912 | Çelik vida ve plakaların kullanımı                                                   |
| 1909      | Pirinç, Al, Ag ve Cu plakalarının kullanımı                                          |
| 1912      | Biyomedikal uygulama alanında ilk alaşım (vanadium çeliği)                           |
| 1938      | İlk kalça kemiği değiştirilmesi ve ilk metal protez                                  |
| 1946      | İlk kalça kemiği protezi ve il plastik yapı eklemlerde kullanıldı                    |
| 1940'lar  | Kornea değiştirilmesi için Akrilik                                                   |
| 1952      | Paraşüt kumaşından ilk kan damarı                                                    |
| 1954      | Nanopartiküllerin ortaya çıkması                                                     |
| 1960      | Kalp kapakçık değişimi yapılması                                                     |
| 1970'ler  | İlk deneysel kalp nakli,                                                             |
| 1990'lar  | İçerisinde biomineral oluşturan kemik protezler                                      |
| 2000'ler  | Doku mühendisliği çalışmaları                                                        |
| 2000'ler  | Nanomalzemeler ile multidisipliner çalışmalar                                        |

Biyomalzemelerden kaynaklanan halen çözüme kavuşturulamamış problemlerde mevcuttur. Bu problemlerin aşılmasında tıp ve mühendislik bilimlerinden köken alan doku mühendisliği ve gen tedavisi gibi çalışmalar iyi bir alternatif çözüm olarak görülmektedir. Bu noktada özellikle nanoteknolojideki çalışmalarla doğrudan ilişkili olarak hatadan ya da kullanımından kaynaklanan sorunların ortadan kaldırıldığı yeni kusursuz biyomalzemelerin üretilip, geliştirilip yaygınlaştırılarak kullanılması hedeflenmiştir (Kel 2012).

### 1.3 BİYOMALZEMELERDE OLMASI GEREKEN ÖZELLİKLER

Biyomalzemeler köken aldıkları maddeye göre, meydana getiriliş yöntemlerine göre aktarıldıkları vücut ile uyum ilişkilerinde çeşitlilik gösterir ve bu durum ile bağlantılı olarak biyomalzemelerin uzun vadede işlevini koruması önemli bir etkidir (Kel 2012). Biyomalzemelerin tanımında yer alan ‘tedavi ya da teşhis amacıyla kullanılan kan ve doku sıvıları dahil olmak üzere vücut içerisindeki sıvılar ile entegre ve temas halinde olan’ ifadesi göz önünde tutularak bu tür malzemelerin herhangi bir toksik etki veyahut alerji gibi organizma

bazında vücutsal tepki çekecek durumlara yol açmamalıdır. Ayrıca biyomalzemeler kesikli veya sürekli bir biçimde vücut sıvıları ile temas halinde olup mekanik tepki veya yüklemelere maruz kalabilirler ve bu tepkiler ile karşılaşıldığında, kimyasal veya ısı dayanıma, itme, kırılma ve çekme mukavemeti gibi çeşitli özelliklere sahip olunması gerekmektedir (Ezgi 2014). Biyomalzemeler beklenen özellikleri, istenilen verimi ve vücutta kullanımını sağlayan veya kolaylaştıran bazı özellikleri barındırması gerektirmektedir. Bu özellikler; Şekil 1.1 'de sıralı bir şekilde görülmektedir.



**Şekil 1.1** Biyomalzemelerde bulunması gereken özellikler

### 1.3.1 Biyouyumluluk

Biyomalzemelerin biyolojik olarak performansından bahsetmek için biyomalzeme ve biyouyumluluk tanımlamalarını bir arada kullanmak gerekmektedir ve buna istinaden biyouyumluluk; uygulama esnasında kullanılan malzemenin vücudun sistemine aykırı olmayan cevaplar verebilmedeki başarısıdır (Gümüşderelioğlu 2002). Biyouyumlu olması bir biyomalzemenin en temel özelliği denilebilmesinin asıl sebebi, vücut ve vücut metabolizması ile uyum içerisinde olup, çevresinde ve kendisini saran dokularda pıhtı oluşturma gibi normal karşılanmayan bir tepkiye yol açmamasıdır (Pasinli ve Aksoy 2010). Biyouyumluluk özelliğinin yanı sıra, kullanılan malzemelerin *in vivo* durumlarında çeşitli yollarla herhangi bir toksik yan ürün oluşumuna sebep olmayacak şekilde, biyobozunur yapıya sahip olması beklenmektedir (Yüksel 2014). Buna karşın gösterilen tepki toksik olmaz ise biyomalzemeler biyoinert veya biyoaktif diye bilinmektedir (Bulut 2014).

Bütün bu esaslar göz önüne alındığında bir malzemenin biyouyumlu olarak adlandırılması; canlı bir organizma üzerinde yapılan test aşamaları sonunda enfeksiyon, deri enfeksiyonu, hassaslaşma durumu, karsinojenite ya da biyolojik açıdan bozunma gibi parametreler incelenmesi ile olur (Anderson ve Shive 2012).

### **1.3.2 Korozyon Direnci**

Korozyon, hidroksit ve oksijen gibi diğer bileşiklerin ortaya çıkması için metal ve metal alaşımlarının ayrışması, aşınması ve bunu takiben zarar görmesi diye özetlenebilir. Metalik özellik de ki biyomalzemeler sağlık ve medikal alanındaki çalışmalarında insan vücudundaki en çok kullanım alanı olan malzeme türüdür. Biyomalzeme olarak kullanılan malzemelerden sadece metal olan türlerine özgü bir oluşum olan korozyonun, bu tür biyomalzemelerin kullanıldığı çalışmalarda daha detaylı araştırılmasını beraberinde getirmektedir. Mekanik amaçla kullanılan biyomalzemelerin korozyon olayı ilk metal maddelerin cerrahi operasyonlarda kullanılması ile gündeme getirilip üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Yılmaz 2019).

Biyomalzeme amaçlı kullanılan metal yapıli maddeler, insan vücudunda bulunan su, çözünür durumdaki oksijen veya hidroksit ve klorür gibi farklı yapıdaki iyonların fazlasıyla aşındırıcı bir ortam haline dönüştüğü bilinmektedir. Korozyondan dolayı oluşan bu durum, kullanılan metal biyomalzemelerin dayanım gücünde bir azalma meydana getirir ve bu durum metal yapıda olan bileşiklerin hücrelere zarar vermesine yol açmaktadır (Öztürk 2020). Korozyon direnci ve biyouyumluluk arasında etkili bir oran vardır ve bu oranda korozyon direncinin yüksek tutulması doğrudan biyouyumluluk derecesini pozitif olarak etkiler (Yılmaz 2019). Bahsedilen bu korozyon direncinden dolayı, biyomalzemelerde metal ve alaşım türleri olarak iki farklı türde malzeme kullanılmakta olup, örneğin: metal yapıda kullanılan biyomalzemeler; altın, platin, gümüş gibi soy metal yapılariken diğer grup ise vücutta korozyon oluşumunu önlemenin en etkin rolü olan, mekanik malzemeler üzerinde oksit bir tabaka oluşturan titanyum (Ti), kobalt-krom (Co-Cr) ve çelik alaşımları gibi kompleks yapılarıdır. Çünkü metalik yapıda olan biyomalzemelerin yüzey kısmında oksit bir tabaka meydana getirmesi, yüzeyin korozyona karşı kinetik olarak dirençli bir yapı olmasını sağlar (Bulut 2014; Yılmaz, Demirören, ve Avcı 2019; Yüksel 2014). Sonuç olarak kesinlikle vücuda uygulanacak olan bu malzemelerin oluşacak olan korozyona en ufak bir olanak tanınmayacak şekilde üretilmesi, gerekli malzemelerin uygun tasarımda kullanılması ve üretiminden itibaren klinik olarak deneylerde bu tepkime durumlarının test edilerek incelenmesi gerekmektedir.

### 1.3.3 Biyoaktivite

Biyoaktivite, kullanıldığı biyolojik tabanlı yapı ile biyomalzemeler arasında negatif bir uyum olmaması temeline dayanan ve biyoaktif özelliği olan malzemelerin, *in vitro* (vücut içi) ortamlarda yerleştirildiği doku ile arasındaki biyolojik ve kimyasal olarak uyum olması olarak ifade edilir (Yılmaz 2019). Biyoaktivite özelliğine sahip malzemelerin, biyolojik açıdan bir tepkime oluşturarak yerleştirildiği vücut dokusu ile malzemenin birbirlerine bağlanmasını sağlama özelliği mevcuttur. Örneğin biyoaktivite durumunda, kemiğin kimyasal olarak yapısı ile benzerliği olan biyolojik bakımdan aktif olan bir HCA (Hidroksikarbonat apatit) katmanının oluşmalarıdır (Kouyate vd. 2013)

Yapışkanlık özelliği olmasından kaynaklı biyoaktif malzemelerin farklılığı ya da bir diğer deyişle biyoinertlerden farklı kısmı implant olarak kullanıldığında doku ile arasındaki yüksek bağ oluşturma kapasitesidir (Bulut 2014). Biyoaktif malzemeler kullanım alanı, kullanım şekli gibi araştırılması gereken durumlardan önce biyoaktif özelliğin incelenmesi gerekir. Bu özelliğin ise test edilebilmesi için yapay bir şekilde laboratuvar ortamında (*in vitro*) oluşturulmuş vücut sıvısı (Simulated Body Fluid-SBF) kullanılmaktadır (Ezgi 2014).

Biyoaktif olan malzemelerin çeşitli işlevsel özelliklere sahip olması beklenir ve bu özelliklerden en dikkat edilmesi gerekenler:

- Entegre edildiği vücudu aktif bir şekilde iyileşmeye götürmek,
- Biyoaktif yapıdaki moleküllerin, organların işlevlerinin geri kazanılması hedef belirlenerek salınımını gerçekleştirilmesi,
- Hücre yayılmasını desteklemek,
- Etki etmesi beklenen dokunun yenilenmesine olanak sağlamak (Yılmaz 2019).

### 1.3.4 Aşınma Direnci

Malzeme yüzey kısımlarından, iki farklı malzemenin temas etmesinden kaynaklanan sürtünme ile ufak parçaların ayrılmasına aşınma denilmektedir. Neredeyse bütün biyomalzemelerde oluşabilecek eylemler sonucunda meydana gelebilmektedir. Kalça protezi operasyonundan sonraki hareket aşamalarından kaynaklı hem kemik dokusunda hem de yerleştirilen protez yapılı malzemenin aşınma uğramış olduğu gözlemlendikten sonra bu aşınma durumuna karşı direnç kazandırılacak bir yöntem geliştirilmiştir. Metal yapılı biyomalzemelerin yüzey kısımlarına biyoinert yapılı seramik kaplama yaparak kullanılmaya başlanılmıştır (Yılmaz

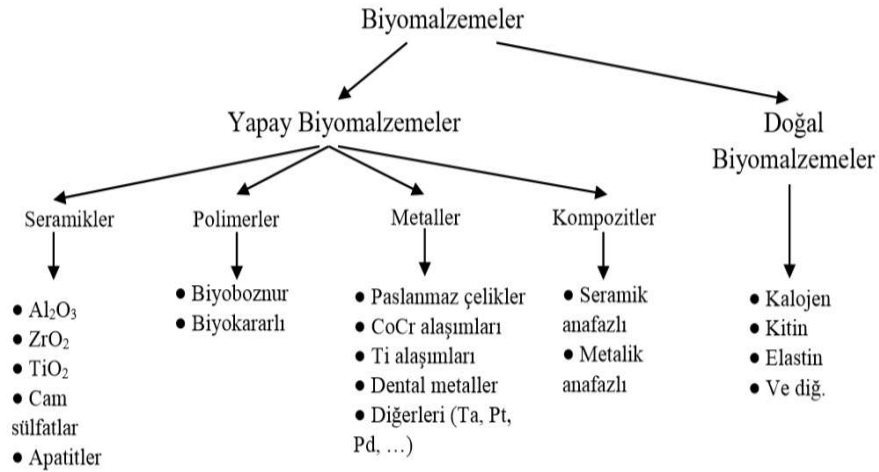
2019). Çünkü aşınan metal yapıları alaşımlar, entegre edildiği vücut açısından, örneğin nikel gibi zararlı olan metal iyonlarını salabilirler (Demirkol 2013).

### 1.3.5 Osseointegrasyon

Biyomalzeme ile canlı kemik arasında dolaylı olmadan direk temaslara osseointegrasyon denilir. Kemik ve biyomalzeme ara bölümünü kapsayan alanda lif doku bulunmaksızın, yerleştirilen biyomalzeme etrafında sabit biçimde kemik dokusu oluşumu şeklinde ifade edilir. Biyomalzeme alanında Titanyum ve alaşımlarının yoğunluğunun düşük olmasına karşın sahip oldukları iyi biyoyumluluk, yüksek derece mukavemet ve kırılma tokluğundan dental ve ortopedik implantlar olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Kullanılan bu yapıların kemiğe bağlanmaları doğrudan olsa da bağlandıkları kemiğin dokusu ile kimyasal bakımdan herhangi bir bağ oluşturmazlar (Breme, Eisenbarth ve Biehl 2003; Şap, Şap, ve Kırık 2019).

## 1.4 BİYOMALZEMELERİN SINIFLANDIRILMASI

Biyomalzemeler malzeme türüne, yapılarına ve kullanım alanlarına göre çeşitli kategorize sınıflandırılabilirler. Biyomalzemeler, malzeme türü baz alınarak Şekil 1.2’ de sınıflandırılmıştır (Yılmaz vd. 2019).



Şekil 1.2 Biyomalzemelerin malzeme türüne göre sınıflandırılması.

Farklı bir sınıflandırma da biyomalzemelerin uygulama alanı göz önüne alınarak; sert doku yerine uygulanacak ya da yumuşak doku yerine uygulanacak olmak üzere biyomalzemeleri iki sınıfta incelemekte doğru bir ayırım olacaktır. Örneğin Ortopedik ve diş uygulamalarında kullanılan metal veya seramik tabanlı olan protezler sert doku yerine kullanılan



biyomalzemelerden olabilirken, polimer tabanlı olan biyomalzemeler çeşitli plastik cerrahisi işlemlerinde kullanılmaktadır (Yetim 2009). Biyomalzemelerin ön bir izlenim ile özelliklerinin karşılaştırılması Çizelge 1.2’ de gösterilmektedir (Park ve Lakes 2007).

**Çizelge 1.2** Canlı vücudunda kullanılan biyomalzeme türleri ve özellikleri.

| <b>Biyomalzemeler</b> | <b>Avantaj</b>                   | <b>Dezavantaj</b>                                             | <b>Örnek Kullanım</b>                                |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Polimerler</b>     | Esnek ve Kolay üretilebilir      | Güçsüz bir yapı zamanla deforme olabilme ve bozulabilme       | Dikişler, yumuşak doku damarları ve kalça protezleri |
| <b>Metaller</b>       | Dayanıklı ve Biçimlendirilebilir | Paslanabilme ve üretim zorluğu                                | Kemik plakaları, vidalar, diş kökü implantları       |
| <b>Seramikler</b>     | Yüksek biyouyumluluk             | Kırılgan yapı olabilme, esnek olmama ve zayıf gerilme kuvveti | Diş ve Ortopedik implantlar                          |
| <b>Kompozitler</b>    | Güçlü ve uygun tasarım           | Üretim zorluğu                                                | Kemik çimentosu ve diş reçinesi                      |

#### 1.4.1 Metalik Biyomalzemeler

İnsan vücudunda Kullanım amacıyla üretilen ilk metal ‘Vanadyum Çeliği’ çeşitli kırıklarda plaka ve vida işlevi için kullanılmıştır. Yapılarının kristal olması ve güçlü metalik bağların bulunması mekanik olarak üstün özelliklerden dolayı metal ve alaşımlarının kullanılan biyomalzeme alanlarındaki payı büyüktür. Metal malzemeler biyolojik alanda bozunuma uğramaması için korrozyon direncinde güçlü bir yapıya sahip olmak ve herhangi bir toksik etki oluşmaması için biyouyumluluk gibi istenilen ilave özellikleri katmak amacıyla biyomalzeme uygulamalarında kullanılmak istenmiştir (Breme vd. 2003; Demirkol 2013).

Metalik biyomalzemeler uygulama alanlarına özgü metal ve metal alaşım türlerine göre dört ana başlık altında toplanabilirler;

- CoCr alaşımları (DIN/ISO 5832-4),
- Paslanmaz Çelikler (AISI 316L),
- CP-titanyum (DIN/ISO5832-2) ve titanyum alaşımları (DIN/ISO 5832-3),
- CP-niobyum ve CP tantalyum (Meral 2013; Yılmaz vd. 2019).

Günümüz teknolojisi ile en çok kullanılan metal yapıllı biyomalzemeler ise, paslanmaz çelikler, titanyum, kobalt ve bunların alaşım türleridir (Yetim 2009). Çizelge 1.3’ de metalik implant ve

protez olarak da kullanılan bu malzemelerin karşılaştırılmalı özellikleri gösterilmektedir (Long ve Rack 1998).

**Çizelge 1.3** Metalik yapıdaki biyomalzemelerin karşılaştırılmalı özellikleri Ti-6Al-4V.

|                          | <b>Paslanmaz Çelikler</b>                                                 | <b>Kobalt Alaşımları</b>                                      | <b>Titanyum Alaşımları</b>                                                         |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Avantajları</b>       | Düşük Maliyet,<br>Kolay Temin<br>Edilebilme ve<br>Uygun Kullanılabilirlik | Aşınma Direnci,<br>Korozyon Direnci<br>ve<br>Yorulma Dayanımı | Biyouyumluluk,<br>Aşınma Direnci,<br>Yorulma Dayanımı ve<br>Düşük Elastisite Modül |
| <b>Dezavantajları</b>    | Uzun Süreli Kullanıma<br>Yatkın Olmama ve<br>Yüksek Elastisite<br>Modül   | Düşük<br>Biyouyumluluk ve<br>Yüksek Elastisite<br>Modül       | Güçsüz Aşınma Direnci ve<br>Düşük Kesme Mukavemet                                  |
| <b>Kullanım Alanları</b> | Vidalar, Kalça<br>protezleri ve<br>Plakalar                               | Diş implantları ve<br>Kalça Protezleri                        | Kalp Pilleri, Kalça ve Diz<br>Protezleri ve<br>Plakalar                            |

Aslında esansiyel olmayan bir element olmakla birlikte titanyum yapısı gereğince hafif, üstün biyouyumluluk özelliği ve dayanıklı yapısından dolayı implantasyon süreci ve sonrasında gerek duyulan tüm gereksinimleri kendiliğinden karşılayan metalik bir biyomalzemedir. Titanyum ve titanyum temelli alaşımlar, düşük yoğunluğa ve biyouyumluluklarına ek olarak özellik bakımından geliştirilmiş mekanik tasarımı sayesinde başta tıp ve enerji gibi çeşitli endüstrilerde yaygın şekilde kullanımı mevcuttur. Günümüzde biyomedikal açısından kullanımı aktif olarak devam eden titanyum ve titanyum alaşımlarından ilk tercih edilenleri saf titanyum ile beraber Ti-6Al-4V alaşımıdır (Geetha vd. 2009; Siddiqi vd. 2011).

Bilinen üstün özellikleri ve temel yapısından dolayı titanyum ve titanyum alaşımları biyomalzeme olarak diş implantları çeşitli eklem protezleri veya yapay kemik uygulamada kullanılması açısından ilk akla gelen malzeme türüdür (Hench ve Wilson 1984; Radenković ve Petković 2017).

#### **1.4.1.1 Demir (Fe)**

Demirin bileşen olarak enzimlerin vazgeçilmez unsurlarından bir olmasından kaynaklanan, demir bazlı alaşımların biyoemilir özellik açısından kullanıma uygun elverişli biyomalzemeler ortaya çıkarıştır. Fe tabanlı biyomalzemelerin diğer biyomalzemeler ile kıyaslandığında özellikle Mg tabanlı biyomalzemelere göre yaygın olarak kullanımı mevcut olan paslanmaz çeliğe daha yakın mekanik özellikler gösterir. Biyobozunur özellikteki tarihteki ilk metal bazlı stent demirden üretilmiştir. Biyomalzeme eldesin de, alaşımlama yapılacağı zaman çeşitli

malzemeler ile bir araya getirildiğinde yapısal durumundan dolayı genellikle ilk tercihler arasında yer almaktadır (Kılıç 2021; Ormiston ve Serruys 2009)

Biyomalzeme olarak saf demirin kullanılmasının olumlu yanlarının yanı sıra olumsuz yanları da olduğu için örneğin: tıbbi görüntüleme cihazları ile uyumluluğu ters oranda etki göstermesi veya saf demir stentlerinin çoğu tıbbi operasyonun ardından bir yıl süresince bozulmaya tabi olmadan kan damarlarında kalabilmiştir ve bu durum uzun vadede vücutta farklı reaksiyonlara sebep olabileceği ön görülmekle birlikte çeşitli metal esaslı kompozit ve alaşım malzemelerinde sıklıkla yapısal özellikleri için katkı malzemesi olarak kullanılmaktadır (Kılıç 2021).

#### **1.4.1.2 Çinko (Zn)**

Yapısal özellik bakımından kendiliğinden antimikrobiyal bir özelliğe sahiptir. Çok çeşitli alaşımlama ve kompozit biyomalzemelerin yapımının bölüm 1.7’de belirtildiği üzere biyomalzemelerin antimikrobiyal aktivite kazandırılması açısından yapılan katkılama malzemelerinin başında çinko yer almaktadır.

Farklı malzeme grupları ile bir araya getirildiğinde Zn’nin elverişli bir biyomalzeme olarak kullanılmasını destekleyen mekanik özelliklerinin de geliştirilmesi söz konusudur. Örneğin magnezyumun (Mg) kemik büyümesi üzerindeki etkilerinden faydalanarak ve Mg elementinin esasında kanserojen olmadığı da kabul edildiği için çinkonun zayıf mekanik özelliklerinin geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur (Kılıç 2021; Kubásek ve Vojtěch 2012; Xu vd. 2007).

#### **1.4.1.3 Demir Mangan Çinko (Fe-Mn-Zn)**

Üst başlıklarda bahsedilen saf metaller ile mangan sırası ile katkılanarak hem Fe’nin yapısı hem Zn’nin antibakteriyel özelliği kullanılarak mekanik özelliklerinde geliştirilmesi üzerine kullanıma her konuda elverişli olduğu tespit edilmiştir (Kılıç 2021).

#### **1.4.2 Polimerik Biyomalzemeler**

Polimer ufak boyutlarda tekrarlanabilen alt birimlerin bir araya gelerek oluşturduğu uzun yapılı zincir motiflerine denir ve tekrarları oluşturan bu yapılara mer adı verilir. Sentez söz konusu olduğunda ise kullanılan molekül ağırlığı bakımından küçük olan yapılara monomer olarak adlandırılır. Bu moleküller bir araya gelip düz zincir oluşturabileceği gibi zincir haldeki yapılar birbirleri ile bağ yaparak üç boyutta ağısı yapılar da oluşturabilmektedir. Biyomalzeme seçimi, polimer yapılarının özellikleri monomer birimlerinden çok büyük farklılık gösterdiği için hassas olarak yapılmalıdır (Gümüşderelioğlu 2002). Biyomalzeme olarak kullanılan bu

biyopolimerler yapı olarak elde edildiği yere göre doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Canlıların kendi organizması bünyesinde meydana getirdiği yapılar (örneğin: DNA, Selüloz, kollojen) doğal polimer olurken, sentetik polimerler ise elastomerler ve plastikler olmak üzere iki çeşittir (Yılmaz vd. 2019).

Polimerik biyomalzemelerin metal seramik gibi biyomalzemelere nazaran kolayca işlenebilirliği ve ekonomik açıdan uygunluğu, doğal ve sentetik biyomalzemeleri bir arada kullanarak fiziksel ya da kimyasal olarak geniş perspektifte özellikler üretilebilmesi gibi kullanılabilirlik açısından üstün avantajlara sahiptir. Bunun yanı sıra sterilizasyonunun zor olması bilindik negatif özelliklerindendir. (Ezgi 2014). Polimerik biyomalzemelerin kullanımda olması istenilen özelliklerin kolayca entegre edilip üretilmesi esasına dayanan sentetik biyopolimerlere çeşitli örnekler Çizelge 1.4’ de verilmiştir (Meral 2013).

**Çizelge 1.4 Üretilen çeşitli polimerik biyomalzemeler**

| <b>Biyopolimerler</b>       | <b>Özellikleri</b>                                                                             | <b>Kullanım Alanları</b>                              |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Polietilen</b>           | Dayanımının ve kimyasal direncinin yüksek olması, kolay işlenebilirliği ve uygun fiyat         | Kalça veya bilek protezleri ve sondalar               |
| <b>Polipropilen</b>         | Su geçirgenliğinin zayıf olması ve iyi bir şeffaflık                                           | Ameliyat ipi                                          |
| <b>Polimetilmetakrilat</b>  | Optik özellikler bulunması ve ısı ile kolay şekillenme                                         | Göz lensleri ve protezler                             |
| <b>Polikarbonat</b>         | Kimyasal olarak inert olması, elektrik yalıtkanlığının iyi olması ve yüksek sertlik, saydamlık | Şırıngalar ve sert doku protezleri                    |
| <b>Polietilentereftalat</b> | Çekme ve aşınma direncinin iyi olması ve saydamlık                                             | Damar protezleri, ameliyat ipi                        |
| <b>Poliamit</b>             | Kimyasal direncinin iyi olması ve mekanik özelliklerin iyi olması                              | Paketleme filmleri, diyaliz cihazları ve ameliyat ipi |
| <b>Poliüretan</b>           | Aşınma, sıkışma ve kırılma direncinin iyi olması                                               | Yapay kalp, diş malzemeleri ve kan pompaları          |
| <b>Silikon kauçuk</b>       | Kimyasal direncinin iyi olması ve termal kararlılığının iyi olması                             | Yanık tedavisindeki köpükler, lens ve membranlar      |
| <b>Polivinilklorür</b>      | Kimyasal ve aşınma direncinin iyi olması, iyi kararlılık                                       | Diyaliz cihazı parçaları, kan torbaları, sonda        |

#### **1.4.2.1 Polihidroksibütirat (PHB)**

Biyopalstikler ile çalışma ilgisi, PHB gibi üst düzey biyoparçalanabilirlik, biyouyumlu olma ile yenilebilir ve doğaya karşı negatif bir etkisinin olmamasından gelmektedir. Ayrıca bu etkilerin bir araya gelmesi ve polimer kimyasında yapılan çalışmalarda alınan pozitif sonuçlar bu ilgiyi iyiden iyiye artırmaktadır (Braunegg, Lefebvre, ve Genser 1998). Polimerik biyomalzemeler arasında biyobozunur özelliğe sahip olmaları dolayısıyla özellikle polimer matrisli biyoçözünür kompozit malzemelerinde üst sıralardan tercih edilmektedirler (Demirkol 2013). Biyomalzeme olarak yaygın kullanım alanlarından bir tanesi de PHB'nin ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan etken maddenin metabolizma içerisinde tutulma ve etki süresinin uzatılması aşamalarında etken madde ile kompozisyonunu içeren bileşiklerde önemli bir rolü bulunmaktadır (Yagmurlu vd. 1999; Yılmaz ve Beyatlı 2003).

#### **1.4.2.2 Polilaktikasit (PLA)**

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden bir diğeri de PLA'dır. Çeşitli ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan PLA, sterokimyasal yapısının biyolojik ve mekanik özelliklerinin modifiye edilmesi ile çeşitli çalışmalarda yer alabilmektedir. En önemli etkinliklerinden biri ise yer aldıkları bir kopolimerdeki oranlarının değiştirilmesi ile polimerin biyolojik açıdan degradasyonu üzerinde değişiklik yapılabilmesidir (Demir 2013).

#### **1.4.2.3 Polihidroksibütirat-Polilaktikasit (PHB-PLA)**

Özellik bakımından birbirlerine benzeyen ve kopolimerle de ki oranları değiştiğinde biyolojik açıdan degradasyonunda değişmesine dikkat edilerek kopolimer içerisindeki oranlarının sırası ile diğer polimerden yüksek olduğu farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Arrieta vd. 2014).

#### **1.4.2.4 Polimetilmetakrilat (PMMA)**

Doğrusal yapıda bulunan hidrofobik özellikli bir zincir polimerdir. Oda ısısında camsı bir formda bulunurken kararlı yapısı, sertliği ve en önemlisi de ışık geçirgenliği sayesinde sert kontak lenslerin ve göz içi lens yapılarının temelini oluşturmaktadır. Poli(HEMA)'nın az miktarda etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ile çapraz bağlanması sonucunda yumuşak kontak lensler oluşturulmaktadır (Lewis 2001). Kemik çimentosu, kan pompası ve haznesi, kan diyaliz cihazı için membran gibi farklı kullanım alanlarında yatkın bir polimerik biyomalzemedir (Demirkol 2013).

