

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

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERLE İYİLEŞTİRİLMİŞ ANTİBAKTERİYEL KEMİK**  
**ÇİMENTOLARININ HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**NANOTEKNOLOJİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ELİF İLHAN**

**EKİM 2018**



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

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERLE İYİLEŞTİRİLMİŞ ANTİBAKTERİYEL KEMİK**  
**ÇİMENTOLARININ HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**NANOTEKNOLOJİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Elif İLHAN**

**DANIŞMAN : Doç.Dr.Ebru KILIÇAY**

**İKİNCİ DANIŞMAN : Doç.Dr.Zeynep KARAHALİLOĞLU**

**ZONGULDAK**

**Ekim 2018**



**KABUL:**

Elif İLHAN tarafından hazırlanan “Gümüş Nanopartiküllerle İyileştirilmiş Antibakteriyel Kemik Çimentolarının Hazırlanması Ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 25/10/2018

**Danışman:** Doç.Dr.Ebru KILIÇAY

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Zonguldak Meslek Yüksekokulu Elektronik ve Otomasyon Bölümü

**İkinci Danışman:** Doç.Dr.Zeynep KARAHALİLOĞLU

Aksaray Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

**Üye:** Prof. Dr. Baki HAZER

Kapadokya Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Uçak Gövde Motor Bölümü

**Üye:** Doç. Dr. Barış AVAR

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü

**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

....../....../20....

Doç. Dr. Ahmet ÖZARSLAN  
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.”*

Elif İLHAN



## **ÖZET**

**Yüksek Lisans Tezi**

### **GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERLE İYİLEŞTİRİLMİŞ ANTİBAKTERİYEL KEMİK ÇİMENTOLARININ HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Elif İLHAN**

**Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç.Dr.Ebru KILIÇAY**

**İkinci Danışman: Doç.Dr.Zeynep KARAHALİLOĞLU**

**Ekim 2018, 87 sayfa**

Kemik çimentosu ortopedik implantların fiksasyonu için cerrahi tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu prosedürlerin geliştirdiği enfeksiyonlar ciddi bir sağlık sorunudur ve sağlık hizmeti sağlayıcıları için de ek bir masraftır. Bu problem halihazırda kullanılan antibiyotiklerin düşük etkinliğinden dolayı daha da derinleşmektedir. Bu nedenle ortopedide mikroorganizmalara karşı yeterli korumanın sağlanması amacıyla yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Sunulan çalışmada kemik bölgesinde oluşabilecek enfeksiyon riskini önlemeye yönelik olacak şekilde gümüş nanopartikül katkılı Polistiren(PS)-soya yağı graft kopolimerleri, kemik çimentosu içerisine emdirilmiş ve böylelikle yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip malzemeler hazırlanmıştır. Bu amaçla öncelikle, soya yağı ve gümüş nitrat otooksidasyona uğratarak gümüş nanopartikül (AgNPs) enkapsüle edilmiş soya yağı elde edilerek (Agsbox), polisitiren (PS) ile kopolimerizasyonundan graft polimer (PS-Agsbox) elde edilmiş ve bu kopolimerlerden farklı boy-boy dağılımına sahip nanopartiküller

## ÖZET (devam ediyor)

hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin boyut ve yüzey yükleri Zeta Sizer kullanılarak tayin edilmiştir.

Morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla SEM ve AFM görüntüleri alınmıştır. Çalışmada polimetil metakrilat (PMMA) ve kalsiyum fosfat bazlı ( $\beta$ -TCP) kemik çimentosu kullanılmıştır. Hazırlanan nanopartiküller karakterize edildikten sonra farklı oranlarda kemik çimentosunun içine karıştırılmıştır. Hazırlanan kemik çimentolarının mekanik özellikleri, ortalama gözenek boyutu ve porozitesi test edilmiştir. PS-Agsbox kopolimer bazlı nanopartikül içeren kemik çimentolarından AgNPs'in salımına bakılmış ve *in-vitro* ortamda antibakteriyel aktivitesi *Escherichia coli*, *E. coli* (Gram-negatif) and *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (Gram-pozitif) türleri kullanılarak test edilmiştir. Kemik çimentolarının *in vitro* biyouyumluluklarının değerlendirilmesi amacıyla PS-Agsbox kopolimer bazlı nanopartikül içeren kemik çimentolarının indirekt sitotoksikite testi osteoblast hücreleri (MC-3T3) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kemik çimentosu, antimikrobiyal, gümüş nanopartiküller, poli(metil metakrilat) PMMA, soya yağı, polisitren (PS ),  $\beta$ -trikalsiyum fosfat.

**Bilim Kodu:**

## **ABSTRACT**

**M. Sc. Thesis**

### **PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBACTERIAL BONE CEMENTS IMPREGNATED WITH SILVER NANOPARTICLES**

**Elif İLHAN**

**Zonguldak Bülent Ecevit University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Nanotechnology Engineering**

**Thesis Advisor: Doç.Dr.Ebru KILIÇAY  
Co-Advisor: Doç.Dr.Zeynep KARAHALİLOĞLU**

**October 2018, 87 pages**

Bone cement is widely used in surgical treatments for fixation of orthopedic implants. The infections, which are developed by these procedures are a major health risk for patients and an additionally cost for the health service providers. The problem was also aggravated because of losing efficacy of antibiotics. Therefore, novel approaches needed for efficient protection against to microorganisms. In the presented study, traditional bone cements were impregnated with silver nanoparticles (Ag NPs) embedded polystyrene (PS)-soybean oil copolymers based nanoparticles to eliminate the infection risks occurred in bone applications and thus, novel bone cements consist of a high antimicrobial activity was prepared. Firstly, soybean oil and silver nitrate were autoxidized, the soybean oil encapsulated AgNPs (Agsbox) was obtained and polymerization of styrene was carried out by oxidized soybean oil polymer with AgNPS, and NPS with different size distributions from PS-Agsbox graft copolymer was obtained. The size and surface charges of the synthesized NPs were tested using Zeta Sizer.

## **ABSTRACT (continued)**

SEM and AFM were used for the surface properties. In this study, PMMA and calcium phosphate based bone cements ( $\beta$ -TCP) were used and the prepared NPs were mixed with these bone cements. The mechanical properties, average pore size and porosity of the synthesized novel bone cements were investigated. The Ag<sup>+</sup> release from PS-Agsbox based NPs and in-vitro antimicrobial activity against Escherichia coli, E. coli and Staphylococcus aureus, S. aureus were evaluated. In order to evaluate in-vitro biocompatibility of bone cements, PS-Agsbox based NPs were treated with mouse osteoblastic cell line (MC-3T3).

**Keywords:** Bone cement, antimicrobial, silver nanoparticles, poly(methyl methacrylate) (PMMA), soybean oil, polystyrene (PS),  $\beta$ -tricalcium phosphate.

**Science Code:**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince çalışmalarımın gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi konusunda hiçbir yardımı esirgemeyen, istikrarlı ve disiplinli çalışmasıyla tezimin üzerine titizlikle duran, sürekli beni cesaretlendiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Ebru KILIÇAY'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince, çalışmalarımı özenle devam ettirmeme büyük yardımcı dokunan, çalışmalarımı başarıyla gerçekleştirebilmem için büyük emek sarfeden kıymetli hocam, ikinci danışmanım Doç. Dr. Zeynep KARAHALİLOĞLU teşekkürlerimi borç bilirim. Yüksek lisans eğitimimin en başından en sonuna kadar, bilgilerinden yararlanmamı sağlayan, her zaman çalışmaya, kendini geliştirmeye ve yükselmeye teşvik eden, hep daha başarılı olmam için beni yüreklendiren çok kıymetli hocam Prof. Dr. Baki HAZER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatım boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen, maddi manevi en büyük yardımcım ve destekçim olan her türlü sıkıntılarımı benimle ortak göğüsleyen sevgili eşim, hayat arkadaşım İlhami İLHAN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Yüksek lisans yapmam gerektiği konusunda beni teşvik eden, bütün eğitim hayatım boyunca en büyük destekçilerim olan, gerek kötü günümde gerekse iyi günümde sevgilerini hiçbir zaman eksik etmeyen canım annem Fatma GÜVEN'e ve canım babam Semih GÜVEN'e saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans tezimi yazma sürecinde her türlü yardımlarını benden esirgemeyen, özellikle teknik konularda akıl danışıp fikirlerini aldığım, maddi manevi destekçilerim, başarılı olmam için uğraşan, hep iyiliğimi ve başarıyı isteyen sevgili kardeşlerim Enes GÜVEN'e ve Yunus Emre GÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

Sayfa

|                                                        |                                  |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------|
| KABUL: .....                                           | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |
| ÖZET .....                                             | iii                              |
| ABSTRACT .....                                         | v                                |
| TEŞEKKÜR .....                                         | vii                              |
| İÇİNDEKİLER.....                                       | ix                               |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                   | xiii                             |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                | xvii                             |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                    | xix                              |
| <br>BÖLÜM 1 GİRİŞ .....                                | <br>1                            |
| 1.1 KEMİK DOKU.....                                    | 1                                |
| 1.2 BİYOMALZEMELER, ENFEKSİYONLAR VE ORTOPEDİ.....     | 3                                |
| 1.3 KEMİK ONARIMI İÇİN KULLANILAN BİYOMALZEMELER ..... | 3                                |
| 1.3.1 Biyoaktif İnorganik Materyaller .....            | 4                                |
| 1.3.2 Polimerler .....                                 | 5                                |
| 1.4 KEMİK ÇİMENTOLARI.....                             | 5                                |
| 1.4.1 Akrilik Kemik Çimentosu.....                     | 7                                |
| 1.4.2 Kalsiyum Fosfat Kemik Çimentosu.....             | 10                               |
| 1.4.3 Biyoaktif Kemik Çimentoları .....                | 13                               |
| 1.4.4 Kalsiyum Sülfat Çimentoları .....                | 13                               |
| 1.4.5 Yağ Asidi İçeren Kemik Çimentoları .....         | 13                               |
| 1.5 KEMİK ÇİMENTOLARIN MODİFİKASYONLARI .....          | 14                               |
| 1.5.1 Fiziksel Özelliklerin Modifikasyonları .....     | 14                               |
| 1.5.2 Mekanik Özelliklerin Modifikasyonları .....      | 15                               |
| 1.5.3 Biyolojik Özelliklerin Modifikasyonları .....    | 16                               |
| 1.6 ANTİBAKTERİYEL KEMİK ÇİMENTOLARI.....              | 16                               |
| 1.6.1 Antibiyotik Eklenmesinin Avantajları .....       | 17                               |

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

### Sayfa

|                                                                                      |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.6.2 Antibiyotik Eklenmesinin Dezavantajları.....                                   | 18     |
| 1.7 GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLER.....                                                       | 20     |
| 1.7.1 Gümüşün Tedavi Amaçlı Kullanımının Tarihi.....                                 | 20     |
| 1.7.2 Gümüş Nanopartiküller ve Genel Özellikleri .....                               | 20     |
| 1.7.3 Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Etkisi .....                            | 22     |
| 1.7.4 Gümüş Nanopartiküllerle Hazırlanmış Kemik Çimentoları .....                    | 24     |
| 1.8 BİTKİSEL KAYNAKLI POLİMERLER .....                                               | 25     |
| 1.8.1 Soya Yağından Sentezlenen Polimerler.....                                      | 27     |
| <br>BÖLÜM 2 DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....                                                 | <br>29 |
| <br>2.1 KİMYASALLAR .....                                                            | <br>29 |
| 2.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ VE BAKTERİYEL SUŞLAR.....                                          | 29     |
| 2.3 AGNPS KATKILI (AGSBOX) POLİMERİK OTOOKSİDE SOYA YAĞININ<br>(PSBOX) SENTEZİ ..... | 30     |
| 2.4 AGSBOX (PS-AGSBOX) İLE STİRENİN KOPOLİMERİZASYONU.....                           | 31     |
| 2.5 PS-AGSBOX NPS'İN SENTEZİ.....                                                    | 31     |
| 2.6 PS-AGSBOX POLİMERİNİN VE PS-AGSBOX NPS'İN KARAKTERİZASYONU                       | 32     |
| 2.7 KEMİK ÇİMENTOLARININ HAZIRLANMASI .....                                          | 33     |
| 2.8 KEMİK ÇİMENTOLARININ KARAKTERİZASYONU .....                                      | 35     |
| 2.9 SU ALIMI.....                                                                    | 35     |
| 2.10 KEMİK ÇİMENTOLARININ KOMPRESYON TESTİ.....                                      | 36     |
| 2.11 KEMİK ÇİMENTOLARINDAN GÜMÜŞ İYONU SALIMI.....                                   | 36     |
| 2.12 KEMİK ÇİMENTOLARININ ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN<br>TANIMLANMASI.....          | 37     |
| 2.13 KEMİK ÇİMENTOLARININ İN-VİTRO BİYOUYUMLUKLARININ<br>DEĞERLENDİRİLMESİ.....      | 38     |
| 2.14 CANLI/ÖLÜ HÜCRE TESTİ .....                                                     | 39     |
| 2.15 KEMİK ÇİMENTOLARININ ALP AKTİVİTESİ.....                                        | 40     |
| 2.16 KALSİYUM TESTİ .....                                                            | 40     |
| 2.17 İSTATİKSEL ANALİZLER .....                                                      | 41     |

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| BÖLÜM 3 _DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR .....                                | 43 |
| 3.1 PS-AGSBOX KARAKTERİZASYONU .....                                           | 43 |
| 3.2 PS-AGSBOXNPS KARAKTERİZASYONU .....                                        | 43 |
| 3.3 KEMİK ÇİMENTOLARININ KARAKTERİZASYONU .....                                | 45 |
| 3.4 SU ALIMI.....                                                              | 48 |
| 3.5 KEMİK ÇİMENTOLARININ SIKIŞTIRMA TESTİ.....                                 | 49 |
| 3.6 KEMİK ÇİMENTOLARINDAN GÜMÜŞ İYONU SALIMI.....                              | 51 |
| 3.7 PS-AGSBOXNPS'İN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİ.....                           | 52 |
| 3.8 KEMİK ÇİMENTOLARININ İN-VİTRO BİYOUYUMLUKLARININ<br>DEĞERLENDİRİLMESİ..... | 54 |
| 3.9 CANLI/ÖLÜ HÜCRE TESTİ .....                                                | 56 |
| 3.10 KEMİK ÇİMENTOLARININ ALP AKTİVİTESİ.....                                  | 59 |
| 3.11 KALSİYUM TESTİ .....                                                      | 61 |
| BÖLÜM 4 SONUÇLAR.....                                                          | 65 |
| KAYNAKLAR.....                                                                 | 69 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                 | 87 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>No</u>                                                                                                                                                                                                                                                       | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 1.1 Kemikte hiyerarşik yapı organizasyonu : (A) kortikal ve süngerimsi kemik; (B) Havers sistemi ve osteon; (C) Lamel; (D) Kollajen fibrillerin birleşmesiyle oluşan kollajen lifler; (E) Kollajen moleküller, kollajen olmayan proteinler ve kemik. .... | 2            |
| Şekil 1.2 Farklı kemik greft materyalleri örneklerinin makromorfolojisi.....                                                                                                                                                                                    | 4            |
| Şekil 1.3 Kalça kemiği içerisinde ki PMMA kemik çimentosu ve protein diyagramı.....                                                                                                                                                                             | 8            |
| Şekil 1.4 Tıpta gümüş (sağ taraf) ve gümüş NP (sol taraf) kullanımları .....                                                                                                                                                                                    | 21           |
| Şekil 1.5 Gümüş iyonlarının antibakteriyel aktivitesinin mekanizmaları .....                                                                                                                                                                                    | 24           |
| Şekil 2.1 PS-Agsbox katkılı kemik çimentolarının hazırlanmasında kullanılan PMMA (Cement Oliga1®) ve $\beta$ -TCP (Neocement®) bazlı ticari kemik çimentoları. ....                                                                                             | 30           |
| Şekil 2.2 AgNPs oluşumu ve (II) AgNPs enkapsüle edilmiş soya yağının oluşumu .....                                                                                                                                                                              | 31           |
| Şekil 2.3 Çift emülsiyon çözücü uzaklaştırma metodu ile nanopartiküllerin hazırlanışı.....                                                                                                                                                                      | 32           |
| Şekil 2.4 Saf ve PS-Agsbox NPs içerikli PMMA ve $\beta$ -TCP-bazlı kemik çimentolarının hazırlanma basamakları. ....                                                                                                                                            | 34           |
| Şekil 2.5 Hazırlanan saf ve PS-Agsbox NPs içerikli PMMA ve $\beta$ -TCP-bazlı kemik çimentoları; Saf PMMA (A), 5PMMA (B), 10PMMA (C), 15PMMA (D), saf $\beta$ -TCP (E), 5 $\beta$ -TCP (F), 10 $\beta$ -TCP (G) ve 15 $\beta$ -TCP (H).....                     | 35           |
| Şekil 3.1 PS-AgsboxNPs'in SEM (A) ve AFM (B) görüntüleri. Ölçek çubuğu sırasıyla 50 nm ve 40 nm. ....                                                                                                                                                           | 45           |
| Şekil 3.2 PS-AgsboxNPs içeren PMMA ve $\beta$ -TCP kemik çimentoları. Ölçek çubuğu 100 $\mu$ m. ....                                                                                                                                                            | 46           |
| Şekil 3.3 Saf PMMA (A), 5PMMA (B), 10PMMA (C), 15PMMA (D), saf $\beta$ -TCP (E), 5 $\beta$ -TCP (F), 10 $\beta$ -TCP (G) ve 15 $\beta$ -TCP (H) kemik çimentolarının micro-CT görüntüleri.....                                                                  | 46           |
| Şekil 3.4 PS-AgsboxNPs içeren PMMA and $\beta$ -TCP kemik çimentolarının por histogramı....                                                                                                                                                                     | 47           |
| Şekil 3.5 PS-AgsboxNPs içeren PMMA and $\beta$ -TCP kemik çimentolarının PBS içerisindeki su alım özellikleri.....                                                                                                                                              | 49           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

| No                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 3.6 PS-AgsboxNPs içeren ve saf PMMA and $\beta$ -TCP kemik çimentolarının sıkıştırma testi sonuçları. ....                                                                                                                                                                   | 50    |
| Şekil 3.7 PS-AgsboxNPs içeren PMMA (A) and $\beta$ -TCP (B) kemik çimentolarından 9 gün boyunca kümülatif $Ag^+$ salımı (SS hata çubuğu olarak gösterilmiştir, n=3). ....                                                                                                          | 51    |
| Şekil 3.8 Sentezlenen PS-AgsboxNPs'in <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> 'ye karşı antibakteriyel aktivitesi.....                                                                                                                                                                  | 52    |
| Şekil 3.9 Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA (A) ve $\beta$ -TCP (B) kemik çimentoları ile <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> 'nin 2 saat boyunca etkileşimi sonrasında, 480 nm'de oluşan formazanın tanımlanması. n=3; **, p < 0.005, *, p < 0.05.....                         | 54    |
| Şekil 3.10 Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA (A) and $\beta$ -TCP (B) kemik çimentolarının indirekt MTT yöntemi ile MC3T3-E1 hücresi üzerindeki sitotoksik etkileri. n=3; *, p < 0.05.....                                                                                     | 55    |
| Şekil 3.11 Kemik çimentoları üzerindeki hücre yapışmasının SEM görüntüleri: saf PMMA (A), 5PMMA (B), 10PMMA (C), 15PMMA (D) ve saf $\beta$ -TCP (E), 5 $\beta$ -TCP (F), 10 $\beta$ -TCP (G), 15 $\beta$ -TCP (H). Kırmızı oklar yapışan MC3T3-E1 hücrelerini göstermektedir. .... | 56    |
| Şekil 3.12 Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA kemik çimentolarının MC3T3- E1 hücresi ile etkileştirildikten sonra alınan floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu 10 $\mu$ m. ....                                                                                         | 57    |
| Şekil 3.13 Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli $\beta$ -TCP kemik çimentolarının MC3T3-E1 hücresi ile etkileştirildikten sonra alınan floresan mikroskopi görüntüleri. ....                                                                                                           | 59    |
| Şekil 3.14 Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve $\beta$ -TCP kemik çimentolarının MC3T3-E1 hücreleri ile 7 gün kültürü sonrası in vitro osteoindüktif aktivitesi. n=3; *, p < 0.05.....                                                                                        | 61    |
| Şekil 3.15 Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve $\beta$ -TCP kemik çimentolarında MC3T3-E1 hücreleri ile 7 gün kültürü sonrası kalsiyum birikimi. n=3; **, p < 0.005. ....                                                                                                     | 62    |
| Şekil 3.16 Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve $\beta$ -TCP kemik çimentolarında MC3T3-E1 hücreleri ile 7 gün kültürü sonrası alizarin kırmızısı ile boyama sonrasında elde edilen kalsiyum birikimi. n=3; **, p < 0.005.....                                                 | 63    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No

Sayfa

Şekil 3.17 Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA (A) ve  $\beta$ -TCP (B) kemik çimentolarında MC3T3-E1 hücreleri ile 7 gün kültürü sonrasında Alizarin kırmızısı ile biomineralizasyonun görselleri. .... 64





## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>No</u>                                                                                                                              | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Çizelge 1.1 Akrilik kemik çimentosunun bileşenleri [51]. ....                                                                          | 9            |
| Çizelge 1.2 Akrilik kemik çimentolarıyla kalsiyum fosfat çimentolarının karşılaştırılması ...                                          | 10           |
| Çizelge 1.3 Gümüş Nanopartiküllerin Kullanım Alanları [132]. ....                                                                      | 22           |
| Çizelge 2.1 Hazırlanan saf ve PS-Agsbox NPs yüklü kemik çimentosu formülasyonları. ....                                                | 34           |
| Çizelge 2.2 MC3T3-E1 (pre-osteoblastik hücre hattı) hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması. ....                             | 38           |
| Çizelge 3.1 PS-AgsboxNPs'lerin karakterizasyonu. Farklı parametrelerin nanopartiküllerin boyut ve boy-boy dağılım üzerine etkisi. .... | 44           |
| Çizelge 3.2 PS-AgsboxNPs içeren PMMA and $\beta$ -TCP kemik çimentolarının porozite değerleri. ....                                    | 48           |
| Çizelge 3.3 PS-AgsboxNPs içeren ve saf PMMA and $\beta$ -TCP kemik çimentolarının sıkıştırma dayanımı ve deformasyon değerleri. ....   | 50           |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| $\mu\text{m}$      | :Mikrometre         |
| nm                 | :Nanometre          |
| Mpa                | :Megapaskal         |
| $^{\circ}\text{C}$ | :Santigrat derece   |
| %                  | :Yüzde              |
| g                  | :Gram               |
| MHz                | :Megahertz          |
| kV                 | :Kilovolt           |
| mL                 | :Mililitre          |
| cm                 | :Santimetre         |
| mm                 | :Milimetre          |
| $\mu\text{l}$      | : Mikrolitre        |
| $\mu\text{g}$      | : Mikrogram         |
| ppm                | :Milyonda bir birim |
| mV                 | :Milivolt           |

### KISALTMALAR

|                                    |                              |
|------------------------------------|------------------------------|
| <b>AFM</b>                         | : Atomik kuvvet mikroskopisi |
| <b>Ag</b>                          | :Gümüş                       |
| <b>AgNO<sub>3</sub></b>            | : Gümüş nitrat               |
| <b>AgNP</b>                        | : Gümüş Nanopartikül         |
| <b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> | : Alüminyum oksit            |
| <b>ALP</b>                         | : Alkalın fosfataz           |
| <b>BaSO<sub>4</sub></b>            | : Baryum sülfat              |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

|                        |                                                 |
|------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>CPC</b>             | : Kalsiyum fosfat kemik çimentosu               |
| <b>DCM</b>             | : diklorometan                                  |
| <b>FDA</b>             | : Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi                 |
| <b>FT-IR</b>           | : Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre   |
| <b>HA</b>              | : Hidroksiapatit                                |
| <b>HACC</b>            | : Hidroksipropiltrimetil amonyum klorit kitosan |
| <b>MMA</b>             | : Metilmetakrilat                               |
| <b>MRSA</b>            | : metisiline dirençli <i>S. aureus</i>          |
| <b>MSN</b>             | : Mezoporous silika nanoparçacık                |
| <b>NMR</b>             | : Nükleer Manyetik Rezonans                     |
| <b>NP</b>              | : Nanopartikül                                  |
| <b>PDI</b>             | : Polidispersite indeksi                        |
| <b>PGA</b>             | : Poliglikolik asit                             |
| <b>PLA</b>             | : Polilaktik asit                               |
| <b>PMMA</b>            | : Polimetilmetakrilat                           |
| <b>SEM</b>             | : Taramalı Elektron Mikroskobu                  |
| <b>-SH</b>             | : Tiol                                          |
| <b>SrO</b>             | : Stronsiyum oksit                              |
| <b>TiO<sub>2</sub></b> | : Titanyum dioksit                              |
| <b>TTC</b>             | : 2,3,5-tripheniltetrazolium klorit             |
| <b>ZrO<sub>2</sub></b> | : Zirkonyum oksit                               |

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

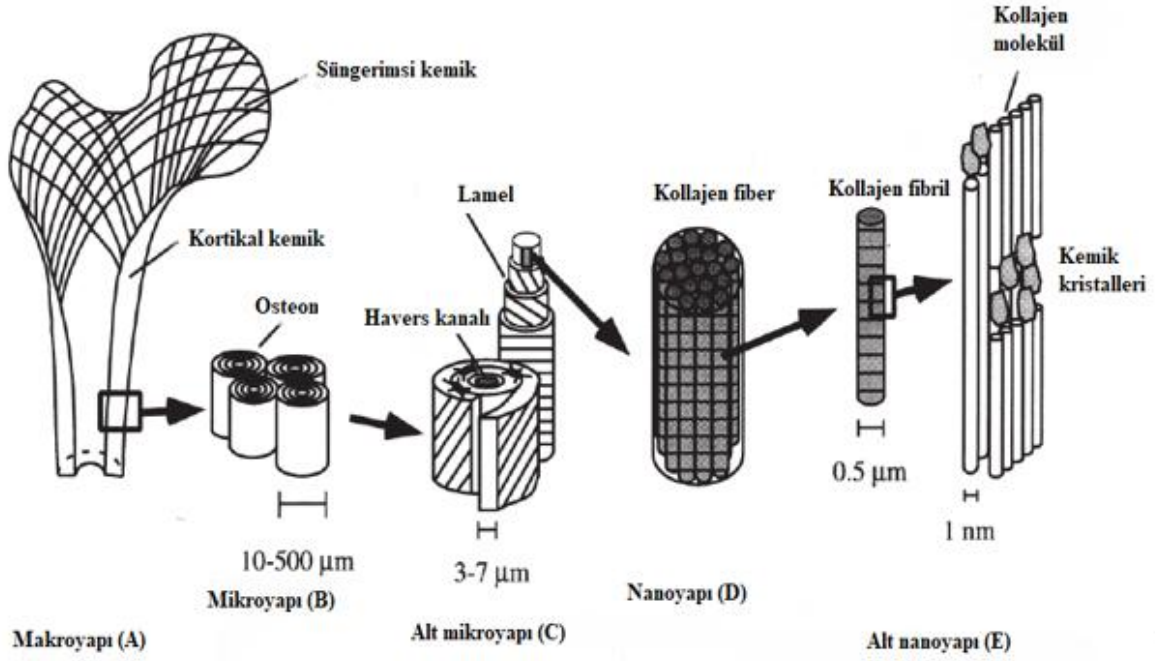
#### 1.1 KEMİK DOKU

Kemik, dört hücre türünü sergileyen mineralize bir bağ dokusudur: osteoblastlar, kemik astar hücreleri(osteoprogenitör hücre), osteositler ve osteoklastlar [1-2].

Kompleks bir organik ve inorganik yapıya sahip olan kemik, mikro ve nanokompozit doku olarak sınıflandırılabilen bir organdır. Karmaşık bir hücresel yapıya sahiptir. Kemğin mineralize matriksi şu yapılardan oluşur;

- Sertliği, viskoelastisitesi ve tokluğundan oluşan bir organik faz
- Yapısal takviyesi, mineral hemeostazı ve sertliği için karbonatlanmış apatit mineral faz
- Hücresel fonksiyonları uyaran kollajen olmayan proteinler [3]

Kemik dokusu, makroyapı, mikroyapı, alt mikroyapı, nanoyapı ve alt nanoyapı olmak üzere çok sayıda farklı seviyelerdeki bileşenlerin hiyerarşik yapısal düzenini göstermektedir. Makroyapı; süngerimsi ve kortikal kemik, mikroyapı; haversiyan sistemler, osteonlar, tek lifler, alt mikroyapı; lamel, nanoyapı; fibriler kollajen ve gömülü minerallerden oluşur. Alt nanoyapı ise kurucu elementlerin moleküler yapısı olan mineraller, kollajen ve kollajen olmayan organik proteinlerden oluşur(Şekil 1.1) [4].



**Şekil 1.1** Kemikte hiyerarşik yapı organizasyonu : (A) kortikal ve süngerimsi kemik; (B) Havers sistemi ve osteon; (C) Lamel; (D) Kollajen fibrillerin birleşmesiyle oluşan kollajen lifler; (E) Kollajen molekül, kollajen olmayan proteinler ve kemik [4].

Makroskopik olarak kemik, yoğun, sert ve silindirik bir kabuk olan kortikal kemikten oluşur. Kortikal kemik, süngerimsi kemik olarakta bilinin gözenekli yapıdaki trabeküler kemiği kapsar [3]. Mikroskopik ölçekte ise kortikal ve süngerimsi kemik, lamel adı verilen katmanlardan oluşur. Bu katmanlar birbirine paralel olarak yığılmış mineralize kollajen lifleri içerisinde barındırır [3]. Havers kanalı denilen yapı, olgun bir kemikte bu lamellerin konsantre tabakalar şeklinde sarılmasıyla oluşur. Havers kanalı içinde, osteon diye adlandırılan sinir ve kan damarlarını içerir [4]. Nanoyapısal düzey incelendiğinde ise, mineral tarafından çevrelenmiş kollajen lifler bulunur. Alt nanoyapı ise kemik kristalleri, kollajen molekül ve kollajen olmayan organik proteinlerden oluşur [4].

Kemik, yumuşak dokuların hareketi, desteklenmesi ve korunması, kalsiyum ve fosfat depolaması ve kemik iliği barınağı gibi önemli işlevleri yerine getirir [5-6]. Kemik sert görünümüne rağmen, osteoklastlar tarafından sürekli rezorbe edilen ve osteoblastlar tarafından yeniden forma sokulan oldukça dinamik bir organdır. Osteositler de bu kemik modelleme sürecinin mekanik sensörleridirler [7-8]. Osteoprogenitör hücrelerin işlevi çok iyi anlaşılamamış olsa da kemik oluşumu sırasında önemli rol oynamaktadır [9].

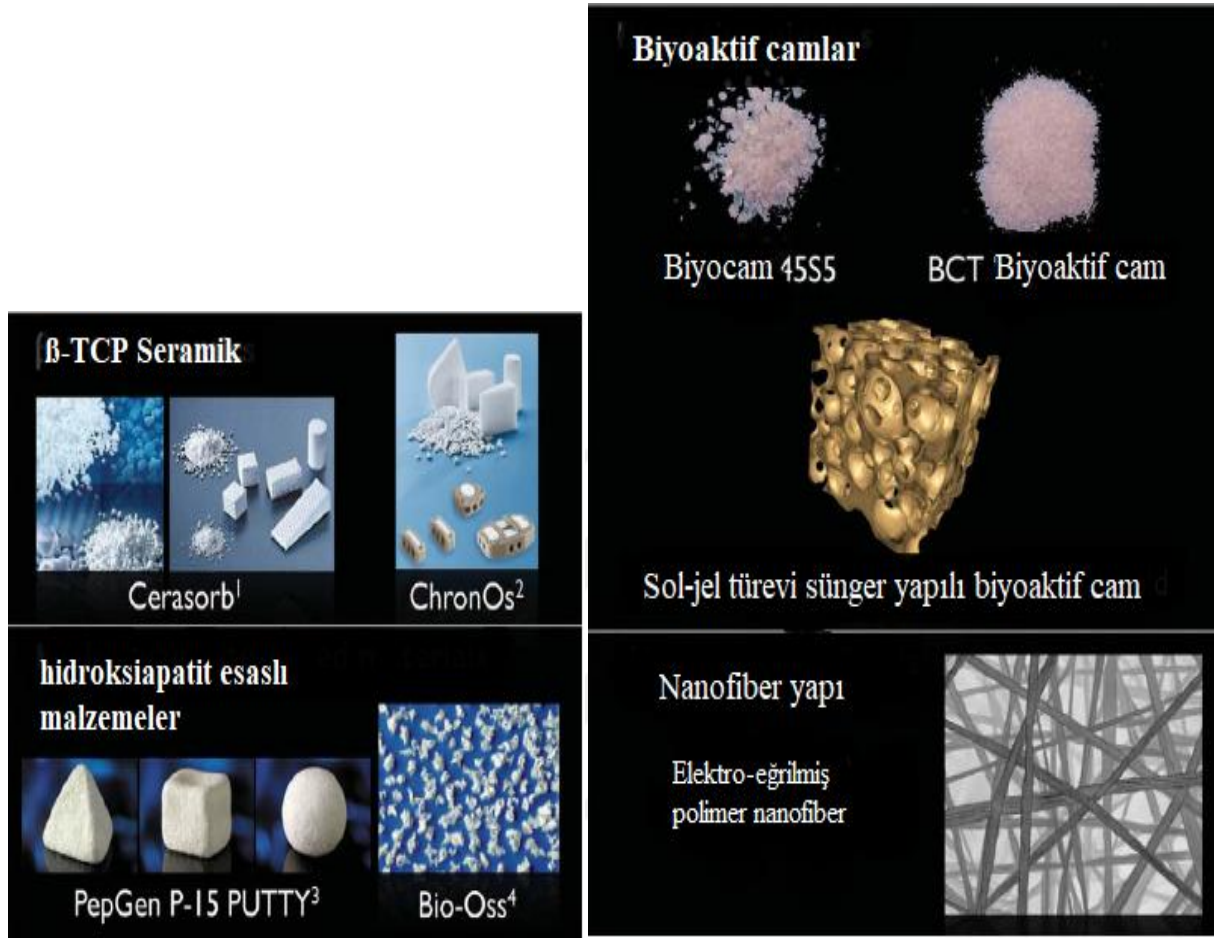
## 1.2 BİYOMALZEMELER, ENFEKSİYONLAR VE ORTOPEDİ

Ortopedik cerrahide biyomalzemelerin varlığı, derin enfeksiyonların gelişimi açısından yüksek risk taşımaktadır [10]. Ana faktörlerden bir tanesi, biyomalzemeye yapışan bakteriler ve bakteri türleri tarafından oluşturulan biyofilm üretimidir [11]. Bu bağlamda, bakterilerin fiziksel ve kimyasal özellikleri aracılığı ile biyomalzemenin yüzeyine bağlanma yeteneği olduğu gösterilmiştir [11-13]. Eklem artroplastisi sonrasında gelişen enfeksiyonlar iyileştirilmesi en zor olanlar arasındadır. Uzun yıllar öncesine kadar, ortopedik enfeksiyonların tedavisi ve engellemesinde kullanılan antibiyotikler birkaç tane ile sınırlı iken, bu antibiyotikler *staphylococci* ve gram-negatif bakterilere karşı da yetersiz kalabiliyordu. Yetmişlerde prostetik eklem ameliyatlarının artması ile, bu problemi de beraberinde getirmiştir. [10, 14–16]. İmplantla ilintili enfeksiyonların büyük bir çoğunluğu *Staphylococcus aureus* veya *Staphylococcus epidermidis* gibi gram pozitif *staphylococci* türü bakterileri tarafından ortaya çıkmaktadır. Patojen olarak bilinen bu mikroorganizmalar, insanlar üzerinde olumsuz etkiye neden olabilmektedir. Enfeksiyon, hastanın fizyolojik özelliklerine ve mikroorganizmaya bağlı olarak ağrı ve ateş sonrası ölümle sonuçlanabilecek durumlara neden olabilmektedir. Antibiyotiklerin yıllarca enfeksiyona çözüm olduğu savunulmuştur. Fakat bu tür inanışlar, mikroorganizmaların tedaviye karşı direnç göstermesiyle ortadan kalkmıştır. Günümüzde bulaşıcı mikroorganizmaların antibiyotikle tedavi edilemeyeceği kabul görmüştür. Patojenlere karşı yeterli korumanın sağlanması amacıyla yeni yaklaşımların gelişimine ihtiyaç duyulmaktadır. Medikal uygulamalardaki güvenilir özellikleri ve antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı metallerin, özellikle de tuz veya nanopartikül formundaki gümüşün kullanımı oldukça ilgi çekmektedir.

## 1.3 KEMİK ONARIMI İÇİN KULLANILAN BİYOMALZEMELER

Klinik ihtiyaçlar doğrultusunda, özellikle ortopedi alanında biyomalzeme esaslı tedavi yöntemleri son zamanlarda gittikçe artmaktadır. Geçmişte bu amaç için tasarlanan malzemeler çoğunlukla biyo-inert malzeme iken, şimdi bilim adamları çoğunlukla biyolojik moleküller ve hücrelerle bütünleşen, dokuları yenileyen biyoaktif malzeme üretimi yoluna gitmişlerdir [17-18].

Kemik için tasarlanan materyaller incelendiğinde çoğunlukla biyoaktif seramikler, biyoaktif camlar, biyolojik ve sentetik polimerler ve kompozitler göze çarpar [18-20].



Şekil 1.2 Farklı kemik greft materyalleri örneklerinin makromorfolojisi[23].

### 1.3.1 Biyoaktif İnorganik Materyaller

Kemiğin mineral fazıyla benzer özellikler taşıyan geniş bir biyoaktif inorganik materyal yelpazesi bulunmaktadır. Bunlara trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit (HA), biyoaktif camlar ve bunların çeşitli kombinasyonları örnek olarak gösterilebilir (Şekil-1.2.) [18,21]. İmplantasyon sonrası biyoaktif camların ve biyoseramiklerin emilme hızı kristal haldeki hidroksi apatit (HA) ile uyarılarak yıllarca devam edebilir. Fakat diğer kalsiyum fosfatların emilimi daha yüksek olmasına rağmen daha az mukavemete sahiptir [22].

Biyoaktif inorganik materyallerin kırılgan bir yapısı bulunmaktadır. Bu özelliği de kemikle uyum sağlamadığı ve kendi başına yük taşıyıcı olarak kullanılmaması anlamına gelmektedir [22].

### 1.3.2 Polimerler

Kollajen ve hiyalünorik asit gibi biyolojik polimerler doku mühendisliğinde bazı avantajlarla beraber dezavantajları da barındırmaktadır. Hücrelerde, hücre bağını destekler ve kemotaktik tepkileri teşvik eder. Bununla birlikte zayıf immünojenitesi, zayıf mekanik özellikleri gibi bazı dezavantajlar kullanım alanını kısıtlamaktadır. Biyolojik polimerlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için polilaktik asit(PLA), poliglikolik asit(PGA) ve bunların kopolimerleri, polikaprolakton gibi sentetik polimerlere farklı alternatifler olarak başvurulmuştur[22].

Özellikle polietilen glikol gibi hidrojeller, yüksek su içeriğine sahip üç boyutlu hücresel bir mikro ortam sağlayabilirler. Hidrojellerin viskoelastik materyal özellikleri özellikle kırık dokuların rejenerasyonu için uygundur [23-26].

### 1.3.3 Kompozit Materyaller

Oluşturulan organik ve inorganik kompozitlerle gerçek bir kemiğin normal doğası taklit edilmeye çalışılır [28]. Yapılan araştırmalar, nano boyutlu bir inorganik bileşenin mikro boyutlu bileşenlerden daha aktif olduğunu göstermektedir. Özellikle doku mühendisliği için tasarlanan hidroksiapatit (HA)-kollajen nanokompozit sistemler hızla ortaya çıkmakta olup umut vaat etmektedirler [29]. Sol-jel işlemi, inorganik ve organik bileşenleri nano ölçekte birleştirebilen bir yöntemdir [30]. Üzerinde çalışılmasına rağmen hala oluşturulan mevcut kompozitlerin mekanik özellikleri kemiğin mekanik özelliklerinden düşüktür [22].

## 1.4 KEMİK ÇİMENTOLARI

Hastalıklardan ve travmatik olaylardan ötürü, her yıl milyonlarca insanın çeşitli kemik grefti operasyonları geçirmesi gerekmektedir [31]. Kemik grefti, ilk olarak iki yüz yıl önce hastaların kendilerinden (autograft) veya donörlerinden (allograft) alınan materyal ile değiştirilmesi prosedürüdür [32,33]. Şu anda otograft hastalardan alınan kemikle kendisi için canlı hücreler ve büyüme faktörleri içermesinden dolayı standart kabul edilse de, otograftın ve allograftın fazlaca kısıtlamaları ve yan etkileri bulunmaktadır. Çeşitli kısıtlamalar ve dezavantajlardan dolayı yeterli kemik tedariki, uyumsuzluğu ve hastalık sınırlamaları, sentetik kemiğe geçme taleplerini giderek arttırmıştır [34].

İngiliz cerrah Charnley'in 1958 yılında kendi kendine polimerleşen akrilik kemik çimentosunu baş protezini bağlamak için kullanmasıyla, artroplastik operasyonlarında kemik çimentosu kullanımı başlamıştır [35]. Günümüzde ise kemik çimentosu ortopedi, travmatoloji ve dişçilikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemik çimentosunun sıkça kullanıldığı alanlar arasında eklem artroplastileri, patolojik kırıkların tespiti, eklem rekonstrüksiyonu, kemik defektlerinin doldurulması, omurga kırıklarında omurun içerisine yapılan enjeksiyon uygulamaları ve kafatası kusurlarının giderilmesi için gerçekleştirilen cerrahi uygulamalar bulunmaktadır.

Kemik cerrahisinde kullanılan kemik çimentolarında çoğunlukla aşağıdaki özellikler aranmaktadır [36-41] :

- aşınma direnci,
- yüksek sürtünme katsayısı,
- kısa bağlanma süresi,
- ideal polimerizasyon sıcaklığı,
- biyouyumluluk,
- kemiklere benzer özellikler (örn. esneklik),
- yüksek yorulma mukavemeti,
- çatlamaya karşı direnç,
- aşındırıcı işlemlere karşı direnç,
- yüksek titreşim sönümlleme faktörü,
- statik ve dinamik yükleri düzgün şekilde iletebilme özelliği.

Eğer kemik çimentosunda gerekli olan özellikler eksikse, kemik çimentosu implantın gevşemesiyle hemen yırtılabilir. Daha ileri vakalarda implantın çatlaması veya enfeksiyon oluşması riski de vardır. Kemik çimentosunun kullanımıyla alakalı başka riskli durumlarda bulunmaktadır:

- yüksek polimerizasyon ısısı- kemik dokuyu termal hasara uğratar.
- yüksek polimerizasyon daralması- implantın hatalı bağlanmasına yol açar.

ISO 5833 standartlarına göre kemik çimentosunun minimum mekanik özellikleri şu şekilde olmalıdır [42]:

- elastikiyet modülü  $\geq 1800$  Mpa,
- çekme mukavemeti  $\geq 50$  MPa,
- basınç dayanımı  $\geq 70$  MPa.

Kemik çimentosu implantasyonun başarısı yukarıda ifade edilmiş olan, çimento için aranan özelliklerin kombinasyonunun tutarlılığına bağlıdır. Özellikle kemikle çimentonun birleştiği sınırın lokal lezyonlara karşı daha savunmasız olduğu, bu durum sonucunda da çeşitli patolojik sorunların ortaya çıkabileceği bulunmuştur [43].

Kemik çimentoları, üretim yöntemlerine, kullanılan ham madde ve malzemelerine, çeşitli özelliklerine ve implantasyon yapılan yerlerine göre farklı gruplara ayrılmaktadır; akrilik kemik çimentoları ve kalsiyum fosfat bazlı kemik çimentoları.