#### **1.4.2.5 Polikaprolakton (PCL)**

Biyolojik olarak parçalanabilen ve implant olarak da kullanımın yaygın olan bir polyester grubu polimerdir. Diğer polyester muadillerine göre daha üstün reolojik ve viskoleastik özellikleri sayesinde implantlarda ve cihazlarda yer alan biyopolimerdir. Örneğin doku mühendisliği, tıbbi cihazlar ve ilaç salınımları gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Woodruff ve Hutmacher 2010).

#### **1.4.2.6 Polihidroksibütirat valerat (PHB-V)**

Bakteriler tarafından üretilen ve doğal olarak parçalanabilen polihidroksialkonaoat tipi bir polimerdir. PHBV, mükemmel biyoyumluluk, toksik olmama ve biyobozunurluk özelliklerine sahip bir mikrobiyal biyopolimerdir. Yapılan çalışmalar ışığında doku mühendisliği uygulamaları için gözenekli PHBV yapı iskeleleri üretmenin en önemli yöntemlerini sunulmaktadır (Rivera-Briso ve Serrano-Aroca 2018).

#### **1.4.3 Kompozit Biyomalzemeler**

Kompozitler kimyasal bakımdan birbirlerinden farklı olan iki ya da daha fazla fazların homojen bir şekilde dağılımı ile birliktelik oluşturmaktan meydana gelen malzeme çeşididir. Bu kompozitlerin temel yapı malzemelerinin bir tanesinin tek başına sahip olamadığı özellikleri, çeşitli yapısal ve fiziksel özellikleri olan yapıların bir araya getirilmesi sonucu birden fazla özellikte etkin bir malzeme oluşmasına olanak sağlar. Örneğin kompozitler yüksek dayanım veya düşük elastisite modülüne yapı olarak sahip olduğundan ortopedik çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Kompozitler bünyesinde manyetik açıdan herhangi bir özellik barındırmadığından tomografi gibi çeşitli belirleyici sistemlere uygundur (Yetim 2009; Yılmaz vd. 2019). Kompozit biyomalzemeler iskelet yapı durumların göz önüne alındığında 3 başlıkta incelenebilir:

- Metal matrisli biyomalzemeler: HA / titanyum
- Seramik matrisli biyomalzemeler: HA matrisli paslanmaz çelik katkılı kompozitler
- Polimer matrisli biyomalzemeler: HA katkılı polietilen matrisli kompozitler (Muhaffel 2010).

Bahsedilen bu kompozit yapıdaki biyomalzemeler biyoaktif veya çözünebilir olabildiği gibi biyo-inert de olabilirler. Kompozit yapı malzemelerin biyolojik açıdan aktiflikleri;

- Biyo-inert kompozitler (örn. karbon/PEEK)

- Biyo-aktif olan kompozitler (örn. paslanmaz çelik/biyocam, HA/Ti-6Al-4V)
- Çözünebilir kompozitler (örn. Trikalsiyum fosfat/poli laktik asit, TCP/polihidroksibütirat) şeklinde sınıflandırabiliriz (Paital ve Dahotre 2009).

Kompozitler biyomalzeme tarzında dental dolgu, gözenek yüzeyli ortopedik implantlar ve kemik çimentosu olarak kullanım alanlarına sahiptir (Meral 2013). Kompozit malzemeler çoğunlukla matriks ve lif olarak en azami şekilde iki malzeme yapısından oluşur. Kür diye adlandırılabilen bir ortam içerisinde farklı farklı güçlendirici yapıdaki ek malzeme türlerinin bir araya getirilmesi ile meydana getirilen yapı ‘bileşik ya da kompozit malzeme olarak adlandırılır (Ulçay, Akyol, ve Gemci 2002). Çizelge 1.5’te kullanım alanına ve entegre edildiği matrislere göre kompozit biyomalzeme örnekleri yer almaktadır (Ratner vd. 2013).

**Çizelge 1.5** Kompozit yapıdaki biyomalzemelerin kullanım yeri ve entegre edilen matrisler

| Uygulama Alanı                        | Kullanılan Matris/Takviye                       |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>Dış sabitleştirici</b>             | Epoksi reçine/CF                                |
| <b>Kemik kırıklarında</b>             | PLLA/HA, PEEK/CF, PMMA/CFPEEK/GF ve PP/CF       |
| <b>Omurga cerrahisi</b>               | PSU/biyocam, PU/biyocam, PLLA/HA ve PEEK/CF     |
| <b>Kemik çimentosu</b>                | PMMA/UHMWPE ve kalsiyum fosfat/aramit fiberleri |
| <b>Dental uygulamalar</b>             | Bis-GMA/inorganik partiküller ve PMMA/KF        |
| <b>Kalça protez sapları</b>           | PEI/CF-GF ve PEEK/CF                            |
| <b>Kemik yedekleri</b>                | PE/HA parçacıkları                              |
| <b>Kemik dolgular ve rejenerasyon</b> | Nişasta/HA parçacıkları ve PLGA/HA              |
| <b>Tendonlar ve lifler</b>            | Hidrojel/PET ve Poliolefin/UHMWPE               |

#### 1.4.3.1 Titanyum Çinko Oksit (Ti-Zn-O)

Kompozit malzeme biliminin temeli olan farklı türde ve yapıdaki malzemelerin bir araya getirilmesi ile yeni özellikteki bir malzemenin ortaya çıkmasını üretilen TiZnO kompozit biyomalzemesinde görmekteyiz. Bölüm 1.4.1.1 ve 1.4.1.3’ de gördüğümüz gibi temelde farklı türlere ait ve hem mekanik hem biyolojik açıdan farklı özelliklerin bir araya gelmesi ile ortaya yeni tip bir biyomalzeme çıkmıştır. Titaanyum Çinkooksit kompozitinde mekanik özelliklerine çeşitli oranlarda Zn eklemesi yapılarak (%1, %3, %6, %9) aslında var olmayan antimikrobiyal

özellği oluşturulan yeni biyomalzemeler kazandırmak hedeflenerek oluşturulan yeni tip metal matrisli biyokompozit malzeme üretilmiştir.

#### 1.4.4 Seramik Biyomalzemeler

Metal olmayan ve inorganik bileşiklerin kullanılması ile elverişli ve pozitif etkisi olan yüksek sıcaklığa dayanıklı ürün elde etme yöntemine seramik bilimi denir. Vücudun herhangi bir yerine veya o bölgede direnç artmasına destek olacak olan seramik veya seramik kompozitlerine, biyoseramik denilmektedir. Üretimlerinin zor olması gözenekli yapıda olmalarına rağmen mekanik dayanımları ve biyoyumluluklarının üst düzey olmasından dolayı implant tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoseramiklerin kullanımının etkin bir şekilde olması için; vücuda entegre edildiği dönemden itibaren biyofonksiyonel olmalı ve (Meral 2013). Biyomalzeme uygulama alanlarında yaygın olarak kullanılan seramiklerin sınıflandırılması: İnert (tepkime vermeyen), biyoaktif, yarı inert (reaktif), biyobozunur, tepkimeye giren (aşınır) şeklinde yapılabilmektedir (Yılmaz 2019). Örneğin hidroksiapatit (HA), yapı olarak kimyasal ve fiziksel açıdan kemik yapısı ile benzerliğe sahip olmasından dolayı ağır yüklerle karşılaşan metalik implantların kaplanmasında etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bu kaplama sayesinde implantlar, metalik özellikteki implantların mekanik açıdan özelliklerine sahipken seramik implantlarında biyoyumluluk özelliğini yansıtmaktadır (Muhaffel 2010). Günümüz teknoloji ile biyomalzeme olarak kullanılmak için geliştirilen ve kullanılan biyoseramiklerin türleri, kullanım alanları Çizelge 1.6’ de gösterilmektedir.

**Çizelge 1.6** Biyoseramik türlerinin özellikleri

| <b>Biyoseramik Türü</b>               | <b>Kullanım Alanları</b>                                                            | <b>Malzeme Örneği</b>                            |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Biyoaktif<br/>Biyoseramikler</b>   | Vida, sterilizasyon cihazları ve destek malzemeler                                  | Zirkonya ve Alümina                              |
| <b>İnert<br/>Biyoseramikler</b>       | Vida, protez kaplamalar ve dolgu malzemeleri                                        | Hidroksiapatit ve Cam seramikler                 |
| <b>Biyobozunur<br/>Biyoseramikler</b> | Kemik travmalarında veya hastalıklarında dolgu malzemesi ve ilaç salınım sistemleri | Fosfat oksit, kalsiyum fosfat, kalsiyum ve çinko |

##### 1.4.4.1 Hidroksiapatit (HA)

Hidroksiapatit, vücutta yer alan sert dokuların başlıca inorganik yapısını meydana getiren kalsiyum fosfat esaslı bir seramik olmakla birlikte hem biyoyumluluğu hem de biyoaktifliği nedeniyle yapay kemik ve kemik dolgu maddesi olarak farklı protezlerin yapım işleminde, kırık



kemiklerin tedavisinde, metalik biyomalzemelerin kaplanması, ortopedik uygulamalarda, fazla dayanım gücüne gerek olmayan kemik dolgu malzemesi uygulamalarında, diş implantları veya kontrollü ilaç salınım sistemleri tarzında birden farklı alanda üst derecede yaygın olarak kullanımı mevcuttur. Bütün bu kullanım özelliklerinin yanı sıra yük taşıyan implant/protez uygulamalarında özellik olarak mekanik dayanımı düşük seviyede olduğu için bir kompozit parçası olarak ya da metal implant kaplama malzemesi olarak daha yaygın kullanımlara sahiptir (Aydın ve Pasinli 2012; Bulut 2014; Ooi, Hamdi, ve Ramesh 2007; Orlovskii, Komlev, ve Barinov 2002).

HA üretiminde atomlar arası boşlukların fazla ya da az olması yüzey hareketliliğini ve çeşitli özelliklerini etkileyebilmektedir. Bu sebepten dolayı ticari olarak hem nano formda hem de partikül boyutunda çeşitli üretilmiş HA'lar mevcuttur.

#### **1.4.4.2 Titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>)**

Titanyum elementinin oksijen ile tepkimeye girmiş formuna denir. Kompozit malzeme türlerinde seramik matrisli kompozit malzemelerin büyük bir çoğunluğunda TiO<sub>2</sub> kullanılır. TiO<sub>2</sub> özellikle metal yüzeylerin kaplanması ile o malzemede bulunmayan mekanik ve yapısal özellikleri kazandırma yeteneğine sahiptir. Seramik biyomalzemelerde ZnO ile birlikte kullanımını en çok gördüğümüz kompozit birleşim malzemesi TiO<sub>2</sub>'dir (Mehmetlioğlu vd. 2016; Pérez del Pino vd. 2004; Saygın Hinczewski ve Tepehan 2009).

Titanyum dioksit kullanım alanlarının çeşitliliği ve yerleri gibi konularda, antimikrobiyal özelliği de kullanılmaktadır. Örneğin gıda ile temas ve paketlenme yüzeylerinde potansiyel bakterisit ve mantar öldürücü uygulamaları olan toksik olmayan bir antimikrobiyaldir. Buna ek olarak nanopartikül şeklinde üretilen TiO<sub>2</sub>'nin antimikrobiyal özelliği kullanılarak yapılan farklı çalışmalar mevcuttur (Ahmed vd. 2020; Desai ve Kowshik 2009).

#### **1.4.4.3 Çinko oksit (ZnO)**

Çinko elementinin oksijen ile reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Bölüm 1.4.1.3'de anlatıldığı gibi özellikle yapısında bulundurduğu antibakteriyal etkinin belirlenmesi ile beraber seramik özelliklerini kompozit malzemelerde etkin bir şekilde kullanılması birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (B vd. 2020; Jones vd. 2008; Siddiqi vd. 2011).

## 1.5 NANOTEKNOLOJİ VE NANOMALZEMELER

*“Nanoteknolojinin etkilemeyeceği bir endüstri kolunu düşünebilmek neredeyse imkânsız. David Bishop, Bell Laboratuvarları, Lucent Technologies (Bozkaya 2013).*

Nanoteknoloji gerek teknolojik bakımdan gelişimi gerekse yeni spesifik çalışma alanları oluşturması bakımından etkili bir disiplindir. Yaşadığımız dönemin eski çağlar ile bağdaştıracak olursak yeni ‘sanayi devrimi’ olarak nitelendirilebilir. Kelime bazında nano tanımı, fiziksel olarak herhangi bir büyüklüğün 1 ile 100 nanometre ölçütlerindeki davranışlarının farkına varılıp üzerinde çalışma bilimidir. Bu üzerinde çalışılan konular köklü değişikliklere ve yeniliklere öncülük etmektedir (Allholf 2009).

Nanoteknolojinin temelini nanomalzemeler oluşturmaktadır. Nanoteknolojide boyutlar küçüldükçe yani nanoboyutlarda çeşitli kuantum etkileri kendini göstermeye başladığında meydana getirilen malzemenin özelliklerinde, aynı malzemenin büyük boyutlarında gösterdiği özelliklerden farklı özellikler görülmektedir. Bu derece ufak boyutlardaki malzemelerde dayanım artışı, ısı iletmedeki çeşitli özelliklerde artma, hafif yapı ve esneklik gibi çok sayıda özellik gösterilebilmektedir.

Nanoboyutlarda metal, seramik, polimer ve kompozit olarak sınıflandırılan malzemelerin, nanomalzeme çalışmalarında etkin şekilde kullanılması yaygın olarak görülmektedir. Nanomalzemelerin özellik bakımından temel farkı, reaktiflik ve dayanım gibi malzeme türüne özgü özelliklerin artış veya azalışını etkileyen bağlı yüzey alanı ve kuantum etkisidir (Leydecker 2008; Yılmaz 2014).

Sıradan malzemeler, nano ölçeğe indirgendiğinde, genellikle olağanüstü güç, kimyasal reaktivite, elektrik iletkenliği, süperparamanyetik davranış ve aynı malzemenin mikro veya makro ölçekte bulunmayan diğer özellikleri gibi yeni ve öngörülemeyen özellikler sergiler (Benelmekki 2015).

Nanoteknolojinin gelişmesiyle çok sayıda nano yapı malzeme oluşturulmuştur. Nano-parçacık genellikle nano-biyomalzemenin merkez yapısını oluşturur. Moleküler dizayn için uygun bir yüzey olarak kullanılabilir ve inorganik ya da polimerik malzemelerden oluşabilir. Ayrıca nano-vezikül şeklinde bir membran veya bir tabaka ile çevrili de olabilir (Salata 2004).

## 1.6 ANTİMİKROBİYAL MADDE TANIMI VE MADDENİN ETKİNLİĞİNİ BELİRLEYEN FAKTÖRLER

Antimikrobiyal madde: Bakteriler, mayalar veya küfler gibi mikroorganizmaları öldüren ya da gelişmesini baskılayan/azaltan maddeleri tanımlamak için kullanılır. Dezenfektanlar, antibiyotikler ve tabii antimikrobiyal katkıları gibi birçok madde antimikrobiyal olarak tanımlanır (Temiz 2000).

Gümüş İyon, Bakır, Çinko ve Organik teknoloji temelli başlıca dört ana tür antimikrobiyal katkı bulunmaktadır. Çizelge 1.7’ de var olan antimikrobiyal katkı türleri gösterilmektedir (Biocote 2010).

**Çizelge 1.7** Antimikrobiyal katkı türleri

| Antimikrobiyal Katkı                                 | Özellikleri                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Gümüş İyon</b><br><b>Antimikrobiyal Katkıları</b> | Boyalar, polimerler, kaplamalar, tekstiller ve diğer malzeme grupları gibi çok geniş kullanım yelpazesi için uygundur.                                                                              |
| <b>Çinko</b><br><b>Antimikrobiyal Katkıları</b>      | İyi bilinen antibakteriyel ve antifungal bir bileşimdir. Çinko pritiyon daha şiddetli küf ve mantar riski beklenen malzeme ve uygulamalarda antibakteriyel koruma sağlamak amacıyla kullanılabilir. |
| <b>Bakır</b><br><b>Antimikrobiyal Katkıları</b>      | Hijyenik uygulamalar ve antimikrobiyal koruyucu amacıyla çeşitli boyalar, kaplamalar ve polimerler gibi substratlarda kullanılmaya çok elverişli                                                    |
| <b>Organik</b><br><b>Antimikrobiyal Katkıları</b>    | Fenolik biyositler, dördü amonyum bileşikleri (QAC veya QUAT) ve fungusitler (Tiabendazol) bu gruba dahildir.                                                                                       |

Birçok madde antimikrobiyaldir ancak işleyiş, uygulama ve dayanma durumları evrensel değildir. ‘Antimikrobiyal’ olan her şeyin mikroplar üzerinde bir etkisi vardır ancak antimikrobiyal terimi performans için bir ölçüt değildir (Biocote 2010).

Antimikrobiyal maddenin etkinliği çeşitli parametrelerin miktar, artış ve özellik, gibi faktörlerine bağlıdır. Bu parametrelerden birincisi antimikrobiyal madde ve uygulaması, ikincisi, ise mikroorganizmalara ait faktörler şeklindedir.

Antimikrobiyal madde ve uygulamaya ait faktörler;

- Antimikrobiyal maddenin kimyasal özelliği
- Antimikrobiyal maddenin konsantrasyonu ve etkinliği için uygulama sıcaklığı
- Kullanılan çözeltinin pH’sı

- Ortamdaki organik ve inorganik kir ve kalıntılar(Temiz 2000).

Mikroorganizmalara ait faktörler

- Mikroorganizmaların karakterizasyonu
- Mikroorganizmaların yaşı
- Ortamdaki canlı mikroorganizma sayısı
- Mikroorganizma çeşidi (mutant olma gibi) (Temiz 2000).

## **1.7 MİKROBİYAL ETKİNLİKLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN AKTİVİTE YÖNTEMLERİ**

Geliştirilen bir ürünün mikroorganizmalar üzerindeki inaktif edici etkisini test etmek amacıyla uygulanan yöntemlere “antimikrobiyal test” olarak tanımlanır. Maddelerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek amacıyla antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivite araştırmaları yapılmaktadır. Hedeflenen amaç ise; bakteri, fungus ve virüslerin üremelerini veya gelişmelerini durdurmak aynı zamanda inaktive etmek ve etkisiz hale getiren madde konsantrasyonlarını belirlemektir. (Abbasoğlu 1996). Bu yöntemlerin seçiminde ve yöntemler arası kıyas noktalarının belirlenmesinde, bölüm 1.10 da verilen bilgiler göz önünde bulundurularak dikkat edilmelidir.

### **1.7.1 Antibakteriyel Aktivite**

Antiviral ve antifungal aktivite test yöntemlerindeki gibi maddenin, üreyen mikroorganizmayı etkileyip üremesinin engellendiğinin belirlenmesi esasına dayanır (Abbasoğlu 1996). Çeşitli maddelere ve yüzeylere antibakteriyel test yöntemleri uygulanabilir. Farklı tipte gram pozitif ve gram negatif bakterilerin çeşitli test yöntemleri ile analiz edilip üreme, gelişme veya nasıl bir yayılım gösterme gibi parametrelere bakılarak yapılmaktadır.

### **1.7.2 Antifungal Aktivite**

İnfeksiyonlarda etken olarak saptanan mantarların antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek amacıyla ve maddelerin bu tarz mikroorganizmaların üremesini engellemek amacıyla yapılan aktivite analiz yöntemidir. Günümüzde yapılan bu çalışmalar ile standart yöntemlerin etkin bir şekilde biçimlendirilip daha fonksiyonel olması amacıyla önemli ilerlemeler kaydedilmektedir (Arıkan 2007). Antifungal ve antibakteriyel aktivite yöntemleri

teknik açıdan aynıdır. Sadece kullanılan besiyerleri ve inkubasyon koşulları farklılık gösterir. Günümüzde kullanımda olan; polien makrolitler, azoller, glukon sentetaz inhibitörleri, DNA ve RNA sentez inhibitörleri sınıfından 10 kadar antifungal ajan vardır (Abbasoğlu 1996).

### **1.7.3 Antiviral Aktivite**

Yöntemin temeli, virüsün ürediği ortamda üremesi ile, maddeyle karşılaştırılınca aynı ortamda üremesinde oluşan değişikliğin belirlenmesine dayanır. Antiviral maddelerin aktivitesini değerlendirmek için özel ekip ve ekipman gibi gereksinimlere ihtiyaç vardır. Virüsler yalnızca canlı hücrelerde üreyebildiklerinden bu tarz çalışmalar doku kültürleri, embriyolu yumurta ve deney hayvanlarında yürütülmektedir. Antiviral maddenin aktivitesinin ölçülmesi, virüsün hücrelere verdiği zararın önlenmesinin ölçülmesine dayanır (Abbasoğlu 1996).

## **1.8 MİKROBİYAL ETKİNLİKLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR**

Yapılan antimikrobiyal analiz yöntemlerinde yöntemin madde üzerinde test edilebilmesi için çeşitli yapılardaki mikroorganizmaların kullanılması gerekmektedir. Klinik laboratuvar çalışmalarında, uygulanacak aktivite yöntemlerine göre çeşitli bakteri türleri gibi *Candida albican* başta olmak üzere çeşitli fungus türleri de kullanılmaktadır.

### **1.8.1 Gram Pozitif Bakteriler**

#### **1.8.1.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus* familyasının genel özellikleri olan sporsuz, katalaz üretimi etkinliği bulunan, fakültatif anaerob ve üzüm salkımı şeklinde hareketsiz olan gram pozitif yapılı bakteri türüdür. Stafilokoklar basit besi yerlerinde kolaylıkla üreyebildiği gibi çok çeşitli besi yerlerinde de üreme ve gelişme gösterebilirler. Koloni çapları inkubasyon süresince ortalama 6-8 mm bandında değişen, yüzey tabakasından belli bir kısım üstte kabarık şeklinde düz ve aynı zamanda şeffaf yapıdadırlar (Tünger 2004). Dirençli karakteristik yapısından dolayı stafilokokların genellikle kendiliğinden geliştirdikleri mekanizmalarla antibiyotiklere direnç gösterdikleri belirlenmiştir (Tohidpour vd. 2010; Wang vd. 2015; Yasmin vd. 2016).

*Staphylococcus aureus* suşlarının üremelerini optimum düzeyde sağlayabilecekleri sıcaklık 35°C'dir. Tanımı genel bir bakışla ele alırsak bazı istisna suşları da dikkate alındığında, üreme

sıcaklığının bu bakteri bazında 7-48°C aralığı şeklinde olmaktadır. Gelişme gösterdikleri ideal pH skalası ise optimum düzey olan 7-7,5 olmasına rağmen 4,5-9,3 pH gibi geniş bir skalaya sahiptir (Bennet ve Monday 2003). *Staphylococcus aureus*, sporsuz bakteriler içerisinde en dayanıklı bakterilerdir. Patojen konumunda bir tür olmasından kaynaklı, plazmayı pıhtılaştırıp toksin üretme, menenjit, ciddi bir kan dolaşımı enfeksiyonu olan sepsis, deri enfeksiyonları veya organ enfeksiyonları gibi etkileri oluşturma potansiyeli bulunmaktadır (Altuner 2008; Çolak 2016).

#### **1.8.1.2 *Bacillus subtilis***

Gram pozitif yapıda olan *Bacillus subtilis* genellikle toprakta bulunmaktadır. Geçici veya tam zamanlı oksijen solunum yapabilen bu bakterilerin ortalama üreme potansiyeli dereceleri 20-30°C arasındadır. Zenginleştirilmiş bir besiyerinde belirtilen sıcaklık değerleri arasında kolaylıkla üreme gösterebilirler. Vejetatif şekilleri dayanıksız durumda iken dayanıklılık açısından üstün korumalı bir endospore oluşturan bakterilerdir. *Bacillus subtilis* çeşitli göz enfeksiyonlarına sebep olabilen aynı zamanda da yiyeceklerin pişirildiği yüksek sıcaklıklara herhangi bir bozunuma uğramadan dayanabilen bir bakteri türüdür (Altuner 2008).

#### **1.8.1.3 *Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* gram pozitif bir bakteridir. *S. epidermidis* kolonileri yuvarlak, kabarık, parlak, gri ve tam kenarlı bir şekle sahiptir. *S. epidermidis* fakültatif bir anaerobdur ancak aerobik koşullar altında iyi yetişir. Optimal üreme aralıkları 30-37 °C'dir. Koloni çapları ortalama olarak 2,5 mm uzunluğundadır. *S. epidermidis* için kültür koşulları *S. Aureus*'a benzerlik gösterir ancak *S. epidermidis* %10 NaCl ile ortam içinde yavaş bir şekilde büyüme gösterir. *S. epidermidis* esas olarak insan cildini kolonize eder. Bu tarz mikroorganizmalar dış plağında genellikle tespit edildiği gibi deri ve üst solunum yolları mukozasında da yer alır ve insan sağlığına ciddi zararları bulunan sistit, menenjit veya endokardit gibi enfeksiyonlara yol açan güçlü bir patojenik bakteri türüdür (Cheng vd. 2015).

#### **1.8.1.4 *Enterococcus faecalis***

Enterokoklar genellikle toprak, su ve doğadaki bitkilerde bulunur. Ek olarak, insanlar ve hayvanların normal gastrointestinal florasının bir parçasıdır. *Enterococcus faecalis* insanların ve hayvanların gastrointestinal sisteminden en sık izole edilen *Enterococcus* türleridir. Enterokoklar hayvanların önemli bir patojeni olmamasına rağmen, *E. faecalis* insanlarda hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık nedenlerinden biridir. Enterokok familyasının üyeleri

olan özellikle *E. Faecalis* ve *E. Faecium* fekal kontaminasyonun göstergeleri ve bakterilerin antimikrobiyal direncinin izlenmesi için kullanılır (Ünal, Aşkar, ve Yıldırım 2017). *Enterococcus faecalis* gibi bütün enterokokların çeşitli antibakteriyellere karşı direnç oluşturma mekanizmaları iki grupta değerlendirilebilir. Birincisi intrensek direnç (doğal) tarzında ifade edilir ve özellikleri tamamen türe özgü bir şekildedir. İkinci olarak kazanılmış direnç şeklinde ifade edilen, genellikle bir DNA mutasyonu veya yeni DNA segmentinin transferi durumu ile durumudur. Enterokok familyasında yeni DNA segmenti transferinden en sorumlu olan mekanizma konjugasyondur (Çiçekler Tok 2006). Genel tip özellikleri bakımından yuvarlak şekilli, hareketsiz, zincir ya da çift halde bulunan ve mikraerofilik gram pozitif bakteri türüdür. Ortalama olarak 45 °C'de %6,5 NaCl' de ve pH değeri olarak da 9 bandında üreme potansiyelleri vardır. Fırsatçı patojen olan bu tür bakteriler idrar enfeksiyonları, intraabdominal enfeksiyonlar ve endokardit tarzı enfeksiyonlara neden olarak ciddi hasarlara yol açabilmektedir (Birimoğlu 2010; Yorgancıoğlu 2012).

## **1.8.2 Gram Negatif Bakteriler**

### **1.8.2.1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli*, Enterobacteriaceae familyasına ait çubuk şeklinde gram-negatif bakteri olarak sınıflandırılır. Bakteri esas olarak insanlar da dahil olmak üzere sıcak kanlı hayvanların kalın bağırsak sisteminde yaşar ve genellikle dışkı ya da atık su atıkları ile çevreye aktarılır. *Escherichia coli* optimum büyüme koşulları altında 20 dakika içinde çoğaltarak, hızla büyüebilir. Bu durumun avantajları kullanılarak, *E. Coli* sayısız enzim ve endüstriyel ürünler üreten, konakçı bakteri olarak da birçok gen manipülasyon sistemi geliştirilmesine olanak sağlayan bakteri türüdür (Jang vd. 2017). *Escherichia coli* tipik açıdan 2.0-6.0 µm uzunluğunda ve 1.1-1.5 µm genişliğinde (basilli) bakterilerdir. *Escherichia coli* fakültatif olarak anaerobiktir ve 37-44 °C' de laktozdan asit ve gaz oluşturmaları gibi birçok karbonhidratı fermente edebilme yeteneğine sahip olduğu gözlemlenmektedir (Percival ve Williams 2014).

### **1.8.2.2 *Klebsiella pneumoniae***

Morfolojik açıdan 1-2 µm uzunluğunda ve 0.5-0.8 genişliğine sahip, hareket yeteneği bulunmayan, sporsuz ve uçları yuvarlak yapıda olan gram negatif bakteri türüdür. Üreme potansiyelleri 37°C' de nötral pH seviyesinde maksimum verimde üreme özelliği göstermektedir. Yapılarında somatik (O) ve kapsül (K) antijenleri bulunan polisakkarid yapıları kapsüllere sahiptirler. Oksijenin varlığına göre aerob ve fakültatif anaerob yapabilme özelliğine sahip patojen bir bakteridir. Bu tür bakterilerin analizlerinde Endo agar ve Kanlı agar gibi gram

negatif bakteriler için seçici besiyerleri kullanılmaktadır. En etkin patojenik olgusu pnömoni yapmasıdır. Bulunduğu floranın dışına çıkıp farklı dokulara geçtiği zaman, çeşitli organ ve idrar enfeksiyonlarına sebebiyet veren bakteri türüdür.