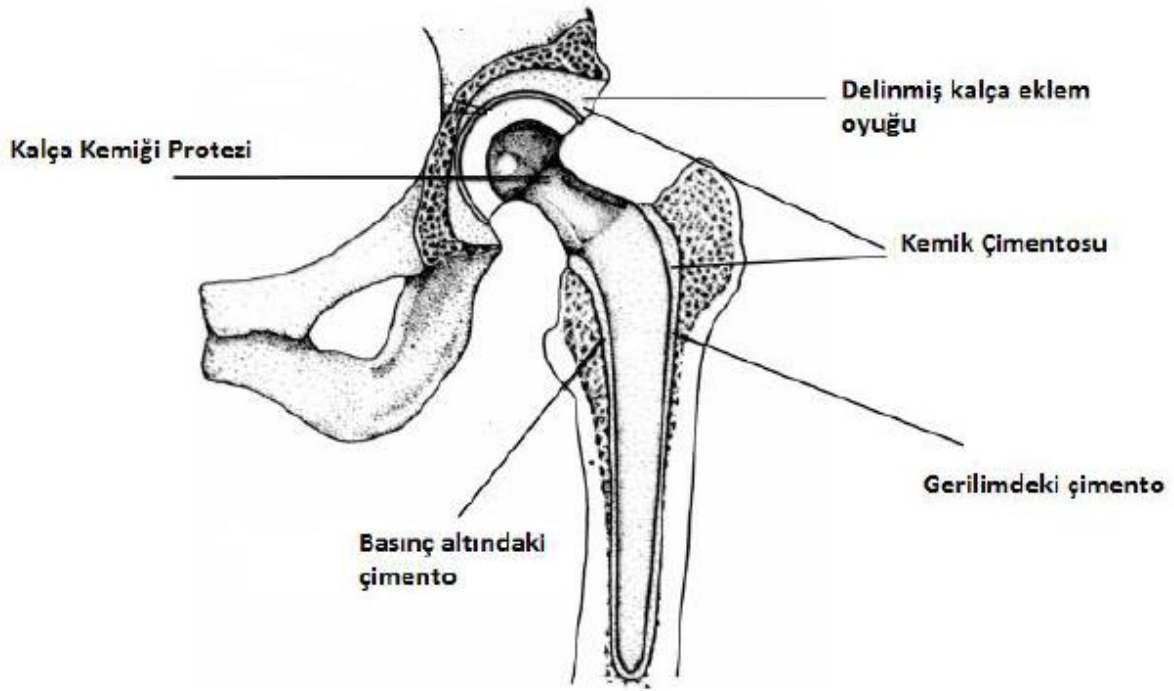
#### **1.4.1 Akrilik Kemik Çimentosu**

Akrilik kemik çimentoları polimetilmetakrilat (PMMA) bazlı kemik çimentoları olup kemik çimentosu denildiğinde akla ilk gelen çimentolardır. 1933 yılında polimetilmetakrilat (PMMA) ürünü plan Pleksiglasın patentini alan Alman kimyager Dr. Otto Rohm, PMMA teknolojisi ile ilgili öncü çalışmaları yapmıştır [44]. 1936 yılında Kulzer öğütülmüş PMMA tozu ile sıvı monomer karışımından oluşan hamurun benzoil peroksit eklenip gerekli şartlar sağlandığında sertleştiğini keşfetmiştir. Bu da kemik çimentosu teknolojisinin kapısını açmıştır. PMMA'nın ilk klinik kullanımı 1938 yılında maymunlarda ki kafatası kusurlarını kapatmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. İnsan kafatası kusurlarını kapatmak için ısıyla sertleşen polimer Paladon 65 kullanılmıştır [45].

Modern PMMA kemik çimentosu Degussa ve Kulzer (1943) tarafından açıklanmıştır. Metilmetakrilatın (MMA) üçüncü derecede bir aromatik amin eklendiğinde oda sıcaklığında polimerizasyonu, PMMA kemik çimentosunu oluşturmuştur [45]. Modern akrilik kemik çimentolarının temelini de oluşturan bu yöntem ilk olarak diş cerrahisinde kullanılmıştır [46].

Ortopedi alanında ilk kemik çimento kullanımı ise, 1958'de total kalça artroplastisi için Dr. John Charnley tarafından yapılmıştır [47]. John Charnley, polimetilmetakrilat kemik çimentolarını kullanarak bir kemik iliği içine gövde protezini sabitleyerek, bu malzemeyi akrilik kemik çimentosu olarak isimlendirmiştir. Fakat ilk klinik sonuçlar mekanik ve biyolojik nedenlerden dolayı zayıf çıkmıştır [45]. Bunun üzerine Dr.Charnley, daha uyarlanabilen biyolojik özelliklere sahip kemik çimentosu (Plexiglass)'ı geliştirmiştir [48]. 1970' li yılların ortalarında Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından kemik çimentosu teknolojisinin kullanımı onaylanmıştır [49]. Bunun üzerine akrilik kemik çimentosu yapay eklemlerin cerrahi fiksasyonunda 50 yıldan beridir kullanılmaktadır.

Şekil 1.3' te görüleceği üzere polimetilmetakrilat kemik çimentosu kemik iliği içine ve delinmiş kalça eklem oyuğuna yerleştirilmiştir. Burada ki kemik çimentosunun temel işlevi ise kuvveti kemikten proteze aktarmaktır (Şekil 1.3) [46].



**Şekil 1.3** Kalça kemiği içerisinde ki PMMA kemik çimentosu ve protein diyagramı [53].

Akrilik kemik çimentosunun iki temel bileşeni vardır. Katı olan temel bileşen genellikle polimetilmetakrilat (PMMA) partikülleri, polimer başlatıcısı, sıvı kısım ise metalmetakrilat (MMA) monomeri ve polimerizasyon hızlandırıcısı içerir [50]. Kendiliğinden katılaşabilme özelliğine sahip polimetilmetakrilat (PMMA), kemikle protez arasında oluşturduğu

bağlantının gevşememesi, uzun süre kullanılmasına rağmen kırılmaması gibi avantajlarından dolayı akrilik kemik çimentolarında en sık kullanılan polimerdir [50].

**Çizelge 1.1** Akrilik kemik çimentosunun bileşenleri [51].

| Akrilik Kemik Çimentosu                                            |                         |                                     |                    |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| Toz bileşenler                                                     |                         | Sıvı bileşenler                     |                    |
| Bileşen                                                            | Kullanım                | Bileşen                             | Kullanımı          |
| <b>Polimetilmetakrilat</b>                                         | Polimer                 | Metilmetakrilat,<br>Butilmetakrilat | Monomer            |
| <b>Metakrilat-<br/>metilmetakrilat,<br/>Metilmetakrilat-stiren</b> | Kopolimer               | Dimetil-<br>paratoluidin            | Etkinleştirici     |
| <b>Baryum sülfat,<br/>Zirkonyum dioksit</b>                        | Radyoopaklaştırıcı<br>1 | Hidrokinon                          | Kararlık sağlayıcı |
| <b>Benzoil peraoksit</b>                                           | Başlatıcı               |                                     |                    |
| <b>Gentamisin,<br/>Tobramisin,<br/>Vankomisin</b>                  | Antibiyotik             | Klorofil                            | Boya               |
| <b>Klorofil</b>                                                    | Boya                    |                                     |                    |

Bununla birlikte PMMA kemik çimentolarının, monomer toksisitesi, dokuya zararlı yüksek polimerizasyon sıcaklığı, kemiğe yeniden modellenmesi veya entegre edilmesi için biyolojik potansiyel bulunmaması ve bitişik seviyelerde kırılmaya neden olabilecek aşırı sertlik gibi belirgin dezavantajları vardır [52]. Bunun yanı sıra, PMMA'nın oral enfeksiyonu hızlandırması ve istenmeyen kokuya sebep olması nedeniyle zayıf antimikrobiyal özellikler göstermektedir[54-55]. Bu sebeple PMMA'nın modifikasyonu önem arz etmektedir ve bu türden problemlerin üstesinden gelmek için çok önemli katkı sağlayacak araştırmalardan bir tanesi, nanopartikül, nanofiber veya nanotüp formlarından biri kullanılarak geliştirilen nano-katkılı sistemlerdir[56-57]. Medikal uygulamalardaki güvenilir özellikleri ve antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı metallerin, özellikle de tuz veya nanopartikül formundaki metallerin kullanımı oldukça ilgi çekmektedir.

#### 1.4.2 Kalsiyum Fosfat Kemik Çimentosu

İlk olarak Brown ve Chow tarafından 1986'da geliştirilen, osteoporotik kemiğin büyütülmesi işlemi için kalsiyum fosfat kemik çimentosu kullanma girişimi 1992'de başlamıştır [58]. PMMA çimentolarına alternatif olarak, kalsiyum fosfat çimentosu doğal kemikle kimyasal benzerlikleri, yüksek biyolojik aktiviteleri, biyolojik bozunabilirliği ve izotermal reaksiyonu nedeniyle çok dikkat çekmektedir [59]. Kalsiyum fosfat çimentoları biyoaktif çimentolardır. Kalsiyum fosfat çimentoları da akrilik çimentolar gibi toz ve sıvı kısımlardan oluşur ve vücutta kendi kendine donabilir. Toz kısmının içeriğini genelde kalsiyum fosfat tozları oluşturur. Bunlar çoğunlukla dikalsiyum fosfat dihidrat, kalsiyum karbonat, monokalsiyum fosfat monohidrat, amorf kalsiyum fosfat gibi maddelerken, sıvı bileşende genelde sodyum fosfat ve sudan oluşur [60]. Bununla birlikte, piyasada bulunan kalsiyum fosfat ürünlerinin çoğu, yetersiz mekanik özelliklere, çok uzun ayarlama ve sertleştirme sürelerine ve kontrolsüz bozulmaya bağlı olarak osteoporotik vertebra kırıklarını tedavi etmek veya taşıyıcı kemiklerin yerini almak için uygun değildir [61] .

**Çizelge 1.2** Akrilik kemik çimentolarıyla kalsiyum fosfat çimentolarının karşılaştırılması[51].

|                              | <b>Akrilik kemik<br/>Çimentosu</b>                                   | <b>Kalsiyum fosfat<br/>Çimentosu</b>            |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>Madde</b>                 | Polimer                                                              | Seramik                                         |
| <b>Sıvı</b>                  | Metilmetakrilat/kopolimer                                            | Sıvı veya sıvı solüsyonlar                      |
| <b>Toz</b>                   | Polimetilmetakrilat/kopolimer                                        | Kalsiyum fosfat tozu                            |
| <b>Sertleşme mekanizması</b> | Polimerizasyon                                                       | Çökünme ve çökeltme                             |
| <b>Ürün</b>                  | Polimetilmetakrilat                                                  | Kalsiyum fosfat<br>(hidroksiapatit veya bruşit) |
| <b>Ekzotermik ısı</b>        | 50-90°C                                                              | 37°C                                            |
| <b>Stabilite</b>             | Rezorbe olmaz                                                        | Rezorbe olur                                    |
| <b>Uygulama</b>              | Orta dereceli yük verilen<br>bölgeler artroplasti,<br>vertebroplasti | Kemik rejenerasyonu, yük<br>verilmeyen bölgeler |

Kalsiyum fosfat kemik çimentolarının en büyük avantajı düşük sıcaklık ayarı sayesinde in vivo olarak sertleşmesidir. Karıştırma işleminden sonra kalsiyum fosfat kemik çimentosu,

viskoz yapıda şekil alabilen bir hamur haline gelir ve ameliyat sırasında enjekte edilebilir [62-65]. Bu özelliği klinik durumlarda önemli faydalar sağlar. Kalsiyum fosfat çimentoları ekzotermik reaksiyon göstermezler. Bu nedenle ortapedik cerrahide kullanılan akrilik kemik çimentolarına kıyasla kalsiyum fosfat kemik çimentoları ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilirler [62,66,68-67].

Kalsiyum fosfat kemik çimentoları, mükemmel biyolojik aktiviteleri sayesinde kemikle doğrudan bir bağ oluşturabilme yeteneklerine sahiptir. Mikroyapısal özelliklerine bağlı olarak emilim hızı yüksektir. Kalsiyum fosfat kemik çimentoları bu avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajlara sahiptir. Akrilik kemik çimentolarına göre mekanik özellikleri daha zayıftır. Yük taşıyıcı olarak kullanıma pek uygun değildirler. Gözenekli yapısından dolayı kalsiyum fosfat seramiklerine göre mukavemetleri daha düşüktür. Enjekte edilebilirliği yetersizdir [62,68].

Son yıllarda yapılan çalışmalarla kalsiyum fosfat kemik çimentolarının kemik yenileme potansiyellerini iyileştirmek, terapatik ihtiyaçlara göre ilaçlarla veya diğer aktif moleküllerle birleşme kabiliyetini geliştirmek için aşamalar kaydedilmektedir [69].

#### **1.4.2.1 Kalsiyum Fosfat Kemik Çimentolarının Biyolojik Aktiviteleri ve Emilimi**

Kalsiyum fosfat kemik çimentolarının en önemli özellikleri biyoaktif yapıda olmalarıdır. Kemik yerine kullanılan bir biyoaktif malzeme lifli doku oluşmadan çevresindeki kemiklerle bağlanabilen malzemedir [70-71].

Biyoaktivite, implantasyon sırasında macun şeklindeki çimentonun mükemmel bir şekilde adapte olabilmesiyle kemik iyileştirme sürecini hızlandırır. Kalsiyum fosfat kemik çimentoları, implante edildiğinde iki farklı mekanizmayla emilir. Makrofaj ya da osteoklastlar gibi canlı hücreler tarafından düzenlenen aktif emilmedir. Pasif emilme ise vücut sıvılarında kimyasal çözünme ve ya hidroliz yoluyla düzenlenir [72-75]. İyonik yer değiştirmenin dahil edilmesi kalsiyum fosfat kemik çimentolarının bozunmasını kontrol etmek için bir diğer yöntemdir. Mesela, karbonatlar bir araya getirildiğinde apatit kafes bozukluğunu artırarak kristal çözünmesini kolaylaştırır [76-77].

Kalsiyum fosfat kemik çimentolarının emilimini etkileyen diğer faktörler gözeneklilik ve kristalliktir. Bu parametreler haricinde hastanın yaşı, metabolizması, sağlık ve sosyal alışkanlıkları, implantasyon bölgesi gibi dış faktörler emilimi etkileyebilir.

Kalsiyum fosfat kemik çimentoları emildikten sonra, kademeli olarak yeni kemiğin yerini alırlar. Çimento, kemik büyümesiyle paralel olarak emilip yer değiştirir. Böylece implant ile doku arasında ki boşlukları önler ve kemik oluşumuna (osteokondüksiyon) sebep olur [51].

#### **1.4.2.2 Kalsiyum Fosfat Çimentolarının İlaçla Etkileşimi**

Kalsiyum fosfat kemik çimentolarının sertleşmesi oda veya vücut sıcaklığında gerçekleşir. Bu çimentoların uygun sıcaklıklarda sertleşmesi ve gözenekli yapıda olması herhangi bir aktivite kaybına uğramadan ilaçlarla, biyolojik olarak aktif moleküllerle ya da farklı hücrelerle bir araya gelmesine olanak sağlar. Bu da kalsiyum fosfat kemik çimentolarının sadece osteokondüksiyona imkan sağlayan kemik grefti olarak değil de aynı zamanda kontrollü ilaç taşıyan sistemler olarak kullanım imkanı sunar. Çeşitli iskelet problemleri, patolojik sorunlar veya materyalin kapasitesini arttırarak kemik yenilenmesini sağlamak için kalsiyum fosfat çimentolarının aktif moleküllerle etkileşimi sağlanır [69]. İki strateji ev sahipliği yaptığı matriksin dokusal özellikleri açısından farklıdır. Örneğin ilaç çimentoya dahil edilirse, gelişmekte olan bir matriksin içine yerleşir. Çimentonun mikroyapısı, seramik parçacıkların karışık kristaller halindeki bir ağa bağlanmasından saatler hatta günler sonra ortaya çıkar. Fakat ilaç önceden hazırlanmış çimentoya eklenirse, oluşan bozulma haricinde ilaç salınım süresi boyunca mikroyapı sabit kalacaktır. Bu nedenle sonuçlar bir önceki durumlarla ilişkilendirilemez ve tahmin edilemez. Tüm bunlara bakarak, ilaç salınımı çalışmalarının gerçek cerrahi koşullar altında yürütülmesi gerektiği anlaşılmaktadır [69]. İlaç yükleme işlemi için farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. İlacı kalsiyum fosfat çimentosuyla birleştirmeden önce polimer yapıda mikro küreler üzerine katmaktır. Bu yöntem, diğer yükleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında bazı avantajlar sunar: ilacın salınım kinetiğinin modifikasyonuna imkan sağlar, mikrokürelerin bozunmasıyla, emilmenin ve yeniden şekillenme kabiliyetinin arttığı gözenekli bir matriks oluşur [69].

### **1.4.3 Biyoaktif Kemik Çimentoları**

Biyoaktif kemik çimentoları, polimetilmetakrilat kemik çimentolarının dezavantajlarından biri olan implant ile kemik arasında direk bir ilişki olmaması nedeniyle gündeme gelmiştir. Akrilik bazlı olup hidroksiapatit (HA) gibi biyoaktif doldurucuları mevcuttur [79-80]. Hidroksiapatit çok iyi biyoyuyumluluğu olan bir madde olması sebebiyle sert dokularla direkt olarak kimyasal bağ kurar. Hidroksiapatitin toksik olmayan özelliklere sahip olması nedeniyle meydana gelebilecek vücut reaksiyonları da minimumdur [50].

Biyoaktif kemik çimentolarına ilave olarak seramik dolduruculu kompozit çimentolar geliştirilmiştir. Bu kompozit çimentolar özellikleri açısından PMMA'dan daha üstündürler fakat kullanım kolaylığı açısından dezavantajları bulunmaktadır [79].

### **1.4.4 Kalsiyum Sülfat Çimentoları**

Kalsiyum sülfat doğada yaklaşık yüz yıldan beri sentetik kemik greft materyali olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum sülfat yüksek biyoyuyumluluğu olan, kolayca emilip göreceli olarak vücutta çözülebilen bir maddedir. Kolay çözülebilen bir madde olması kalsiyum sülfat çimentolarını ilaç salınımı konusunda avantajlı hale getirmektedir. Biyomekanik özellikleri açısından kalsiyum fosfat çimentolarına göre daha dezavantajlıdır [51,80].

### **1.4.5 Yağ Asidi İçeren Kemik Çimentoları**

Yağ asidi içeren kemik çimentolarının içeriğini doğal yağ asitleri ve kalsiyum karbonat oluşturur. Şimdilik piyasada sadece bir adet ürünü bulunmaktadır. Yağ asitleri hint yağından elde edilir ve bu da komponent A ve B' yi oluşturur. Yağ asidi polimerizasyonu komponent B içeriğinde ki su ve katalizör vasıtasıyla gerçekleşir. Kalsiyum karbonat ise tepkimeye girmez. Ancak dolgu maddesi olarak gözenekliliği ve mekanik özelliği sağlamaktan sorumludur [51].

## 1.5 KEMİK ÇİMENTOLARIN MODİFİKASYONLARI

### 1.5.1 Fiziksel Özelliklerin Modifikasyonları

#### 1.5.1.1 Polimerizasyon sıcaklığını ve sertleşme süresini değiştiren katkı maddeleri

Polimerizasyon sıcaklığını düşürmek ve sertleşme süresini hızlandırmak için, literatürde belirtilen kemik çimentosunun aşağıdaki modifikasyonları araştırılmıştır [81,82,83-85]:

- Baryum sülfat nanopartiküller,
- Silikon oksit nanopartiküller,
- Magnezyum oksit nanopartiküller,
- Hidroksiapatit nanopartiküller,
- Kitosan nanopartiküller,
- Karboksimetilselüloz partüküller,
- PMMA nanoküre ve mikroküreler,
- MMA partiküller,

Bu katkı maddelerinin bazıları sıcaklığı azaltırken, diğerleri artırabiliyor veya istenilen değerde sıcaklığı tutabiliyor. Aynı durum sertleşme süresi içinde geçerlidir. Literatürde bulunan en iyi sonuçlar şu şekildedir; ağırlıkça %2’lik konsantrasyonda magnezyum oksit ekleme sonrasında, modifikasyonsuz kemik çimentosuna kıyasla (58,9 °C), maksimum sıcaklık %11 daha düşüktür. Sertleşme süresi için de en iyi sonuçlar ise; hidroksiapatit için ağırlıkça %2’lik konsantrasyonda (2:05 dakika kısalma) ve magnezyum oksit için ise ağırlıkça %6’lık konsantrasyonda (2:50 dakika kısalma) eklenmesiyle gerçekleştiği görülmüştür [77] . Ek olarak karboksimetil-selülozun ilavesi, sertleştirme süresini yaklaşık %40 oranında azaltmıştır (ağırlıkça % 0,20) [81] .

#### 1.5.1.2 Karşıt maddeler olarak kullanılan katkı maddeleri

BaSO<sub>4</sub> (ağırlıkça% 8-10) ve ZrO<sub>2</sub> (ağırlıkça% 10-15) parçacıkları kemik çimentosunun X-Ray altında görünümünü sağlayan katkı maddeleridir [77,78]. Ek olarak Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SrO, SrHa, TiO<sub>2</sub> parçacıkları test edilmiştir [87-90].

### 1.5.2 Mekanik Özelliklerin Modifikasyonları

Kemik çimentosunun mekanik özelliklerini arttırmak için aşağıda ki katkı maddeleri eklenip test edilmiştir [82-84, 87-98]:

- Hidroksiapatit nanopartiküller,
- Floroapatit nanopartiküller,
- Montmorillonit partiküller,
- Titanyum oksit nanopartiküller,
- Silikon oksit nanopartiküller,
- Silika mezoporöz nanopartiküller,
- Çekirdek/Kabuk nanopartiküller,
- Zirkonya nanopartiküller /nanotüpler,
- Karbon nanotüpler,
- Polietilen,
- Polietilen tereftalat lifleri,
- Amonyum nitrat partiküller,
- Cam fiberler/tanecikler,
- Titanyum oksit fiberleri,

Örneğin, 40-60 nm çapında, 0.5-40 nm uzunluğunda karbon nanotüpler sıvı kemik çimento bileşenine eklenmiştir. Solüsyon ultrasonik banyoda tutulmuş ve 50 °C’de polimerizasyon başlatılmıştır. Karbon nanotüp eklenmesiyle kemik çimentosunun çekme mukavemeti ve sıkıştırma mukavemeti %20 oranında gelişmiştir [95]. 20 nm çapındaki hidroksiapatit ve floroapatit nanopartiküllerinin kullanılması da mukavemeti arttırmıştır. Örneğin; ağırlıkça %5 hidroksiapatit, sıkıştırma kuvvetini %3.7, çekme mukavemetini %16.7 arttırmıştır. Ağırlıkça % 5 floroapatit, sıkıştırma kuvvetini %12.3, çekme mukavemetini %36.7 arttırmıştır. Ayrıca ağırlıkça %8 hidroksiapatit ve floroapatit çimentonun sertliğini sırasıyla %6 ve %27 oranında arttırmıştır [95]. Kemik çimentosunun basınç dayanımını %48 oranında arttıran madde ağırlıkça %20 oranında eklenen zirkonyum nanopartiküllerdir [98]. Eklenen bazı katkı maddeleriyle kemik çimentosunun mekanik özellikleri artarken bazıları ise yararlı etkiye sahip olmamıştır. Mesela, %5 oranında eklenen mezoporöz silika nanopartiküller

(mesoporous silica nanoparticle-MSN) çimentonun kompresyon mukavemetini %4.2 arttırırken, eğme mukavemetini %16 düşürmüştür [93].