#### **1.8.2.3 *Pseudomonas aeruginosa***

Gram negatif bakteriden olan *Pseudomonas aeruginosa*, kapsülsüz basil ya da kokobasil şeklinde olan hareket kabiliyetini sadece polar flagellası ile yapabilen bakterilerdir. Bu tip bakterilerin izolasyonları, spesifik açıdan seçici bir besiyerine ihtiyaç duymadan kolaylıkla yapabilmektedirler. Optimum üreme sıcaklığı 37°C'de olan zorunlu aerob bakterilerdir (Yorgancıoğlu 2012). Bu tip bakterilerin üreme ortamları sulu ve nemli alanlarsa daha kolay üreyebilirler.

*P. aeruginosa* pioverdin ve piyosiyanin tarzı pigmentler meydana getirir. Çok çeşitli besiyerlerinde üreyebilir ve aynı zamanda identifikasyonunu sağlayan karakteristik durumların azlığından kaynaklı *P. aeruginosa*'nın klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında identifikasyonu göreceli olarak nispeten daha kolaydır. Yapılan deneysel çalışmalarda hastane enfeksiyonlarında, *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin *E. Coli*'nin ardından etken olan ikinci patojenik bakteri olduğu ortaya koyulmuştur (Tuncer ve Akova 1997).

#### **1.8.2.4 *Salmonella typhimurium***

*Salmonella* cinsinden köken alan *Salmonella typhimurium* gibi suşlar, şekil olarak çubuksu, fakültatif anaerobik, katalaz (+), oksidaz (-) olan gram negatif bakterilerdir. Boyutları 0,7-1,5 µm x 2-5 µm ölçütlerinde olan koloni oluşturduğunda da ortalama olarak 2-4 mm çapında koloniler oluşturan sporsuz bakterilerdir. *Salmonella* türlerinin üreyebilmesi için 7-45°C gibi geniş bir skalaya sahiptir.

Dünya çapında *salmonella*'dan kaynaklı oluşan insan enfeksiyonlarının %80 gibi büyük bir bölümünü *salmonella typhimurium*'un neden olduğu bilinmektedir (Josefsen vd. 2011; Maloray vd. 2009). *Salmonella typhimurium* ile yapılan bir antibakteriyel araştırma çalışmasında, çeşitli maddelere yüksek direnç gösteren yapısından kaynaklı karakteristik özelliğinden dolayı daha farklı bitkiler aracılığı ile yeni antibiyotikler arayan farmakolojik çalışmalara teşvik eden bir sonuç ortaya koyulmuştur (Pérez ve Anesini 1994).



### 1.8.3 Fungus

#### 1.8.3.1 *Candida albicans*

*Candida albicans* tomurcuklanma ile çoğalabilen maya tipi bir mantar türüdür. İzolasyon açısından sorunsuz bir türdür. Çok büyük bir çoğunlukla içerisinde antifungal yer almayan her türlü besiyerinde üreme gerçekleştirebilir. Kolay bir şekilde üreyebileceği besiyerlerine, mısır unlu agar, patatesli nişastalı dekstroz agar ve sabourad's agar örnek verilebilir. Optimum sıcaklık olarak 37°C' de 1-4 inkübasyon sürecinde standart tipte koloniler oluşturur. Koloni morfolojisi ise grimsi bir renk, nemli bir görünüş ve yumuşak bir yapıdadır. Ayrıca peynirimsi bir kokusu mevcuttur. *Candida albicans* konakçıya zarar vermeden insanlarda komensal olarak bir arada bulunur. Cilt, genital sistem ve gastrointestinal sistem gibi birçok vücut bölümünde kolonileştirir. Yine de fırsatçı patojen, konağın veya mikrobiyotanın bağışıklık durumu bozulduğunda, geniş mukozal kolonizasyona ve lokal veya sistemik hastalığa yol açabilmektedir (Costa-de-Oliveira ve Rodrigues 2020). *Candida* türlerinin sebep olduğu enfeksiyonlara kandidiyaz veya monilyaz denilir. İmmün yetersizliğinin bulunduğu durumlarda bu patojenik türün insanlarda deri, mukoza ya da iç organlarda enfeksiyonlara yol açabildiği bilinmektedir (Aydın 2004).

## 1.9 ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE YÖNTEMLERİNİN SEÇİLMESİ VE UYGULANMASINDAKİ BELİRLEYİCİ FAKTÖRLER

Günümüzde birçok araştırmacı potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak bitki ve mikrobiyal ekstraktlar, uçucu yağlar, saf ikincil metabolitler ve yeni sentezlenmiş moleküllerin araştırılmasına odaklanmıştır. Son yıllarda, biyomalzemelerin mikrobiyal etkinliğinin araştırılması ve geliştirilmesi konusunda artan bir ilgi vardır. Biyomalzemelerin mikrobiyal etkinliği, sıklıkla değerlendirilen bir parametre durumuna evrilmiştir.

Mikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesinde kullanılan çeşitli antimikrobiyal etkinlik testleri mevcuttur. Son yıllarda, mikrobiyal dirençle savaşmak ve maddelerin antimikrobiyal dirençliliğini saptamak için araştırma ve geliştirilme yöntemlerine ilgi artmaktadır. Bu nedenle, antimikrobiyal aktivite tarama ve değerlendirme yöntemlerine daha fazla dikkat edilmelidir. Bu kapsamda, tüm antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri geçmiş zamanlı ve halen yürütülen çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve geliştirilmeye devam etmektedir. Bazı

teknikler, CLSI ve EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi) tarafından standardizasyona tabi tutulmuştur. Bununla birlikte, maddeleri test ederken, standartlaştırılmış protokollerin bazı modifikasyonları sıklıkla talep edilir. Ayrıca, test edilen mikroorganizmanın büyümesini etkileyebilecek çözücülerin kullanımını düşünürsek, standartlaştırılmış protokollere küçük metodolojik uyarlamalar yapmanın, doğru deneysel yaklaşım sağlamak ve diğer araştırmacıların sonuçları karşılaştırmasına olanak sağlamak için iyi bir çözüm olabileceğini söylenebilmektedir. (Balouiri, Sadiki, ve Ibensouda 2016).

Yapılan araştırma veya geliştirme çalışmalarında istenilen sonuç özelinde, maddelerin ve malzemelerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek amacıyla çeşitli in vitro yöntemlere başvurulmaktadır. Bu yöntemlerle, test edilen maddenin antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığı, eğer bir aktiviteye sahip ise, Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve mikroorganizma spektrumu belirlenir. Deneysel çalışmalarda en stabil ve beklenen sonuca ulaşmak için in vitro antimikrobiyal aktivite test yöntemlerinden deneyin amacına en uygununu seçmek, yapılan çalışma kapsamında en elzem durumların başında yer alır. Yöntemin seçiminde; maddenin/maddelerin sayısı, miktarı, çözünürlüğü ve başka bir açıdan bakılacak olunursa, kullanılacak mikroorganizmanın cinsi, özelliği ve yoğunluğunun da göz önünde bulundurulması gereken hususlardandır. Sonuçların güvenilir ve tekrarlanabilir olmasına ek olarak en az emek uygulanarak, en kısa sürede tamamlanabilen ve ekonomik açıdan en mütevazı olan yöntem tercih edilmelidir (Abbasoğlu 1996).

Antimikrobiyal test yöntemlerinin seçilmesinde etkili faktörler olduğu gibi, birbirleri ile arasındaki avantaj ve farklılıklar dikkatlice incelenmelidir. Disk difüzyon, kuyu difüzyonu ve sıvı veya agar seyreltme gibi çeşitli biyoanalizler iyi bilinmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak akış sitoflorometrik ve biyoluminesan yöntemler diğer yaygın kullanılan metotlar gibi sıklıkla kullanılmamaktadır. (Balouiri vd. 2016).

Antimikrobiyal duyarlılık testi için birçok onaylanmış kılavuz mevcuttur. En tanınmış standartlar, CLSI ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından sağlanmaktadır. Önerildiği gibi, bu kılavuzlar, çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmesi pratik olan tek tip bir test prosedürü sağlar iken bu tür metodolojik standartların geliştirilmesi, bu tür testlerin klinik bakımdan uygunluğunu garanti altına almaz. Bununla birlikte, sonuçların klinik boyutunu değerlendirmek için biyoassay'in standart bir yaklaşımla gerçekleştirilmesine olanak sağlar (Balouiri vd. 2016).

Günümüzde birçok araştırmacı potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak bitki ve mikrobiyal ekstraktlar, uçucu yağlar, saf ikincil metabolitler ve yeni sentezlenmiş moleküllerin araştırılmasına odaklanmıştır. Tüm bu çalışmalar ek olarak, biyomalzemelerin de mikrobiyal etkinliği sıklıkla literatüre kazandırılmış bilgiler arasına girmiştir. Bununla birlikte, ürün ve malzemelerin mikrobiyal etkisi hakkındaki yayınlanmış makaleleri incelediğimizde, standartlaştırılmamış farklı yaklaşımlar (suş hazırlama teknikleri, ekim boyutu, büyüme ortamı) nedeniyle sonuçlar arasındaki karşılaştırma genellikle zordur.

Özellikle biyomalzemelerin mikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi konusu multidisipliner çalışmalar kapsamında olmasından dolayı, zaman zaman isabetli olmayan yöntemler seçilmekte ya da sonuçların analiz edilmesinde farklı yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. Bir biyomalzemenin antimikrobiyal etkisinin taranması ve / veya nicelleştirilmesi için mevcut yöntemlerin daha iyi anlaşılmasının önemi oldukça etken bir faktördür.

## **BÖLÜM 2**

### **DENEYSEL ÇALIŞMALAR**

#### **2.1 MATERYAL**

##### **2.1.1 Biyomalzemeler**

Biyomalzemeler statüsünde deneysel çalışmalarda Metalik ve metal alaşım, polimerik, seramik ve kompozit biyomalzemeler olmak üzere 4 farklı biyomalzeme türünden çeşitli biyomalzemeler kullanılmıştır. Çalışmada yer alan biyomalzeme grupları ve bu gruplar içerisindeki malzeme türleri:

- **Metal - Metal Alaşım Biyomalzemeler:** Ti-6A-14V, Zn, FeMn, FeMnZn
- **Polimer - Ko-Polimer Biyomalzemeler:** PHB, PLA, PHB-PLA, PCL, PBHV, PMMA
- **Kompozit Biyomalzemeler:** TiZnO
- **Seramik Biyomalzemeler:** TiO, ZnO ve HA şeklindedir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan Ti-6A-14V, Zn, FeMn, FeMnZn biyomalzemeleri, metal alaşımlı ve kompozit ve seramik malzemeler Bülent Ecevit Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalürji ve Malzeme Mühendisliği bölümü Doçent Doktor Barış AVAR, PHB polimeri Bülent Ecevit Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Profesör Doktor Baki HAZER, TiZnO kompozit biyomalzemeler Bülent Ecevit Üniversitesi Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Araştırma Görevlisi İlker Emin DAĞ, HA'lar Bülent Ecevit Üniversitesi Makine Bölümü üyesi Araştırma Görevlisi Hamidullah YAŞAR tarafından temin edilmiştir.

##### **2.1.2 Mikroorganizmalar**

Deneysel yöntemlerin tamamında, bölüm 1.9'da yer alan tüm test mikroorganizmaları çalışılmıştır. Sırası ile hem bakteri hem de bir maya türü olan fungus test mikroorganizması olarak kullanılmıştır. Bu amaç, test edilen antimikrobiyal özelliğin hem tür içi hem de mikroorganizma bazında karşılaştırılabilir olmasından kaynaklanmaktadır.

Gram pozitif özellikli; RSKK 02.001 *Staphylococcus aureus*, RSKK 96086 *Bacillus subtilis*, RSKK 08.021 *Staphylococcus epidermidis* ve laboratuvarımızda bulunan insan patojeni *Enterococcus faecalis* kullanılırken gram negatif özellikli; ATCC 25922 *Escherichia coli*, RSKK 703 *Klebsiella pneumoniae*, RSKK 26I *Pseudomonas aeruginosa*, RSKK 1107 *Salmonella typhirium* ve fungus türü olan RSKK 35 *Candida albicans*. Belirtilen RSSK suşları T.C. Halk Sağlığı Laboratuvarı kapsamında Referans Mikrobiyoloji Laboratuvarı / Refik Saydam Kültür Koleksiyonundan ticari olarak temin edilmiştir.

### **2.1.3 Mikroorganizmaların Canlandırılmasında Kullanılan Kimyasallar ve Sarflar**

Antimikrobiyal aktivite test yöntemlerinin tamamında kullanılan test mikroorganizmalarının deneysel metodolojisi için canlandırılma aşamasında;

Kullanılan kimyasallar: TSB (Condalab marka Tryptic Soy Broth): Bileşimi, peptone from casein 17,0 g/L; Peptone from soymeal 3,0 g/L; D(+) Glucose 2,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/L şeklindedir. TSA (Condalab marka Tryptic Soy Agar): Bileşimi, Peptone from casein 15,0 g/L; Peptone from soymeal 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Agar-agar 15,0 g/L şeklindedir.

Kullanılan sarf malzemeler: Cam tüpler, bek alevi, selolojik pipet (10 ml'lik), elektronik pipet (2-20 ve 100-1000 mikro litrelik), petri kapları (6 ve 10 cm'lik), sapatül, dragaski spatülü, thoma lamı, lamel kullanılmaktadır.

## **2.2 METOD**

### **2.2.1 Test Mikroorganizmalarının Canlandırılması ve Yoğunluk Optimizasyonu**

Mikroorganizmaların canlandırılmasında ilk aşama olarak mikroorganizmanın canlanıp üreyeceği ortam olan sıvı besiyerinin hazırlanmasıdır. Bu aşama, dehidre besiyerinden (TSB), 30,0 g/L olacak şekilde 1000 ml damıtık su içinde çözdürülmesi amacı ile ısıya tabi tutularak eritilip, amaca uygun kaplara (kapaklı cam şişelere) dağıtılır. Aynı işlem katı dehidre besiyeri için (TSA) 40,0 g/l olacak şekilde yapılır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyerleri berrak sarımsı renkte olup, 25 °C'de pH'sı 7,3±0,2'dir. Hazırlanılan besi yerinden otoklav sonrasında oda sıcaklığında soğutularak ve el yakmayacak seviyeye gelene kadar beklenir. TSB, (40-50°C') canlandırılacak mikroorganizma sayısı kadar cam tüp içerisine serolojik cam pipetler kullanarak steril şekilde 4,5 ml aktarılır ve kapakları ateşten geçirilerek kapatılır. TSA ise standart boyutlardaki (10cm'lik) petri kaplarının tabanını 2-3 ml kaplayacak

şekilde dökme işlemi gerçekleştirilir. İşlem sonrasında petri kapları kendi yörüngelerinde ufak bir hareket ile besiyerini tabana homojen yaymak için hareket ettirilir ve sonrasında katılaşması için kenara bırakılır. İkinci aşama olarak ise liyofilize ya da daha önceden çalışılmış ve santrifüjlenip +4°C’de saklanan mikroorganizma suşları aseptik koşullar altında içerlerinde sıvı besiyeri olan tüplere spatül veya mikropipet kullanarak aktarılır. Aktarma işleminin ardından canlandırma sürecinin son aşaması olarak, tüpler kapakları sıkı bir şekilde kapatılmadan sadece gevşek bırakılarak (mikroorganizmaların oksijenli solunum yapmasından kaynaklı tüp içerisine oksijen girişi sağlamak için) etüv cihazına inkübasyona bırakılır. (Çizelge 2.1) 18-24 saat sonunda canlandırılan test mikroorganizmalarının ürettiği gözlemsel olarak yapılır. Ardından TSB içerisinde yer alan ve üreyen test mikroorganizmalarımızı stok ve bir sonraki deneysel çalışmada kullanmak amaçlı katı besiyerine ekim işlemi uygulanır. Bu ekim işleminde üretilen test mikroorganizmalarının bulunduğu tüplere steril bir öze daldırılır ve bu özenin ucundaki mikroorganizmalar TSA’lı petri kapları içerisine aseptik koşullar çerçevesinde teke düşürme yöntemi ile ekim yapılır. Bu ekimin temel prensibi öze ile petriyi sırası ile her çizgi ekimden sonra 45 derece çevirerek ve her çevirme sırasında bir önceki ekim alanından bir çizgi çekerek daha seyrek ekim yapma işlemine dayanır. Bu işlemin sonrasında petri kapları +4°C’de buzdolabında bir sonraki deneysel çalışmaya kadar muhafaza edilir. Çizelge 2.1’de ise deneysel metotlar hakkında, CLSI tarafından önerilen şekilde, antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri için kültür ortamı, mikrobiyal inokulum boyutu ve inkübasyon koşulları gösterilmektedir (Balouiri vd. 2016).

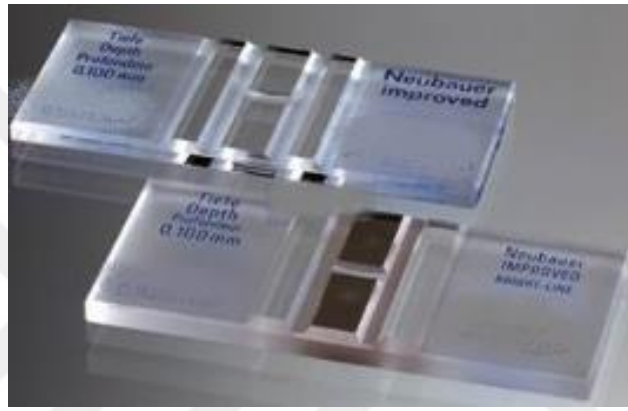
**Çizelge 2.1** CLSI tarafından önerilen antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri

|                           | Mikroorganizma          | İnokülüm Yoğunluğu CFU/mL | İnkübasyon Sıcaklığı °C | İnkübasyon Süresi |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| <i>Agar Disk Difüzyon</i> | <i>Bakteri</i>          | $(1-2) \times 10^8$       | $35 \pm 2$              | 16-18             |
|                           | <i>Fungus</i>           | $(1-5) \times 10^6$       | $35 \pm 2$              | 20-24             |
| <i>MİC</i>                | <i>Bakteri</i>          | $1 \times 10^5$           | $35 \pm 2$              | 20                |
|                           | <i>Fungus</i>           | $(0.5-2.5) \times 10^3$   | 35                      | 46-50             |
| <i>E Test</i>             | <i>Bakteri / Fungus</i> | $(1-2) \times 10^8$       | $35 \pm 2$              | 16-18             |
| <i>Time-Kill</i>          | <i>Bakteri / Fungus</i> | $1 \times 10^5$           | $35 \pm 2$              | 0-3-6-18-24       |
| <i>Plak Sayma</i>         | <i>Bakteri / Fungus</i> | $(1-5) \times 10^6$       | $35 \pm 2$              | 16-24             |

Canlandırma işleminin ardından inkübasyon sonucunda mikroorganizmaların kullanılacağı deneye özgü bir yoğunluk optimizasyonu yapılması gerekmektedir. Deneysel metotların hepsinde test edilecek mikroorganizmaların yoğunluğunun (sayısının) her bir biyomalzeme ve

her bir yöntem arasında standart bir şekilde olması, çalışma sonuçlarının ne kadar stabil ve düzenli olduğu ile doğrudan bağlantılıdır ve bu açısından mikroorganizma optimizasyonu oldukça önem arz etmektedir.

Test mikroorganizmalarının yoğunluk optimizasyonu ya da bir diğer değişle mikroorganizmanın ml'deki sayısıdır. Yapılacak olunan her bir antimikrobiyal aktivite deneyi öncesinde mikroorganizma standart olarak sıvı besi yeri içerisinde çoğaltılır. Deney zamanında ise deneylerde kullanılacak mikroorganizma sayısı bilinmelidir. Thoma lamının prensibi ise mikroskop altında  $0,1\text{mm}^3$  hacimde sayım yapılarak hesaplama yardımıyla numunenin bir ml'sinde bulunan maya sayısını belirlemektir.



**Şekil 2.1** Thoma Lamı

Sayım için Thoma lamı üzerinde bulunan bölgelerinden yararlanılır. Sayım bölgesinin toplam alanı  $1\text{ mm}^2$ 'dir. Lamel yapıştırıldığında sayım bölgesinin yüksekliği de  $0,1\text{ mm}$ 'dir. Sayım işlemini kolaylaştırmak amacıyla her bir sayım bölgesi de kendi içerisinde karelere bölünmüştür. 16 büyük kare ve her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplamda 400 kare bulunur. Bu kısmın hacmi  $0.1\text{ mm}^3$  'tür. Sayım işlemine geçilmeden önce ışık mikroskobu ve örneği thoma lamına yerleştirdikten sonra üstüne kapatılacak lamel hazırlanılır. Eğer kullanılacak ise mikroorganizmaların daha net görülebilmesi için metilen mavisini de kullanıma hazırlanmalıdır. Hazırlık aşamasında en son 18-24 saat aralığında inkübe edip çoğalttığımız mikroorganizma tüpleri alınır.

#### Thoma lamı ile sayım işlemi:

1. Steril bir tüp içerisine  $10\mu\text{l}$  çoğaltılan mikroorganizmadan alınır.
2. Ardından eğer kullanılacak ise metilen mavisinden de  $10\mu\text{l}$  alınarak mikroorganizma ile karışmaların için 3 defa pipetaj yapılır. Bu durumda ölü hücreler metilen mavisini ile boyanır, canlı hücreler boyanmaz. Yalnızca boyanmamış hücreler sayılarak canlı sayımı

gerçekleştirilebilir. Bu işlem bakteri veya fungusların daha net görülebilmesi ve kümeleşmenin engellenmesi içinde yapılır.

3. Daha sonrasında bu karışım içerisinden 10µl alınarak thoma lamı üzerindeki kuyucuya koyulur ve üzeri lamel ile kapatılır. Lamel dikkatlice ve 45°'lik bir açı ile kapatılmalıdır. Burada sıvının lamel üzerine taşmayacak miktarda olmasına dikkat edilmelidir
4. Lamelin üzerine yavaşça bastırılarak incelenecek örneğin lamdaki sayım hacmine homojen dağılımı sağlanır.
5. Preparat mikroskop tablasına yerleştirilerek sayıma geçilir. İlk olarak 10x veya 20x objektif ile genel görüş sahası tespit edilir. Daha sonra 40x objektif ile küçük karelerdeki hücreler sayılır.
6. Genel olarak çapraz 8 büyük karede sayımlar gerçekleştirilir ve ortalaması alınır. Bulunan değer 2 ile çarpılarak bütün büyük karelerdeki maya sayısı bulunur. Daha sonra formül ile toplam maya sayısı/ml değeri hesaplanır.

Sayım yapılırken şu hususlara dikkat edilir:

1. Sayıma alınan küçük karelerin üst ve sağ taraflarındaki kare çizgilerine teğet olan veya çizgiler ile temas eden hücreler sayıma alınır.
2. Küçük karelerin alt ve sol taraflarındaki kare çizgilerine teğet olan veya çizgiler ile temas eden hücreler sayıma alınmaz.

Bu sayım işlemi ve dikkat edilmesi gereken noktalar ışığında sayım şu formülasyon ile yapılır:

Total hücre sayısı = 16 Büyük karedeki hücre sayısı x 10,000 x Dilüsyon faktörü

- A: 16 karede sayılan mikroorganizma sayısı
- SF: Seyreltme Faktörü
- 10000 ise mm<sup>3</sup>' ün mL'ye çevrilmesinde kullanılan sabit sayıdır.

Bu formülasyon ile beraber 1 ml'deki bakteri/fungus sayısını hesaplayarak ve deneysel metotta istenilen miktar kadar bakteri/fungus çoğaltıp (10<sup>8</sup> /10<sup>7</sup> / 10<sup>6</sup> vb.) literatür ışığında ayarlanıp standart şekilde eklenmesini sağlamaktayız.

Thoma lamı kullanarak mikroorganizma yoğunluğunun optimizasyon işlemi her deneyde her bakteri/fungus için aynı sayıya sahip mikroorganizma örneği alarak bir standart oluşturmak esas amaçtır. Bu amaç doğrultusunda deneyler arası stabilizinin sağlanmış ve sonuçların herhangi bir mikroorganizma yoğunluğu etkisinde kalmadan yorumlanabilmesi mümkün olmuştur.



### 2.2.2 Sterilizasyon

Gerçekleştirilen tüm antimikrobiyal aktivite çalışmalarında, yapılan deneysel yöntemin hangisi olduğu fark etmeksizin standart olarak uygulanması gereken sterilizasyon işlemleri bulunmaktadır. Bu önemli etkenin, her bir deney öncesinde optimize işlemleri sırası ile yapılmalıdır.

Mikrobiyolojik ve sonuçların hassas yorumlandığı çalışmalar yapıldığında deneysel metotların en başında kullanılacak sarf malzemelerin (metal-cam) sterilizasyon işlemi planlanıp yapılmalıdır. En bilindik ve güvenilirliği en yüksek olan sterilizasyon yöntemi otoklav cihazı kullanılarak yüksek basınçta 121°C steril etmektir. Deneysel çalışmalarda kullanılan sarf malzemelerin ve test edilen biyomalzemelerin sterilizasyonu, test malzemelerinin yapısı ve durumu gereği sadece otoklav ile sağlanamamaktadır. Cam ve metal malzemelerin dışında çalışmamızda yer alan diğer (2.1.1 bölümünde anlatılan) biyomalzemelerin sterilizasyonu, UV ışınli laminer kabinde her bir yüzeyini 15'er dakika UV ışığa maruz bırakılarak sterilizasyonu sağlanmaktadır.

### 2.2.3 Antibiyotik Diskler

Agarlı petriler üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite analiz yöntemlerinde bilhassa zon çapı gözlemlenen deneysel metotlarda, test mikroorganizmalarının kontrollü kullanımı ve etkinliklerinin kontrol edilmesi amacı ile çeşitli antibiyotikli ticari diskler kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalarımızda kullanılmak üzere laboratuvarımızda yer alan Bioanalayse marka tetrasiklin, streptomisin, penisilin ve ampisilin+sulbaktam olmak üzere 4 çeşit antimikrobiyal ajan mevcuttur.

- Tetrasiklin: *Salmonella typhirium* ve *Staphylococcus epidermidis* (Duran, Çeken, ve Kula Atik 2021; Yener vd. 2012)
- Streptomisin: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* (Duran, Çeken, ve Kula Atik 2020; Sevim vd. 2006; Varışlı vd. 2017)
- Penisilin: *Enterococcus faecalis* ve *Klebsiella pneumoniae* (Gök vd. 2020; Kahraman vd. 2017)
- Ampisilin+sulbaktam: *Staphylococcus aureus* (Duran vd. 2021)
- Uniderm Farmaceutici- Candinet: *Candida albicans* (filtre kâğıtlarına emdirilerek)

+4 C° muhafaza edilen antibiyotikli diskler agar disk difüzyon metodunda petri kaplarına yerleştirilir. Test mikroorganizmalarının antimikrobiyal özelliklerinin test ettiğimiz

biyomalzemelerin, herhangi bir antimikrobiyal etki vermesi durumunda, antibiyotikli disk etrafında oluşması beklenen zon çapı ile kıyaslanarak antimikrobiyal etkisinin değerlendirilmesi ve yorumlanması yapılır.

#### 2.2.4 Antimikrobiyal Aktivite Yöntemlerinde Pozitif ve Negatif Kontrol Seçimleri

Deneysel çalışmalarımızın tamamında test edilen biyomalzemelerin yanı sıra deneyin optimize edilmesi, sonuçların yorumlanması esnasında kolaylık ve en önemlisi her deney özgü deneysel sonuçlarda boşluk yaratmayacak bir pozitif veya bir de negatif kontrol grubuna deneye özgü olarak ise bu iki kontrol grubuna birden yer verilmelidir.

Yatay bir skala düşünecek olursak, bu skalanın tam ortasında deney sonucumuz yani test edilen malzememizin verdiği sonuç bulunmaktadır. Bu skalanın sağ ve sol taraflarında bu sonucu daha da sağlamlaştıracak ve sonucu etkileyecek başka unsurlardan uzak tutacak negatif ve pozitif kontrol sonuçları yer almaktadır. Kontrol grupları ne kadar doğru seçilirse ve uygulanırsa deney sonuçları dış etkilerden o kadar uzak tutularak yorumlanabilir.

Çizelge 2.2’de deneysel metodolojimizde yer alan tüm yöntemlere özgü spesifik olarak seçilen pozitif ve negatif kontrol grupları yer almaktadır.