### 1.5.3 Biyolojik Özelliklerin Modifikasyonları

Biyolojik özelliklerin modifikasyonları iki farklı şekilde yapılır: osteointegrasyon ve günümüzde sıklıkla yapılan antibiyotik eklenmesidir [100-102]. Hidroksiapatit ve biyosel partiküllerin eklenmesi ve gümüş nanoparçacık eklenmesi üzerinde çalışılan ve geliştirilen deneyler arasındadır[103-105].

## 1.6 ANTİBAKTERİYEL KEMİK ÇİMENTOLARI

Artroplasti ameliyatlarında en sık karşılaşılan komplikasyonlarından biri enfeksiyon riskidir. Gelişen teknolojiye ve iyi, steril ameliyathane koşullarına rağmen enfeksiyonu engelleyebilmek çok mümkün değildir [106]. Enfeksiyonun hasta ve hekimde yarattığı travma araştırmacıları, enfeksiyon sıklığını azaltmak için farklı koruyucu ve tedavi edici yöntemleri geliştirmeye zorlamıştır. Gelişen antisepsi teknikleri, laminar hava akımı ve ultraviyolenin ameliyathanelerde kullanımı enfeksiyon oranını belli bir oranda düşürse de tamamiyle etkili olamamıştır [51]. Bunun üzerine enfeksiyonların önlenmesi için lokal olarak antibiyotik kullanımı ön plana çıkmıştır [106]. İlk olarak ise kemik çimentosuna antibiyotik katma fikrini 1970 yılında Buchholz ve Engelbrecht ortaya atmıştır [107]. Geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitesi, mükemmel su çözünürlüğü, termal kararlılığı ve düşük allerjenitesi nedeniyle gentamisin sülfatın seçilecek en iyi antibiyotik olduğunu düşünmüşlerdir. Bu nedenle, 2 gram gentamisin tozunu 40 gram Palacos kemik çimentosuna katarak kalça artroplastisi olgularında enfeksiyon oranını belli bir oranda düşürmüşlerdir [108]. 1974'den itibaren ise Klemm, antibiyotikli çimentoyu çeşitli tedavilerde kullanmaya başlamıştır [109]. Antibiyotik katılan kemik çimentosunun Avrupa'da 30 yılı aşkın bir tarihi bulunmasına rağmen Amerika'da popülerliğini FDA (Food and Drug Administration) kurumunun 2003 yılında onay vermesiyle kazanmıştır[51].

Kemik çimentosu taşıyıcı olarak kullanılmaya uygun bir materyaldir [106]. Spesifik aktif maddeler özellikle antibiyotikler kemik çimentosunun toz bileşenine kolaylıkla eklenebilir. Bu özelliği ise kemik çimentosunu gerekli ilaçları direkt olarak cerrahi bölgeye ileten modern bir ilaç iletim sistemi haline getirmektedir [110].

Antibiyotikli çimento, antibiyotiğin kemik çimentosunun toz kısmına eklenmesiyle elde edilir. Antibiyotikler sıvı halde eklenmeyip, sıvı olan kemik çimentosunun monomerleriyle karıştırılmazlar. Kemik çimentosuna elle karıştırılan antibiyotiklerin yanı sıra piyasada hazır antibiyotikli çimentolar da bulunmaktadır. Bunlar da elle karıştırılmaya kıyasla antibiyotiğin daha homojen dağılması mümkündür [111]. Kemik çimentosuna eklenecek olan antibiyotiğin çeşitli özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bu özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir [112];

- Geniş bakteriyel spektrum,
- Proteinlere düşük bağlanma oranı,
- Düşük alerjik potansiyel,
- Düşük konsantrasyonlarda iyi bakterisidal etki,
- Düşük direnç gelişimi,
- Suda iyi çözünür olma,
- Kemik çimentosundan salınımın iyi olması,
- Kimyasal ve termal faktörlere karşı dayanıklı olması,
- Kemik çimentosu mekanizmasını etkilememesi ya da etkisinin önemsiz olması

Bütün bu özellikler göz önünde bulundurulacak olursa gentamisin 1970'lerden beri en çok tercih edilen antibiyotik olmuştur [113].

#### **1.6.1 Antibiyotik Eklenmesinin Avantajları**

Kemik çimentosunda antibiyotik kullanılmasının avantajları aşağıda sıralanmıştır [114];

- Lokal yüksek antibiyotik seviyesinin sağlanması ,
- Düşük sistemik toksisite,
- Minimal lokal doku toksisitesi ,
- Uzun süreli sistemik antibiyotik kullanımının yan etkilerinin azaltılması,
- Derin periprostetik enfeksiyonların önlenmesinde profilaktik etki sağlama başlıca avantajıdır [115].

Antibiyotik yüklü kemik çimentolarının yukarıda bahsedilen avantajları olduğu gibi dezavantajlarında bulunmaktadır.

### 1.6.2 Antibiyotik Eklenmesinin Dezavantajları

**Mekanik Etki :** Antibiyotikler çeşitli enfeksiyonları engellemesinin yanı sıra birçok dezavantajı da barındırır. Antibiyotiklerin en önemli dezavantajlarından biri çimento matriks yapısını bozmasıdır. Bu da kemik çimentosunun mekanik özellikleri üzerinde olumsuz bir rol oynar [116]. Enfeksiyonun şiddetli olabileceği durumlarda antibiyotik miktarını arttırmak gerekli olabilir. Fakat 4,5 gramın üzerinde antibiyotik kullanımı kemik çimentosunu mekanik özelliklerini zayıflatmaktadır [116]. Yapılan bir çalışmada 40 gramlık kemik çimentosu içine 4.5 gramın üzerinde toz gentamisin eklenmesi yapılmıştır. Elde edilen bulgular incelendiğinde antibiyotiğin eklenmesiyle kemik çimentosunun kompresyon gücünün 70 Megapaskal(Mpa)'nın altına düştüğü bunun da kemik çimentosu için istenmeyen bir sonuç olduğu gözlemlenmiştir[117]. Bargar ve ark. yaptığı çalışmada 40 gr PMMA içine 1.2 gr tobramisin eklenmesiyle bükülme kuvvetinde % 13 azalma tespit etmişlerdir [118]. Göğüs ve ark. antibiyotik ekli kemik çimentosunun bükülme ve kompresyon gücünde belirgin bir azalma olduğunu belirtmişlerdir [119].

**Alerjik reaksiyon:** Richter-Hintz ve arkadaşlarının yaptığı başka çalışmada PMMA kemik çimentosunun içine gentamisin eklenmesiyle bir hastada tip 4 hipersensivite reaksiyonu gözlenmiştir [120].

**Toksisite:** Kemik çimentosuna antibiyotik eklenmesinde klinik olarak toksisite tespit edilmesede in vitro çalışmalarda negatif etkiler tespit edilmiştir. Sistemik toksisite olmamasına rağmen osteoblast ve osteosit fonksiyonları üzerine lokal toksisite olabilmektedir [115]. Isefuku ve ark. yaptıkları in vitro deneysel çalışmalarda 100 mg/L üzerindeki gentamisin seviyelerinde osteoblast proliferasyonunun inhibe olduğunu bulmuşlardır [121] .

**Bakterilerin direnç kazanması:** Antibiyotik yüklü kemik çimentosuyla ilgili bir diğer endişe ise bakterilerin o antibiyotiğe karşı direnç kazanmasıdır. Antibiyotik yüklü kemik çimentosunun kolonizasyon için optimal bir yüzeye sahip olduğu ve antibiyotiğe uzun süre maruz kalınmasının mutasyon direncinin oluşmasına izin verdiği bilinmektedir [122].

Antibiyotikli kemik çimentolarının dezavantajlarını genel başlıklar altında toplayacak olursak aşağıdaki maddelerden bahsedebiliriz [115] ;

- PMMA üzerindeki yapısal ve mekanik etkiler,
- Alerjik reaksiyonlar,
- İlaç direnci,
- Yüksek oranda salınan antibiyotiğin oluşturacağı toksite,
- Maliyet

Devam eden klinik kullanıma rağmen, antibiyotiklerin kemik çimentolarına dahil edilmesinin klinik etkinliği ile ilgili endişeler artmaktadır [123].

Antibiyotiklerin sebep olduğu bu dezavantajlar araştırmacıları farklı antimikrobiyel yöntemler geliştirmeye itmiştir. Bunlar; kemik çimentosuna bakteriyosin, kitosan ve gümüş iyonları katkısı gibi başlıca üzerinde çalışılan konulardır. Van Staden bir çalışmada bakteriyosinin kemik çimentosuna dahil edilmiş antibiyotikler için olası bir alternatif olabileceğini bildirdi. Çalışmanın in-vitro sonuçları, kalsiyum fosfat çimentosuna dahil edilen bakteriyosinlerin, matriksin özelliklerini önemli ölçüde değiştirmedığını ve peptitlerin aktif bir formda salındığını göstermiştir. Fareler üzerinde yaptığı çalışmalarda nisin-F yüklü kemik çimentosunun *S. aureus* enfeksiyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir [114]. Tan ve arkadaşları PMMA kemik çimentolarının yüzeyinde bakteri biyofilm oluşumunu önleyip önlemediğini araştırmak için PMMA kemik çimentosunu bir kitosan türevi olan HACC (hidroksipropiltrimetil amonyum klorit kitosan) ile yüklemişlerdir. Bu, kitosan yüklü PMMA, gentamisin yüklü PMMA ve antibiyotik içermeyen PMMA ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, HACC yüklü PMMA'nın yüzeyinde, biyolojik film oluşumunu inhibe ettiğini ve real-time PCR, HACC'nin bakteriyel gen ekspresyonunu değiştirdiğini göstermiştir [124]. Volker ve arkadaşları PMMA kemik çimentosuna gümüş nanopartiküller emdirerek *S. epidermis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda gümüş nanopartikül içeren kemik çimentosunun bu bakterilere karşı çok güçlü bir antibakteriyel etki gösterdiğini ve biyofilm oluşumunu geciktirdiğini görmüşlerdir. Aynı zamanda gümüş nanopartikül içeren bu kemik çimentosunun fare fibroblastlarında ve insan osteoblastlarında sitotoksik etki göstermediği ve iyi bir biyouyumluluk gösterdiği gözlemlenmiştir [125].

## 1.7 GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLER

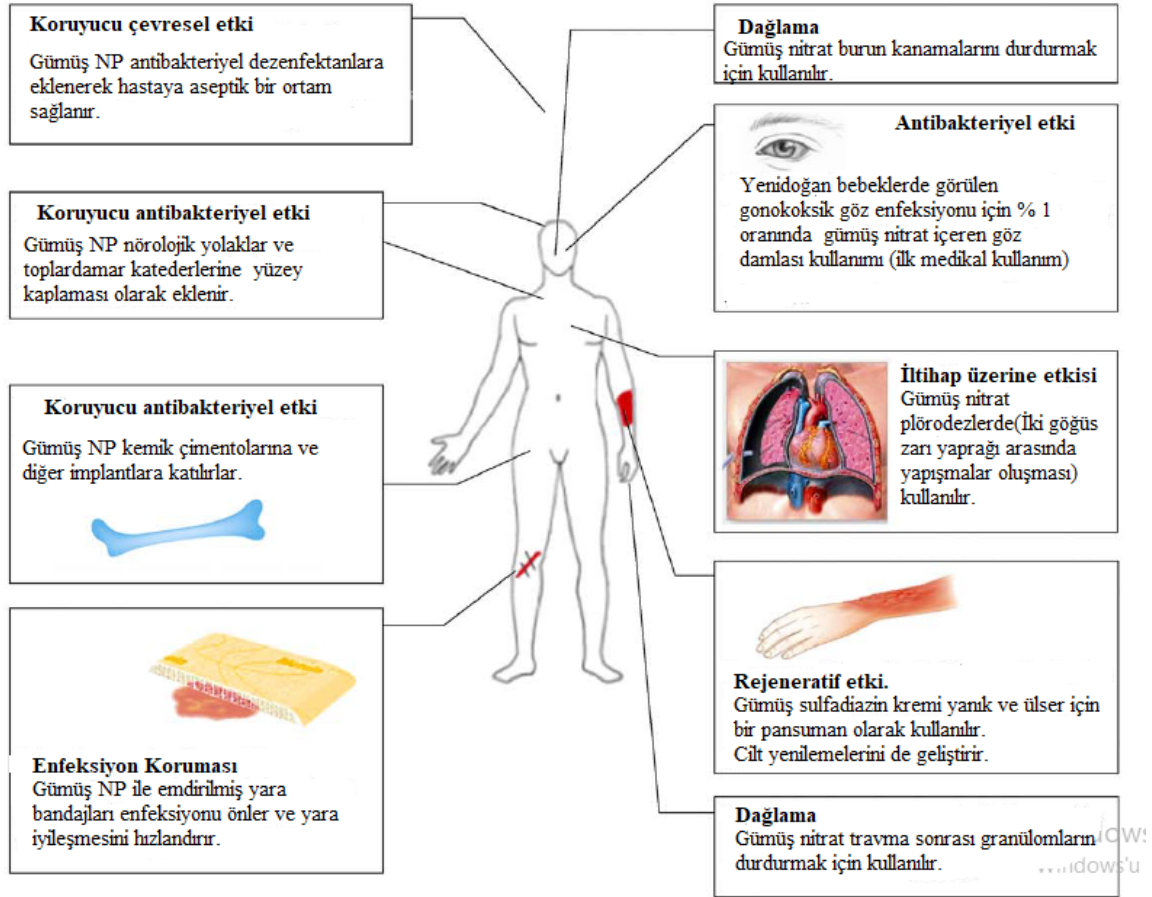
### 1.7.1 Gümüşün Tedavi Amaçlı Kullanımının Tarihi

Gümüş, yüzyıllar boyunca bir antimikrobiyal madde olarak kullanılmıştır. Örneğin, Fenikeliler uzun yolculuklarda su ve şarabı korumak için gümüş kaplar kullanmışlar. Eski Mısırlılar, gümüş tozunun faydalı, şifalı ve hastalık karşıtı özellikler sağladığına inanıyorlardı; bu yüzden antibiyotiklerden önce yara enfeksiyonlarının önlenmesi için gümüş bileşikler kullanılmıştır. Gümüşün ilk medikal anlamda kullanımı ise, 1884 yılında Alman kadın doğumcu Crede'nin, yenidoğan gonokokal oftalmi hastalığını önlemek için %1 oranında gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) içeren göz solüsyonu hazırlaması kayıtlara geçmiştir [126]. Şu anki toplumda ise, lokal olarak kullanılan gümüş sülfadiazin kremi, ciddi yanık yaraları için standart antibakteriyel tedavi olup, halen günümüzde yanık ünitelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [127]. Fakat, yetersiz lokal koruma ve ciddi sitotoksik etkiler, gümüş materyalinin bu iyonik rezervuar formlarının klinik kullanımını sınırlamıştır [128-130] .

Nano ölçekli materyallerin eşsiz özellikleri, nanopartikül (NP) üretimine, karakterizasyonuna ve uygulamalarına yönelik muazzam bir araştırma faaliyeti oluşturmuştur. Şu an nanoteknolojide ki son gelişmelerle birlikte nano ölçekli gümüş üretmekte mümkün olmuştur.

### 1.7.2 Gümüş Nanopartiküller ve Genel Özellikleri

Gümüş nanopartiküllerinin en belirgin özelliği birçok bakteri üzerinde antibakteriyel etki gösterebilmesidir. Gümüş materyalinin boyutlarının 1-100 nm' ye kadar inmesi, bakteri, virüs ve mantarlar üzerinde yok etme ve uzun süre bu aktivasyonunu koruma özelliğini büyük oranda arttırmaktadır. Bir maddeyi nano boyuta indirgemek onun yüzey alanını birkaç milyon kez arttırmak anlamına gelir. Artan yüzey alanı sayesinde güçlü bir antibakteriyel etki sağlar. Hazırlanan raporlara göre nano boyuta indirgenmiş gümüş mutasyona uğramış veya uğramamış yaklaşık 600 patojen üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. Bu nedenle de tıp dünyasında doğal antibiyotik olarak nitelendirilmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç dairesi (FDA), çok az yoğunluktaki kollodial nanogümüşün, diğer antibiyotiklere direnç gösteren birçok patojeni öldürdüğü için, nano gümüşü ilaç olarak kabul etmiştir (Şekil 1.4) [131] .



**Şekil 1.4** Tıpta gümüş (sağ taraf) ve gümüş NP (sol taraf) kullanımları [142].

Son yıllarda giderek artan nanopartikül üretimi, nanogümüş üretimini de aynı oranda arttırmıştır. Üretilen nanogümüş antibakteriyel özelliğe sahip olması nedeniyle birçok kullanım alanına sahip olmuştur. Çizelge 1. 3’de nanogümüşün bazı kullanım alanları gösterilmektedir.

**Çizelge 1.3 Gümüş Nanopartiküllerin Kullanım Alanları [132].**

| <b>Kullanım Alanı</b>                                     | <b>Örnek Uygulama</b>                                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Hastane Odaları ve Ameliyat Giysileri</b>              | Patojenlerin ve metisilin dirençli <i>S. auerus</i> enfeksiyonu (MSRA)'nın hastanede yayılmasını önler, ameliyat elbiseleri ve ameliyathane döşemeleri, personel üniforması, banyo havluları, perdeler, el sabunu, cerrahi maske |
| <b>Yara Tedavisi</b>                                      | Pansumanda polietilen nefes alabilen filmler, oyuk yaralarda hidrojel poliüretan köpük                                                                                                                                           |
| <b>Kişisel Temizlik</b>                                   | Pantolon, gömlek ve çoraplarda koku önleyici, cildin tahriş olmasına ve şiddetli ağrılara karşı çocuk bezinde                                                                                                                    |
| <b>Sağlık Araçları, Vücuda Takılan Parçalar (implant)</b> | Damar içine girip besin vermek ya da film çekmek için kullanılan ince uzun boruların kaplanması, yumuşak dokulara takılan parçalar ve tendonların onarılması                                                                     |
| <b>Mesleki Deri Hastalıkları</b>                          | Mesleki deri hasarlarını önlemek için eldiven astarları                                                                                                                                                                          |
| <b>Saklama ve Muhafaza İşlemleri</b>                      | Antik kitaplar, el yazmalarını, haritaları mantar ve kurtlardan korumak, gözenekli duvarların yalıtım malzemelerinde mantar ve küflerin hasarını engellemek,                                                                     |
| <b>Çevre</b>                                              | Banyo ve mutfak döşemelerinde küflere karşı dolgu maddesi olarak, yiyeceklerin saklandığı alanlarda bozulmayı ve zehirlenmeyi önlemek                                                                                            |
| <b>Yiyecek Paketleme</b>                                  | Yiyecek kapları ve paketleme materyallerinde bozulmayı önlemek                                                                                                                                                                   |
| <b>Kozmetik</b>                                           | Sivilce ve aknelerde                                                                                                                                                                                                             |

### **1.7.3 Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Etkisi**

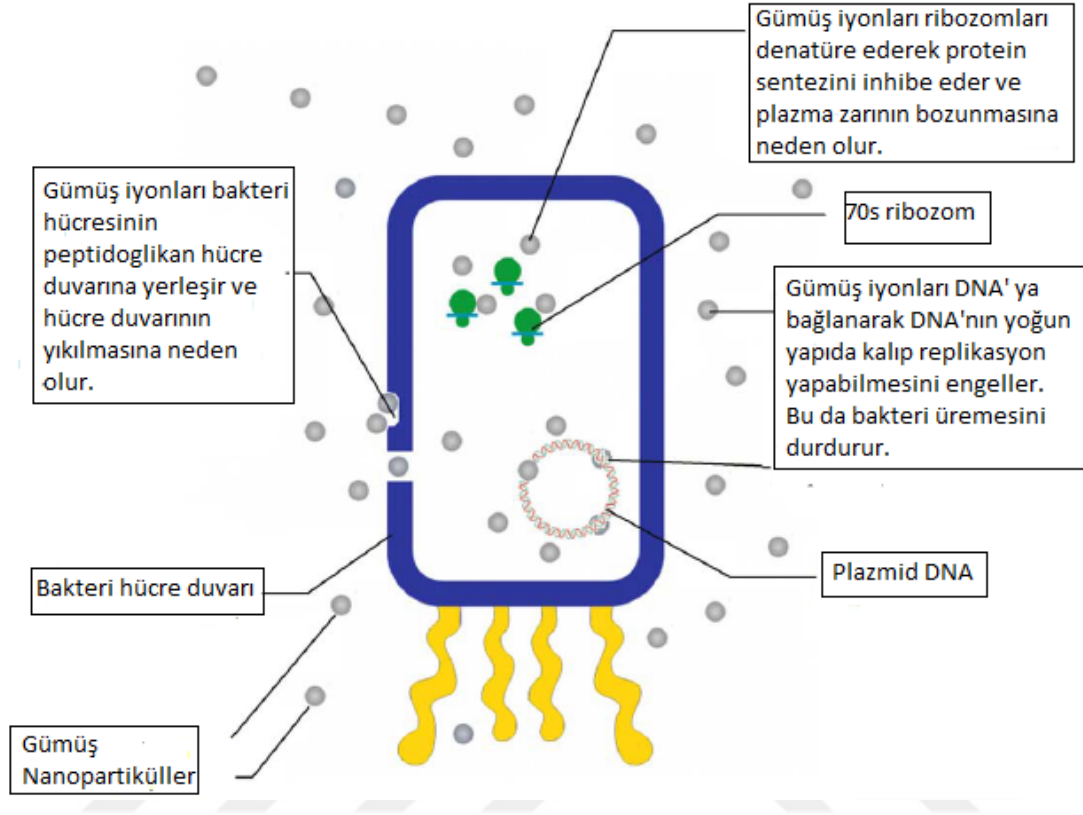
Antimikrobiyal maddeler; bakteri, virüs ya da mantar üremesinin önüne geçen veya sınırlandıran madde demektir. Bazı antimikrobiyal maddeler birden fazla bakteri, virüs ve mantar çeşiti üzerinde etkili iken, bazıları ise sadece belirli canlılar üzerinde spesifik olarak

öldürücü etki gösterir. Fakat nano ölçekli gümüş gibi neredeyse bütün mikroorganizmaların üzerinde etkili olan antimikrobiyal madde sayısı yok denecek kadar azdır [131]. Aynı anda birçok mikroorganizma üzerinde öldürücü etkisi olması nanogümüşü tercih sebebi haline getirmektedir. Aslında yapılan araştırmalar nano boyuta indirgenmiş pek çok metalin antimikrobiyal etkisi olduğunu göstermektedir. Fakat gümüşün tercih edilmesinin başlıca sebepleri; nanogümüş üretim işleminin kolay, maliyetinin ucuz olması, kontrollü kullanımında vücuda herhangi bir toksik etki yapmaması ve zararsız olması ve aynı anda birçok bakteriye karşı en direçli metal olmasıdır [133]. Antibiyotikler, insanlarda bulunmayan bakterilerin spesifik kimyasal hedeflerine bağlanan tıpta kullanılan standart antimikrobik maddelerdir [134]. Fakat bu bağlanma, spesifik bir antibiyotiğe açık olan bakteri türlerinin sayısını daraltıyor ve bakteriler tarafından geliştirilen antibiyotik direncine katkıda bulunuyor ve nihayetinde birçok ilaca dirençli bakteriler yaratıyor [135]. Birçok ilaca dirençli hale gelen bu bakteriler, enfeksiyon sayısını daha da arttırmakta ve etkili antimikrobiyal alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle nanogümüş harika bir alternatiftir. Geniş spektrumda ki Gram + ve Gram – bakteriler üzerinde etkilidir [136-137]. Ayrıca bakterilerin antibiyotiklerde olduğu gibi gümüşe direnç kazanması nadiren gerçekleşir. Çünkü gümüş direnci oluşması için, bir bakteri jenerasyonunun üç farklı bakteri sisteminde, üç farklı mutasyona uğraması gerekir [137-138].