**Çizelge 2.2** Antimikrobiyal aktivite yöntemlerindeki pozitif ve negatif kontrol grupları

| Yöntemler          | Pozitif Kontrol                                            | Negatif Kontrol                             |
|--------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Agar Disk Difüzyon | Antibiyotikli Diskler                                      | Boş Filtre Kâğıt Diskleri                   |
| E Test             | Antibiyotikli Diskler                                      | Boş Filtre Kâğıt Diskleri                   |
| MİC ve Time-Kill   | Besiyeri İçerisine Mikroorganizma<br>+Biyomalzeme çözücüsü | Besiyeri İçerisine Sadece<br>Mikroorganizma |
| Plak Sayma         | Antibiyotikli Kültür                                       | Besiyeri İçerisine Sadece<br>Mikroorganizma |

#### 2.2.5 Antimikrobiyal Aktivite Yöntemleri

Bir ekstraktın, saf bir bileşiğin ve bu tez çalışmasının çıkış noktası olan biyomalzemelerin in vitro antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek veya taramak için çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılabilir. En bilinen ve temel yöntemler disk difüzyon ve broth seyreltme yöntemleridir. Bir biyolojik ajanın antimikrobiyal etkisini derinlemesine incelemek için, zamana bağlı veya konsantrasyona bağlı bilgi sağlayan time-kill testi, E test ve ATP biyoluminans yöntemleri tercih edilen başlıca yöntemler arasındadır. Biyofilm değerlendirmeleri içinde taramalı elektron mikroskopisi (SEM) kullanılmaktadır (Balouiri vd. 2016).

### 2.2.5.1 Agar Disk Difüzyon Yöntemi

Agar disk difüzyon metodunda, metal-metal alaşımlar, polimerler, kompozitler ve seramik biyomalzemeler bölüm 2.1.2’de yer alan test mikroorganizmaları ile teste tabi tutulmuştur (Tablo 2.2). Deney öncesinde bakteri suşları 37°C de 4,5 ml TSB besiyerinde  $10^8$  CFU/ml konsantrasyona ulaşıncaya kadar 24 saat inkübe edilmiştir. Aynı şartlar altında *Candida albicans* ise  $10^6$  CFU/mL konsantrasyona kadar 24 saat inkübe edilmiştir. Mikroorganizma yoğunluk tayini bölüm 2.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.1).

Agar disk difüzyon yönteminde yer alan biyomalzeme gruplarından seramik biyomalzeme grubundaki üç tip malzeme toz formda oldukları için HA’ler Bülent Ecevit Üniversitesi Metalürji ve Malzeme Mühendisliği bölümünde 1cm çaplı özel pres kalıplarında yüksek basınç temelli presleme cihazında preslenerek 1 cm çapında diskler olarak deneysel çalışmalara hazır hale getirilmiştir. Bu presleme işlemi, yapılan literatür taraması ve bilinen teorik bilgiler ışığında seramik malzemelerin herhangi bir çözücü içerisinde tam olarak homojen çözünmemesinden dolayı ve toz formda teste tabi olamayacakları için ihtiyaç duyulmuştur.

#### Metal-Metal Alaşımlar - Kompozitler - Seramikler

Öncelikle tüm malzemeler UV ışık altında her bir yüzü 15’er dakika olacak şekilde 30 dakika boyumca steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra TSA’lı agarlar üzerine, belirli standartlara getirilmiş mikroorganizma inokülumlarından standart değere oranlayarak ( $10^8$  CFU/ml=20µl) belirlenen miktarların ekim işlemleri yapılmıştır. Ekim işleminden 15 dakika geçmeden numuneler birbirlerinden ve petri kabı kenarlarından 1,5 cm uzak olacak şekilde yerleştirilmiştir. Petri kaplarının ortasına ise ekimi yapılmış mikroorganizma suşuna uygun, antibiyotikli disklerden konulmuştur.

Ardından aşılınmış ve numuneleri yerleştirilmiş petri kapları uygun koşullar altında 37 C de bir gece etüve kaldırılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda antimikrobiyal aktivite özelliğe sahip olan biyomalzemelerin etrafında oluşan zon çapları kumpas veya cetvel yardımı ile ölçülüp gerekli sonuçlar hem grup içi hem de biyomalzeme grupları arasında mm cinsinden karşılaştırılarak analiz gerçekleştirilir.

#### Polimerler - Kopolimerler

Polimer ve kopolimerlerin agar disk difüzyon deneyinde diğer biyomalzemelerden ayıran bir bölüm vardır. Bu bölüm polimerler ve kopolimerlerin deney için hazırlanması aşamasıdır. Bahsedilen bu aşamada ilk olarak tüm polimer ve kopolimerler 25 mikrogram hassas terazide

tartılır. Ardından tüm polimer ve kopolimerler 1:1 oranına tabi olarak 250µl kloroform içerisinde çözündürülür. Çözünme işlemi tamamlanana kadar tüp içerisinde pipetaj işlemine devam edilir. Çözündürülen numuneler daha önceden filtre kağıtlarından hazırlanmış ve her bir yüzeyi 15'er dakika steril edilmiş disklerle sırası ile 5'er mikro litre konulur. Bu işlem 4 defa disklerin sıvıyı emmesini takiben devam ettirilir. Totalde her bir polimer ve kopolimer diski 20µl sıvı emmiştir. Hazırlanılan bu diskler tekrardan kontaminasyon durumuna karşın her bir yüzü 15'er dakika olacak şekilde UV ışık altında steril edilir. Diskler TSA'lı petri kaplarına diğer numuneler gibi yerleştirilir ve geri kalan süreç aynı şekilde yürütülür.

### **2.2.5.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Tespiti**

Minimum inhibisyon konsantrasyonu test edilen mikroorganizma karşısında maddenin/malzemenin hangi konsantrasyon grubunda test mikroorganizmasına karşı üstün bir inhibe edici etkisinin olduğunun (üremenin %70-80 engellenmesi) araştırılması esasına dayanır. Bu konsantrasyonun hesaplanması aşamasında kullanılan madde/malzeme konsantrasyon miktarı değişikliğe uğratarak farklı konsantrasyonlarda test edilir. Bu süreç içerisinde test yöntemi içerisindeki geri kalan tüm değişkenler sabit tutularak madde/malzeme konsantrasyonunun tespiti gerçekleştirilir. Bu tespitin gerçekleştirilmesi temelinde iki yöntem kullanılmıştır. E test metodu ve Spektrofotometrik ölçüm metodu yer almaktadır. Bu yöntemlerin kantitatif yöntem gruplarında yer almasından dolayı MIC için etkin ve net bir sonuç vermektedir.

#### **2.2.5.2.1 E Test**

Çalışmamızdaki E-test yöntemi ile malzemenin çözünebilme durumuna göre sadece polimerler-kopolimerler ile çalışma kısmında gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.2). Çalışma öncesinde kullanılan tüm test mikroorganizma suşları  $10^8$  CFU/mL olacak şekilde 24 saat inkübasyon sonucunda bölüm 2.2.1'de anlatıldığı üzere mikroorganizma yoğunluk tayini gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.1). Test prosedüründe her bir polimer için sırası ile 50 mg, 25 mg, 12,5 mg ve 6 mg olacak şekilde 4 miktar tartılır. Her bir tüpe 250 µl kloroform konularak çözündürülür. Ardından çözündürülen bu polimer sıvıları daha önceden hazırlanmış ve UV ışınla 30 dakika steril edilmiş 1cm'lik filtre kağıtlarına 5 ul emdirilir. Bu işlem 4 defa disklerin sıvıyı emmesini takiben devam ettirilir. Totalde her bir polimer ve kopolimer diski 20µl sıvı emmiş ve sağlamıştır. Bu diskler tekrardan kontaminasyon durumuna karşın her bir yüzü 15'er dakika olacak şekilde UV ışık altında steril edilir. TSA'lı ağarlar üzerine, belirli standartlara getirilmiş mikroorganizma inokülasyonlarından standart değere oranlayarak ( $10^8$  CFU/ml=20µl) belirlenen

miktarların ekim işlemleri yapılmıştır. Diskler çalışmada yer alan mikroorganizmalardan aşılınmış olduğu TSA'lı petri kaplarına yerleştirilir.

Petri kapları 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra disklerin etraflarında herhangi bir zon çapı oluşmuş mu diye kontrol edilir. Çap oluşmuş ise kumpas veya cetvel yardımı ile ölçüm mm cinsinden kaydedilir. Çalışmamızdaki E Test yöntemi yukarıda anlatıldığı formda gerçekleştirilmesi ile birlikte E Test metodunun dikkate değer bir farklılığının ve işleme mekanizmasının olduğu göz ardı edilmemelidir. Şekil 2.2'te yer alan görselde standart bir E Test metodu görüntüsü yer almaktadır. Petri kabının orta kısmına, üzerine test edilen maddenin çeşitli konsantrasyonlarının emdirildiği bir çeşit test şeridi yerleştirilir. Bu test şeridinin deneysel araştırma kapsamında uygun inkübasyon sonrasında test edilen madde konsantrasyonlarından hangisinin mikroorganizmanın üremesini durdurucu etki verdiğini yani agarlı ortamda minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesine olanak sağlar. Genellikle antibiyotik analiz çalışmalarında yer alan bu metot bizim antimikrobiyal aktivite çalışmalarımızda test metoduna ve biyomalzeme türüne özgü değişikliklerle beraber yöntemi tek test şeridinden ziyade filtre kağıt disklerine test edilecek biyomalzemenin farklı konsantrasyonlarının aynı miktarda emdirilmesi ve bu disklerin agar ortamına birbirlerinden uzak konumlarda yerleştirilmesi esasına dayanmaktadır.



**Şekil 2.2 E Test Metodu**

#### **2.2.5.2.2 Seri Dilüsyon Yöntemi (Makro Dilüsyon)**

Çalışmamızda yer alan malzeme gruplarından sadece polimer ve ko-polimer olan malzemeler, çözünübilirlik durumlarından dolayı spektrofotometrik yöntemler için elverişli konumdadırlar.

Spektrofotometrik ölçümlerin yapılmasında ve karşılaştırılmalı analizlerde başlıca temel ilerleme yolu seri dilüsyon metodudur. Seri dilüsyon metodu maddenin/malzemenin analiz edileceği konsantrasyonların belirlenmesinden sonra 24. saat inkübasyon sonucunda kontrol

grupları ile hem gözlemsel olarak incelenmesi hem de spektrofotometre ile ölçüm alınarak karşılaştırılmasıdır.

Çalışmada yer alan seri dilüsyon metodu sadece malzeme durumunun çözülme yeteneğine göre polimerler-kopolimerler ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.2). Çalışma öncesinde kullanılacak olunan tüm bakteri suşları  $5 \times 10^5$  CFU/mL olacak şekilde, *Candida albicans* ise  $2 \times 10^3$  CFU/mL konsantrasyona kadar inkübasyona bırakılır ve 24 saat inkübasyon sonucunda bölüm 2.2.1’de anlatıldığı üzere mikroorganizma yoğunluk tayini gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.1). Test prosedüründe her bir polimer için sırası ile 50 mg, 25 mg, 12,5 mg ve 6 mg olacak şekilde 4 miktar tartılır. Her bir tüpe 250 µl kloroform konularak çözündürülür. Daha sonrasında her bir test mikroorganizması için 4 tüp belirlenir. Tüpler içerisine 9,90 ml TSB konulur ve üzerlerine 100 µl bakteri/fungus eklenir. En son aşamada ise tüplere sırası ile çözödürölen polimer-kopolimerlerden 25 µl tüplere eklenir. But tüpler dışında her bir test mikroorganizması için bir negatif kontrol, pozitif kontrol ve kontaminasyon kontrolü ayarlanır. Negatif kontrol numunesinde 9,90 ml TSB, 100 µl bakteri ve 25 µl kloroform yer alırken Pozitif kontrolde ise 9,90 ml TSB ve 100 µl bakteri yer almaktadır. Kontrol tüpünde ise sadece 9,90 ml TSB yer alır. Bu şekilde her tip kontrol elde edilmiştir ve deney sonucunda net bir yorum yapılabilir hale gelmiştir. Bu işlemlerin ardından tüpler 37°C’de 24 saat inkübasyondan bırakılır. İnkübasyonun ardından tüpler çıplak gözle kontrol edilir ve hangi madde konsantrasyonunun üremeyi engelleyecek veya azaltacak durumda olduğu spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda ölçömleri kontrol grubuna göre yapılarak kantitatif olarak tespit edilir. Gözlemsel olarak tespit edildiğinde gözle rahat bir şekilde ayırımı yapılacak olan bulanıklık olarak ifade edilirken kantitatif çalışma sonucunda kontrol ile kıyaslandığında azami olarak %70 oranında bir azalmanın olduğu konsantrasyon seçilir.

### **2.2.5.3 Zamana Bağlı Ölüm Deneyi (Time-Kill Yöntemi)**

Ölüm zamanı (Time-Kill) yöntemi konsantrasyonların inkübasyon sürecinde test mikroorganizmalarının üremelerini nasıl etkilediğı ve hangi zaman aralığında mikroorganizmaların kontrol numunesine karşı yarısını (%50) inhibe edici etkinin gösterildiğı ve hangi konsantrasyonda olduğunun analizi yapar.

Deneyssel çalışma prosedürü bölüm 2.2.5.2.2’deki seri dilüsyon test yöntemi ile bire bir aynıdır. Kullanılan malzemeler tüp sayıları ve miktarları, polimer-kopolimer oranları. Kısaca süreç aynı işlemektedir. Farklılık ise time-kill yöntemin amacı olan kalitatif sonuç elde etmektir.

Bu tespit işlemi için spektrofotometre kullanılmıştır. (Şekil 2.4) Spektrofotometre, tüplerdeki mikroorganizma yoğunluğunun absorbans değerlerini saptamak amacı ile 3. 6. 18. ve 24. Saatte her bir test mikroorganizması için 4 er tüpten ve pozitif kontrolden 1 ml alarak steril spektrofotometrik amaçla kullanılan tam geçirgen özelliğe sahip küvetlere konularak 625 nm dalga boyutunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu değerleri Lambert-Beer kanununa göre, bir hücre süspansiyonundan geçen ışığın yoğunluğu (I) giriştekine (I<sub>0</sub>) göre azalır. Optik yoğunluğun bir ölçüsü olan ekstinksiyon (OD = Optik Density) hücre süspansiyonundaki biyomas (hücre) konsantrasyonu (c) ile doğrudan orantılıdır. Ortalama hücre boyutları sabit kaldığı sürece optik yoğunluğun alt sınırlarında optik yoğunluk değerleri ile hücre yoğunluğu (hücre sayısı/ml) arasında lineer bir ilişki vardır.

$A = \epsilon c l$  Denklemine göre ekstinksiyon katsayısını hesaplamak için absorbans ölçümleri yapılır. 'ε' ekstinksiyon katsayısı, 'c' solüsyonun konsantrasyon miktarı, 'l' ise yol uzunluğudur. 'l' değeri 1 ml hacimli küvetlerden dolayı kalınlığı 1 cm'dir. 'c' ise; 1ml hacim içerisinde bulunan hücre miktarıdır (ml/CFU).

Time-kill testi için başlangıçta  $5 \times 10^5$  CFU / ml bakteriyle başlanmıştır. Candida albicans için bu değer  $2 \times 10^3$ 'tür. Bir gecelik besiyeri ortalama olarak  $10^9$  CFU / ml bakteri/fungus içereceğinden, 625 nm'de her bir zaman dilimi için (3, 6,18 ve 24. saat) absorbans değerleri ölçülür. Zamana bağlı olarak mikroorganizma konsantrasyonları ve ekstinksiyon katsayıları hesaplanır. Hesaplama sonucunda kalitatif ölçüm yapılmış olunur. Ölçüm sonucunda ise sayısal değerler ile bir grafik oluşturulur. Bu grafik, herhangi bir biyomalzemenin herhangi bir test mikroorganizmasını öldürmüş mü veya üremesini durdurmuş mu, durdurduysa bu süreç hangi saat aralığında başlamış sorularına cevap niteliği taşır. Bu sorulara cevap niteliği, kontrol grubuna karşı mikroorganizma sayısının yarısını inhibe etme yetisini absorbans değerleri ve yukarıda belirtilen Lambert-Beer kanununu esasında belirlenmesidir. Belirlenmenin yazımsal aktarımı olarak da değerlerin bilimsel açıdan bir diğer ve daha yalın bir gösterime sahip olması açısından log10 formasyonu ile tespit edilmesi tercih edilmektedir. **Log10 formasyonunda** kontrol grubu değerinden **>0,30 ve daha altında bir değere sahip olunması** o polimerik maddenin o saat dilimine ait olarak mikroorganizma sayısının en az yarısını inhibe edici etki gösterdiğinin kanıtı konumundadır. Örneğin: 24. Saat kontrol grubu 500.000.000 değerine sahip olduğu bilindiğinde, bu değer log10 formasyonunda 8,69 iken bu mikroorganizma sayının yarısı yani 250.000.000 değerinin log10 formasyonunda karşılığı 8,39'dur. Bu durum her konsantrasyon ve değer için aynı duruma sahiptir. Bu sebepten Log10 formasyonunda kontrol grubu değerinden 0,30 ve daha altında bir değere sahip olmasının tespiti de yapılabilmektedir.

Absorbans değerlerinin belirlenmesini takiben hücre sayıları hesaplanır. Bu işlemten sonra basit yapılı bir hesap makinesi yardımı ile yalın görünüm ve basit analiz edebilme açısından da Log10 formasyonuna dönüştürülür.



**şekil 2.3** Spektrofotometre Cihazı

#### **2.2.5.4 Plak Sayma Metodu**

Plak sayma metodu Agar disk Difüzyon, MIC veya Mikroskop yöntemlerinden bağımsız olarak yapılan fakat bu yöntemler ile doğrudan temas halinde olan bir yöntemdir. Malzeme gruplarının hangi madde/malzeme üzerinde tutunma ve yaşama olasılığının kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Çalışmada yer alan plak sayma metodunda sadece malzeme durumuna göre metal-metal alaşımlar, polimerler ve kompozitler ile gerçekleştirilmiştir (izelge 2.2). Tüm numuneler için aynı süreçler uygulanmıştır. Çalışma öncesinde kullanılan tüm test mikroorganizma suşları  $10^6$  CFU/mL olacak şekilde 24 saat inkübasyon sonucunda bölüm 2.2.1’de anlatıldığı üzere mikroorganizma yoğunluk tayini gerçekleştirilmiştir (izelge 2.1). Deneysel aşamalarda test edilen numuneler 30 dakika ile UV ışını kullanarak her bir yüzleri steril edilmiştir. Steril edilmiş numuneler petriler içerisine yerleştirilir ve daha sonra  $10^6$  CFU/ml konsantrasyondaki bakteri süspansiyonundan 100 l alınarak numunelerin yüzeyini kaplayacak şekilde yayılmıştır. Numune ve mikroorganizma süspansiyonlarının bulunduğu petriler 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$  de inkübe edilir. 24 saat inkübasyonun ardından, numune yüzeyleri 900 l steril fosfat tamponu (PBS) ile yıkanır ve numunelerin yüzeyinden 100 l zelti alınarak TSA plaklarına inoküle edilir Ekim işleminden sonra petri kaplarındaki örnekler  $37^{\circ}\text{C}$ ’de tekrardan 24 saat inkübe edilir ve ortamda gelişen koloni sayısı sayılarak, numunelerin antibakteriyel etkinlikleri değerlendirilir.



**Çizelge 2.3** Antimikrobiyal aktivite çalışmaları ve kullanılan malzemeler

|                           | Agar Disk Difüzyon | E Test | Seri Dilüsyon | Time-Kill | Plak Sayma |
|---------------------------|--------------------|--------|---------------|-----------|------------|
| <b><u>Metaller</u></b>    |                    |        |               |           |            |
| Ti6Al4V                   | +                  |        |               |           | +          |
| Fe                        | +                  |        |               |           | +          |
| Zn                        | +                  |        |               |           | +          |
| Fe-Mn-Zn                  | +                  |        |               |           | +          |
| <b><u>Polimerler</u></b>  |                    |        |               |           |            |
| PHB                       | +                  | +      | +             | +         | +          |
| PLA                       | +                  | +      | +             | +         | +          |
| PHB-PLA                   | +                  |        |               |           |            |
| PMMA                      | +                  | +      | +             | +         | +          |
| PCL                       | +                  | +      | +             | +         | +          |
| PHB-V                     | +                  | +      | +             | +         |            |
| <b><u>Seramikler</u></b>  |                    |        |               |           |            |
| N/M - HA                  | +                  |        |               |           |            |
| TiO <sub>2</sub>          | +                  |        |               |           |            |
| ZnO                       | +                  |        |               |           |            |
| <b><u>Kompozitler</u></b> |                    |        |               |           |            |
| Ti-Zn-O                   | +                  |        |               |           | +          |

## BÖLÜM 3

### BULGULAR

#### 3.1 Agar Disk Difüzyon Yöntemi

Antimikrobiyal test yöntemleri arasında agar disk difüzyon deneyleri, antimikrobiyal ajanlar olarak bitki ve mikrobiyal ekstraktlar, uçucu yağlar, saf ikincil metabolitler ve biyomalzemelerin mikrobiyal etkinliğini tespit etmek için bakteri ve maya testleri için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü tarafından kabul görmüş ve onaylanmış birçok standarda sahip bir deney metodudur. Agar disk difüzyon metodolojisi, kâğıt disklerle emdirilen maddenin veya direkt yüzeye yerleştirdiğimiz biyomalzemenin, duyarlılığı araştırılan mikroorganizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu temel kapsamında, yöntemin asıl ölçmeyi hedeflediği amaç ise: hem agar yüzeyine yerleştirilen maddelerin emdirildiği disklerde hem de yüzeye konulan malzemelerde, belirli bir inkübasyon süreci sonrasında, üremeye başlayan test mikroorganizmasını inhibe edici etken maddenin (antimikrobiyal madde) var olup olmama durumunu tespit etmek. Var ise bu madde agara difüze olurken, disk çevresinde inhibe edici maddeden kaynaklı mikroorganizma üremesi olmayan bölgelerin hem nicel hem de nitel ölçüm yapılması esasına dayanır.

Agar disk difüzyon test metodu standartları kapsamında literatüre bakıldığında ölçüm amacı, mikroorganizmaların kullanılan biyomalzemeler ve antimikrobiyal maddeler üzerinde duyarlı, orta veya dirençli olarak kategorize ederek kalitatif sonuçlar sağlamasıdır (Reller vd. 2009). Kullanılan biyomalzemelerin metot kapsamında analizi, test mikroorganizmalarının disklerin veya biyomalzemelerin etken maddelerine karşı ne kadar duyarlı ise diskin ya da biyomalzemelerin etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş olması temeline dayanır. Bu zon çapının tespitini takiben inhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirilmeleri yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan biyomalzemelere karşı duyarlılık durumu belirlenir. Bir diğer değişle, biyomalzemelerin hangi tip mikroorganizmalara karşı bir antimikrobiyal etki verdiğinin tespiti yapılmaktadır. Tespit kapsamında ayrıca bakteri üremesinin engellenmesi bakteri ölümü anlamına gelmediği için bu yöntem bakterisidal ve bakteriyostatik etkileri ayırt edemez. Agar disk difüzyon metodunda

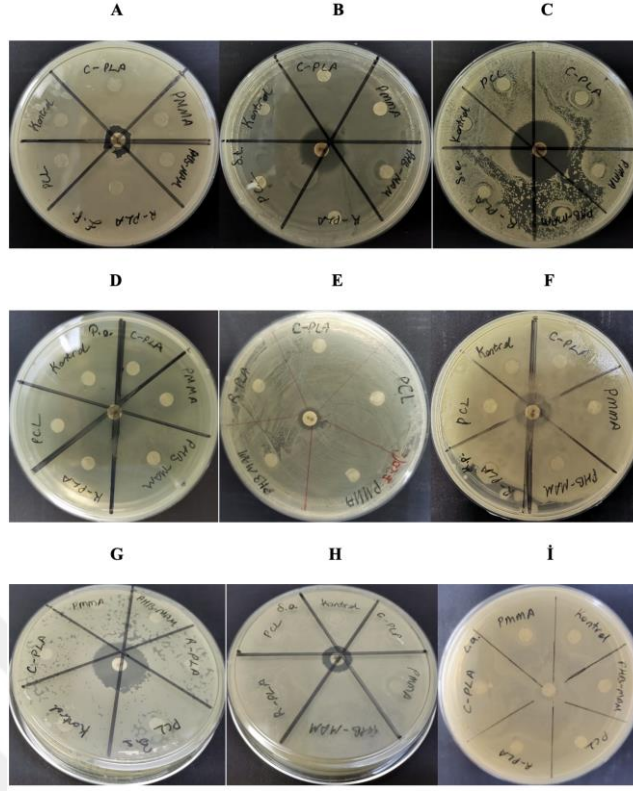
çeşitli test mikroorganizmalarına karşı özellikle doğal yoldan elde edilen antimikrobiyal maddelerin yaygın olarak yer verildiği bilinmektedir. Bilhassa fungus türlerinde, Lo'pez-Oviedo ve arkadaşlarının posakonazolün filamentli mantarların kullanıldığı (Lo vd. 2006), Arikan ve arkadaşlarının dünya çapında geniş bir yelpazeye yayılmış olan *Aspergillus* cinsi fungusunun yer aldığı (Arikan, Yurdakul, ve Hascelik 2003) ve CLSI standartlarına uygun olarak filamentli mantarların test mikroorganizmalarına karşı emdirilen disklerin içerisindeki antimikrobiyal maddenin agara difüze olmasını takiben mikroorganizmaların üremesini nedenli durdurduğunun analizi zon çapı ölçümlerine dayanan standart agar disk difüzyon yöntemleri yer almaktadır (Clinical and Laboratory Standards Institute 2012; CLSI 2004; Lo vd. 2006).

Agar disk difüzyon yönteminde kullanılan suş sıralaması aşağıdaki gibidir (Şekil 3.1-5).

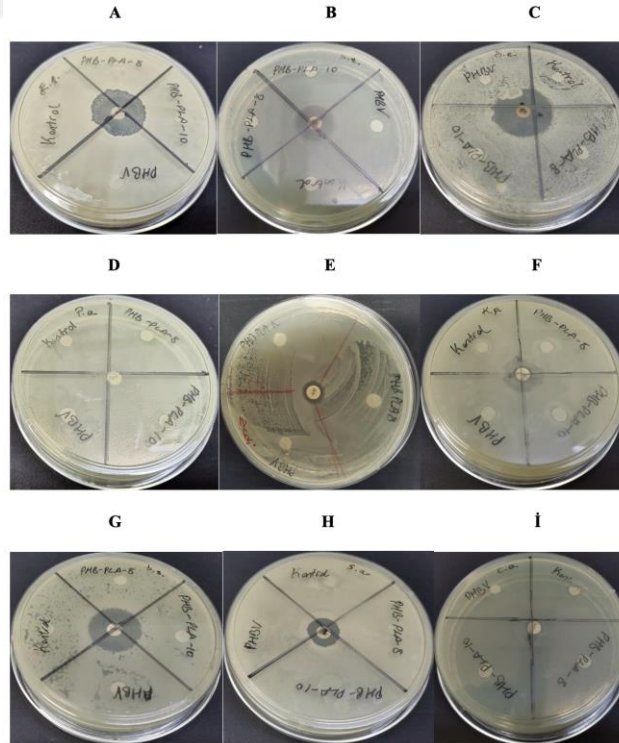
- A) *Enterococcus faecalis*
- B) *Salmonella typhirium*,
- C) *Staphylococcus epidermidis*,
- D) *Pseudomonas aeruginosa*,
- E) *Escherichia coli*,
- F) *Klebsiella pneumoniae*,
- G) *Bacillus subtilis*,
- H) *Staphylococcus aureus*,
- İ) *Candida albicans*

### 3.1.1 Polimerik ve Kompozit Polimerik Biyomalzemeler

Deneyisel çalışmalarımızda yer alan polimer ve kompozit polimer olan biyomalzemelerin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.1.2'de yer alan test mikroorganizmalarına karşı agar disk difüzyon test metodunda incelenmiştir. Sırası ile şekil 3.1 'de ve şekil 3.2'de polimer ve kompozit polimerlerin ilgili test mikroorganizmalarına karşı agar disk difüzyon test sonuçları yer almaktadır.



Şekil 3.1 Polimerik biyomalzemelerin agar disk difüzyon deneyi.



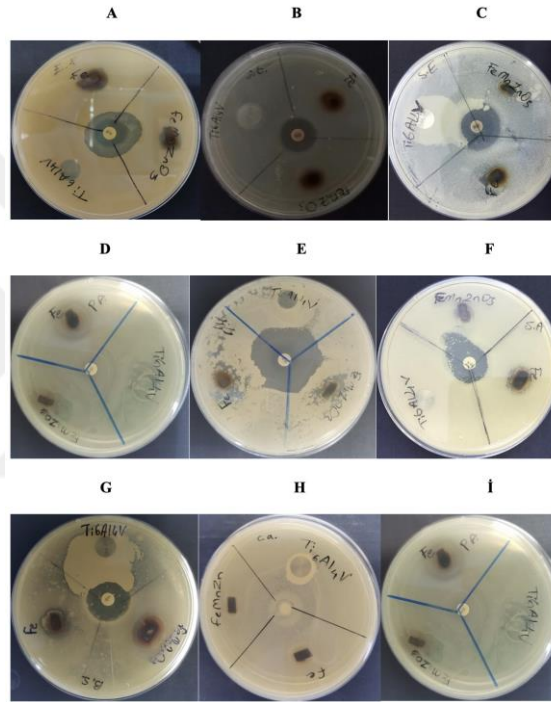
Şekil 3.2 Ko-polimerik biyomalzemelerin agar disk difüzyon deneyi.