Gümüş nanopartiküllere (AgNP) maruz kalmak, bakterilerde toksisiteye sebep olur. Gümüş iyonlarının mikroorganizmaları nasıl öldürdüğü konusu halen araştırılmaktadır. Gümüş iyonlarının ve AgNP'lerin bakteri hücrelerinde meydana getirdiği değişiklikler incelenerek mekanizma anlaşılmaya çalışılmıştır. Bir teoriye göre; gümüşün bakterinin membran proteinleri ve enzimleri üzerindeki, tiol (-SH) işlevsel gruplarına bağlanarak onları etkisiz hale getirdiği ve hücrenin yaşamsal proseslerine müdahale ettiği, zar geçirgenliğini düşürerek hidrojen katyonu ( $H^+$ ) yer değiştirdiği ve böylece bakterinin ölümüne neden olduğu bildirilmektedir [139]. Ag iyonları, geçirgenlik ve solunum dahil hücresel fonksiyonları bozarak plazma membranı ile etkileşime girer ve sonuçta hücre yıkımına sebebiyet verir. AgNP maruziyeti, DNA' ya bağlanarak ya da ribozomları bozarak, DNA replikasyonunu ve protein sentezini engeller [140].

Yapılan bir çalışmaya göre gümüş iyonunun güçlü bir nükleik asit bağlayıcı olarak DNA replikasyonuna engel olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 1.5). *E. coli* ve *S. aureus*

bakterilerinin, gümüş bulunan ortamda DNA'larının zarar gördüğü ve bu sayede DNA replikasyonunun gerçekleşemediği gösterilmiştir [141].



Şekil 1.5 Gümüş iyonlarının antibakteriyel aktivitesinin mekanizmaları [143-144].

#### 1.7.4 Gümüş Nanopartiküllerle Hazırlanmış Kemik Çimentoları

Kemik çimentosu, diz ve kalça protezi ameliyatlarında olduğu gibi eklem protezlerini, implant ve kemik arasında ki boşluğu doldurmak için kullanılır. Çoğunlukla kullanılan kemik çimentosu oda sıcaklığında donabilen akrilik özellikteki polimetilmetakrilat (PMMA) kemik çimentosudur [145]. Yapılan çalışmalarda total eklem protezi ameliyatı sonrası enfeksiyon oranının %3' e kadar yükseldiği, antibiyotik yüklü PMMA kemik çimentosuyla enfeksiyon riskinin %0'a düşürülebileceği bulunmuştur [146]. Fakat bunun yanısıra birçok çalışma da, antibiyotik yüklü kemik çimentosunun enfeksiyon riskini belirli bir şekilde azaltmadığını göstermiştir [147]. Bu nedenle, geleneksel kemik çimentosunun antibiyotiklerle yüklenip yüklenmediğinin, artroplastiyi takiben enfeksiyon oranını etkili bir şekilde azaltıp azaltmadığı hala belirsizliğini korumaktadır [148-149]. Antibiyotiklere direnç kazanan bakteriler yüzünden, antibiyotik yüklü kemik çimentolarının etkinliğinin azalması, tedavi edilemez bulaşıcı hastalıklara, küçük yaralarla beraber ölüme bile sebebiyet verebilmektedir.

Gümüş nanopartiküller birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanmış bakteriler üzerinde bile güçlü öldürücü etkiye sahiptir [145]. AgNP ile karıştırılan PMMA esaslı kemik çimentosu yüzey biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azaltarak, bakteri yüzey kolonizasyonunu önlemektedir [150]. % 0.05 gibi düşük bir nanogümüş konsantrasyonlu kemik çimentosu bile, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *A. baumannii* enfeksiyonlarını oluşturan artroplast cerrahisinde enfeksiyon oranını önemli ölçüde azaltmıştır [151].

Yapılan ayrı bir çalışmada ise gentamisin antibiyotiği yüklü PMMA kemik çimentosuyla gümüş nanoparçacıklara maruz bırakılmış PMMA kemik çimentosunun antibakteriyel etkisi karşılaştırılmıştır. Tek bir parametre olarak metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) bakterisine bakılmıştır. Gentamisin az bir bakteriyel etki gösterirken, gümüş nanoparçacıklar bakterilerin çoğalmasının tamamen engellemiştir [152].

Başka bir çalışmada ise, Polina ve arkadaşları oleik asitle kaplı gümüş nanopartikülleri hazırlayarak karakterize etmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki gümüş nanopartikülleri PMMA kemik çimentosuna emdirmiştir. Yaptıkları çalışmada elde edilen kemik çimentosunun MRSA, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. baumannii* 'ye karşı antibakteriyel etkisini incelemişlerdir. Seçilen patojenlerden özellikle *A. baumannii* ortopedik ameliyatlarda kullanılan ilaçlara karşı fazla direnç gösteren bir bakteri olması açısından dikkati çekmektedir. *S. epidermidis* gentamisin antibiyotiğine yüksek direnç gösterirken, MRSA da metisiline direnç gösteren bir bakteridir. Bu çalışma oleik asitle kaplı gümüş nanopartiküllerle hazırlanmış PMMA kemik çimentosunun MRSA ve *S. aureus* üzerinde fazlaca antimikrobik etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca *S. epidermis* ve *A. baumannii* bakterilerinin azalması, enfeksiyonu önlemek için uygulanabilir bir yaklaşım olduğunu göstermiştir [153].

## 1.8 BİTKİSEL KAYNAKLI POLİMERLER

Tarımsal ürünlerin, yakıtlar ve tüketici ürünleri için endüstriyel kullanımı 1920'lerde başlamıştır. İkinci Dünya Savaşı'ndan kısa bir süre sonra, bu sentetik polimerler daha ucuz, daha dayanıklı ve daha çok yönlü olan petrol bazlı kimyasallarla değiştirilmiştir. Üretilen petrol bazlı polimerler, plastikler insanlığa birçok açıdan kolaylık sağlamıştır. Fakat petrol kaynaklarının sınırlı olması, fiyatlarının artmaya devam etmesi ve en önemlisi çevresel

yönden ve insan sağlığı açısından zararlı yönlerinin çok olması çeşitli kaygılara sebep olmaktadır [154].

Petrol bazlı sentetik plastikler olarak bilinen polistiren, polipropilen, polivinil klorür, polimetilmetakrilat, polietilen günlük yaşantımızda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu plastikler her yıl 250 milyon tondan fazla üretilmekte ve bu miktarın birçoğu ambalaj malzemesi olarak kullanılıp, doğaya atılmaktadır. Bu doğaya atılan sentetik plastiklerin toprağa karışmaları uzun yıllar sürdüğü için canlıların yaşamını ve doğanın doğal dengesini olumsuz etkilemektedir. Bu petrol bazlı plastiklerin bozulma süresinin uzun olmasından dolayı oluşan çevre kirliliği de sorun haline gelmiştir [155].

Petrole olan bağılılığı arttıran, canlı yaşamını ve sağlığını olumsuz etkileyen ve doğal ekosisteme zarar veren bu plastiklerin yerine biyobozunur özellikte, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen hammaddelerin kullanıldığı bitkisel kaynaklı polimerlere ihtiyaç doğmuştur [155]. Sadece çevre ve ekosistem için değil aynı zamanda medikal uygulamalar için de doğal olarak üretilmiş biyopolimerler, biyolojik olarak uygunluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği, toksik olmaması ve biyoaktif molekülleri adsorbe etme kabiliyeti nedeniyle tercih sebebidir [156].

Polimer mühendisliğinde teknolojik ilerleme, istenen uygulama için yeni özelliklere sahip yeni polimer kompozitlerin üretimine imkan vermektedir. Yün, pamuk, deri ve ipek gibi tarımsal kaynaklardan elde edilen biyopolimerler, bilim insanları tarafından bir süredir tercih sebebidir [157]. Doğal olarak üretilen bu biyopolimerler kaynaklarına göre farklı gruplara ayrılırlar. Fakat genel olarak bahsedecek olursak bunlar; selüloz, nişasta, karraginan, aljinat, agar gibi polisakkaritlerden oluşur. Ayrıca yine hayvansal polisakkarit kökenli olan kitin, kitosan, hyaluronatlar ve protein kökenli fibrinojen, albumin, kollajen, resilin, ipek ve çeşitli yağlardan oluşur [155].

Bir diğer alternatif olarak da, doymamış bitkisel yağlar düşük maliyetle polimerleştirilebilir. Evrensel kullanılabilirlikleri, doğada bulunan biyolojik bozunabilirlik ve düşük fiyat nedeniyle, bitkisel yağlar hem polimer malzemeler için platform kimyasalları olarak, hem akademik hem de endüstriyel araştırmalar için yoğun bir ilgi alanı haline gelmiştir [158-159]. Özellikle son yıllarda, doğal yağlar, geleneksel petro-kimyasal bazlı polimerler ve reçineleri değiştirmek ve polimerik malzemelerin hazırlanması için uygun hammadde olarak dikkatleri

üzerine çekmiştir. Bezelye ve tung yağı gibi doğal yağlar boya ve vernik endüstrisinde uzun zamandır çeşitli kullanım alanları bulmuştur. Bu yağlar geleneksel olarak reçineler veya reçinelerin hazırlanması için hammadde olarak organik kaplamalarda kullanılmıştır. Polimerizasyonlarda soya yağı, aspir yağı, ayçiçeği yağı ve kanola yağı gibi yağlar kullanılmıştır [160]. Hint yağı, susam yağı, keten tohumu yağı gibi doğal yağlar da bitkisel kaynaklı polimer sentezi için uygun yağlardır. Özellikle soya yağından oluşan polimer üzerinde çalışmalar devam etmektedir [161]. Doğal yağlar yağ asitlerinin trigliserid esterleridir. Trigliseridler, bir gliserol merkezi ile birleştirilen üç yağlı asitten oluşur [162]. Bu yağların yapısında bulunan trigliseritlerin çok çeşitli uygulama alanları olduğundan modifikasyonla fiziksel ve kimyasal özellikleri değiştirilerek yeni polimerler elde edilebilir [163].

Karbonhidratlar, proteinler ve bazı diğer bitkisel kökenli polimerlere kıyasla bitkisel yağlardan elde edilen polimerleri cazip hale getiren bazı özellikler vardır [164];

- Bitkisel yağlar doğal olarak polimerler olarak mevcut olmamasına rağmen poliüretan, poliester, polietir ve poliolefin gibi çeşitli polimerleri sentezlemek için kullanılabilecek monomer zincirleri için öncü maddelerdir. Bu nedenle, bitkisel yağlardan elde edilen polimerlerin yapıları, bitkisel yağdan farklı monomerlere dönüştürülerek kolaylıkla ayarlanabilir.
- Bitkisel yağlar, hidrofobik polimerlerin sentezi için çok uygundur ve karbonhidrat ve protein gibi, doğal olarak hidrofilik olan diğer canlı kaynakları da tamamlarlar.
- Bitkisel yağlar, petrol esaslı monomerlere benzer yapılar içeren monomerler üretmek için uygundur. Bu nedenle, petrol bazlı biyopolimerlerin muhtemelen aynı istenen özelliklere sahip bitkisel yağlardan elde edilmiş polimerler elde edilmesi mümkündür .

### **1.8.1 Soya Yağından Sentezlenen Polimerler**

Soya yağı ucuz, bol miktarda bulunan ve biyolojik olarak kolayca parçalanabilen maddelerdir [165]. Soya yağlarından türetilmiş polimerler, Larock ve ark. tarafından yoğun ve detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Soya fasulyesi yağları biyolojik olarak parçalanabilen bitkisel yağlar olup, yığın halde mevcuttur [166-169]. Doğal soya yağı, yüksek oranda doymamış yağ asidi yan zincirleri olan bir trigliserid yapısına sahiptir. Bu yağlardaki doymamışlık onları çeşitli

polimerlerin hazırlanması için ideal monomerler yapar. Soya yağı, düşük doymuş soya yağı veya konjüge doymuş soya yağının stiren veya divinilbenzen ile katyonik kopolimerizasyonu, çeşitli kopolimerlerin oluşmasının sağlar. Soya yağının özellikle stiren ile yapılan kopolimerizasyonu iyi mekanik özellikleri ve termal kararlılığı olan polimerler oluşmasını sağlar. Soya yağından üretilmiş birkaç çeşit polimer incelendiğinde elastomerlerden sert, sünek ve nispeten kırılğan gerilme özellikleri gösterdiği görülmüştür. Normal ve düşük doymuş soya yağı polimerleri strete yavaş bir artış sergiler [170]. Katyonik kopolimerizasyon ile hazırlanan bazı soya yağı polimerleri, çok şiddetli deformasyona uğramış olsa bile belirli bir şekli hatırlayabilme kabiliyetini olan iyi bir şekil-bellek (shape-memory) etkisi göstermektedir [170-171]. Bu tarz özelliği olan malzemelere de , inşaat, mekanik ve imalat, elektronik ve haberleşme, matbaacılık ve ambalajlama, tıbbi malzeme ve medikal ürün, eğlence ve spor, ev eşyaları gibi alanlarda sıkça ihtiyaç duyulmakta ve kullanılmaktadır [170].

## BÖLÜM 2

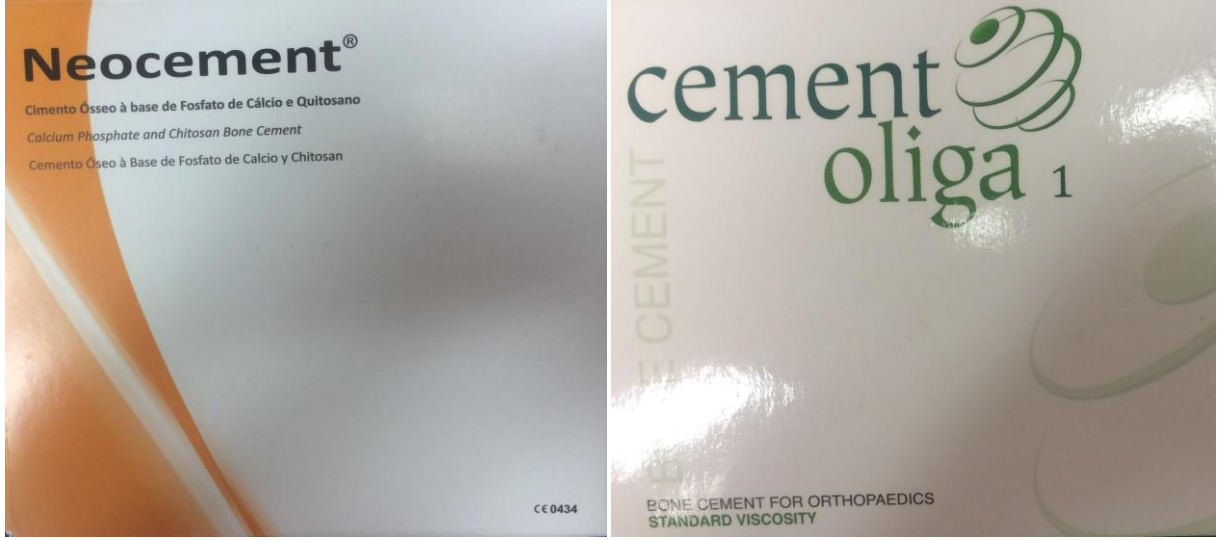
### DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 2.1 KİMYASALLAR

Polimer sentezi için kullanılan, palmitik asit (10.7 wt%), stearik asit (4.6 wt%), oleik asit (23.5 wt%), linoleik asit (52.8 wt%) and linolenik asit (5.7 wt%) içeren soya yağı Çotanak/Altaş Yağ Su ve Tarım Ürünleri Gıda İnşaat Otomotiv Nakliyat San. ve Tic. AŞ' den tedarik edilmiştir.  $\text{AgNO}_3$  ve diklorometan (DCM) Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

#### 2.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ VE BAKTERİYEL SUŞLAR

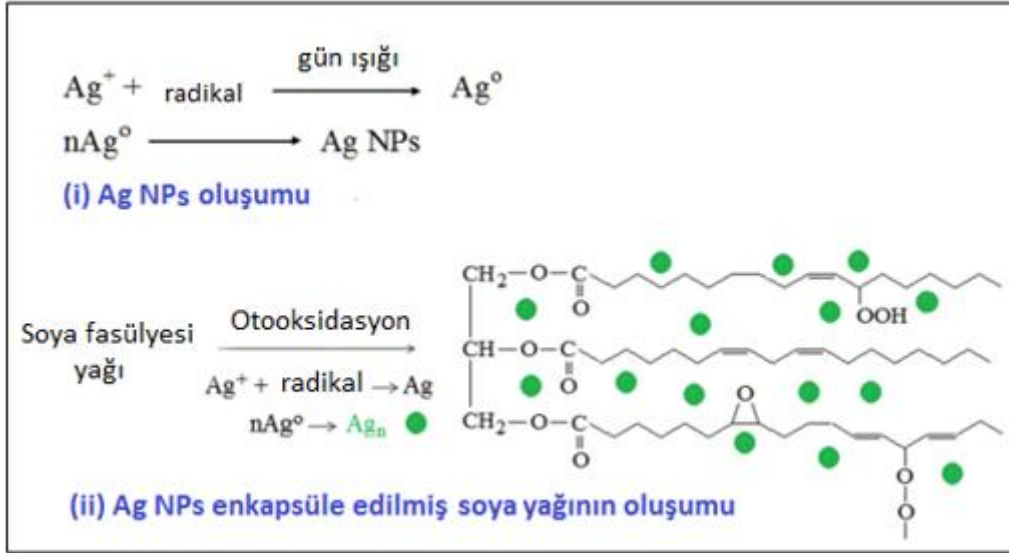
Pre-osteoblastik MCT3T3-E1 hücreleri American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)'dan tedarik edildi ve %10 fetal sığır serumu ve %1 UI  $\text{ml}^{-1}$  penisilin–streptomisin içeren  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium) besi ortamında 37 °C'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde büyütüldü. *E. coli* ATTC25922 ve *S. auerus* ATTC25923 bakterileri ATCC'den temin edildi. 2-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ve ölü/canlı hücre ikili boyama kiti, Sigma-Aldrich (USA) firmasından satın alındı. Çalışmada, PMMA-bazlı kemik çimentosu olarak Oliga firmasından, Cement Oliga1® ve kalsiyum fosfat bazlı kemik çimentosu olarak Gelişim Medikal, Neocement® ürünü kullanıldı.



**Şekil 2.1** PS-Agsbox katkılı kemik çimentolarının hazırlanmasında kullanılan PMMA (Cement Oliga1®) ve  $\beta$ -TCP (Neocement®) bazlı ticari kemik çimentoları.

### **2.3 AGNPS KATKILI (AGSBOX) POLİMERİK OTOOKSIDE SOYA YAĞININ (PSBOX) SENTEZİ**

Agsbox otooksidasyonu, daha önce geliştirilmiş prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir [171]. Kısaca, 2.7 g soya yağı bir petri kabı içerisine ( $\Phi = 7$  cm, oil thickness: 0.7 mm) yayılmıştır. Sonrasında bu yağ içerisine 0.5 g  $\text{AgNO}_3$  eklenerek cam bir baget yardımıyla zaman zaman karıştırılmıştır. Yağ tabakası, 40 gün oda sıcaklığında havada gün ışığına maruz bırakılmıştır. AgNPs'in oluşumu ile birlikte kahverengi viskoz bir polimer elde edilmiştir. Polimerik soya yağının çözünabilir kısmı kloroform ekstraksiyon metodu ile uzaklaştırılmış ve oda sıcaklığında 24 saat boyunca vakumlu fırında kurutulmuştur.