Polimer ve ko-polimer olan tüm biyomalzemelerin agar disk difüzyon deney sonuçlarında metodun temel amacı göz önüne alındığında A, B, C, D, E, F, G, H ve İ görsellerindeki test

edilen mikroorganizmalara deneyde yer alan polimerik malzemelerin herhangi bir mikroorganizmanın üremesini engelleyecek etken bir madde barındırmadığı belirlenmiştir.

### 3.1.2 Metal ve Metal Alaşım Biyomalzemeler

DeneySEL çalışmalarımızda yer alan metal ve metal alaşım bazlı olan biyomalzemelerin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.1.2’de yer alan mikroorganizmalara karşı agar disk difüzyon test metodunda incelenmiştir. Şekil 3.3 ‘de metal ve metal alaşım olan biyomalzemelerin test mikroorganizmalarına karşı agar disk difüzyon test sonuçları yer almaktadır.



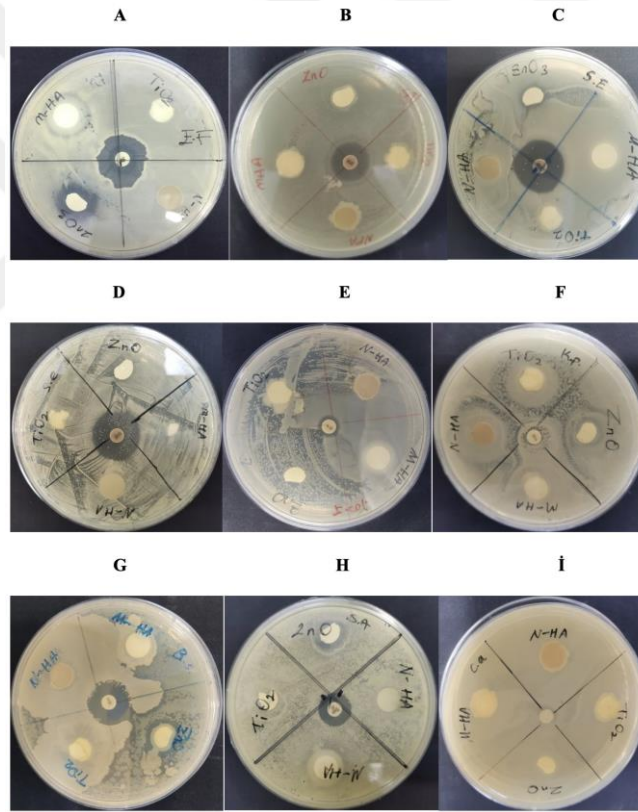
**Şekil 3.3** Metal ve metal alaşım olan biyomalzemelerin agar disk difüzyon deneyi.

Metal ve metal alaşım olan biyomalzemelerin agar disk difüzyon deney sonuçlarına göre antimikrobiyal aktivite gösterecek ve mikroorganizmaların üremesini engelleyecek bir etken madde varlığı saptanmamıştır. Bir diğer dikkat çeken sonuç ise Ti6Al4V metalinin yapısal formundan ve malzeme yüksekliğinden kaynaklı ve antimikrobiyal bir özellik göstermediğinden dolayı mikroorganizmalar bu biyomalzeme etrafında yoğun bir üreme göstermiştir. Bu sonuçtan bağımsız olarak tüm görsellerde de görüldüğü üzere, metal ve metal alaşım yapıdaki biyomalzemelerin kendi formlarından kaynaklı agar disk difüzyon test metoduna tabi tutulduklarında, oksijen ve sıvı ile temas sonrasında oksitlenme meydana gelmektedir. Oksitlenme sonucunda antimikrobiyal özellik verebilecek bir yapıda dahi olsalar detaylı incelemeler sonrasında bu özelliğin oksitlenme ile meydana gelen kimyasallaşma ve

renkten kaynaklı olarak tespit edilememiş olması da muhtemel bir sonuçtur. Görsel içersinde her deneyde kontrol numunesi amacı ile antimikrobiyal diskler yerleştirilmiştir. Bu disklerin aktiviteleri mikroorganizmaların herhangi bir antimikrobiyal ajana karşı tepki verdiğini göstermektedir.

### 3.1.3 Seramik Biyomalzemeler

Deneyssel çalışmalarımızda yer alan metal ve metal alaşım bazlı olan biyomalzemelerin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.1.2’de yer alan mikroorganizmalara karşı agar disk difüzyon test metodunda incelenmiştir. Şekil 3.4 ‘de metal ve metal alaşım olan biyomalzemelerin test mikroorganizmalarına karşı agar disk difüzyon test sonuçları yer almaktadır.



**Şekil 3.4** Seramik biyomalzemelerin agar disk difüzyon deneyi.

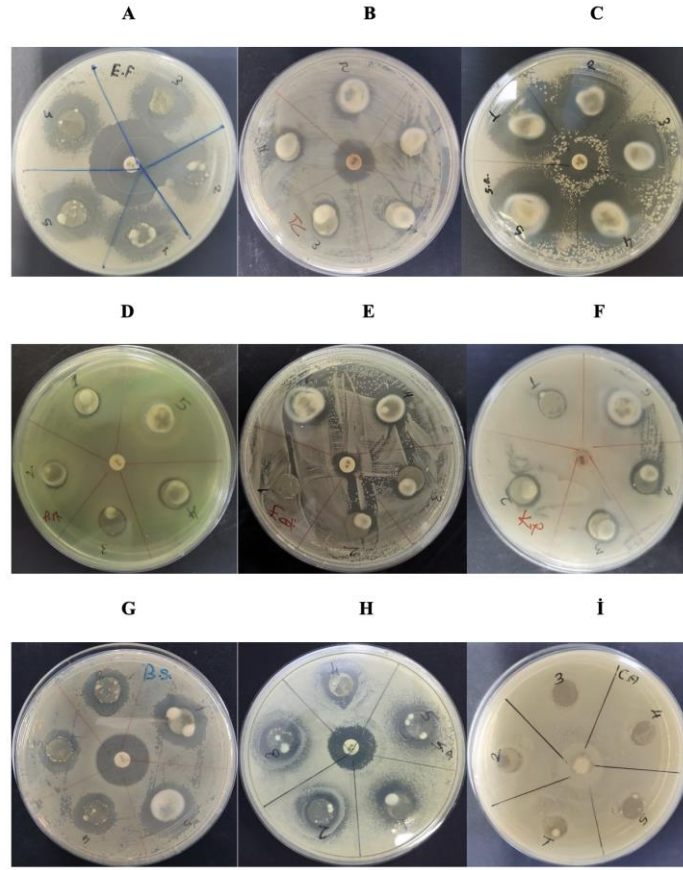
Seramik biyomalzemelerde ise üst iki başlığa göre durum biraz daha farklı. Bu fark ilk olarak göze çarpan ZnO’nin çalışılan 9 mikroorganizma arasından sırası ile *Enterococcus faecalis*’e karşı 14 mm, *Staphylococcus aureus*’a karşı ise 12 mm ve *Staphylococcus epidermidis*’e karşıda 10.5 mm ölçümünde zon çapı vermiştir. Zon çaplarından da anlaşıldığı üzere ZnO antimikrobiyal özellik göstermekle birlikte geri kalan test mikroorganizmalarına karşı herhangi bir antimikrobiyal varlık gösterememiştir. ZnO dışındaki seramik biyomalzemelerin

antimikrobiyal aktivite gösterdiği bir deney tespit edilmemiştir. Hidroksiapatit biyomalzemesinin gözlemsel sonucu olarak, nano ya da mikro boyutta olmasının antimikrobiyal aktivite özelliği bazında bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir. Seramik biyomalzemelerin bir cm çapında diskler haline preslenme sonucunda getirilmesi dışında testte tabi tutulamayacağından dolayı bu etkinlik verilerinin, toz seramik biyomalzemelerin dış kuvvet tarafından etki ile katılaştırılarak deneylerde analiz edilmesi sağlanmıştır. Bu sonuç doğrultusunda biyomalzemelerde bir antimikrobiyal aktivite standardizasyonu bulunmamasından dolayı ZnO'in diğer mikroorganizmalara, toz formdan katı forma getirilmesinden kaynaklı olarak mı yoksa art arda test edilmesinden kaynaklı olarak mı antimikrobiyal aktivite göstermediğinin sonucu net olarak tayin edilememektedir. Her deneyde olduğu gibi mikroorganizma ve antimikrobiyal ajan kontrolü için her bir petri kabının ortasına çeşitli antibiyotik diskler yerleştirilmiştir. Bu diskler mikroorganizmaların bir antimikrobiyal ajana karşı tepki verebildiğini göstermektedir.

#### **3.1.4 Kompozit Biyomalzemeler**

Deneyisel çalışmalarımızda yer alan metal matrisli kompozit yapıda olan biyomalzemelerin ve çinko metalinin çinko bazlı bir kompozit artış malzemelerine sahip olmasından dolayı bu malzeme grubu ile bir test edilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.1.2'de yer alan mikroorganizmalara karşı agar disk difüzyon test metodunda incelenmiştir. Şekil 3.5 'de metal ve metal alaşım olan biyomalzemelerin test mikroorganizmalarına karşı agar disk difüzyon test sonuçları yer almaktadır. Görselde yer alan malzemeler **1:** Çinko, **2:** Çinko+Titanyum, **3:** malzeme içeriğinin %3 oranında çinko içeriğinin artmış hali, **4:** malzeme içeriğinin %6 oranında çinko içeriğinin artmış hali, **5:** malzeme içeriğinin %9 oranında çinko içeriğinin artmış hali şeklindedir.



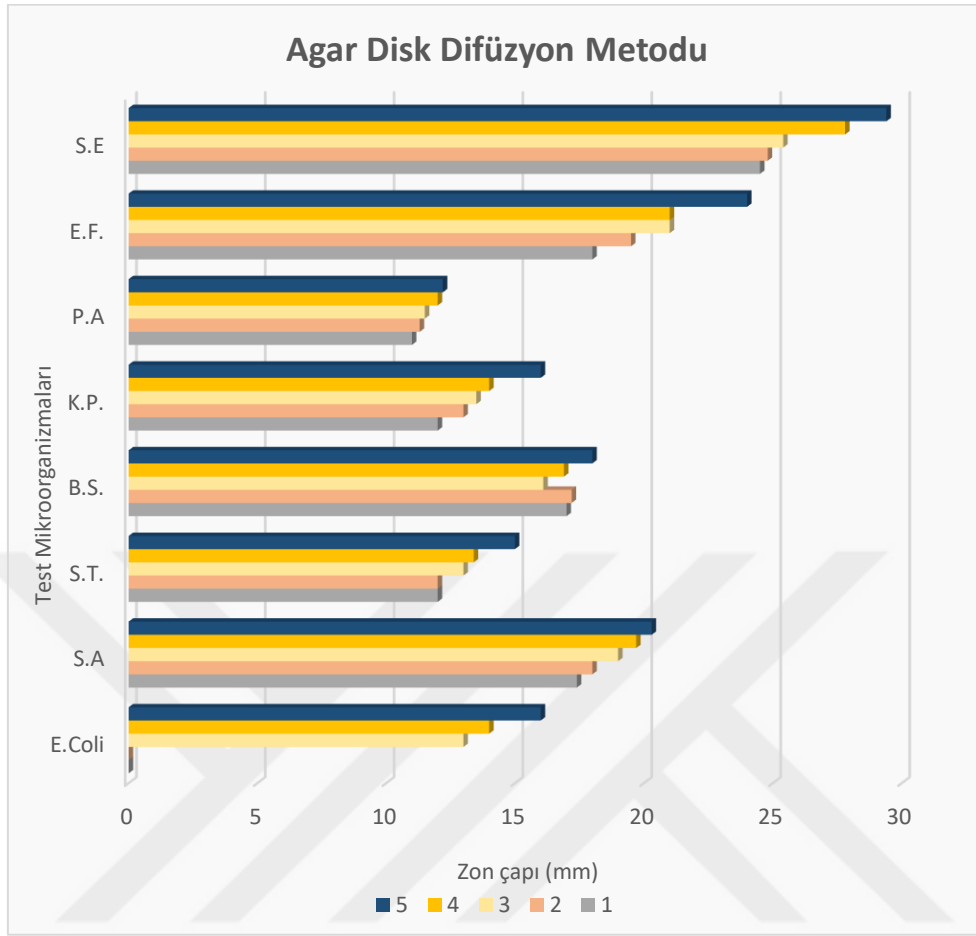


**Şekil 3.5** Kompozit yapılı biyomalzemelerin ve çinko metalinin agar disk difüzyon deneyi.

Agar disk difüzyon sonucunda kompozit malzemelerin ve çinko metalinin deneysel amaç göz önünde bulundurularak, verdikleri antimikrobiyal aktivite oranları yani zon çapları çizelge 3.1’de verilmiştir.



**Çizelge 3.1** Kompozit malzemelerin ve çinko metalinin verdikleri zon çapları



**1:** Çinko, **2:** Çinko+Titayum, **3:** malzeme içeriğinin %3 oranında çinko içeriğinin artmış hali, **4:** malzeme içeriğinin %6 oranında çinko içeriğinin artmış hali, **5:** malzeme içeriğinin %9 oranında çinko içeriğinin artmış formu

Çalışmamızda kompozit malzemelerin ve çinko metalinin *Candida albicans*'a karşı bir antimikrobiyal özellik göstermediği görülmektedir. Bunun yansıra deneysel süreç sonunda göze çarpan ilk detay belirli bir korelasyon doğrultusunda katkılanan materyaller antimikrobiyal aktivite göstermesidir. Sadece 1 ve 2 numaralı numunelerin E.coli suşunda herhangi bir zon çapı vermediği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra bütün katkılama işlemine sahip numunelerin bütün test mikroorganizmalarına karşın yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Petri kaplarının fotoğrafları çekildiğinde malzemelerin metal kompozit türüne sahip olmasından dolayı alt kısımlarında 24 saat inkübasyon süresi sonucunda buharlanma gözlenmektedir. Malzeme durumları göz önüne alınarak ölçümler yapılmıştır. Agar disk difüzyon test metodu sonucunda hem çinko metali hem de metal matrisli kompozit malzemeler birlikte bir malzeme grubu olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmenin

ışığında en yüksek oranda antimikrobiyalite verdiği test mikroorganizmaları S.E. > E.F. > S.A. > B.S. > K.P. = E.C. > S.T. > P.A. şeklindedir.

Agar disk difüzyon test yönteminde antimikrobiyal etkinlik analizinin yapılması hem ucuz maliyet hem de uygulanış kolaylığı ve az gereksinime sahip olması açısından etkin sonuçların alındığı bir yöntem olarak kayıtlara geçmiştir. Biyomalzeme kapsamında polimer, metal, seramik ve kompozit yapıları malzemelerin uygun koşul ve şartlar altında deneye uyarlanabilirlik açısından fazla zorluk çekilmemiştir. Bu kapsam bağlamında malzemelerin deneye uygunluk ve yapılabilirlik açısından bulgular ile doğru bir orantı gelişmiştir. Bu doğru orantı, malzemelerin kullanım şekli, yapısı, antimikrobiyal madde barındırması ve yöntemle yakınlığı ile uygun korelasyon gelişimine katkı sağlamıştır. Çok çeşitli biyomalzemelerin aynı ortam ve deney koşullarında belirli bir stabilizasyon sağlanarak etkin sonuçlar alınmasının, biyomalzeme aktivite çalışmalarında, belirli bir standart dizasyon kapsamında etkili bir analiz yöntemine dahil olabileceği gösterilmiştir.

### **3.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi İçin Analiz Yöntemleri**

#### **3.2.1 E Test**

Agar ortamına yayılan antimikrobiyal maddenin miktarını ölçmek mümkün olmadığından, agar disk difüzyon yöntemi minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlemek için uygun değildir. Bununla birlikte, katı besiyerinde difüzyon yoluyla MİK değerlerinin saptanması amacıyla olanak sağlayan yöntemler de bulunmaktadır. E-test bu prensibe dayanan bir yöntemdir.

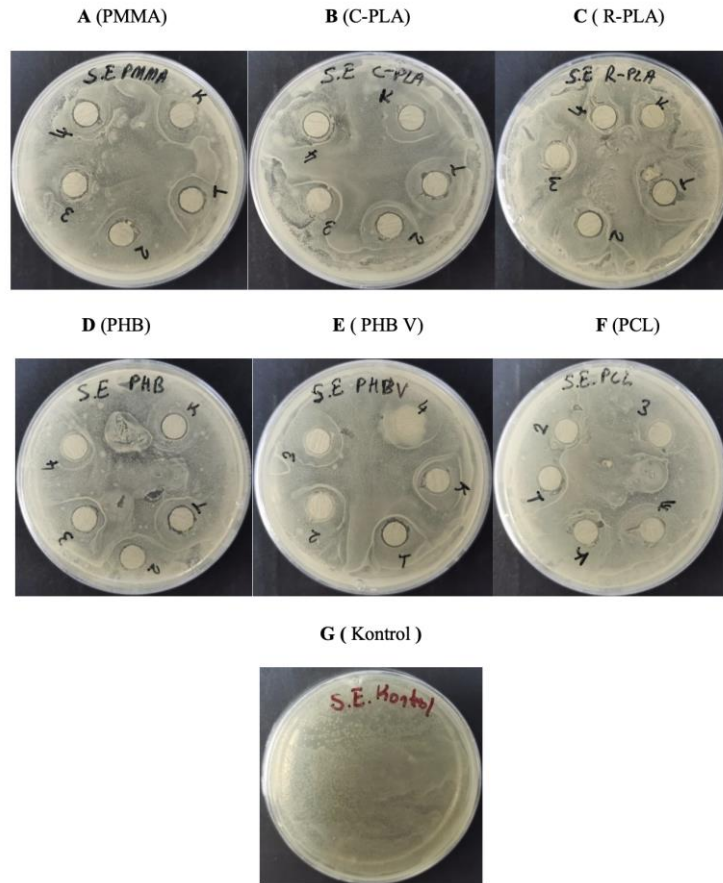
MİK bir mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanırken, bu tanım doğrultusunda deneyde agara difüze eden çeşitli polimer ve ko-polimer konsantrasyonlarına sahip disklerin, test mikroorganizmalarında hangi derecede bir inhibe etki yaratacağının ölçümü hedeflenmektedir.

Balouiri ve ark.(Balouiri vd. 2016) ve Demirpek'in (Demirpek 2010) yaptığı çalışmalar ve literatürde yer alan bilgiler ışığında, bir uçtan diğer uca antimikrobiyal ajanın artan konsantrasyon gradyanıyla empenye edilmiş bir şerit, önceden test edilen mikroorganizma ile aşılınmış agar yüzeyinde biriktirilir ve zon çapı verdiği nokta tespit edilmesine dayanır. Yapılan çalışmalarda çeşitli ilaçların antifungal ve antimikrobiyal aktivite özelliklerinin birbiri ile

kıyaslanmasına olanak sağlayan ve aynı olanağı çeşitli yöntemler ile doğru bir korelasyon yaparak yerine getirmeyi hedefleyen bir yöntemdir (Berghaus vd. 2015; Gupta vd. 2015; White vd. 1996). Bu prosedürü esas kabul ederek, temel amaç kapsamında farklı konsantrasyonlarda etken maddenin nasıl bir antimikrobiyal özellik vereceği ve hangi konsantrasyondan başlayıp devam edeceğini tespit etmek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal etkiye sahip olup olmadığını araştırdığımız polimerik biyomalzemeler, bir şerit şeklinden ziyade farklı konsantrasyonların olduğu diskler şeklinde biyomalzeme standartlarına uygun hale getirme isteği analizin temelini oluşturmaktadır.

### 3.2.1.1 Polimer ve Kompozit Polimerik Biyomalzemeler

Deneyisel çalışmalarımızda yer alan polimer ve kompozit polimer olan biyomalzemelerin Bölüm 2.1.2’de yer alan test mikroorganizmalarına antimikrobiyal aktivite açısından, etkin olup olmadıkları E-Test metoduyla araştırılmıştır. E-Test metodunun anlamlı sonuçların elde edildiği mikroorganizma deney sonuçları şekil 3.6’da yer almaktadır.



**Şekil 3.6** Polimerler ve ko-polimer biyomalzemelerin E Test deneyi *Staphylococcus epidermidis* 1: 50mg/ml - 2: 25 mg/ml - 3: 12,5 mg/ml - 4: 6 mg/ml K: Kontrol

Tüm deneysel sürecin sonunda verilerin tamamı incelendiği zaman, etken madde analizinin yapıldığı biyomalzemelerin, agar disk difüzyon deneyinde yer alan konsantrasyon miktarının hem üstünde hem de altında konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu sonuç doğrultusundan test mikroorganizmalarının tamamında E-test metodu uygulanmıştır. Sadece *Staphylococcus epidermidis* mikroorganizmasına karşı PMMA, R-PLA, PHB ve PHB-V polimerlerinin 50mg/ml konsantrasyonlarının az miktar da olsa E test metodu kapsamında etki verdiği gözlemlenmiştir. Etki gösteren polimerlerin kumpas ve cetvel ile ölçüm sonuçlarında PMMA için 12 mm zon çapı ölçümü yapılmışken sırası ile R-PLA, PHB ve PHB-V için 11 mm olarak ölçülmüştür. *Staphylococcus epidermidis* mikroorganizması dışında herhangi bir konsantrasyona ve bakteriye ait net şekilde antimikrobiyal özellik olarak yorumlanabilecek bir zon çapı ve 10 mm yani disk boyutunun üstünde bir ölçüm gözlemlenmemiştir.

Zon çapının görülmemesi agar disk difüzyonu sonuçları bilindiği için ve kısa sürede sonuç alınması sayesinde bu test, diğer testlerle birlikte analiz yapılacağı zaman, korelasyonun çok iyi bir parçası olacağını gözler önüne sermiştir. Agar kapsamlı bir deney olmasının avantajı ile uygulanabilirlik ve analiz kolaylığı metodun hem tercih edilmesinde hem de etkin sonuçlar istenmesinde etkili bir rol oynamaktadır. Bu sonuç ile ilgili olarak metoda karşı bakış açımızı değiştirecek olursak, biyomalzeme uygunluğunun test metoduna entegre edilmesi oldukça güç bir durumdur. Deneyin bu zorluğunun belirleyici faktörü olarak, tez kapsamında çalışılan tüm biyomalzeme gruplarından sadece polimerik biyomalzemelerin bu teste yatkın olması, testin analiz kolaylığından ziyade analiz edilecek malzeme türünde seçici davranması görülmektedir. Çözünme durumunun sorun olmadığı biyomalzeme türlerinde, hangi konsantrasyondan başlayarak antimikrobiyal aktivite gösterdiğinin belirleneceğini test etmek için en uygun analiz yöntemlerinden biri olduğu ortaya koyulmuştur. Bu deney süreci sonundan gözle görülen en net sonuç: Analiz edilecek biyomalzeme uygunluğu kısıtlı olsa da E-test yöntemi, gerçekleştirme sürecinde ve analiz yolunda, gayet etkin bir rol oynamakla birlikte, deneyler arası korelasyon açısından da yardımcı bir rol oynayacaktır.

### **3.2.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Makro dilüsyon yöntemi olarak da bilinen seri dilüsyon yöntemi, literatüre bakıldığında aerobik bakterileri, mayaları ve fungusları, en düşük madde konsantrasyonlarının gözlemsel olarak herhangi bir mekanik analize girilmeden sadece nicel bir tanımlama yapılarak analiz edilmesi prensibine dayanır. Bu prensip CLSI tarafından deneyin standartlaştırılmasına dayanmaktadır (Clinical and Laboratory Standards Institute 2002, 2008, 2012). Bu standartlaşa kapsamında etken maddenin mikroorganizma üzerinde %80 ve üzeri bir oranda inhibisyon etkisi 24.saat

sonunda varsa bu sonuç MİK deneyleri kapsamında kabul edilir ve antimikrobiyal ajan veya biyomalzeme antimikrobiyal özellik göstermektedir ifadesi doğru bir şekilde kullanılabilir. MİK değerinin belirlenmesi seri dilüsyon sonrası, 24 saat inkübasyon sonrası sıvı besiyerinden spektrofotometrik yöntemle absorbans ölçümü ya da agarlı besiyerine ekim ve 24 saat inkübasyon sonrası koloni sayımı yapılarak tespit edilir. Bu çalışmada MİK değeri spektrofotometrik ölçüm metodu kullanılarak elde edilmiştir.

### 3.2.2.1 Polimer ve Kompozit Polimerik Biyomalzemeler

Deneyisel çalışmalarımızda yer alan polimer ve kompozit polimer olan biyomalzemelerin antimikrobiyal aktiviteleri bölüm 2.1.2’de yer alan test mikroorganizmalarına karşı seri dilüsyon test metodunda incelenmiştir. Polimer ve kompozit polimerlerin ilgili test mikroorganizmalarına karşı 24 saat inkübasyonun ardından deneyin sonuçları yer almaktadır.

Bizim analiz yöntemimiz test metodu gereğince canlı hücre sayısını baz alarak yapıyorken bu sayının absorbans değeri ile pekiştirilmesi yani absorbans değeri kullanılarak tüplerdeki hücre sayısı sonucunu tespit etmek amacına dayanmaktadır. Absorbans değerlerinin bölüm 2.2.5.4’te anlatıldığı gibi; Ekstinksiyon katsayısının  $CFU \times ml^{-1} \times cm^{-1}$  ‘ε’  $0,08 \times 5.10^{-8}$  Kontrol numunesinin 24.saatde ki hücre sayısının ve Absorpsiyon değerini (Çizelge 3.4) 625nm de alınması ve formülasyonda kullanılması esasına dayanarak yaklaşık olarak test mikroorganizmasının %70’ini inhibe eden madde konsantrasyonu belirlenmiştir. Deneyisel süreç sonundaki anlamlı sonuçlara ait test tüplerinin görselleri ve tüm mikroorganizmalara ait elde edilen absorbans ve hücre sayıları aşağıda yer almaktadır.

Sırası ile çizelge 3.2 ve 3.3 de yer alan görseller ve bilgileri ışığında seri dilüsyon metodunda anlamlı sonuçlar yani test metodu amacı doğrultusunda maddenin/malzemenin mikroorganizmayı belirli etkin oranda inhibe edici etki gösterdiği sonuçlar yer almaktadır.

**Çizelge 3.2** Spektrofotometrik sonuçlar, *Staphylococcus epidermidis* HS: Hücre sayısı CFU/ml  $\times 10^6$ , İnkübasyon süresi: 24 sa, Absorbans: 625 nm

| Polimer/ Hücre Sayısı | PMMA | C-PLA      | R-PLA | PCL | PHB | PHB-V | Konsantrasyon |
|-----------------------|------|------------|-------|-----|-----|-------|---------------|
| Hücre Sayısı          | 457  | <b>170</b> | 292   | 455 | 470 | 355   | 50 mg/ml      |
|                       | 421  | 435        | 477   | 422 | 443 | 481   | 25 mg/ml      |
|                       | 493  | 517        | 483   | 560 | 510 | 490   | 12,5 mg/ml    |
|                       | 507  | 535        | 571   | 520 | 541 | 546   | 6 mg/ml       |

**Çizelge 3.3** Spektrofotometrik sonuçlar, *Staphylococcus aureus* HS: Hücre sayısı CFU/ml  $\times 10^6$ , İnkübasyon süresi: 24 sa, Absorbans: 625 nm

| Polimer/ Hücre Sayısı | PMMA | C-PLA | R-PLA | PCL | PHB | PHB-V | Konsantrasyon |
|-----------------------|------|-------|-------|-----|-----|-------|---------------|
| Hücre Sayısı          | 406  | 148   | 338   | 466 | 374 | 297   | 50 mg/ml      |
|                       | 473  | 488   | 532   | 400 | 439 | 503   | 25 mg/ml      |
|                       | 525  | 530   | 486   | 547 | 528 | 472   | 12,5 mg/ml    |
|                       | 510  | 558   | 671   | 515 | 626 | 490   | 6 mg/ml       |

C-PLA polimerinin 50mg/ml konsantrasyonda 24.saat inkübasyon sonucunda alınan absorbans değeri, hesaplanan hücre sayısı değeri, bize kontrol numunesinin yarısından fazlasını inhibe ettiğini göstermektedir. Bu değer minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak değer görmektedir.

Tablolar da yer alan absorbans değerleri ışığında çizelge 3.9'daki tablo temeli ve  $A = \epsilon c l$  formülasyonu kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda 24. Saatteki 1 ml içerisinde bulunan konsantrasyonları yani hücre sayıları hesaplanarak tabloda yer verilmiştir. Bu hesaplama sonucunda kontrol numunesi ile kıyaslama sonucunda, tablolarda kırmızı renk ile belirtilen konsantrasyon miktarları o mikroorganizma için MİK değerini göstermektedir. Kısaca kontrol numunesinde bulunan hücre sayısının en az yarısını inhibe edici madde konsantrasyonunu yani MİK olarak ifade edilir.