**Şekil 2.2** AgNPs oluşumu ve (II) AgNPs enkapsüle edilmiş soya yağının oluşumu [171].

## 2.4 AGSBOX (PS-AGSBOX) İLE STİRENİN KOPOLİMERİZASYONU

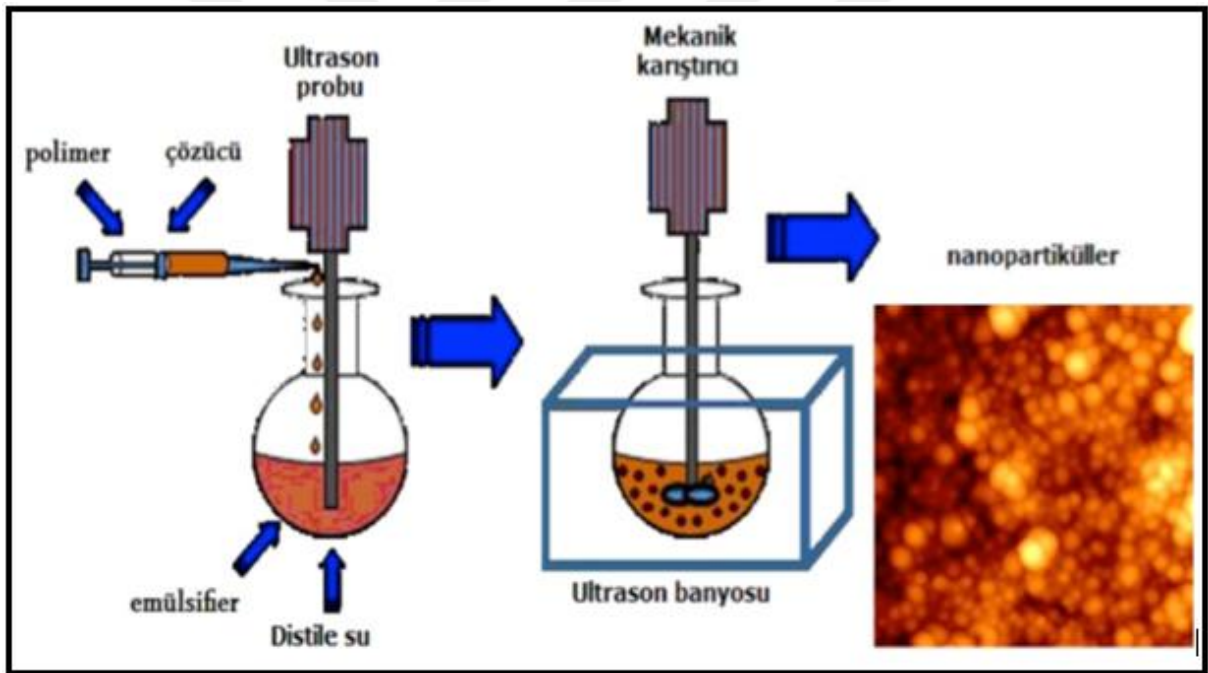
Stirenin polimerizasyonu için ilk olarak, 10 g stiren ve 1 g Agsbox karıştırılmıştır. Daha sonra oksijen ve nitrojen gibi reaktif türleri uzaklaştırmak için yaklaşık 3 dakika boyunca argon gazı geçirilmiştir. Ağzı sıkıca kapatılmış olan tüp yağ banyosunda 95 °C’de 5 saat boyunca bekletilmiştir. Ardından polimer 25 ml saf kloroformda çözüldü. Daha sonra çözeltiye 200 ml metanol eklenerek polimerin çökmesi sağlanmıştır. Çöken polimer ilk olarak filtre kağıdıyla filtre edildi. 24 saat açık havada kurutulduktan sonra 24 saat 40 °C’deki vakumlu etüvde kurutulmuştur.

## 2.5 PS-AGSBOX NPS’İN SENTEZİ

PS-Agsbox NPs çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. PS-Agsbox kopolimeri (1 mg/mL) organik çözücü olarak diklorometan kullanılarak çözülmüştür. Sürfaktan olarak Tween 80 içeren (%6) sulu faza, organik faz prob sonikatör (T 125 Digital Ultra Turrax Homogenizer; IKA, Germany) kullanılarak buz banyosu eşliğinde damla damla eklenmiştir (Şekil 2.3.). Oluşan emülsiyon organik çözücünün uzaklaşması için 2 saat mekanik karıştırma altında sonike edilmiştir. Çözücünün uzaklaşmasından sonra, elde edilen nanopartiküller ~12,000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj (Centrifuge 5810R; Eppendorf, Germany) edilmiştir. Elde edilen pellet deiyonize su içerisinde süspanse edilip, santrifüj

edilmiştir. Yıkama adımı 2 kez tekrarlanarak sonraki deneylerde kullanılmak üzere pelleti toz haline getirmek için dondurarak kurutulmuştur.

Tipik bir emülsifikasyon-çözücü uzaklaştırma nanopartikül hazırlama prosesinde, farklı değişkenler (polimer konsantrasyonu, Tween-80 konsantrasyonu ve homojenizasyon değeri) nanopartikülün fizikokimyasal özelliklerini değiştirmektedir. PS-Agsbox NPs hazırlanmasında bu proses değişkenlerinin etkisi bu çalışmada değerlendirilmiştir. Partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), ve zeta potansiyel analizi dinamik ışık saçılması cihazı (DLS; model 3000 HAS; Malvern Instruments, UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En küçük partikül boyunun alındığı homojenizasyon değeri ve polimer/Tween-80 konsantrasyonu seçildikten sonra, optimize edilmiş formülasyon bütün deneylerde kullanılmıştır.



**Şekil 2.3** Çift emülsiyon çözücü uzaklaştırma metodu ile nanopartiküllerin hazırlanışı.

## 2.6 PS-AGSBOX POLİMERİNİN VE PS-AGSBOX NPS'İN KARAKTERİZASYONU

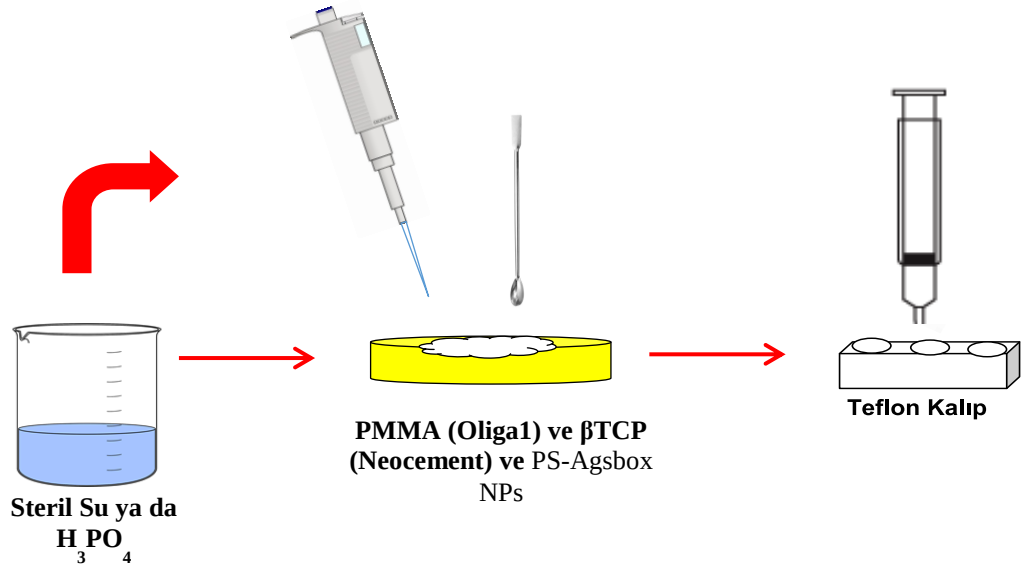
PS-Agsbox NPs'in moleküler yapısını analiz etmek için fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (Perkin-Elmer SpectrumOne, Thermo Nicolet) kullanılmıştır. NPs'in yüzey morfolojisi görüntüleri, 5.0 kV'a ayarlanmış taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Quanta

FEG 450, Germany) alınmıştır. SEM örneği hazırlamak için , bir damla NPs solüsyonu grid üzerine damlatılarak, “sputter coating” cihazı kullanılarak 30 saniye 1 nm kalınlığında partiküller altın/palladyum tabakası ile kaplanmıştır. Ayrıca PS-Agsbox NPs morfolojisi atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) (Nanomagnetics, Turkey) kullanılarak da incelenmiştir. Farklı parametrelerde üretilen nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımı, zeta potansiyeli Zeta Sizer (Malvern Instruments, Model 3000 HSA, England) kullanılarak ölçülmüştür.

PS-Agsbox polimerinin fizikokimyasal özelliklerini incelemek için daha önce alınmış olan Attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) spektrumu[172] ve H-NMR spektrumu[171] kullanıldı.

## **2.7 KEMİK ÇİMENTOLARININ HAZIRLANMASI**

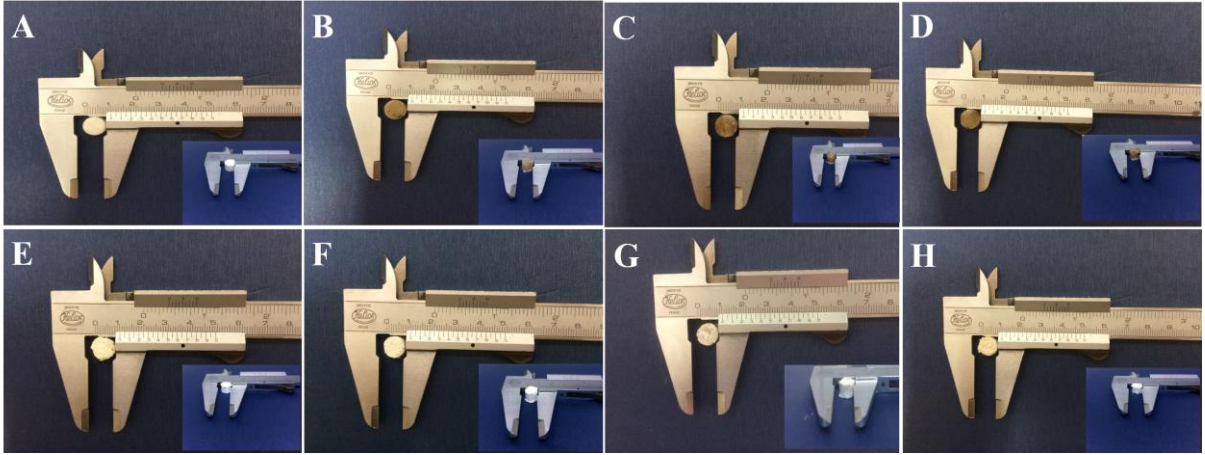
PMMA-bazlı kemik çimentoları (Cement Oliga1®, Ankara, Turkey), 0.4 g toz bileşen 1 mL benzoil peroksit ile basit bir mikser aracılığı ile karıştırılarak silindirik kalıplara (1 cm çap ve 0.5 cm yükseklik), dökülmesi ile hazırlanmıştır. Farklı oranlarda PS-Agsbox NPs içeren kemik çimentoları ağırlıkça PS-Agsbox NPs: PMMA oranı, 1.25, 2.5 ve 3.75% olacak şekilde bileşen olarak katkılanarak aynı şekilde hazırlanmıştır (Şekil 2.4.). Karışımda kullanılan oranlar Çizelge 2.1.’de verilmiştir. Kemik çimentoları sertleştikten sonra, örnekler karanlıkta, steril koşullarda saklanmıştır.  $\beta$ -TCP-bazlı kemik çimentoları da aynı yöntemle hazırlanmıştır. Kısaca, farklı oranlardaki PS-Agsbox NPs [1.25, 2.5 and 3.75% (w/w)], 0.4 g  $\beta$ -TCP (Neocement®, Portugal), 0.07 g kitosan , ve sıvı fazın (sitrik asit, glikoz ve apirojenik su) düşük ayardaki mikser yardımı ile karıştırılması ile hazırlanmıştır. Hazırlanan Şekil 2.5.’de PMMA bazlı (A, B, C, D) ve  $\beta$ -TCP-bazlı (E, F, G, H) kemik çimentolarının fotoğrafları verilmiştir.



**Şekil 2.4** Saf ve PS-Agsbox NPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP-bazlı kemik çimentolarının hazırlanma basamakları.

**Çizelge 2.1** Hazırlanan saf ve PS-Agsbox NPs yüklü kemik çimentosu formülasyonları.

| Numune          | Bileşim                                             |
|-----------------|-----------------------------------------------------|
| PMMA            | [PMMA:PS-AgsboxNPs, 100:0% (w/w)]                   |
| 5PMMA           | [PMMA:PS-AgsboxNPs, 98.7:1.2% (w/w)]                |
| 10PMMA          | [PMMA:PS-AgsboxNPs, 97.5:2.5% (w/w)]                |
| 15PMMA          | [PMMA:PS-AgsboxNPs, 96.2:3.75% (w/w)]               |
| $\beta$ -TCP    | [CaPO <sub>4</sub> :PS-AgsboxNPs, 100:0% (w/w)]     |
| 5 $\beta$ -TCP  | [CaPO <sub>4</sub> :PS-AgsboxNPs, 98.7:1.2% (w/w)]  |
| 10 $\beta$ -TCP | [CaPO <sub>4</sub> :PS-AgsboxNPs, 97.5:2.5% (w/w)]  |
| 15 $\beta$ -TCP | [CaPO <sub>4</sub> :PS-AgsboxNPs, 96.2:3.75% (w/w)] |



**Şekil 2.5** Hazırlanan saf ve PS-Agsbox NPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP-bazlı kemik çimentoları; Saf PMMA (A), 5PMMA (B), 10PMMA (C), 15PMMA (D), saf  $\beta$ -TCP (E), 5 $\beta$ -TCP (F), 10 $\beta$ -TCP (G) ve 15 $\beta$ -TCP (H).

## 2.8 KEMİK ÇİMENTOLARININ KARAKTERİZASYONU

Hazırlanan PMMA- and  $\beta$ -TCP-bazlı kemik çimentolarının morfolojisini değerlendirmek için taramalı elektron mikroskopisi (SEM, Quanta FEG 450, Germany) kullanılmıştır. SEM görüntüleri 15 kV'da alınmıştır. Hazırlanan kemik çimentolarının por dağılımını ve porozitesini analiz etmek için cıvalı porozimetre (Quantachrome Corporation, Poremaster 60) bilgisayarlı mikro tomografi (Bruker, Sky Scan 1272 X-ray micro-CT) kullanılmıştır. Cıvalı porozimetreler, tepkimeye girmeyen, ıslatımsız bir sıvının yeterli basınç uygulanmadıkça küçük gözeneklere giremeyeceği fiziksel prensibine göre çalışmaktadırlar. Uygulanan basınç ile gözenek çapı arasındaki ilişki Eşitlik 1'de verilen Washburn denklemi ile elde edilmektedir:

$$D = (-4\gamma\cos\theta) / P$$

Eşitlik 1

Burada P uygulanan basınç, D gözenek çapı,  $\gamma$  cıvanın yüzey gerilimi (480 dyne/cm) ve  $\theta$  cıva ile gözenek duvarı arasındaki kontak açısıdır (genellikle 140°).

## 2.9 SU ALIMI

Saf ve PS-Agsbox NPs içeren PMMA- and  $\beta$ -TCP-bazlı kemik çimentolarının su alım yeteneğini değerlendirebilmek için, öncelikle hazırlanan kemik çimentoları tartılmıştır.

(W<sub>kuru</sub>) (Eşitlik 2) ve 10 mL'lik pH 7.4'deki PBS tamponu içeren tüplere yerleştirilmiştir. Örnekler 37°C'lik fırında 19 gün boyunca inkübe edilmiştir. İlk günü takiben, örnekler PBS ortamından dışarı alınmış ve fazla su filtre kağıdı ile alınarak tartılmıştır (W<sub>ıslak</sub>). Her tartımdan sonra PBS ortamı yenilenerek örnekler ortama tekrardan yerleştirilmiştir. Örneklerin su alım yeteneği aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanmıştır;

$$W = [(W_{ıslak} - W_{kuru}) / (W_{kuru})] \times 100 \quad \text{Eşitlik 2}$$

buradaki W, W<sub>kuru</sub>, and W<sub>ıslak</sub> PBS absorblama yüzdesi, başlangıç ağırlık ve t zamanındaki ağırlığa karşılık gelmektedir. Bu değerler üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ve standart sapmaları olarak sunulmuştur.

## 2.10 KEMİK ÇİMENTOLARININ KOMPRESYON TESTİ

Karıştırma işleminden 24 saat sonra, 0.5 cm uzunluğunda ve 1 cm çapında silindirik kemik çimentolarının basma testleri BS ISO 5833:2002 standardizasyonuna uygun olarak uluslararası bir cihaz (Zwick Roell, 250 kN, Ulm, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Testler sabit bir kompresyon oranında (10 mN/dk) oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Basmaya ilişkin gerilim-gerinim eğrisi çizilmiştir ve ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır (n=3).

## 2.11 KEMİK ÇİMENTOLARINDAN GÜMÜŞ İYONU SALIMI

PS- Agsbox NPs içeren kemik çimentolarından Ag iyon salımı atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS, ThermoFischer) kullanılarak tanımlanmıştır. Test öncesi, örnekler pH 7.4'deki taze PBS içerisinde 37 °C'de 9 gün boyunca sabit karışma altında karıştırılmıştır. Farklı inkübasyon sürelerinde tampon ortamından 1 mL alınarak eşit hacimde taze PBS ile tamamlanılmıştır. Deney sonunda toplanan örnekler 10 kat seyreltilerek zamana bağlı Ag iyonu salım grafiği alınmıştır ve her zaman dilimi ortalama± SD değeri olarak verilmiştir.

## 2.12 KEMİK ÇİMENTOLARININ ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN TANIMLANMASI

Hazırlanan PS-Agsbox NPs içerikli kemik çimentolarının in-vitro antibakteriyel aktivitesine bakmadan önce hazırlanan PS-Agsbox NPs'in antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme için agar kuyucuk difüzyon metodu kullanılmıştır. *Escherichia coli*, *E. coli* (Gram-negatif) ve *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (Gram-pozitif) türleri kullanılarak test gerçekleştirilmiştir. Mikrobiyal türler, *S. aureus* nutrient broth'da, *E. coli* ise Luria–Bertani ortamında bir gece boyunca 37 °C'de 250 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Yayma plak metoduna göre, bakteri süspansiyonu dilüe edilerek optik dansitesi 625 nm'de 0.08-0.1 aralığına ayarlanarak (0.5 Mac Farland standardı, ortalama  $10^8$  CFU/mL), nutrient broth agar plaklar üzerine yayılmıştır ve steril koşullar altında 10 dakika boyunca havada kurutulmuştur. Agar üzerine, belirli çapta açılan kuyulara homojen olarak dağıtılmış PS-Agsbox NPs solüsyonu konulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda, çukurların etrafında belirgin biçimde üremenin olmadığı inhibisyon zonları oluşmuştur. Oluşan inhibisyon zonlarının çapları açılan kuyucukların çapından çıkarılarak değerlendirilmiştir.

Kemik çimentolarının, Agsbox NPs ile modifikasyonu sonrası yüzeyinde herhangi bir biyofilm oluşumu olup olmadığı nicel bir test olan tetrazolium/formazan testi yapılarak değerlendirilmiştir. Bu test, renksiz 2,3,5-tripheniltetrazolium klorit (TTC) tuzunun ortamdaki bakteri varlığında kırmızı formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır. Bu kırmızı renk ortamdaki bakteri hücrelerinin canlılığı ve aktivitesini göstermektedir. Bu test için, UV ile sterilize edilen kemik çimentoları (1x0.5 cm) steril bir pens yardımıyla well-plate'in tabanına yerleştirilmiştir ve 0.5 McFarland'a ayarlanmış ( $10^8$  CFU/mL) mikroorganizma (*E. coli* and *S. aureus*) solüsyonundan 2 mL eklenmiştir. Sadece mikroorganizma solüsyonunun konulduğu kuyucuk kontrol olarak kabul edilmiştir. Well-plate, 37°C'de 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuktan 1'er mL alınarak 100 µL TTC solüsyonu (0.5% w/v) içeren steril ependorf tüplere eklenmiştir. Örnekler, 37°C'de 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Kırmızı renkli formazan kristalleri 4000 ×g'de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Pelletler, %50'lik etanol içerisinde süspanse edilmiştir. Son olarak, bakteri hücrelerinin canlılığını ve aktivitesini gösteren kırmızı formazan solüsyonun absorbans değerleri 480 nm'de mikropłaka okuyucu kullanılarak (Biochrom Asys Expert Plus. Microplate Reader, Holliston, MA) alınmıştır.

## 2.13 KEMİK ÇİMENTOLARININ İN-VİTRO BİYUYUMLUKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sunulan çalışma kapsamında yapılan hücre kültür testlerinde pre-osteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı (MC3T3-E1) kullanılmıştır. Hücreler Çizelge 2.2’de verilen koşullar altında çoğaltılmıştır. Hücrelerin besi ortamları iki günlük aralıklarla değiştirilmiş ve hücreler, hücre kültür kabı zeminini kapladıklarında 1/3 pasaj yapılmıştır. Hücreler, mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her gün mikroskopik incelemeye tabi tutulmuştur.

**Çizelge 2.2** MC3T3-E1 (pre-osteoblastik hücre hattı) hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması.

|                    |                                                                                                        |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hücre Türü:        | MC3T3-E1 (pre-osteoblastik hücre hattı)                                                                |
| Kültür kabı:       | 25 cm <sup>3</sup> ’lük polistren flask (yüzeyi hücre yapışmasına uygun)                               |
| Kültür vasatı:     | %10 fetal sığır serumu ve %1 UI ml <sup>-1</sup> penisilin–streptomisin içeren $\alpha$ -MEM ortamında |
| Rutin sub-kültür:  | 1/3                                                                                                    |
| Kültür özelliği:   | Monolayer                                                                                              |
| Toplam hacim:      | 5 ml                                                                                                   |
| pH:                | 7,2-7,5                                                                                                |
| Sıcaklık:          | 37 $\pm$ 0.5 °C                                                                                        |
| İnkübasyon ortamı: | 5’lik CO <sub>2</sub> etüvü                                                                            |

Model osteoblast davranışı olarak, pre-osteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı (MC3T3-E1), kemik çimentolarının biyoyumluluğunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu değerlendirmeler mitokondriyal aktivitenin ölçülmesi bazlı MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) testi ile yapılmıştır. In-direkt sitotoksosite testi için hazırlanan kemik çimentoları deney öncesi UV ışık altında yarım saat boyunca bekletilerek steril edilmiştir. Kemik çimentoları, %10 fetal sığır serumu ve %1 UI ml<sup>-1</sup> penisilin–streptomisin içeren  $\alpha$ -MEM ortamında 37 °C’de, %5’lik CO<sub>2</sub>’li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. Bu arada, MC3T3-E1 hücreleri 96’lık well-plate’e 9x10<sup>3</sup> hücre/well olacak şekilde ekilmiş ve kemik çimentoları ile etkileştirilen besiyerinden 200  $\mu$ l pipetlenmiştir. Plaka, 24 saat boyunca 37 °C’de , %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde bekletilmiştir. 24 saat sonunda besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 200  $\mu$ l (5 $\mu$ g/ml, fenol redsiz RPMI 1640 ile seyreltilmiş)

MTT solüsyonu eklenmiştir. 96 well 3 saat boyunca karanlıkta bekletilerek sonrasında MTT formazan kristallerini çözmek için 200 µl izopropil alkol-HCL solüsyonu eklenmiştir. 96 well plağı 570 nm’de Elisa Reader’da (Biochrom Asys Expert Plus. Microplate Reader, Holliston, MA) okutulmuştur. Polistren 96 well kuyucuğu %100 kabul edilerek hücre canlılığı bu değer üzerinden hesaplanmıştır. Hücre canlılığı Eşitlik 3’e uygun olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = [A_{570} (\text{numune}) / A_{570} (\text{kontrol})] \times 100$$

Eşitlik 3

3 bağımsız kemik çimentosundan alınan değerlerin ortalaması ve standart sapması kullanılarak hücre canlılığı grafiği çizilmiştir.

Buna ek olarak, kültürün 3. gününde, MC3T3-E1 hücreleri paraformaldehid solüsyonu ile (4%, w/v) fikse edilmiş ve kemik çimentoları üzerine yapışan hücrelerin morfolojisi SEM ile incelenmiştir.

## 2.14 CANLI/ÖLÜ HÜCRE TESTİ

Kemik çimentoları üzerindeki canlı-ölü hücrelerin değerlendirilmesi canlı/ölü hücre görüntüleme kiti (Life Technologies LIVE/DEAD Cell Double Staining Kit, Sigma, Carlsbad, CA) kullanılarak üretici firmanın belirtmiş olduğu yönergelerle uygun olarak yapılmıştır. Bu test hücreden geçen kalsein AM boyasının (eksitasyon/emisyon 495/515 nm) canlı hücreleri boyaması ve hücre zarından geçmeyen etidyum homodimer-1 boyasının (eksitasyon/emisyon 528/617 nm) ölü hücreleri boyaması temeline dayanır. Kısaca, MC3T3-E1 hücreleri 24 well plakada  $5 \times 10^3$  hücre/well olacak şekilde kültüre edilmiş ve 1 gece boyunca büyütülmüştür. Bu arada kemik çimentoları hücre besiyerinde 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün örnekler ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, 1 mL ekstraksiyon ortamından, daha öncesinde  $5 \times 10^3$  hücre ekilen ve 1 gece boyunca etüvde bekletilen her bir well kuyucuğuna eklenmiştir. 3 saatlik inkübasyon süresinden sonra, hücre kültür ortamı uzaklaştırılmış ve nazıkçe PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 2 mmol/L kalsein-AM ve 4 mmol/L etidium homodimer-1 ile 37°C’de, 5% CO<sub>2</sub> inkübatör içerisinde, karanlık ortamda boyanmış ve Texas Red ve floresan filtrelerini içeren bir floresan mikroskop aracılığı ile (Leica, Germany) görüntüler alınmıştır.

## 2.15 KEMİK ÇİMENTOLARININ ALP AKTİVİTESİ

Alkalin fosfataz testi (ALP), kemik çimentoları üzerinde 7 ve 14 gün boyunca kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin aktivitesini tanımlamak için ALP Assay Kit (Sigma AP0100, Boston, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ALP aktivite testi kit içerisindeki yönergeler takip edilerek yapılmıştır. Kısaca, örnekler üzerine  $2 \times 10^4$  yoğunluğunda hücreler ekildikten sonra, PBS ile yıkanmıştır. Hücreler, % 0.25 tripsin kullanılarak kemik çimentolarından ayrılmıştır ve hücre lizati 10 dakika boyunca 5000 rpm’de santrifüj edilmiştir, PBS ile iki kez yıkanmıştır. 20  $\mu$ l süpernatant, 20  $\mu$ l *p*-nitrophenol fosfat (pNPP) (0.67 M) ve 960  $\mu$ l tampon solüsyonu içeren 96 well kuyucuğunun herbirine eklenmiştir. Sonrasında, 20  $\mu$ l alkalin fosfataz solüsyonu plakaya eklenir ve 405 nm’de her 5 dakikada absorbans ölçülmüştür. Enzimatik aktivite Eşitlik 4’e uygun olarak hesaplanmıştır.

$$\frac{(\Delta A_{405nm} / \text{min Test} - \Delta A_{405nm} / \text{min Kör}) (d_f) (V_f)}{(18.5)(V_e)}$$

Eşitlik 4

buradaki  $A_{405}$  körün ve test solüsyonunun 405 nm’deki absorbansı,  $V_f$  test solüsyonunun hacmi,  $V_e$  kullanılan örnek solüsyonun hacmi ve  $\beta$ , *p*-nitrophenol için sönme katsayısını ifade etmektedir (405 nm’de 18.5).

## 2.16 KALSİYUM TESTİ

Kolorimetrik kalsiyum testi, kemik çimentoları üzerinde 7 ve 14 gün boyunca kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin aktivitesini tanımlamak için kolorimetrik kalsiyum testi kiti (Sigma MAK022, Boston, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolorimetrik kalsiyum testi kit içerisindeki yönergeler takip edilerek yapılmıştır. Kısaca, örnekler üzerine  $2 \times 10^4$  yoğunluğunda hücreler ekildikten sonra, PBS ile yıkanmıştır. Hücreler, % 0.25 tripsin kullanılarak kemik çimentolarından ayrılmıştır ve hücre lizati 10 dakika boyunca 5000 rpm’de santrifüj edilmiştir, PBS ile iki kez yıkanmıştır. Hazırlanan hücre lizati 2-50  $\mu$ l arasında 96 wele pipetlenerek son hacim saf su ile 50  $\mu$ l’ye tamamlanmıştır. Kitin içerisinde var olan kromojenik reaktiften ve kalsiyum testi kit tamponundan her bir numune üzerine sırasıyla 90 ve 60  $\mu$ l pipetlenerek nazikçe kuyucuklara pipetaj yapılmıştır. 5-10 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildikten sonra 575 nm’de absorbans alınmıştır. Daha öncesinde kalsiyum standardının seyreltilmesi ile elde edilmiş olan standart eğriden çıkarılan

denklemden alınan absorbanslar yerine koyularak numunedeki kalsiyum miktarına ulaşılmıştır ( $\mu\text{g}$ ). Kalsiyum konsantrasyonu ise Eşitlik 5'e uygun olarak hesaplanmıştır;

$$C = S_a/S_v$$

Eşitlik 5

buradaki  $S_a$  bilinmeyen numunedeki standard eğriden çıkarılan kalsiyum miktarı ( $\mu\text{g}$ ),  $S_v$  ise wele eklenen örnek hacmini ( $\mu\text{l}$ ),  $C$  ise örnekteki kalsiyumun konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Ayrıca kemik çimentosu-hücre yapıları üzerindeki kalsiyum birikimi, Alizarin Red-S boyaması ile test edilmiştir. Kemik çimentosu-hücre yapıları 10 dakika boyunca soğuk metanol ile fiks edildikten sonra iki kez destile su ile yıkanmış ve %2 Alizarin Red (Sigma-Aldrich, USA) solüsyonu ile 3 dakika boyunca boyanmıştır. Boyayı uzaklaştırmak için, aseton ile yıkanmış, kırmızı matriks çökeltisi 10 mM'lık sodyum fosfat içerisinde oda sıcaklığında %10 konsantrasyonda hazırlanan setilpiridinyum klorit (Sigma-Aldrich, USA) içerisinde çözülmüş ve optik dansitesi 570 nm'de okutulmuştur.

## 2.17 İSTATİKSEL ANALİZLER

Gruplar arası istatistiksel anlamlılığı tanımlamak için One way ANOVA kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. Tüm analizler için,  $p < 0.05$  ve  $p < 0.005$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.



## BÖLÜM 3

### DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR

#### 3.1 PS-AGSBOX KARAKTERİZASYONU

PS-Agsbox gümüş nanopartikül içeren otookside soya yağı makroperoksidinden stirenin serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Soya yağı içerisine eklenen  $\text{AgNO}_3$  otooksidasyon prosesi boyunca gün ışığının etkisiyle indirgenmiştir. Hazer ve ark. daha önce yaptıkları çalışmada sentezledikleri PS-AgPsbox graft kopolimerlerinin bir  $^1\text{H}$  NMR spektroskopisini çekmişlerdir [171].

Can ve arkadaşları tarafından rapor edilen bir çalışmada ise fizikokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirmek amacıyla soya yağının otooksidasyon ve polimerizasyonu sonrası karakteristik piklerini göstermek için ATR-FTIR spektrumu çekmişlerdir.  $3422\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen en baskın pik O=H gerinimine,  $2910\text{ cm}^{-1}$  ve  $2840\text{ cm}^{-1}$ 'de asimetrik ve simetrik gerilmeye karşılık gelen pikler C-H gerinimine ait karakteristik piklerdir. AgPSsb ve Agsbox emdirilen numunelerde  $2919\text{ cm}^{-1}$  ve  $2849\text{ cm}^{-1}$  'deki karakteristik piklerin yoğunluğu artmıştır [172]. Bu veri açıkça soya yağının otookside olduğunu göstermiştir.

#### 3.2 PS-AGSBOXNPS KARAKTERİZASYONU

Polimer, sürfaktan konsantrasyonu, sentez prosesi boyunca homojenizasyon oranı değiştirilerek sistematik bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Farklı sentez parametrelerinde farklı boyutlara sahip PS-Agsbox nanopartiküller elde edilmiştir. Ana parametreler ve partikül boyutu dağılımı Çizelge 3.1'de özetlenmiştir. Polimer konsantrasyonu 1, 3 ve 5 olarak değiştirildiğinde sürfaktan ve homojenizasyon değeri sabit tutulmuştur. Çizelge 3.1'de de görüldüğü gibi polimer miktarının artması ile nanopartiküllerin boyutunun da arttığı gözlemlenmiştir. Bu genel durum hazırlama aşamasında polimerin daha fazla çökmesine neden olup dolayısıyla nanopartikül boyutunu arttırmıştır [173]. Homojenizasyon değerinin nanopartiküller üzerindeki etkisine bakılacak olursa, karıştırma hızı arttıkça süspansiyon

ortamına iletilen enerji miktarı artmıştır ve bu etki nanopartiküllerin boyutunu küçülmüştür. Çizelge 3.1’den de görüleceği gibi %90 amplitud değerinde  $193\pm 2$  nm boyuta sahip nanopartiküller elde edilirken, düşük karıştırma hızlarında hazırlanan nanopartiküller (70 ve 50%, amplitüt) daha büyük partikül boyutuna (sırasıyla  $299\pm 4$  ve  $410\pm 1$  nm) sahip olmuştur.

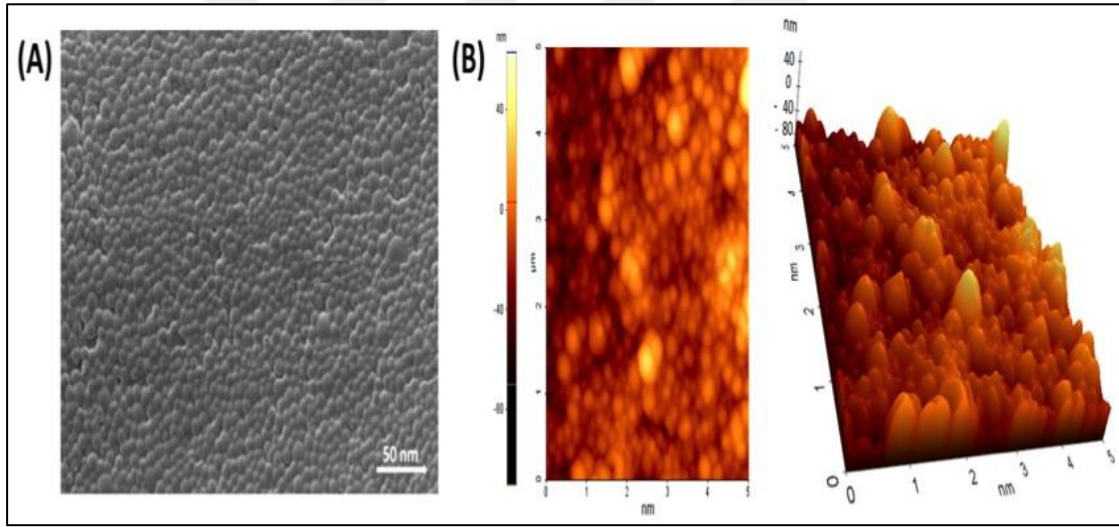
**Çizelge 3.1** PS-AgsboxNPs’lerin karakterizasyonu. Farklı parametrelerin nanopartiküllerin boyut ve boy-boy dağılım üzerine etkisi.

| Polimer Konsantrasyonu (mg/mL DCM) | Tween 80 Konsantrasyonu (mL/mL) | Homojenleşme Oranı (% büyüklük) | Boyut (nm) | Polidispersite İndeksi (PDI) | Zeta Potansiyeli (mV) |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|------------------------------|-----------------------|
| 5                                  | 0.06                            | 90                              | $402\pm 7$ | $0.119\pm 0.045$             | $-26.5\pm 0.43$       |
| 3                                  | 0.06                            | 90                              | $364\pm 5$ | $0.098\pm 0.063$             | $-28.1\pm 0.020$      |
| 1                                  | 0.06                            | 90                              | $193\pm 2$ | $0.020\pm 0.010$             | $-31.9\pm 0.15$       |
| 1                                  | 0.10                            | 90                              | $252\pm 7$ | $0.115\pm 0.032$             | $-29.2\pm 0.22$       |
| 1                                  | 0.06                            | 90                              | $193\pm 2$ | $0.020\pm 0.010$             | $-31.9\pm 0.15$       |
| 1                                  | 0.03                            | 90                              | $327\pm 6$ | $0.101\pm 0.005$             | $-15.8\pm 0.31$       |
| 1                                  | 0.06                            | 90                              | $193\pm 2$ | $0.020\pm 0.010$             | $-31.9\pm 0.15$       |
| 1                                  | 0.06                            | 70                              | $299\pm 4$ | $0.070\pm 0.077$             | $-30.1\pm 0.25$       |
| 1                                  | 0.06                            | 50                              | $410\pm 1$ | $0.129\pm 0.024$             | $-10.7\pm 0.08$       |

Bu çalışmada sürfaktan olarak, Tween-80 seçilmiştir. Sürfaktan konsantrasyonunun 0.03’den 0.1 mL’e artmasıyla birlikte (v/v, destile su içerisinde) partikül boyutu sırasıyla  $327\pm 6$ ’den  $252\pm 7$  nm’ye düşmüştür. Sürfaktan miktarı, daha küçük nanodamlar için daha büyük yüzey alanına sahip olduğundan önemli bir rol oynar ve bu nedenle daha fazla sürfaktana ihtiyaç duyulur [174]. Bu sonuçlara göre sürfaktan miktarının artmasıyla nanopartiküller arasında itme kuvveti artmış, dinamik arayüzey gerilimi önemli bir şekilde azalmıştır ve böylelikle nanopartiküllerin boyutları azalarak daha kararlı hale gelmiştir. Ancak belli bir değerin üzerinde ortama sürfaktan eklenmesi partikül boyutunu küçültmemiştir. Nanopartikül boyutu artan sürfaktan konsantrasyonu ile birlikte azalmıştır. Partikül boyutundaki bu düşüş Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) teorisi ile açıklanabilir. Bu teori NPs’i ayrı tutmak için Coulomb itme kuvvetinin yeterli gelmezse nanopartiküllerin aglomerasyonunu tanımlar [175]. Farklı parametrelerin nanopartiküllerin boy-boy dağılımı üzerine etkisine

bakıldığında sonuç itibarıyla uygun boyutta ve yüzey yükü özelliklerine sahip nanopartiküller elde edilmiş ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, Çizelge 3.1’de de görüldüğü gibi optimize nanopartiküllerin boyutu  $193\pm 2$  nm; çoklu dağılma indeksi  $0.020\pm 0.010$  ve yüzey yükü  $-31.9\pm 0.15$  mV olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre küçük boyuta sahip, homojen dağılım gösteren ve yüksek yüzey yükü dolayısıyla oldukça kararlı nanopartiküller elde edilmiştir.

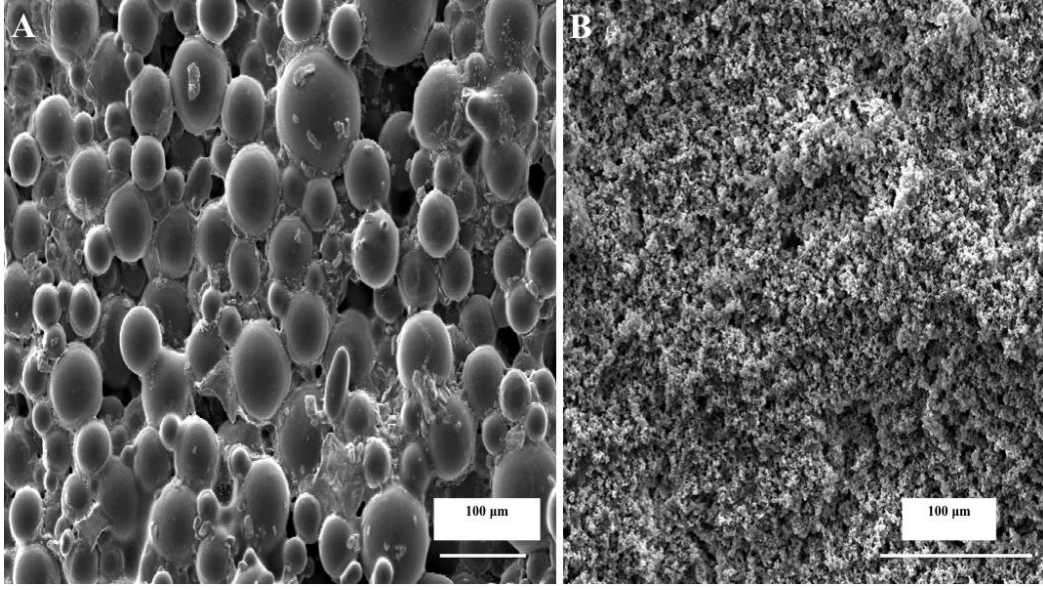
Optimize edilen nanopartiküllerin yüzey morfolojisini incelemek amacıyla PS-Agsbox NPs’lerin SEM ve AFM görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.3’e bakıldığında oldukça küresel formda ve düzgün yüzey morfolojisine sahip nanopartiküller elde edilmiştir. SEM ve AFM’den elde edilen sonuçlara göre partikül boyutları yaklaşık olarak 40-50 nm arasında değişmekte olup, DLS’den elde edilen sonuçlara göre boyutların çok daha küçük olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 3.1** PS-AgsboxNPs’in SEM (A) ve AFM (B) görüntüleri. Ölçek çubuğu sırasıyla 50 nm ve 40 nm.

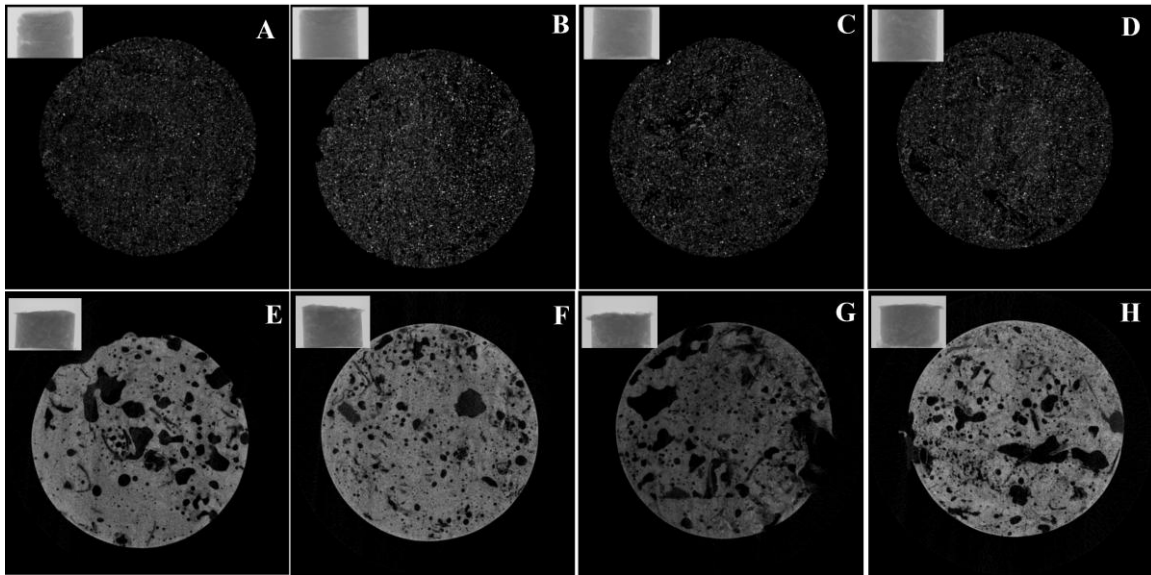
### 3.3 KEMİK ÇİMENTOLARININ KARAKTERİZASYONU

Bu karakterizasyonda, iki tip çimento; PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve biyoaktif olan  $\beta$ -TCP çimentoları hazırlanmıştır. PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 3.4. A ve B’de görülmektedir. Kuru kemik çimentosu matriksi içinde PS-AgsboxNPs homojen olarak dağıldığı görülmektedir. Partiküller PMMA matriks ile tamamen entegre olmuşken  $\beta$ -TCP kemik çimentolarında yapıyla bütünleşmiş gözükmemektedir.