Örneğin başta C-PLA polimerik biyomalzemesinin özellikle 50 mg/ml oranında olan en yoğun madde konsantrasyonun hem diğer madde konsantrasyonlarına karşı hem de kontrol numunesine kıyasla %80-90 bandında olmasa da %70-75 bandında gözle görülebilecek bulanıklık farkı olduğu absorbans değeri ve 1ml'deki hücre sayısı hesabı yapılarak tespit edilmiştir. C-PLA ile çok yakın sonuçlar gösteren R-PLA ise belli bir oranın (test mikroorganizmasının en az yarısını inhibe etme oranının) altında kaldığı için dahil edilmemiştir. Özellikle belirtilen polimerik biyomalzemede madde konsantrasyonu artıkça, net bir antimikrobiyal özellik görülme de mikroorganizmanın üremesini yer yer yavaşlattığı kanaatine varılmıştır. Diğer polimerik biyomalzemelerin ise bu deney sürecinde kullanılan 20mg/ml konsantrasyondan ziyade sırası ile 50 - 25 - 12,5 - 6 mg/ml konsantrasyonlara karşı 24 saat süre boyunca olmadan da inkübasyon sürecinde mikroorganizmaların üremesi üzerinde kısa süreli bir etki gösterip ardından ortadan kaybolma gibi bir etkinin varlığının olması

durumunda tespit etmek için seri dilüsyon metodu time-kill metodu için bir zemin oluşturmuştur.

### 3.3 Zamana Bağlı Ölüm Testi (Time-Kill Metodu)

Pfaller ve arkadaşlarının (Pfaller, Sheehan, ve Rex 2004) yaptığı çalışma hazırlığı kapsamında temel olarak time-kill testi, bakterisidal veya fungisidal etkinin belirlenmesi hedefinde olan antimikrobiyal ajan ve mikrobiyal suş arasındaki dinamik etkileşim hakkında bilgi elde etmek amacı doğrultusunda analizlerin yapıldığı yöntemdir. Çalışma kapsamındaki hedef zamana veya konsantrasyona bağlı bir antimikrobiyal etki ortaya çıkarma potansiyelidir. Özellikle bakteriler için bu test iyi standardize edilmiştir ve CLSI'nin M26-A belgesinde tanımlanmıştır (Clinical and Laboratory Standards 1998). Clancy ve ekibinin (Clancy vd. 2006) yapmış olduğu çalışmada ise bakteriler ve özellikle çalışmamızda da bulunan *Candida albicans* türünün de test mikroorganizması olarak kullanıldığı time-kill metodu çalışmaları yer almaktadır. Bu çalışma kapsamında analiz farklı zaman dilimlerindeki tüpler içerisinde canlı kalan mikroorganizma hücre sayılarına göre yapılmaktadır. Bizim analiz yöntemimiz ise yine canlı hücre sayısını baz alarak yapılıyorken artı olarak bu sayının absorbans değeri ile pekiştirilmesi sonucuna dayanmaktadır.

**Çizelge 3.4** Time-Kill analiz yöntemi için pozitif kontrol ekstinksiyon katsayısı sonucu

| Süre/ Saat | Hücre Sayısı<br>ML / CFU 'C' | Absorbsiyon-625<br>OD | Ekstinksiyon Katsayısı<br>CFU X ML <sup>-1</sup> X CM <sup>-1</sup> 'E' |
|------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 3          | 5.10 <sup>5</sup>            | 0,85                  | 0.85x5.10 <sup>-5</sup>                                                 |
| 6          | 1.10 <sup>6</sup>            | 0,75                  | 0.75x10 <sup>-6</sup>                                                   |
| 18         | 1.10 <sup>8</sup>            | 0,1                   | 0,1x10 <sup>-8</sup>                                                    |
| 24         | 5.10 <sup>8</sup>            | 0,08                  | 0,08x5.10 <sup>-8</sup>                                                 |

#### 3.3.1 Polimerik ve Kompozit Polimerik Biyomalzemeler

Deneyisel çalışmalarımızda yer alan polimer ve kompozit polimer olan biyomalzemelerin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.1.2'de yer alan test mikroorganizmalarına karşı time-kill metodunda incelenmiştir. Polimer ve kompozit polimerler ilgili test mikroorganizmalarına karşı deney sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 3.5'te, *Staphylococcus epidermidis* ile 6-50 mg/ml değişen konsantrasyonlarda polimerler ile inkübasyonu yapılan polimerlerin 625 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik absorbans değerleri için hesaplanan hücre sayıları verilmiştir.

**Çizelge 3.5** Ölüm Zamanı Analizi için Spektrofotometrik sonuçlar, *Staphylococcus epidermidis*  
HS: Hücre sayısı CFU/ml X10<sup>3</sup>

| Polimer/Ko-polimerler |          |         |          |          |         |         |               |
|-----------------------|----------|---------|----------|----------|---------|---------|---------------|
| Hücre Sayısı          | PMMA     | C-PLA   | R-PLA    | PCL      | PHB     | PHB-V   | Konsantrasyon |
|                       | 3. Saat  |         |          |          |         |         |               |
|                       | 424      | 398     | 483      | 457      | 431     | 405     | 50 mg/ml      |
|                       | 417      | 437     | 488      | 492      | 398     | 435     | 25 mg/ml      |
|                       | 486      | 507     | 403      | 514      | 469     | 492     | 12,5 mg/ml    |
|                       | 479      | 466     | 520      | 509      | 501     | 478     | 6 mg/ml       |
|                       | 6. Saat  |         |          |          |         |         |               |
|                       | 887      | 821     | 917      | 918      | 949     | 323     | 50 mg/ml      |
|                       | 931      | 899     | 964      | 958      | 337     | 847     | 25 mg/ml      |
|                       | 959      | 926     | 970      | 1.084    | 980     | 893     | 12,5 mg/ml    |
|                       | 976      | 984     | 1.125    | 1.050    | 1.108   | 926     | 6 mg/ml       |
|                       | 18. Saat |         |          |          |         |         |               |
|                       | 87.800   | 93.400  | 89.440   | 75.100   | 99.000  | 81.000  | 50 mg/ml      |
|                       | 83.000   | 94.700  | 104.300  | 89.000   | 76.400  | 104.000 | 25 mg/ml      |
|                       | 105.500  | 131.500 | 122.000  | 88.300   | 92.000  | 100.700 | 12,5 mg/ml    |
|                       | 116.000  | 107.000 | 119.500  | 112.800  | 117.600 | 98.200  | 6 mg/ml       |
|                       | 24. Saat |         |          |          |         |         |               |
|                       | 457.500  | 170.000 | 292.500. | 455.000. | 470.000 | 355.000 | 50 mg/ml      |
|                       | 421.250  | 435.000 | 477.500  | 422.500  | 443.200 | 481.250 | 25 mg/ml      |
|                       | 493.750  | 517.500 | 483.750  | 560.000  | 510.000 | 490.000 | 12,5 mg/ml    |
|                       | 507.500  | 535.000 | 571.250  | 520.000  | 541.250 | 546.875 | 6 mg/ml       |

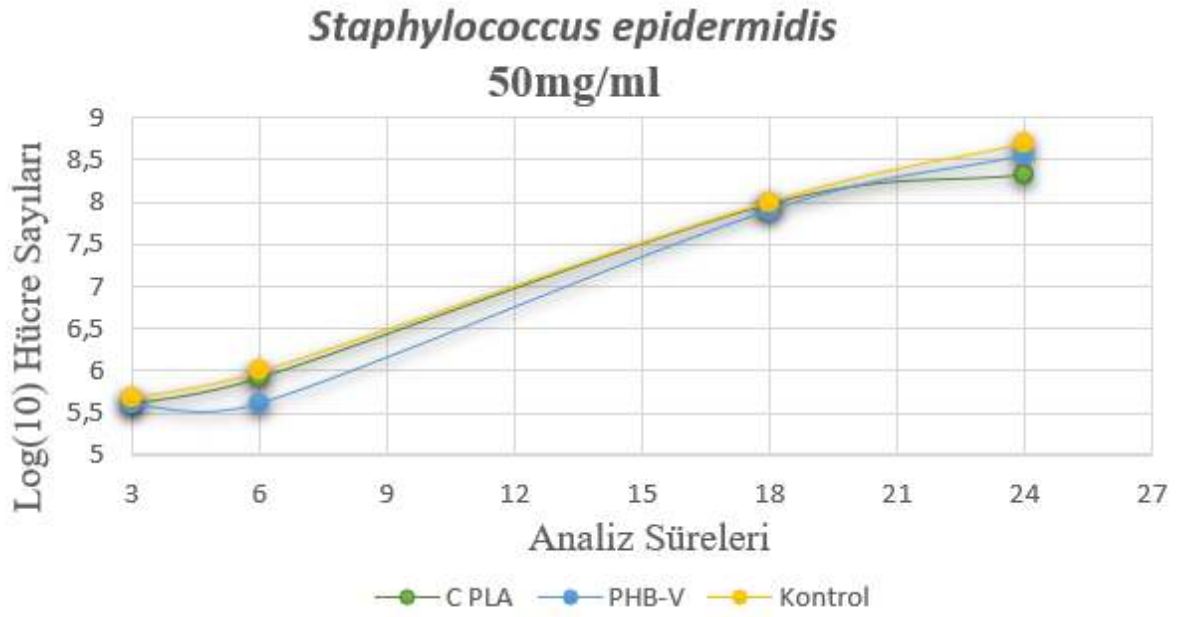
Bölüm 2.2.5.4'te de belirtildiği üzere kontrol grubuna karşı mikroorganizma sayısının yarısını inhibe etme yetisini log10 formasyonu ile tespit edilmektedir. Log10 formasyonunda kontrol grubu değerinden 0,30 ve daha altında bir değere sahip olunması o polimerik maddenin o saat dilimine ait olarak mikroorganizma sayısının en az yarısını inhibe edici etki gösterdiğinin kanıtı konumundadır. Örneğin: 24. Saat kontrol grubu 500.000.000 değerine sahiptir. Bu değer log10 formasyonunda 8,69 iken bu mikroorganizma sayının yarısı yani 250.000.000 değerinin log10 formasyonunda karşılığı 8,39dur. Bu durum her konsantrasyon için aynı duruma sahiptir.

Deneyisel çalışmalar sonucunda *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı kontrol grubuna kıyasla bakterilerin yarısını inhibe etme etkisi 4 polimerde çeşitli saat ve konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Çizelge 3.5 öncülüğünde diğer çizelge ve grafiklerde farklı açılardan da belirtildiği üzere:

- C-PLA-R-PLA polimerinin *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı 50mg/ml konsantrasyonunda ölüm zamanı 24.saat itibari ile tespit edilmiştir. (Figür 3.1)
- PHB-V ko-polimerinin *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı 50mg/ml konsantrasyonunda ölüm zamanı 6.saat itibari ile tespit edilmiştir. (Figür 3.1)



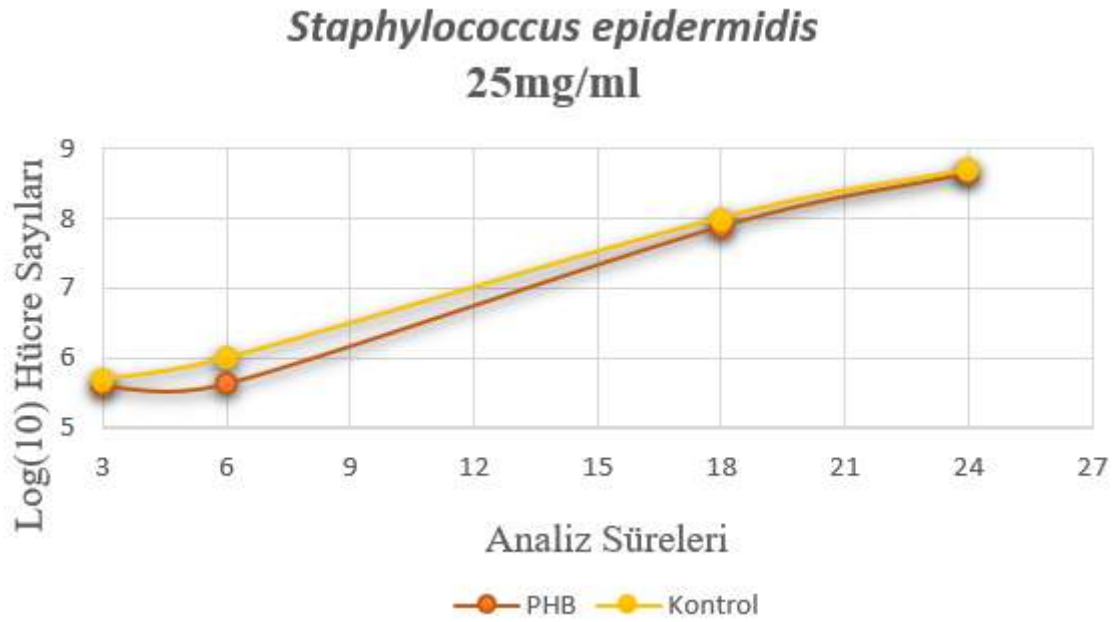
- PHB polimerinin *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı 25mg/ml konsantrasyonunda ölüm zamanı 6.saat itibari ile tespit edilmiştir. (Figür 3.2)



**Şekil 3.7** *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı C-PLA, PHB-V ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 50mg/ml konsantrasyona ait logaritmik değer grafiği

**Çizelge 3.6** Şekil 3.7’de log10 değerlerinin çizelge üzerinde gösterimi

| Süre    | Kontrol | C-PLA       | PHB-V       |
|---------|---------|-------------|-------------|
| 3.Saat  | 5,69    | 5,60        | 5,60        |
| 6.Saat  | 6       | 5,91        | <b>5,50</b> |
| 18.Saat | 8       | 7,97        | 7,90        |
| 24.Saat | 8,69    | <b>8,23</b> | 8,55        |



**Şekil 3.8** *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı PHB ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 25mg/ml konsantrasyona ait logaritmik değer grafiği

**Çizelge 3.7** Şekil 3.8’de ki log10 değerlerinin çizelge üzerinde gösterimi

| Süre    | Kontrol | PHB         |
|---------|---------|-------------|
| 3.Saat  | 5,69    | 5,60        |
| 6.Saat  | 6       | <b>5,52</b> |
| 18.Saat | 8       | 7,88        |
| 24.Saat | 8,69    | 8,64        |

*Staphylococcus epidermidis* bakteri suşuna karşı diğer test örnekleri ile eş zamanlı yapılan time-kill analiz yöntemi sonucunda çizelge 3.4’te yer alan pozitif kontrol bazlı ölçüm kontrolüne dayanarak kontrol grubunda yer alan hücre sayılarının, yukarıda belirtilen zaman aralıklarında en az yarısının inhibe edildiği hem çizelgelerde hem de grafiklerde belirtilmektedir.

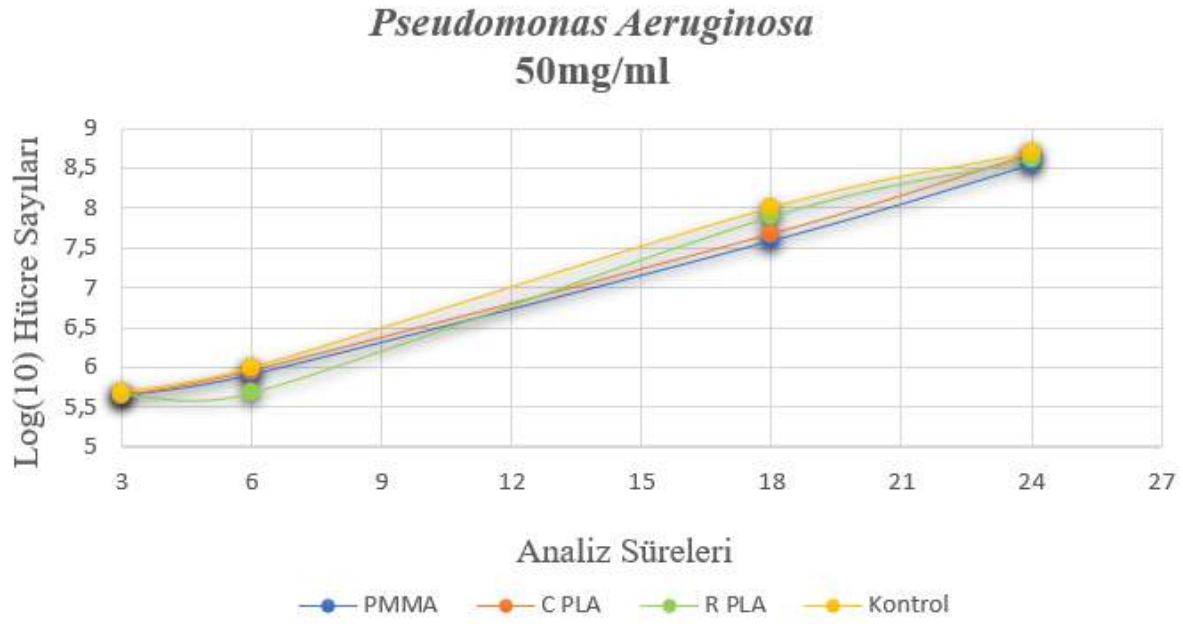
Çizelge 3.8’te, *Pseudomonas aeruginos* ile 6-50 mg/ml değişen konsantrasyonlarda polimerler ile inkübasyonu yapılan polimerlerin 625 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik absorbans değerleri için hesaplanan hücre sayıları verilmiştir.

**Çizelge 3.8** Ölüm Zamanı Analizi için Spektrofotometrik sonuçlar, *Pseudomonas aeruginosa*  
HS: Hücre sayısı CFU/ml X10<sup>3</sup>

|              | Polimer/Ko-polimerler |               |            |            |         |         | Konsantrasyon |
|--------------|-----------------------|---------------|------------|------------|---------|---------|---------------|
|              | PMMA                  | C-PLA         | R-PLA      | PCL        | PHB     | PHB-V   |               |
| Hücre Sayısı | <b>3. Saat</b>        |               |            |            |         |         |               |
|              | 432                   | 480           | 463        | 470        | 487     | 476     | 50 mg/ml      |
|              | 466                   | 471           | 489        | 462        | 479     | 485     | 25 mg/ml      |
|              | 459                   | 502           | 508        | 487        | 512     | 526     | 12,5 mg/ml    |
|              | 510                   | 500           | 539        | 491        | 507     | 534     | 6 mg/ml       |
|              | <b>6.Saat</b>         |               |            |            |         |         |               |
|              | 807                   | 898           | <b>321</b> | 966        | 948     | 880     | 50 mg/ml      |
|              | 887                   | 932           | 904        | 979        | 982     | 920     | 25 mg/ml      |
|              | 957                   | 947           | 917        | <b>283</b> | 987     | 973     | 12,5 mg/ml    |
|              | 961                   | 964           | 972        | 1.022      | 1.198   | 995     | 6 mg/ml       |
|              | <b>18.Saat</b>        |               |            |            |         |         |               |
|              | <b>26.000</b>         | <b>29.000</b> | 78.800.    | 96.500     | 92.800  | 108.000 | 50 mg/ml      |
|              | 103.300               | 81.500        | 93.200     | 98.600     | 126.600 | 116.000 | 25 mg/ml      |
|              | 95.500                | 91.700        | 89.200     | 86.500     | 101.500 | 129.000 | 12,5 mg/ml    |
|              | 116.900               | 124.400       | 109.700    | 133.400    | 147.300 | 118.200 | 6 mg/ml       |
|              | <b>24.Saat</b>        |               |            |            |         |         |               |
|              | 362.500               | 475.000       | 410.000    | 455.000    | 405.000 | 495.000 | 50 mg/ml      |
|              | 470.000               | 515.500       | 505.000    | 470.000    | 510.000 | 522.500 | 25 mg/ml      |
|              | 481.250               | 596.250       | 480.200    | 490.000    | 502.500 | 525.000 | 12,5 mg/ml    |
|              | 550.000               | 585.000       | 561.250    | 572.500    | 585.000 | 620.000 | 6 mg/ml       |

Çizelge 3.9 ve 3.10’da *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı etki gösteren polimerik biyomalzemelerin hücre sayı değerleri Log10 formasyonunda gösterilmiştir. Bununla beraber aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmalar sonucunda *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı kontrol grubuna kıyasla bakterilerin yarısını inhibe etme etkisi 4 polimerde çeşitli saat ve konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Çizelge 3.8 öncülüğünde diğer çizelge ve grafiklerde farklı açılardan da belirtildiği üzere:

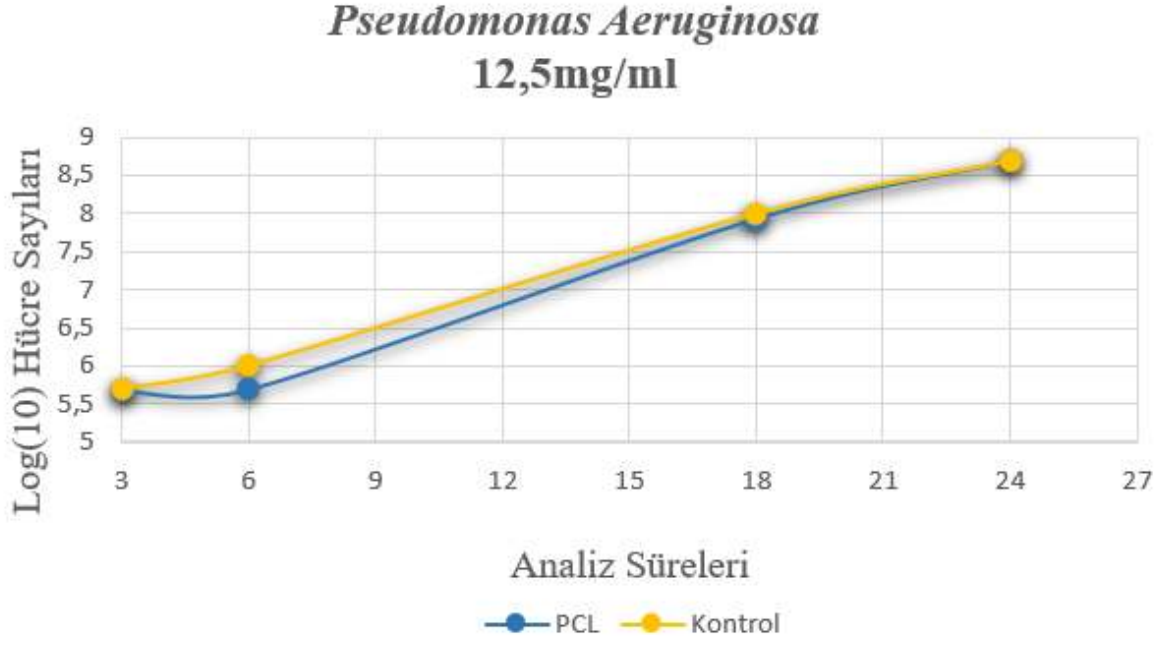
- PMMA ve C-PLA polimerinin *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı 50mg/ml konsantrasyonunda ölüm zamanı 18.saat itibari ile tespit edilmiştir. (Figür 3.3)
- PCL polimerinin *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı 12,5mg/ml konsantrasyonunda ölüm zamanı 6.saat itibari ile tespit edilmiştir. (Figür 3.4)
- R-PLA polimerinin *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı 50mg/ml konsantrasyonunda ölüm zamanı 6.saat itibari ile tespit edilmiştir. (Figür 3.3)



**Şekil 3.9** *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı PMMA, C-PLA, R-PLA ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 50mg/ml konsatrasyona ait logaritmik değer grafiği

**Çizelge 3.9** Şekil 3.9’da log10 değerlerinin çizelge üzerinde gösterimi

| Süre    | Kontrol | PMMA        | C-PLA       | R-PLA       |
|---------|---------|-------------|-------------|-------------|
| 3.Saat  | 5,69    | 5,63        | 5,68        | 5,66        |
| 6.Saat  | 6       | 5,90        | 5,95        | <b>5,50</b> |
| 18.Saat | 8       | <b>7,41</b> | <b>7,46</b> | 7,89        |
| 24.Saat | 8,69    | 8,55        | 8,67        | 8,61        |



**Şekil 3.10** *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı PCL ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 50mg/ml konsantrasyona ait logaritmik değer grafiği

**Çizelge 3.10** Şekil 3.10'da log10 değerlerinin çizelge üzerinde gösterimi

| Süre    | Kontrol | PCL         |
|---------|---------|-------------|
| 3.Saat  | 5,69    | 5,68        |
| 6.Saat  | 6       | <b>5,45</b> |
| 18.Saat | 8       | 7,93        |
| 24.Saat | 8,69    | 8,69        |

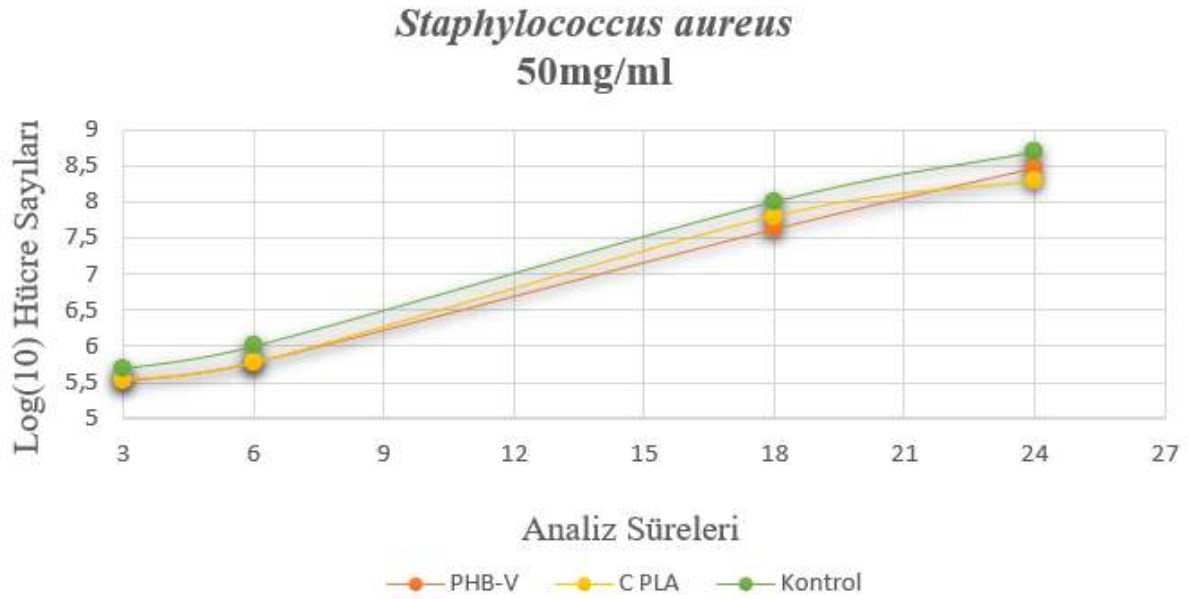
*Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşuna karşı diğer test örnekleri ile eş zamanlı yapılan time-kill analiz yöntemi sonucunda çizelge 3.4'te yer alan pozitif kontrolüne dayanarak belirtilen zamanlarda en az yarısının inhibe edildiği hem çizelgelerde hem de grafiklerde belirtilmektedir.

**Çizelge 3.11** Ölüm Zamanı Analizi için Spektrofotometrik sonuçlar, *Staphylococcus aureus*  
HS: Hücre sayısı CFU/ml X10<sup>3</sup>

|              | PMMA           | C-PLA          | R-PLA   | PCL     | PHB     | PHB-V         | Konsantrasyon |
|--------------|----------------|----------------|---------|---------|---------|---------------|---------------|
| Hücre Sayısı | <b>3. Saat</b> |                |         |         |         |               |               |
|              | 390            | 356            | 403     | 461     | 411     | 348           | 50 mg/ml      |
|              | 410            | 319            | 378     | 508     | 379     | 365           | 25 mg/ml      |
|              | 445            | 442            | 396     | 503     | 452     | 484           | 12,5 mg/ml    |
|              | 470            | 483            | 452     | 539     | 440     | 433           | 6 mg/ml       |
|              | <b>6.Saat</b>  |                |         |         |         |               |               |
|              | 820            | 608            | 717     | 808     | 748     | 593           | 50 mg/ml      |
|              | 855            | 839            | 709     | 860     | 822     | 757           | 25 mg/ml      |
|              | 917            | 791            | 871     | 812     | 991     | 763           | 12,5 mg/ml    |
|              | 968            | 834            | 1.115   | 954     | 1.034   | 946           | 6 mg/ml       |
|              | <b>18.Saat</b> |                |         |         |         |               |               |
|              | 77.800         | 63.400         | 69.800  | 72.800  | 59.700  | <b>31.800</b> | 50 mg/ml      |
|              | 81.000         | 94.700         | 84.100  | 122.100 | 88.500  | 92.400        | 25 mg/ml      |
|              | 95.000         | 99.210         | 104.200 | 98.550  | 82.600  | 105.100       | 12,5 mg/ml    |
|              | 106.000        | 117.460        | 139.400 | 101.300 | 97.100  | 87.690        | 6 mg/ml       |
|              | <b>24.Saat</b> |                |         |         |         |               |               |
|              | 406.000        | <b>148.750</b> | 338.000 | 466.000 | 374.600 | 297.500       | 50 mg/ml      |
|              | 473.000        | 488.125        | 532.500 | 400.000 | 439.100 | 503.800       | 25 mg/ml      |
|              | 525.000        | 530.625        | 486.980 | 547.500 | 528.700 | 472.000       | 12,5 mg/ml    |
|              | 510.000        | 558.125        | 671.030 | 515.650 | 626.500 | 490.200       | 6 mg/ml       |

Deneyisel çalışmalar sonucunda *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı kontrol grubuna kıyasla bakterilerin yarısını inhibe etme etkisi 2 polimerde çeşitli saat ve konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Çizelge 3.11 öncülüğünde diğer çizelge ve grafiklerde farklı açılardan da belirtildiği üzere:

- C-PLA polimerinin *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı 50mg/ml konsantrasyonunda ölüm zamanı 24.saat itibari ile tespit edilmiştir. (Figür 3.5)
- PHB-V polimerinin *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı 50mg/ml konsantrasyonunda ölüm zamanı 18.saat itibari ile tespit edilmiştir. (Figür 3.5)



**Şekil 3.11** *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı C-PLA, PHB-V ve Kontrol grubunun hücre sayılarının yer aldığı 50mg/ml konsantrasyona ait logaritmik değer grafiği

**Çizelge 3.12** Şekil 3.11’de log10 ki değerlerin çizelge üzerinde gösterimi

| Süre    | Kontrol | C-PLA       | PHB-V       |
|---------|---------|-------------|-------------|
| 3.Saat  | 5,69    | 5,55        | 5,54        |
| 6.Saat  | 6       | 5,78        | 5,77        |
| 18.Saat | 8       | 7,80        | <b>7,50</b> |
| 24.Saat | 8,69    | <b>8,17</b> | 8,47        |

*Staphylococcus aureus* bakteri suşuna karşı diğer test örnekleri ile eş zamanlı yapılan time-kill analiz yöntemi sonucunda çizelge 3.4’te yer alan pozitif kontrol bazlı ölçüm kontrolüne dayanarak kontrol grubunda yer alan hücre sayılarının, yukarıda belirtilen zaman aralıklarında en az yarısının inhibe edildiği hem çizelgelerde hem de grafiklerde belirtilmektedir.

Deney sonucunda kullanılan polimerik biyomalzemelerin farklı konsantrasyonlarda test edilmesi antimikrobiyal özellik bakımından etkin bir analiz sonucu açığa çıkarmıştır. Time-Kill deney metodunun sonucunda elimize kalan en net analiz avantajı diğer metotlarda edinilemeyen veya olmayan durum, konsantrasyon farkının hem kalitatif hem de kantitatif açıdan ele alınması

durumudur. Bu durum biyomalzemeler özelinde gözlemsel olarak antimikrobiyal özelliği analiz edip bir karara vardığımız sonucun hangi oranda doğru ve kaç kat iyileştirilebilir olduğunu saptamamızdaki detay bakımından ince işlenen bir metottur.

Değerler sonucunda ko-polimer ve polimerlerde *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhirium*, *E.Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* *Bacillus subtilis* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı, kontrol grubuna kıyasla herhangi bir saat ve konsantrasyon değerinde, bakteri sayısında net bir azalma (yarısını inhibe etme) etkisi bulunmamaktadır.

### 3.4 Plak Sayma Deneyi

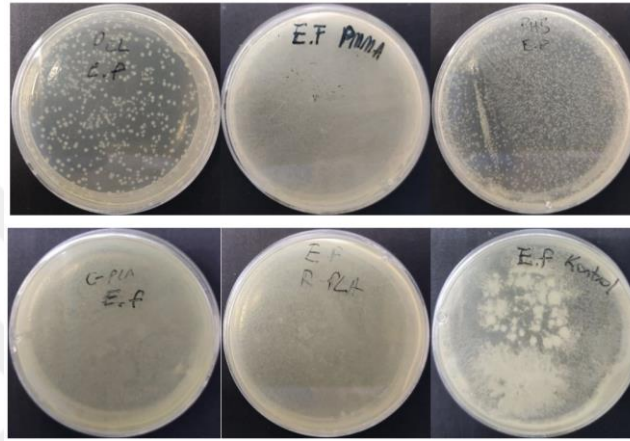
Üretilen biyomalzemelerin üzerinde test mikroorganizmalarının canlılıklarını, plak içerisinde oluşturdukları koloni sayılarının sayılması esasına dayanmaktadır. Koloni sayılarının test edilen malzeme üzerinde net bir özellik ayırımı yapılmasına olanak sağlamaktadır. Deneylerimizde kullanılan biyomalzemelerin bu kapsam dahilinde, biyomalzemelerin antimikrobiyal özelliklerinin var yok denilmesinden ziyade var ise hangi oranda veya kaç koloni üzerinde doğrudan etkisi var şeklinde analiz edebilme hedefi doğrultusunda uygulanmaktadır.

Sotoudehbagha ve arkadaşlarının (Sotoudehbagha vd. 2018) yapmış olduğu çalışma kapsamında bakılacak olunursa, üretilen metal matrisli kompozit biyomalzemelerin antimikrobiyal özelliklerinin plak sayma metodu ile malzeme oranlarının arttırılarak eklenmesinin üzerine, petri kaplarındaki sırası ile azalan koloni sayılarının gözlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Sun ve ekibinin (Sun vd. 2021) ele aldığı çalışmasında demir mangan alaşımının yine antimikrobiyal aktivite gösterip göstermediğini çeşitli süreler kapsamında (6 saat veya 24 saat gibi) plak sayma metodu ile koloni sayısının zamana bağlı doğrusal korelasyonu temel alınarak analiz yapılmaktadır. Plak sayma metodunun üretilen karakteristik biyomalzemelerde antibakteriyel özellik değerlendirilmesinin yer aldığı çeşitli tezlerde mevcuttur. Bu çalışmalarda da yukarıdaki makalelerde de yer aldığı gibi biyomalzemenin hangi oranda katkılanarak antibakteriyel özelliğin koloni sayısındaki değişim yüzdesi ile belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Batıbay 2021; Kılıç 2021).

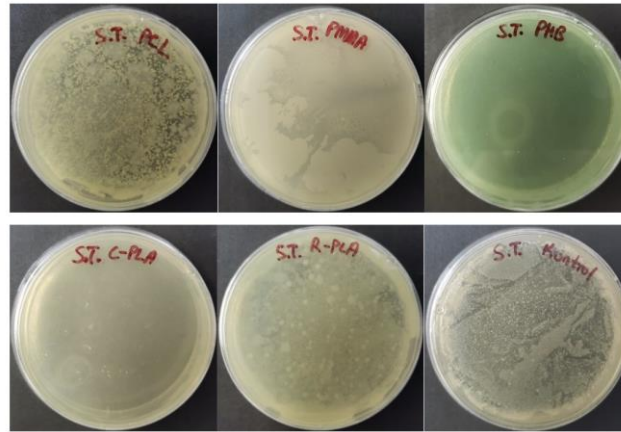


### 3.4.1 Polimer ve Kompozit Polimer Biyomalzemeler

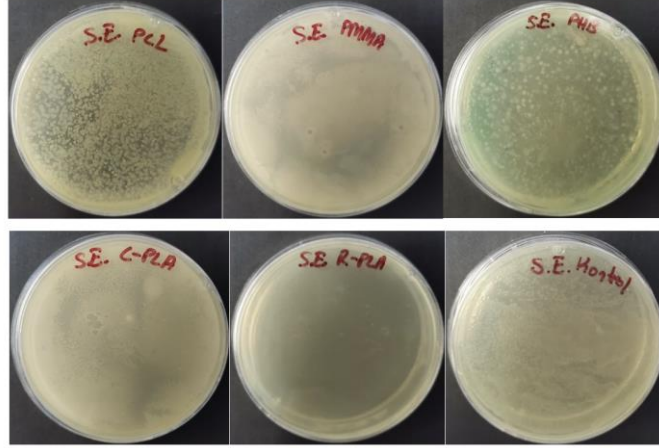
Deneyisel çalışmalarımızda yer alan polimer ve kompozit polimer olan biyomalzemelerin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.1.2’de yer alan test mikroorganizmalarına karşı plak sayma metodunda incelenmiştir. Deney sonuçlarında anlamlı olan bulgular sırası ile şekil 3.7 - 3.9’da polimer ve kompozit polimerlerin ilgili test mikroorganizmalarına karşı deneyin sonuç görselleri yer almaktadır. Görsellerde sırası ile yer alan polimerik malzemeler PCL - PMMA - PHB - C PLA - R PLA ve Kontrol şeklindedir.



Şekil 3.12 Polimer biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi: *Enterococcus faecalis*.



Şekil 3.13 Polimer biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi: *Salmonella typhrium*.



**Şekil 3.14** Polimer biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi: *Staphylococcus epidermidis*.

Polimerik biyomalzemelerin plak sayma sonucunda net bir antimikrobiyal ayırım gözlenmediği için tablo yerine sözlü olarak ifade edilecek olunursa, şekil 3.50, 3.52 ve 3.53 numaralı şekillerdeki mikroorganizmalara karşı PCL polimerinin petri kabında, kesin bir antimikrobiyal özellik göstermemesine rağmen kontrol numunelerinden sayıca daha az koloni üremesi gözlemlenmiştir (Bu gözlem kolonilerin daha az olduğu yönünde olup sayım aşamasının yapılamamasından kaynaklı ifadeler nicel olarak yapılmaktadır). Yine PCL polimerinin petri kabında ve ek olarak PHB polimerinin petri kabında şekil 3.49, 3.51 ve 3.56’ta kontrol numunelerine kıyasla sayıca daha az koloni ürettiği tespit edilmiştir.

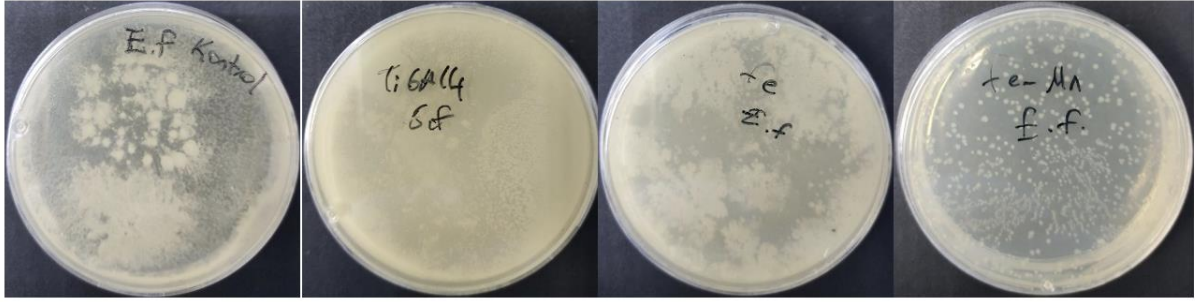
Kontrol numunelerine karşı da olsa bir miktar az üreme gösteren bu polimerler dışında geri kalan polimerler ve mikroorganizma testlerinde herhangi bir antimikrobiyal etki olarak yorumlanabilecek bir bulguya rastlanmamıştır. Yapılan bu analiz sonucunda diğer metotlarda da belirtildiği üzere polimerin antimikrobiyal etkilerinin hiç olmadığı kanısına varılmadığı için, içerik miktarı ve yoğunluğu ile ilgili değişikliklerin bu özellik gösterimini etkileyebileceği bir kez daha ortaya konulmuştur.

**Çizelge 3.13** Plak Sayma metodu, Polimerik malzemelerin koloni sayıları.

|                                   |                                   |      |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------|
| <i>Enterococcus faecalis</i>      | PCL                               | 215  |
|                                   | PHB                               | >468 |
|                                   | PMMA, C- PLA, R-PLA, Kontrol      | >750 |
| <i>Salmonella tyhpriium</i>       | PCL                               | >481 |
|                                   | PMMA, C- PLA, R-PLA, PHB, Kontrol | >750 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | PCL                               | >520 |
|                                   | PHB                               | 162  |
|                                   | PMMA, C- PLA, R-PLA, Kontrol      | >750 |
|                                   |                                   |      |

### 3.4.2 Metal ve Metal Alaşım Biyomalzemeler

Deneyisel çalışmalarımızda yer alan metal ve metal alaşım özellikli olan biyomalzemelerin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.1.2’de yer alan test mikroorganizmalarına karşı plak sayma metodunda incelenmiştir. Deney sonuçlarında anlamlı olan bulgular aşağıda sırası ile şekil 3.10 - 3.12’de ilgili test mikroorganizmalarına karşı deneyin sonuç görselleri yer almaktadır. Görsellerde sırası ile Kontrol - Ti6Al4V - Fe - FeMnZnO yer almaktadır.



Şekil 3.15 Metal ve metal alaşım biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi *Enterococcus faecalis*.



Şekil 3.16 Metal ve metal alaşım biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi *Salmonella typhirium*.



Şekil 3.17 Metal ve metal alaşım biyomalzemelerin plak sayma metodu deneyi *Escherichia coli*.

Metal ve metal alaşım olan biyomalzemelerin plak sayma metodu sonuçlarında ilk dikkat edilen nokta, yeni üretilen FeMnZnO biyomalzemesinin tüm mikroorganizmalara karşı kontrol

numunesi başta olmak üzere hem Ti6Al4V hem de Fe malzemesine karşı antimikrobiyal özellik açısından gözle görülür bir derecede farklılık yaratmıştır. Ayrıca bir diğer etkin sonuç ise şekil 3.61’de yer alan görsellerde de görüldüğü üzere hem FeMnZnO hem de saf Fe malzemesi net bir antimikrobiyal özellik göstererek herhangi bir mikroorganizma (E.coli) kolonisinin üremesine olanak sağlamamışlardır. Bu etkin bulgular sayesinde, FeMnZnO biyomalzemesinin özellikle *Enterococcus faecalis* > *Escherichia coli* > *Staphylococcus aureus* şeklinde bu mikroorganizmalara karşı Saf demirin ise *Escherichia coli*’ye karşı biyomalzeme içeriğinden kaynaklı üstün bir antimikrobiyal aktivite özelliği gösterdiği tespit edilmiştir.

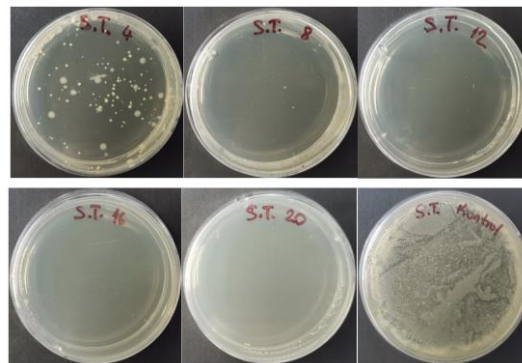
**Çizelge 3.14** Plak Sayma metodu, Metal ve Metal alaşım malzemelerin koloni sayıları.

|                              |                       |      |
|------------------------------|-----------------------|------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Fe-Mn                 | 243  |
|                              | Kontrol - Ti6Al4V- Fe | >750 |
| <i>Salmonella typhrium</i>   | Fe-Mn                 | >277 |
|                              | Kontrol - Ti6Al4V- Fe | >750 |
| <i>Escherichia coli</i>      | Fe - Fe-Mn            | 0    |
|                              | Kontrol - Ti6Al4V     | >750 |

### 3.4.3 Kompozit Biyomalzemeler

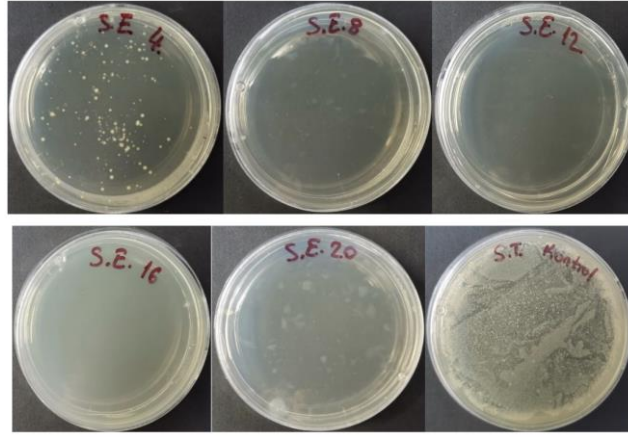
DeneySEL çalışmalarımızda yer metal matrisli kompozit biyomalzemeler ve çinko metalinin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.1.2’de yer alan test mikroorganizmalarına karşı plak sayma metodunda incelenmiştir. Deney sonuçlarında anlamlı olan bulgular sırası ile şekil 3.13 - 3.16 arası ilgili test mikroorganizmalarına karşı deneyin sonuç görselleri yer almaktadır.

Görselde sırası ile yer alan malzemeler **4:** Çinko metal, **8:** Çinko+Titanyum, **12:** malzeme içeriğinin %3 oranında çinko içeriğinin artmış hali, **16:** malzeme içeriğinin %6 oranında çinko içeriğinin artmış hali, **20:** malzeme içeriğinin %9 oranında çinko içeriğinin artmış hali şeklindedir.

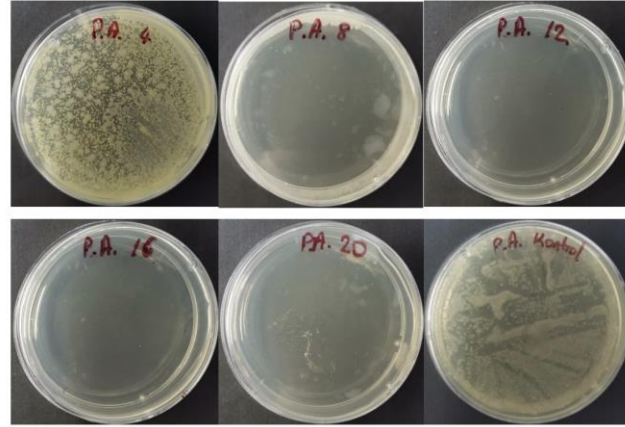


**Şekil 3.18** Kompozit ve çinko metal biyomalzemelerinin plak sayma metodu deneyi *Salmonella typhirium*.

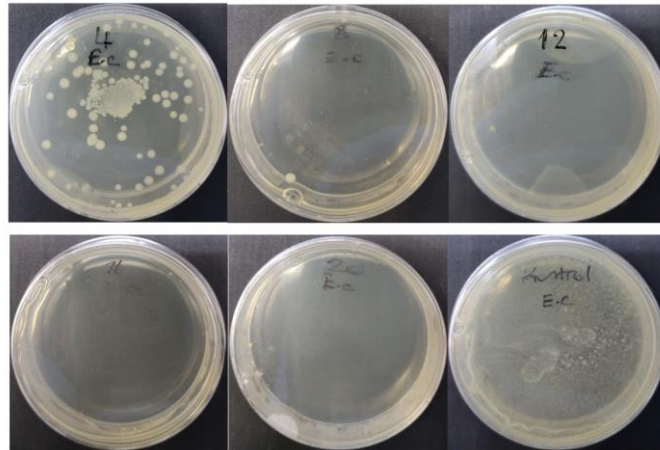




**Şekil 3.19** Kompozit ve çinko metali biyomalzemelerinin plak sayma metodu deneyi *Staphylococcus epidermidis*.



**Şekil 3.20** Kompozit ve çinko metali biyomalzemelerinin plak sayma metodu deneyi *Pseudomonas aeruginosa*.



**Şekil 3.21** Kompozit ve çinko metali biyomalzemelerinin plak sayma metodu deneyi *Escherichia coli*.

Plak sayma metodu sonucunda kompozit malzemelerin ve çinko metalinin deneysel amaç göz önünde bulundurularak, verdikleri antimikrobiyal aktivite oranları yani petrilerde üreyebilen

koloni sayıları çizelge 3.10’da verilmiştir. Tablodaki koloni sayıları *CFU*/ul şeklinde belirlenmiştir.

**Çizelge 3.15** Plak sayma metodu sonucunda kompozit malzemelerin ve çinko metalinin petri kabındaki koloni sayıları.

| Örnek No /<br>Suşlar | 4    | 8  | 12 | 16 | 20 |
|----------------------|------|----|----|----|----|
| <i>E.F.</i>          | >310 | 0  | 0  | 0  | 0  |
| <i>S.T.</i>          | 88   | 7  | 0  | 0  | 0  |
| <i>S.E.</i>          | 104  | 1  | 0  | 0  | 0  |
| <i>P.A.</i>          | >589 | 11 | 0  | 0  | 0  |
| <i>E.C.</i>          | >117 | 2  | 0  | 0  | 0  |
| <i>K.P.</i>          | 35   | 18 | 0  | 0  | 0  |
| <i>B.S.</i>          | 56   | 3  | 0  | 0  | 0  |
| <i>S.A.</i>          | 2    | 0  | 0  | 0  | 0  |

Kompozit biyomalzemeler ve çinko metalinin plak sayma deneyleri sonucunda, ilk dikkat çeken noktanın malzeme gruplarında katkılama oranlarının artması ile (12, 16, 20) bütün test mikroorganizmalarının petri kaplarında herhangi bir bakteri kolonisi tespit edilmemiştir. Sırası ile çalışılan tüm suşlarda birbirlerini takiben (4, 8) tespit edilen bakteri koloni sayılarında dikkate değer bir düşüş saptanmıştır. Bu sonuçlar ışığında katkılama oranı 12’den büyük olan tüm katkı etkilerinde net bir antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. Deney görsellerinde tüm test mikroorganizmalarının özellikle 4 numaralı numunelerde bazı yoğun üreme bölgeleri oluşturduğu ve bu bölgelerin inokülüm ve mikroorganizma kaynaklı olup herhangi bir kontaminasyonun söz konusu olmadığı kısaca üst üste gelmiş koloni kümeleri olduğu detaylı mikroskobik analiz onucunda saptanmıştır. Bu metal matrisli kompozit malzeme grubunun çeşitli katkılama yapılan malzemelerin antimikrobiyal aktivite oranlarında, katkı oranı artmasını takiben doğrusal bir korelasyon gözlemlenmiştir. Çalışılan malzeme grubunun, süreç içerisindeki antimikrobiyal aktivite gösteriminin zamana karşı stabilizesinin netleşmesi, çalışmanın çeşitli mikroorganizmalar kapsamında ilerletilebilmesi ve yeni malzeme gruplarının çalışılabilmesi açısından bu doğrusal korelasyon çok büyük bir önem arz etmektedir.



## BÖLÜM 4

### TARTIŞMA

#### 4.1 Sterilizasyon

Otoklav ile her deney öncesi aynı protokol uygulanarak öncesinde otoklav içerisine 1 litreye kadar saf su eklenir. Steril edilecek malzemeler daha stabil durması ve uygunluğu için derin tabanlı beherler içerisine konularak, beherin ağzı tam kapatılmayacak şekilde (otoklav prensibine uygun olarak beher içerisine buhar basıncı etki etmesi amacıyla) alüminyum folyo ile örtülerek kazanlar içerisine malzemeler yerleştirilir. Ardından son aşama olarak seçilerek 121C° 15 dakika sterilizasyon işlemi gerçekleştirilir.

Deney öncesi yapılan otoklav işlemleri aynı süreç takip edilerek her bir deneyin sonrasında deneyin sonuçları not edildikten sonra kullanılan cam ve metal malzemeler için tekrarlanır. Deney sonucunda tüpler içerisindeki kalan besi yeri ve mikroorganizmalar ayrı boş ve derin bir behere doldurulup bu kez sterilizasyon numunesi sıvı olduğu için otoklavda 121C° seçilerek 20 dakika sterilizasyon işlemi gerçekleştirilir.

Diğer bir yandan deney sonucunda steril edilecek numuneler agarlı bir petri kabı olduğunda ise yine aynı şekilde derin tabanlı bir beher içerisine petri kapları üst üste konularak (Sterilizasyon sonrasında beherden sıvı taşmaması için tamı tamına doldurulmamalıdır. 121C° 15 dakika sterilizasyon işlemi yapılır.

UV ışık ile sterilizasyon işlemlerinin cam ve metal olmayan malzemelerin sterilizasyonunda kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan polimer ve seramik biyomalzemelerin otoklavdaki yüksek basınca maruz bırakmadan, sterilize etmek amacıyla deney öncesi her iki yüzeyi de laminar kabin içerisinde UV ışık altında sterilizasyon işlemi yapılır. Otoklavda gerçekleştirilen malzeme sterilizasyonunun aynısı deney içerisindeki metal biyomalzemeler için UV ışık altında da sterilize edilerek aynı deneyler tekrar edilmiştir. Bu tekrarlar sonucunda hem otoklav hem de UV ışının sterilizasyon açısından deney kontaminasyon olumsuz yönde etkileyecek bir ayırım olup olmadığı incelenmiştir.

Deneyisel çalışmamızın, süreçleri başlamadan önceki hazırlık evrelerinde her deney için belirli bir standartta hem malzeme hem de kullanılan test mikroorganizmaları arasında sağlanması



deney sürecine ve sonucuna doğrudan etki etmektedir. Bu etki oranını en sağlıklı düzeyde tutabilmek için bahsedilen optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

## **4.2 Antimikrobiyal Aktivite Yöntemi Temelli Analiz**

Antimikrobiyal aktivite analiz yöntemlerini tez kapsamında, yöntemlerin kendi içerisindeki, analiz açısından sağladıkları olumlu yanlar ve etkilendikleri olumsuz yanların ele alınması, diğer yöntemler ile aralarındaki doğrusal ya da doğrusal olmayan korelasyonların incelenmesi ve antimikrobiyal aktivite yöntemlerine tabi tutulan biyomalzemelerin kendi içerisindeki araştırma sonuçları üzerine değerlendirme yapılmıştır.

### **4.2.1 Agar Disk Difüzyon Metodu**

Agar disk difüzyon yönteminde test edilen malzemenin yapısal formu ve fiziksel durumunun analize etkisinin en az olduğu test yöntemi olmaktadır. Örneğin: Çalışılan biyomalzemelerde toz form ya da katı formda olan malzemelerin olması, toz formda bulunan malzemelerin çözünürlük durumunun olup olmaması var ise çözündürülüp steril disklerle emdirilmesi yok ise presleme işlemi yapılarak katı disk haline getirilmesi, katı formda ise bu katı maddenin yüzey özellikleri ve kalınlığı gibi unsurların en esnek şartlarda test edildiği yöntem agar disk difüzyon yöntemi olarak tespit edilmiştir. Ayrıca seramik malzemelerin toz formda olması ve çözünürlük durumlarının net olmamasından kaynaklı tez kapsamında yapılan metotlardan sadece agar disk difüzyon metodu analiz edilmelerine elverişli olmuştur.

Analiz sonucunda değerlendirme yapılırken yöntemin olumlu yanı olan farklı tip malzemeler ile çalışılmasının getirdiği olumsuz yanlarda mevcuttur. Örneğin: Çalışılan katı malzemelerin yüzeylerinin katı agar üzerine mikroorganizma ekimi gerçekleştikten sonra agar yüzeyine yerleştirildiğinde yüzeyde kayma işlemi gerçekleşiyor ve bu hassasiyet sağlanmazsa inkübasyon sonucunda zon çapı için sağlıklı bir veri elde edilememektedir. Bu hassasiyet deney sırasında ve inkübasyon süresinde sürekli olarak sağlanmalıdır. Bu hassasiyetin yapılamayacağı durumlarda malzeme boyutuna elverişli olarak, agar disk difüzyon deneyine paralel olan agar kuyu difüzyon metodu uygulanabilir. Bir diğer olumsuz etki ise kullanılan malzemelerin metal esaslı olmasına bağlı olarak oksijen ve sıvı ile temas sonucunda oksitlenme gözlemlenebilmektedir. Bu durum etkin zon çapı ölçümleri için elverişli bir durum değildir. Bu tip malzemelerin yüzeylerinin çok temiz ve istenilen durumda iken deneye başlamak ve deney süresini minimumda tutarak (18-24 saat) malzemenin deforme olmasından sonuçların elde edilmesi araştırmacıları en sağlıklı sonuçlara yönlendirebilmektedir.

Agar disk difüzyon metodu malzeme türüne göre verdiği sonuçlar bakımından plak sayma yöntemi ile doğrusal bir korelasyon göstermiştir. Örneğin: Kompozit malzemeler ve malzeme türünden kaynaklı net ölçümlerin alınamadığı metal malzemelerin etkinlerinin plak sayma metodu ile takip çalışması yapıldığında agar disk difüzyonun yöntem içindeki malzeme kaynaklı olumsuzluğuna rağmen plak sayma çalışmaları için öncü bir çalışma grubu oluşturduğu net verilerle gözlemlenmiştir. Bu yöntemlerin malzeme türü de imkan verdiğinde eş zamanlı olarak çalışılması sonuçların netliği ve sağlamlığı açısından üst düzey bir oran vermektedir.

Sonuç olarak Agar disk difüzyon yöntemi geleneksel, bilinirliği yüksek, maliyet açısından ucuz ve malzeme yelpazesi geniş olmasına karşın yöntem ve malzeme içi barındırdığı olumsuzluklar yöntemin malzeme türüne göre net bir etkinlikte verim verebileceğini tam olarak ön görmemektedir.

#### **4.2.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirleme Yöntemleri**

Minimum İnhibisyon konsantrasyonun belirlenmesinin farklı iki temelli yöntemle sahip olmasının derin bir analiz kaynağı ve sonuçların etkin şekilde karşılıklı yorumlanabilmesi imkanını sağlamaktadır.

##### **4.2.2.1 E Test Yöntemi**

E test metodunda bilinen E test çalışmalarından farklı olarak tek bir test şeridine etkin bir madde emdirilerek yapılan gözlemsel sonuçlardan ziyade, maddelerin farklı konsantrasyonlarının (50-25-12.5-6) filtre disklerine emdirilmesi sonucunda zon çapının hangi disk etrafında da görüleceği esasına dayanmaktadır. Tez kapsamında yer alan polimer ve ko polimer malzemeleri çözünürlük avantajından kaynaklı olarak bu yöntemde yer almaktadırlar. E test metodu çözünürlük durumu aktif olan malzemelerin sonuç alacağı bir yöntem grubu olmasından kaynaklı time kill- ve seri dilüsyon yöntemi dışında kalan yöntemler ile yakın bir malzeme yelpazesi bulunmamaktadır. Tüm agar disk temelli yöntemlerin ortak sorunu etken maddenin disk içerisinden agara nüfuz etmesi ve mikroorganizmayı inhibe etmesi esaslı olduğu için bu yöntemlerde disk içerisine emdirilen konsantrasyonların özenle seçilmesi ve konsantrasyon farklarının sabit tutulması madde ve yöntem açısından en sağlıklı sonuçların alınmasına yarar sağlamaktadır.

E test yöntemi malzeme ve deneysel amaç bakımından seri dilüsyon ve time-kill yöntemleri ile benzerlik gösterse de maddenin diskten agara yayılımının etkinliği sıvı besiyeri içerisinde

gerçekleştirilen yöntemlerden sonuç analizi olarak daha az etkin olduğu net şekilde tespit edilmiştir. Yöntemlerin amacı doğrultusunda etkin bir MIC tayini E test metodunda diğer doğrusal korelasyon gösterdiği yöntemlerden daha az efektif olduğu için yöntemin dezavantajları arasında yer almaktadır. Örneğin: E test metodunda MIC olarak gözlemlenmeyen mikroorganizma ve konsantrasyon diğer MIC belirleme metodunda tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yöntem içinde malzemenin farklı konsantrasyonlarının yer aldığı durumda MIC olarak nitelendirilen bir sonuç vermesi yöntemin aktif şekilde sonuç verdiği fakat deneysel sonuçların hassasiyeti ve derinliği ile ilgili korelasyon kurduğu diğer MIC çalışmalarının bir ön çalışması niteliğinde olduğu tespit edilmiştir. Bu yöntemlerin malzeme türü de imkan verdiğinde eş zamanlı olarak çalışılması sonuçların netliği ve sağlamlığı açısından üst düzey bir oran vermektedir.

#### **4.2.2.2 Seri Dilüsyon sonrası Spektrofotometrik Analiz**

Bir diğer MIC belirleme yöntemi olan seri dilüsyon yöntemi E test ile bir korelasyon halinde olduğu tespit edilmiştir. Bu korelasyonun deney sonuçlarını sağlamlaştıran ve analizi kantitatif olarak bir üst seviyeye çıkaracak yöntem olması metodun en belirgin avantajları arasında yer almaktadır. Seri dilüsyon metodunun 24 saat inkübasyon ardından spektrofotometre kullanılarak absorbans değerleri alınıp bu değerleri tüp içerisindeki o ana ait olan hücre sayılarının tespiti konusunda etkin çalışması bu deney metodunun hassasiyeti ve bu tip malzeme gruplarında e test öncül çalışmasının yapılmasını takiben mutlaka analiz yöntemi olarak değerlendirilmesi gerektiği tez çalışmamız kapsamında tespit edilmiştir. Örneğin e test yönteminde elde edilen sonucun seri dilüsyon yönteminde test edilmesi ve E test metodunda yer almayan ya da maddenin o yöntem bazında etkinliğinin gözlemsel olarak belirlenememesi sonucunda hatalı karar verme durumun önüne geçilmesi için net bir destekleyici faktör olarak görev yapmaktadır.

MIC hesaplanmasının yöntem bazında 24. saat inkübasyon sonucu bakılması bu süreç içerisinde etkinliği çok yüksek ve sürekli seviyede olmayan maddelerin 24. saat sonucunda mikroorganizmaların üremesini önleyemediği fakat inkübasyon sürecinin farklı dilimlerinde bunun gerçekleşebileceği tespiti açık bir konudur. Bu durum göz önüne alınarak nasıl E test metodu seri dilüsyon yöntemine öncü bir çalışma olarak destek veriyorsa, seri dilüsyon yöntemi de time-kill metoduna öncülük eden ve hangi mikroorganizmanın ve maddenin bir üst derinlikte araştırılması konusuna ışık tutmaktadır.

#### 4.2.3 Zamana Bağlı Ölüm Testi (Time-Kill Yöntemi)

Zamana bağlı ölüm testinde bir üst başlıkta belirtildiği üzere E test, seri dilüsyon ve time-kill çalışmaları aynı paralellikte farklı derinliklerde hesaplama yapılan analiz yöntemleridir. Time kill metodu kendi içerisinde analiz edilen madde ve analizi yapan kurum neticesinde zamansal olarak farklılık gösterebilir fakat her bir zaman diliminde absorbans değerlerinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu tez kapsamında her bir zaman diliminden (3,6,18,24) sonra spektrofotometre kullanılarak absorbans değerleri ile hücre sayıları belirlenerek sonuçlar yorumlanabilmektedir. Time-kill yönteminin üstün avantajlarından biri de yöntem içerisinde sonuca gidebilecek iki farklı kantitatif yol bulunmasıdır. Bu tez kapsamında olduğu gibi absorbans değerleri kullanılmasının yanı sıra her bir zaman diliminden sonra agarlı petrilere ekim yapılarak inkübasyon sonucunda kolonilerin sayılarak matematiksel veri eldesi sağlanır. Bu avantaj, yöntemin malzeme konusunda E test ve seri dilüsyon olduğu gibi çözünürlük durumu ile ilgilenirken, yöntemin çalışılacağı laboratuvar imkanına göre de elverişli olmasıdır diğer yöntemlerden pozitif olarak ayırılmasını sağlamaktadır.

Bu tez çalışması, tercih edilebilirlik ve net sonuçların alınması açısından malzeme durumu göz önünde bulundurarak maliyet durumu analiz olanakları yöntemin yapılacağı ortam ve yöntemlerin sıkça tekrarlarının yapılması gibi konuların değerlendirilmesi açısından bir basamak çalışması özelliğinde imkanlara göre sırası ile ya da tek başına E test, seri dilüsyon ve time-kill yöntemlerinin yapılmasını sonuçların derinliği sağlamlığı ve yinelenebilirliği açısından değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır.

Yöntemin negatif olarak sayılabileceği bir durum ise tüp içerisinde spektrofotometre ile ölçümde maddenin üremesini engellediği durumların dışında mikroorganizmaların inkübasyon sonucunda kendiliğinden öldüğü durumlarda absorbans değerine bu durumun etkisi göz ardı edilmemelidir. Bu durumu da desteklemek ve soru işaretlerinin giderilmesi için her bir zaman diliminde spektrofotometre ile ölçüm alınırken eş zamanlı olarak katı agara her konsantrasyondan ekim yapılarak, ölü canlı hücre farkını net şekilde yöntemi değiştirmeden, gidiş yolunu farklılaştırarak sonuca net şekilde varılabilmektedir.

Sonuç olarak MIC sonrası MIC konsantrasyonun veya diğer konsantrasyonların hangi zaman diliminde etkinlik olanaklarının incelenmesi açısından tek başına etkin olabileceği gibi doğrusal korelasyon sağladığı yöntemler ile de eş zamanlı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

#### 4.2.4 Plak Sayma Metodu

Plak sayma metodu çözünürlük durumundan ziyade yöntem olarak diğer analiz yöntemlerine elverişli olmayan örneğin: agar disk difüzyon metodunda malzeme türü bazında net ölçüm alınamayan metal esaslı malzemeler veya Genel açıdan katı bir malzemenin ya da çözünme yeteneği olmayan bir maddenin, çözünme yeteneği olsa da düzgün bir yüzeye sahip olan malzemenin analizini kolayca ve etkin bir şekilde hücre sayısı temeline inerek net bir ayırım yapma durumu bulunmaktadır.

Analizin net bir antimikrobiyal aktivite analizi bazında agar disk difüzyon yöntemi ile doğrusal bir korelasyon ve eş tabanlı bir çalışma sunmaktadır. Agar disk difüzyon yönteminin hassasiyet olarak yetersiz kaldığı durumlarda plak sayma bu eksiliği dolduracak etkinlikte bir yöntem olduğunu, metal esaslı malzemeler veya agar disk difüzyon metodunda herhangi bir zon çap vermeyen fakat koloni sayısı olarak farklarını net şekilde gözlemlediğimiz polimerik biyomalzemenin etkinliğinin analiz edilmesine olanak sağlayan net bir analiz yöntemidir. Plak sayma metodu diğer agarlı yöntemlere nazaran kendi içerisinde araştırmacıya en çok bilgiyi veren yöntem olduğu malzemelerin hem mikroorganizmalar arasındaki etki değişiminin hem de bir mikroorganizma içerisindeki malzemelerin etki değişimini net şekilde koloni bazlı göstermesi esasına dayanır.

Sonuç olarak; tez kapsamında yapılan anttimikrobiyal aktivite çalışmalarının malzeme türüne özgü olarak seçimlerin yapılabileceği bir karşılaştırma yapılmıştır. Özellikle **E test seri dilüsyon ve time-kill deney** korelasyonu ile **agar disk difüzyon ve plak sayma** metodlarının birbirlerini tamamlama durumları net şekilde tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında hangi malzeme türüne sahip olduğunda bu türe ve bu malzeme türü için hangi antimikrobiyal aktivite testin seçilmesi gerektiği gibi hususlara cevap niteliği taşıdığı düşünülmektedir.

Her türden malzemenin ve sonuç kapsamı bakımından farklı analiz yöntemlerinin seçilmesi ve uygulanabilir her tür malzeme ile test edilmesi, çalışmanın malzeme ve istenilen antimikrobiyal test arasındaki doğru eşleşmenin sağlanması açısından büyük önem arz etmektedir. İlerleyen çalışmalarda malzeme türlerinin ve tür çeşitliğinin artması ve analiz yöntemlerinin farklılaştırılması ile çalışmaların yapılması için öncü ve elzem bir çalışma konumundadır.

## KAYNAKLAR

- Abbasoğlu U** (1996) Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22:111-18.
- Ahmed F Y, Aly U F, Abd El-Baky R M and Waly G F M** (2020) Comparative study of antibacterial effects of titanium dioxide nanoparticles alone and in combination with antibiotics on MDR pseudomonas aeruginosa strains. *International Journal of Nanomedicine*, 15:3393-3404.
- Akyıldız E** (2014) Ticari Hidroksiapatit Esaslı Üç Bileşenli Kompozit Biyomalzemelerin Üretimi ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 53s.
- Allhoff F** (2009) The Coming Era of Nanomedicine. *The American Journal of Bioethics* 9(10):3-11.
- Altuner E M** (2008) Bazı Karayosunu Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi, Ankara 300s.
- Anderson M J and Shive S M** (2012) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(Biocompatibility and tissue/material interactions):72-82.
- Arikan S, Yurdakul P, and Hascelik G** (2003) Comparison of Two Methods and Three End Points in Determination of In Vitro Activity of Micafungin against *Aspergillus spp.* *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 47(8):2640-43.
- Arikan S** (2007) Antifungal Duyarlılık Testleri: Neredeyiz. *İnfeksiyon Dergisi*, 21:69-70.
- Arrieta M P, Fortunati E, Dominici F, Rayón E, López J, and Kenny J M** (2014) PLA-PHB/cellulose based films: Mechanical, barrier and disintegration properties. *Polymer Degradation and Stability*, 107:139-49.
- Aydın İ, and Pasinli A** (2012) Ti6AL4V Malzeme Yüzeyine Oluşturulan Hidroksiapatit Kaplamanın Yüzey Pürüzlülüğünün İncelenmesi. *Mesleki Bilimler Dergisi, (MBD)* 1(2):112-18.
- Aydın M** (2004) Candida cinsi mantarlar (*C. albicans*). Ss. 1109-18, *Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji*, editör T. Cengiz, A. Mısırlıgil, ve M. Aydın. Güneş yayınevi.
- Abebe B, Zereffa E A, Tadesse A and Murthy Ananda H C** (2020) A Review on Enhancing the Antibacterial Activity of ZnO: Mechanisms and Microscopic Investigation. *Nanoscale Research Letters*, 15:2-19.
- Balouiri M, Sadiki M and Ibensouda S** (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2):71-79.
- Batıbay A B** (2021) Mekanik Alaşımlama Yöntemi İle Üretilen Ti-Nb Esaslı Alaşımlarının Mikroyapısal, Mekanik, Antibakteriyel ve Sitotoksik Özelliklerinin İncelenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 116 s.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Benelmekki M** (2015) An introduction to nanoparticles and nanotechnology. Ss. 2-4 *Designing Hybrid Nanoparticles*. Japan: Morgan & Claypool.
- Bennet R W and Monday S R** (2003) *Staphylococcus aureus*. Ss. 41-59 *In International Handbook of Foodborne Pathogens*, editör M. D. Miliotis, J. W. Bier, ve D. Marcel. New York, Basel: CRC Press.
- Berghaus J L, Giguère S, Guldbech K, Warner E, Ugorji U and Berghaus R** (2015) Comparison of Etest, Disk Diffusion, and Broth Macrodilution for In Vitro Susceptibility Testing of *Rhodococcus equi*. *Journal Of Clinical Microbiology* 53(1):314-18.
- Biocote Biocote** (2010) Biocote. 14 Temmuz 2020 (<https://www.biocote.com/tr/what-is-an-antimicrobial>).
- Birimoğlu T** (2010) Gümüş Tuzu Kullanarak Elde Edilen Tekstil Ürününün Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep, 66 s.
- Bozkaya Y** (2013) *İleri Teknolojiler Araştırma Birimi Tanıtımı*. Eskişehir s.8.
- Braunegg G, Lefebvre G and Genser K F** (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65(2-3):127-61.
- Breme J, Eisenbarth E and Biehl V** (2003) Titanium and its Alloys for Medical Applications. Ss. 423-51. *Titanium and Titanium Alloys: Fundamentals and Applications*, editör C. Leyens ve M. Pecers.
- Bulut B** (2014) Ticari İnert Cam Katkılı Hidroksiapatit-Alümina Ve Hidroksiapatit-Zirkonya Kompozitlerin Üretimi Ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul s130
- Cheng L, Cheng X, Deng M, Deng X, Du Q, Ge Y, Guo Q, He J, Jia W, Kang D, Kuang Y, Li C, Li M, Li Y, Li Y, Liu X, Lu C, Peng X, Qiu W, Sun Y, Wang H, and Wang S** (2015) Supragingival Microbes. Ss. 41-65 *Atlas of Oral Microbiology*, editör X. Zhou ve Yuqing Li. Elsever.
- Clancy C J, Huang H, Cheng S, Derendorf H and Nguyen M H** (2006) Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(7):2569-72.
- Clinical and Laboratory Standards** (1998) *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline*. Pennsylvania, 19087, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute** (2002) *Reference Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard*. Pennsylvania, 19087-1898, USA.: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute** (2008) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Filamentous Fungi, Approved Standard*. Pennsylvania, 19087, USA.: CLSI.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Clinical and Laboratory Standards Institute** (2012) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard*. Pennsylvania 19087, USA.: CLSI.
- CLSI** (2004) *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts*. C. 38. Pennsylvania, 19087-1898, USA.
- Costa-de-Oliveira S and Rodrigues A G** (2020) *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms*, 8(154):1-19.
- Çelik S E, Karaoğlu Ş, Ali S ve Özgümüş O B** (2006) İçme sularından izole edilen *Bacillus* suflarının identifikasyonu ve antibiyotiklere direnç profilleri. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*, 36(4):219-23.
- Çiçekler Tok N** (2006) Enterokoklarda Vankomisin Direnci. *Uzmanlık Tezi*, T.C Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul 50s.
- Çolak A** (2016) Hastaneden İzole Edilen Patojen Bakterilere Karşı Bitki Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, T.C. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 85s.
- Demir D** (2013) Dosetaksel İçeren Nanopartiküllerin Formülasyonu ve İn Vitro Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 94s.
- Demirkol N** (2013) Koyun Hidroksiapatit Esaslı Kompozitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu. *Doktora Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul s.136
- Demirpek U** (2010) *Antimikrobiyal Duyarlılık testleeri* 34 s.
- Desai V S and Kowshik M** (2009) Antimicrobial Activity of Titanium Dioxide Nanoparticles Synthesized by Sol-Gel Technique. *Research Journal of Microbiology*, 4(3):97-103.
- Duran H, Çeken N ve Atik T K** 2020. Antibiotic resistance rates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine culture: A four-year analysis. *ANKEM Dergisi*, 34(2):41-47.
- Duran H, Çeken N ve Atik T K** (2021) Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Direnç Oranları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 51(3):233-38.
- Fratzi P** (2007) Biomimetic materials research: what can we really learn from nature's structural materials? *The Royal Society*, 637-642.
- Geetha M, Singh A K, Asokamani R and Gogia A K** (2009) Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Progress in Materials Science* 54(3):397-425.
- Gök Ş M, Dağ H, Kara F, Arslan U ve Fındık D** (2020) Investigation of antibiotic resistance and virulence factors of *enterococcus faecium* and *enterococcus faecalis* strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 54(1):26-39.
- Gümüşderelioğlu M** (2002) Yeni Ufuklara Biyomalzemeler. *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi Eki*, 3:24.



## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gupta P, Khare V, Kumar D, Ahmad A, Banerjee G and Singh M** (2015) Comparative Evaluation of Disc Diffusion and E-test with Broth Micro-dilution in Susceptibility testing of Amphotericin B, Voriconazole and Caspofungin against Clinical Aspergillus isolates. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research*, 9(1):2013-16.
- Hench L L and Wilson J** (1984) Surface-Active Biomaterials. *Science*, 226(4675):630-36.
- Jang J, Hur H G, Sadowsky M J, Bayappanahalli M N, Yan T and Ishii S** (2017) Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123:570-81.
- Jones N, Ray B, Ranjit K T and Manna A C** (2008) Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 279:71-76.
- Josefsen M H, Löfström C, Olsen K E P, Mölbak K and Hoorfar J** (2011) *Salmonella*. Ss. 1023-35 In *Molecular detection of human bacterial pathogens*, editör D. Liu. Florida: CRC Press.
- Kahraman E P, Karakeçe E, Erdoğan F, Uluçurt H, Köroğlu M ve Çiftçi İ H** (2017) The evaluation of antibiotic resistance status of Klebsiella pneumoniae. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 9(1):12-18.
- Kel D** (2012) Doğal Kaynaklardan (yerli deniz kestanesi, yumurta kabuğu, salyangoz kabuğu) Nanoseramik Üretimi ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 85s.
- Kılıç F** (2021) Nanoyapılı fe-mn-zn Alaşımların Mekanik Alaşımlama Yöntemiyle Üretilmesi ve Özelliklerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak, 95s.
- Kouyate A, Ahoussou A, Rogez J and Benigni P** (2013) Application of Solution Calorimetry to the Prediction of  $20.15[(2.038 + x)SiO_2 - (1.457 - x)Na_2O] - 2.6-P_2O_5 - 26.95CaO$  Glass Bioactivity. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 3(1):123-129.
- Kubásek J and Vojtěch D** (2012) Zn-based alloys as an alternative biodegradable materials. *METAL*, 5:23-25.
- Lewis G** (2001) Properties of crosslinked ultra-high-molecular-weight polyethylene. *Biomaterials*, 22(4):371-401.
- Leydecker S** (2008) *Nano Materials: in Architecture, Interior Architecture and Design*. editör Birkhäuser Verlag AG. Springer Science & Business Media.
- Lo E, Aller A I, Martı C, Castro C, Ramirez M and Pema J M** (2006). Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: Comparison with CLSI broth microdilution method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3):1108-11.
- Long M and Rack H J** (1998) Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*, 19: 1621-39.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Maloray B, Löfsröm C, Honfar J, Schelin J and Rådström P** (2009) *Salmonella*. s. 447-58  
*In Molecular detection of foodborne pathogens*, editör D. Liu. CRC Press.
- Mehmetlioğlu C, Özüyağlı A, Akcan E, Şen Ş, Olgun U ve Şen U** (2016) Nano TiO<sub>2</sub> dolgulu polimer esaslı hidrofobik kaplamanın yüzey özelliklerinin incelenmesi  
Investigation of surface properties of nano TiO<sub>2</sub> filled polymer based hydrophobic coating. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1: 77-81.
- Meral M** (2013) Çok İşlevli Uyluk Çivisi Tasarımı, Üretimi ve Mekanik Özellikleri. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 79 s.
- Mike A and Kara J** (2002) *Materials and Design: The Art and Science of Material Selection in Product Design*. Elsevier S. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Muhaffel F** (2010) Mikro ark oksidasyon yöntemiyle titanyum esaslı implantların yüzey özelliklerin geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul teknik üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 80 s.
- Ooi C Y, Hamdi M and Ramesh S** (2007) Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone. *Ceramics International*, 33(7):1171-77.
- Orlovskii V P, Komlev V S and Barinov S M** (2002) Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics. *Inorganic Materials*, 38(10):973-84.
- Ormiston J A and Serruys P W** (2009) Bioabsorbable coronary stents. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 2(3):255-60.
- Öztürk D** (2020) Biyouyumlu Malzemelerin İşlenmesinde Çalışan Sağlığını Tehdit Eden Faktörlerin ve Alınabilecek Önlemlerin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, T. C. İstanbul Esenyurt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 51s.
- Paital S and Dahotre N** (2009) Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science and Engineering R* 66( Department of Materials Science and Engineering, The University of Tennessee, Knoxville, TN 37996, USA):1-70.
- Park J and Lakes R S** (2007) Definition of Biomaterials. s4. *Biomaterials An Introduction*. USA: Springer.
- Pasinli A ve Aksoy R S** (2010) Yapay Kemik Uygulamaları İçin Hidroksiapatit. *BiyoTeknoloji Elektronik Dergisi* ,1:41-51.
- Percival S L and Williams D W** (2014) *Escherichia coli*. Ss. 89-117 içinde *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*, editör S. L. Percival, D. W. Williams, N. F. Gray, M. V. Yates, ve R. M. Chalmers. Academic Press.
- Pérez C and Anesini C** (1994) In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 44:41-46.
- Pérez del Pino A, Fernández-Pradas J M, Serra P and Morenza J L** (2004) Coloring of titanium through laser oxidation: Comparative study with anodizing. *Surface and Coatings Technology*, 187(1):106-12.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Pfaller M A, Sheehan D J and Rex J H** (2004) Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2):268-80.
- Radenković G and Petković D** (2017) Metallic biomaterials. in *Biomaterials in Clinical Practice: Advances in Clinical Research and Medical Devices*, 183-224.
- Ratner B D, Hoffman A S, Schoen F J and Lemons J E** (2013) An Introduction to Materials in Medicine, *Biomaterials Science*, Elsevier, 1:22-47
- Reller B L, Weinstein M, Jorgensen J H and Ferraro M J** (2009) Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11):1749-55.
- Rivera-Briso A L and Serrano-Aroca A** (2018) Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications. *Polymers* 10(7):1-28.
- Salata O V** (2004) Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(3):1-6.
- Saygın H N ve Tepehan F Z** (2009) Titanyum dioksit ve çinko oksitten yansıtımayıcı filtre üretimi. *İTÜ dergisi*, 7(1):3-8.
- Siddiqi A, Alan G, Payne T, De Silva R K and Duncan W J** (2011) Titanium allergy: Could it affect dental implant integration? *Clinical Oral Implants Research* 22(7):673-80.
- Sönmez M** (2009) Polimer Matrisli Kompozitlerin Endüstri Ürünleri Tasarımında Önemi ve Geleceği: Türkiye’den Dört Örnek Firma Üzerine Bir İnceleme. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 183 s.
- Sotoudehbagha P, Sheibani S, Khakbiz M, Ebrahimi-Barough S and Hermawan H** (2018) Novel antibacterial biodegradable Fe-Mn-Ag alloys produced by mechanical alloying. *Materials Science and Engineering*, (C 88):88-94.
- Sun Y, Chen L, Liu N, Wang H and Liang C** (2021) Laser-modified Fe-30Mn surfaces with promoted biodegradability and biocompatibility toward biological applications. *Journal of Materials Science*, 56(24):13772-84.
- Şap S, Şap E ve Kırık İ** (2019) III. Uluslararası battalgazi bilimsel çalışmalar kongresi tam metin kitabı. Ss. 1052-59 *Titanyum ve Alaşımlarının Biyomalzeme Olarak Kullanılması*. Malatya, ISBN: 978-605-7811-13-4.
- Temiz A** (Ed.) (2000) *Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri*. Ankara: Hatiboğlu yayınevi, Ankara 117s.
- Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A and Nazemi J** (2010) Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 17:142-45.
- Tuncer S ve Akova M** (1997) *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonları. *FLORA Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(1):61-65.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Tünger A** (2004) *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ss. 9-22, Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları, editör S. Ulusoy, G. Usluer, ve S. Ünal. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
- Ulcay Y, Akyol M ve Gemci R** (2002) Polimer Esaslı Lif Takviyeli Kompozit Malzemelerin Arabirim Mukavemeti Üzerine Farklı Kür Metotlarının Etkisinin İncelenmesi. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 7(1):93-116.
- Ünal N, Aşkar Ş ve Yıldırım M** (2017) Antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from broiler cloacal samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41:199-203.
- Varışlı A, Altan N, Aksoy I B ve Aksu N** (2017) Antibiotic Resistance Rates of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Specimens by Years. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 74(3):229-36.
- Wang T, Zhang Z, Li Y and Xie G** (2015) Amplified Electrochemical Detection of *mecA* Gene in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* based on target Recycling Amplification and Isothermal Strand-Displacement Polymerization Reaction. *Sensors and Actuators B*, (221):148-54.
- White R L, Burgess D S, Manduru M, Bosso J A and Carolina S** (1996) Comparison of Three Different In Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 40(8):1914-18.
- Woodruff M A and Hutmacher D W** (2010) The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 35(10):1217-56.
- Xu L, Yu G, Zhang E, Pan F and Yang K.** (2007) In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application. *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res* (83A):703-11.
- Yagmurlu M, Korkusuz F F, Gün İ, Korkusuz P, Örs Ü, and Hasirci V** (1999) Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: In vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis. *John Wiley & Sons, Inc.* 494-503.
- Yasmin M, El Hage H, Obeid R, El Haddad H, Zaarour M and Khalil A** (2016) Epidemiology of Bloodstream Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at a Tertiary Care Hospital in New York. *American Journal of Infection Control*, 44(1):41-46.
- Yener B, Akçelik N, Şanlıbaba P ve Akçelik M** (2012) Çoklu ilaç dirençli *Salmonella* suşlarının tanısı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(4):201-12.
- Yetim A F** (2009) Biyomalzeme Olarak Kullanılan Aısı316l Paslanmaz Çelik Ve Ti6al4v Alaşımının Plazma İle Nitrüleme Davranışı, Ti-Dlc İnce Film Kaplama İle Karşılaştırılması. *Doktora Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 137s .

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Yılmaz M S** (2014) Nanomalzemelerin Mimaride Kullanım Olanakları. *Yüksek Lisans Tezi* Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Trabzon, 203s
- Yılmaz M ve Beyatlı Y** (2003) Biyoplastik: Poli- $\beta$ -Hidroksibütirat (PHB). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(9):1-33.
- Yılmaz Y, Demirören H ve Avcı B** (2019) Isas Winter. *4th International Symposium on Innovative Approaches in Engineering and Natural Sciences*. Ss. 357-62.
- Yılmaz Y** (2019). Biyomalzeme Olarak Kullanılan Titanyum Alaşımlarının Mekanik Davranışları Ve Korozyon Özellikleri Üzerine Isıl İşlemin Etkilerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, T.C Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 98s.
- Yorgancıoğlu A** (2012) Bazı Uçucu Yağlarla Kollajen İçerikli Antimikrobiyal Krem Üretilebilirliği Üzerine Araştırmalar. *Yüksek Lisans, Tezi* Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir 93s
- Yüksel E** (2014) Antimikrobiyal Peptitlerin İmmobilizasyonu İle Enfeksiyona Dirençli Malzemelerin Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 95s.

## ÖZGEÇMİŞ

Çağdaş ÖZDEMİR

İlköğretimini Ankara'nın Etimesgut

ilçesinde tamamladı. Eryaman Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2014 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne girdi. 2019 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimine başladı.