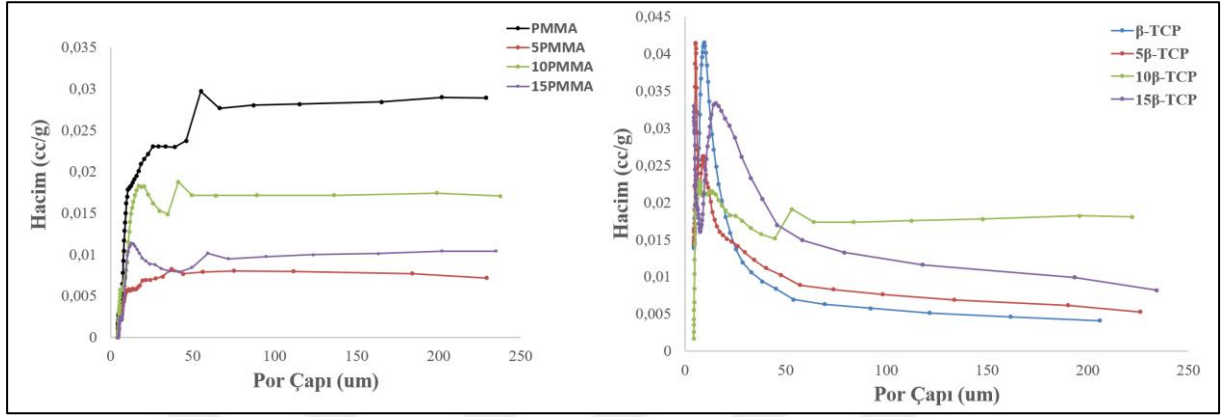
**Şekil 3.2** PS-AgsboxNPs içeren PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentoları. Ölçek çubuğu 100  $\mu$ m.

Hazırlanan PS-AgsboxNPs içeren PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının por yapısını ve dağılımını incelemek için micro-CT ve civa porozimetresi analizleri yapılmıştır. Micro-CT sonuç görselleri Şekil 3.5.'de verilmiştir.  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentolarında makroporlar gözlemlenirken PMMA kemik çimentoları daha küçük porlara sahiptir. Ayrıca  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentolarında, por dağılımı homojen olarak gözlemlenirken por çapları değişiklik göstermektedir.



**Şekil 3.3** Saf PMMA (A), 5PMMA (B), 10PMMA (C), 15PMMA (D), saf  $\beta$ -TCP (E), 5 $\beta$ -TCP (F), 10 $\beta$ -TCP (G) ve 15 $\beta$ -TCP (H) kemik çimentolarının micro-CT görüntüleri.

Hazırlanan PS-AgsboxNPs içeren PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının por yapısına dair sayısal veriler elde edebilmek ve karşılaştırmak için ek olarak civa porozimetresi kullanılmıştır. Hazırlanan PMMA ve  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentoları Şekil 3.6'dan da görüleceği üzere ortalama 10–200  $\mu\text{m}$  çapında mikroporlar içermektedir.



**Şekil 3.4** PS-AgsboxNPs içeren PMMA and  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının por histogramı.

Çizelge 3.2'ye bakıldığında, 10 ve 15PMMA kemik çimentoları  $60.03 \pm 6.3$  ve  $71.42 \pm 5.2$  ile en yüksek poroziteye sahip kemik çimentoları olmuştur.  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentolarında ortalama yüzde porozite her grup için %50 civarındadır. PS-AgsboxNPs katkılanması sonrası  $\beta$ -TCP kemik çimentolarında % porozite değeri çok fazla değişmezken, PMMA kemik çimentolarında porozite NPs eklenmesi ile artmıştır.

Yüksek elastik modülüne sahip olan PMMA stres transferinde önemli değişikliklere neden olabilmektedir [176]. Bu nedenle PMMA'nın bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için modifikasyon ve iyileştirme amaçlı farklı metotlar rapor edilmektedir. PMMA'yı diğer biyomalzemelerle karıştırma en etkili metot olarak gözükmemektedir. Tai ve arkadaşları hint yağı ile modifiye edilen PMMA'da porozitenin artmasının yanısıra Young modülüsünü ve sıkıştırma dayanımının azaldığını görmüşlerdir [177]. Ayrıca, He ve arkadaşları poröz PMMA oluşturabilmek için karboksimetilselüloz, aljinat ev jelatin mikropartiküller ekleyerek kemik büyümesini iyileştirmeye çalışmışlardır [178].

El-Fiği ve arkadaşları da kalsiyum fosfat kemik çimentolarının içerisine mekanik ve biyolojik özelliklerini iyileştirmek için farklı oranlarda mesoporöz biyoaktif cam (mBGn) katkılarını yapmışlardır. Kemik çimentolarının porozitesini incelediklerinde mBGn içeriğinin artışıyla birlikte kemik çimentolarının porozitesinde de bir miktar artış gözlemlemişlerdir [179].

Ayrıca her iki kemik çimentosu formülasyonunda da PS-AgsboxNPs katkı grupları saf PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarına kıyasla daha yüksek ya da aynı porozite değerine sahiptir. Bu veri kemik çimentolarına PS-AgsboxNPs katkılanmasının por boyutu ya da dağılımını etkilemediğini kanıtlamaktadır. Ayrıca SEM görüntüleri de kemik çimentolarının por yapılarının katkılanma sonrası değişmediğini kanıtlamaktadır. CP-çimentoları için rapor edilen minimum 75-100  $\mu\text{m}$ 'lik (poröz yapının içinde kemiğin büyümesine izin vermesi için) por boyutu hazırlanan kemik çimentoları tarafından da karşılanabilmektedir [180].

**Çizelge 3.2** PS-AgsboxNPs içeren PMMA and  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının porozite değerleri.

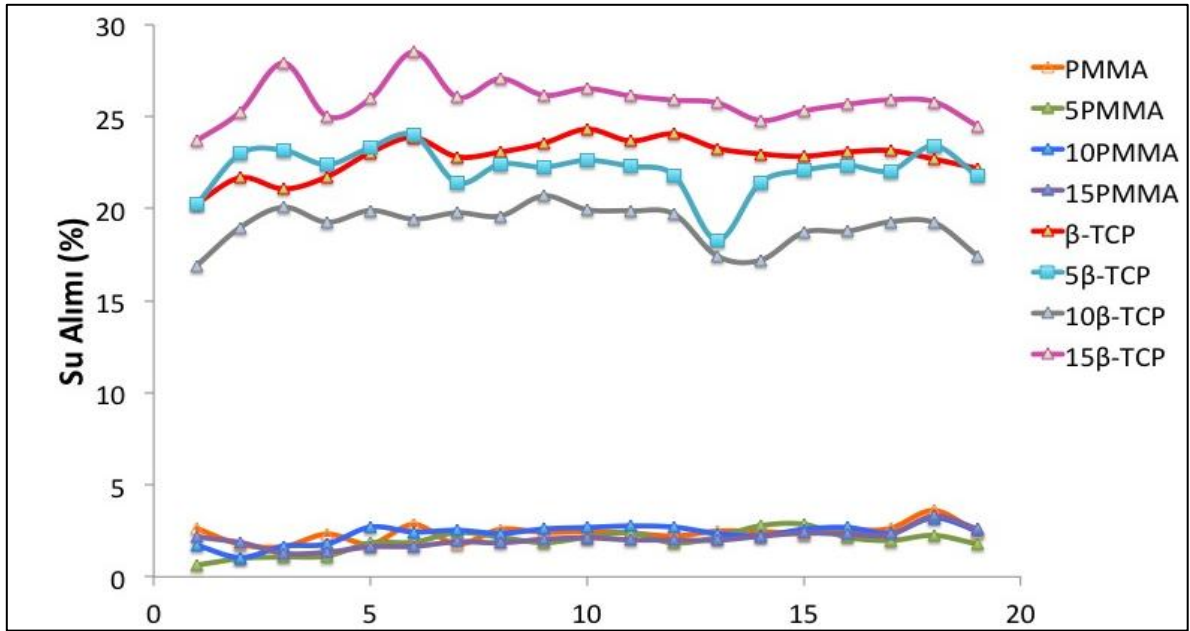
| Formülasyon      | % Porozite      |
|------------------|-----------------|
| Saf PMMA         | 12.36 $\pm$ 1.7 |
| 5PMMA            | 27.05 $\pm$ 2.5 |
| 10PMMA           | 60.03 $\pm$ 6.3 |
| 15PMMA           | 71.42 $\pm$ 5.2 |
| Saf $\beta$ -TCP | 45.73 $\pm$ 3.2 |
| 5 $\beta$ -TCP   | 50.71 $\pm$ 5.6 |
| 10 $\beta$ -TCP  | 50.64 $\pm$ 4.8 |
| 15 $\beta$ -TCP  | 55.70 $\pm$ 4.1 |

### 3.4 SU ALIMI

Şekil 3.7. PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve biyoaktif olan  $\beta$ -TCP çimentolarının inkübasyon süresi boyunca su alım davranışlarını göstermektedir. Şekil 3.7., PS-AgsboxNPs içerikli  $\beta$ -TCP çimentolarının 19 gün boyunca en yüksek su alımı davranışı gösterdiğini ve  $\beta$ -TCP içerisine PS-AgsboxNPs enkapsülasyonu ile su alımının iyileştiğini kanıtlamaktadır. Sonuç olarak diyebiliriz ki, PS-AgsboxNPs eklemek  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının su alım davranışı üzerinde olumlu etki yapmaktadır [181].

Şekil 3.7.'den de görüldüğü gibi PS-AgsboxNPs içeren  $\beta$ -TCP kemik çimentoları PMMA bazlı kemik çimentolarına kıyasla tüm zaman önemli ölçüde daha iyi su absorplamaktadır.  $\beta$ -TCP grubunda bu olumlu etki literatürdeki diğer çalışmalarla da desteklenmektedir [182-183].

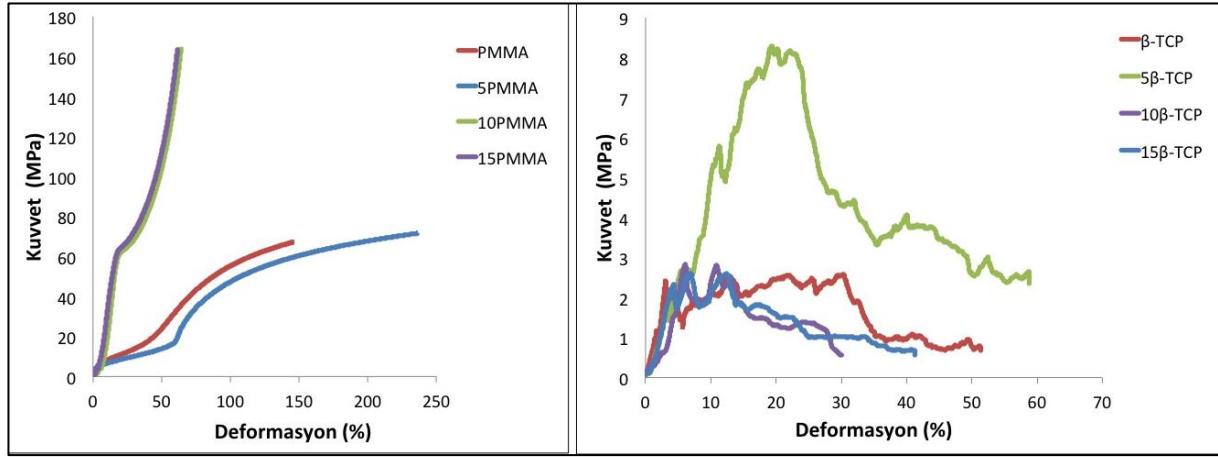
PS-AgsboxNPs içeren PMMA'nın farklı formülasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 3.5 PS-AgsboxNPs içeren PMMA and β-TCP kemik çimentolarının PBS içerisindeki su alım özellikleri.

### 3.5 KEMİK ÇİMENTOLARININ SIKIŞTIRMA TESTİ

PS-AgsboxNPs içeren PMMA and β-TCP kemik çimentolarının bazı fiziksel özellikleri Çizelge 3.3 ve Şekil 3.8'de verilmiştir. Çizelge 3.3'te PMMA and β-TCP kemik çimentolarının sıkıştırma dayanımı ve kopmadaki uzama değerleri verilmiştir. Doğal kemiğin sıkıştırma dayanımı 80– 200 MPa arasında iken PMMA bazlı kemik çimentolarının  $146.68 \pm 3$  MPa'dır. PS-AgsboxNPs kemik çimentolarının içine katıldıktan sonra, PMMA kemik çimentosunun sıkıştırma dayanımı  $236.79 \pm 2$  MPa'a yükselmiştir. Aynı şekilde Hamedirad ve arkadaşları çalışmalarında gümüş nanopartikülleri ağırlıkça %5 civarında PMMA'ya katıldıklarında sıkıştırma dayanımı 102.16'dan 121.19 MPa'a değişmiştir [184]. Alınan sonuçlara göre en yüksek sıkıştırma dayanımını 5PMMA göstermiştir. Ghaffari ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada AgNPs ile katılanmış PMMA'nın ortalama sıkıştırma dayanımının modifiye edilmeyene kıyasla daha yüksek olduğunu bulmuşlardır ve %0.2 ve %2 AgNPs katılma arasında önemli bir istatistiksel farklılık gözlemlenmemiştir [185]. Deneysel sonuçlar da, PS-AgsboxNPs içeriği ile mekanik gücün doğru orantılı olmadığını doğrulamaktadır.



**Şekil 3.6** PS-AgsboxNPs içeren ve saf PMMA and  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının sıkıştırma testi sonuçları.

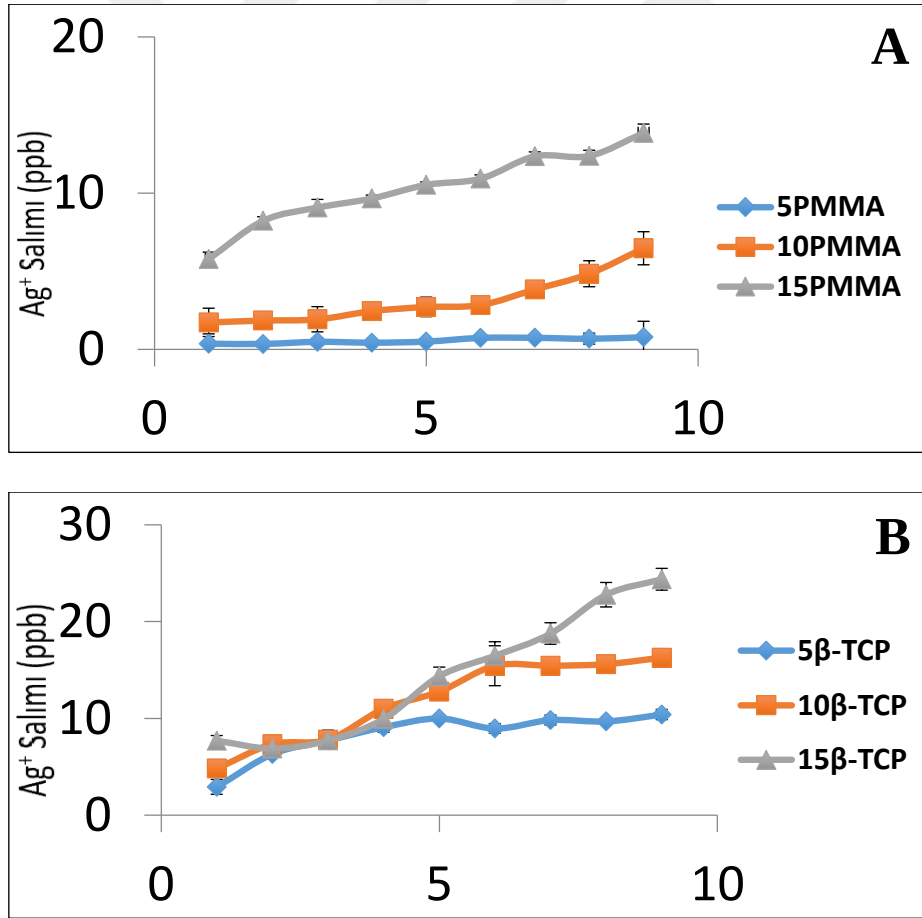
$\beta$ -TCP kemik çimentoları PMMA kemik çimentolarından daha düşük başlangıç sıkıştırma dayanımına sahip olduğu görülmüştür. PMMA'da olduğu gibi  $8.28 \pm 0.2$  MPa ile 5  $\beta$ -TCP en yüksek sıkıştırma dayanımını göstermiştir. CP-çimentoları için sıkıştırma dayanımı 20-40 MPa arasında tipik bir değer alırken ortalama 4-120 arasında farklılaşabildiği rapor edilmektedir [186]. Ancak Rau ve arkadaşları da gümüş dop edilmiş kalsiyum fosfat (CPC-Ag) kemik çimentoları hazırlamışlardır. Ağırlıkça %0 Ag içeren CPC-Ag,  $6.5 \pm 1.0$  MPa sıkıştırma dayanımına sahip iken, dop edilmiş CPC-Ag 0.6 ve CPC-Ag 1.0,  $4.0 \pm 1.0$  ve  $1.5 \pm 1.0$  MPa, aralığında sıkıştırma dayanımı göstermişlerdir [187]. Çalışmada elde edilen veriler hem PS-AgsboxNPs içeren  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının mekanik özelliklerinin daha iyi olduğunu kanıtlamaktadır hem de Ag içeriği ile birlikte mekanik dayanımın doğru orantılı olmadığını doğrulamaktadır.

**Çizelge 3.3** PS-AgsboxNPs içeren ve saf PMMA and  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının sıkıştırma dayanımı ve deformasyon değerleri.

| Numune          | Kuvvet (MPa)    | Deformasyon (%) |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| PMMA            | $146.68 \pm 3$  | 67.37           |
| 5PMMA           | $236.79 \pm 2$  | 71.69           |
| 10PMMA          | $164.98 \pm 6$  | 64.14           |
| 15PMMA          | $166.51 \pm 9$  | 61.99           |
| $\beta$ -TCP    | $2.57 \pm 0.3$  | 30.18           |
| 5 $\beta$ -TCP  | $8.28 \pm 0.2$  | 19.30           |
| 10 $\beta$ -TCP | $2.82 \pm 0.04$ | 6.05            |
| 15 $\beta$ -TCP | $2.60 \pm 0.01$ | 6.94            |

### 3.6 KEMİK ÇİMENTOLARINDAN GÜMÜŞ İYONU SALIMI

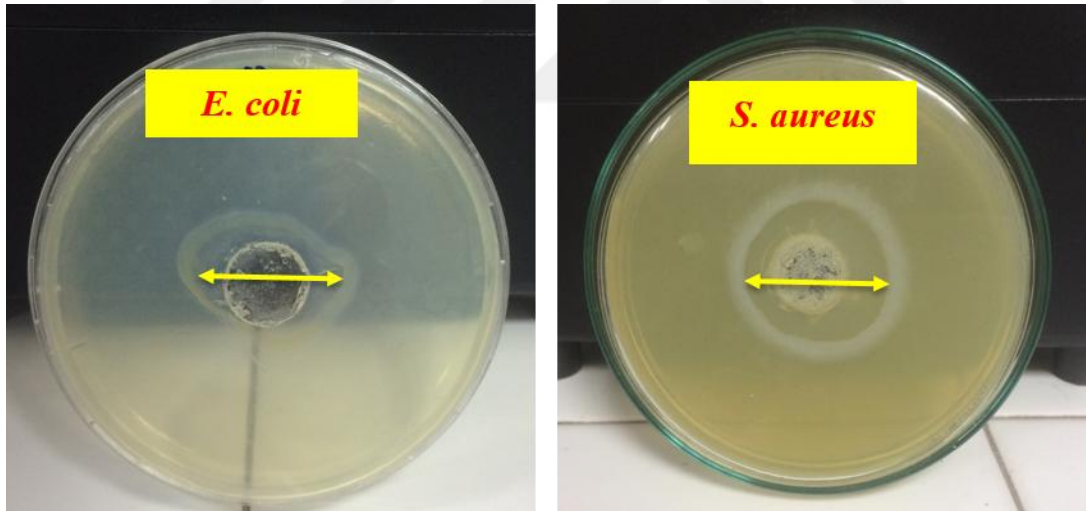
Farklı zaman aralıklarında kemik çimentolarından PBS içerisine gümüş iyonu salımı ölçülmüş ve Şekil 3.9’da gösterilmiştir. Aynı miktarda nanopartikül içeren PMMA ve  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentoları kıyaslandığında, inkübasyon süresince  $\beta$ -TCP kemik çimentoları önemli ölçüde daha fazla gümüş iyonu salmıştır. Benzer olarak, Perni ve arkadaşları farklı tip kemik çimentolarına (PMMA, hidroksiapatit ve bruşit) gömülen propoliparaben nanopartiküllerin salımını incelediğinde, parabenin tamamının kalsiyum fosfat kemik çimentolarından salındığını, PMMA’dan ise parabenin sadece %5’inin salındığını rapor etmişlerdir [188]. PMMA kemik çimentoları başlangıçta hızlı bir salım eğrisi gösterirken, bunu takiben bir platoya erişiyor.  $\beta$ -TCP kemik çimentoları ise dış ortama istenen miktarda ve kontrollü bir sürekli salım göstermektedir. Ag iyonlarının konsantrasyonu 1. günden 9. güne kadar sabit bir şekilde artmaktadır.



**Şekil 3.7** PS-AgsboxNPs içeren PMMA (A) and  $\beta$ -TCP (B) kemik çimentolarından 9 gün boyunca kümülatif  $Ag^+$  salımı (SS hata çubuğu olarak gösterilmiştir, n=3).

### 3.7 PS-AGSBOXNPS'İN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİ

Hazırlanan kemik çimentolarının antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmek açısından ilk olarak PS-AgsboxNPs'in gram pozitif (*Staphylococcus aureus*) ve gram negatif (*Escherichia coli*) bakterilere karşı etkinlikleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Kuyucuklara enjekte edilen nanopartikül solüsyonu etrafında oluşan zonlar alınan Şekil 3.10.'da verilen fotoğraflarda görülmektedir. PS-AgsboxNPs 10 mg/mL konsantrasyonunda *S. aureus* büyümesini  $12 \pm 0.703$  mm çapında bir disk ile inhibe ederken *E. coli* büyümesini aynı konsantrasyonda  $9 \pm 0.335$  mm'lik bir zon ile engellemektedir. Alınan zonlar değerlendirildiğinde, maksimum zon *S. aureus* bakterisine karşı elde edilmiştir. Gram negatif ve gram pozitif bakteriler arasındaki yüzey yükü zonların oluşumunda önemli rol oynamaktadır [189]. Çalışmada hazırlanan negatif yüklü PS-AgsboxNPs'in, pozitif yüklü mikroorganizmalarla ve bakteri hücre membranındaki proteinlerle elektrostatik etkileşime girmesi ve gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus*'e karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite göstermesi beklenmektedir. Bu çıkarım alınan sonuçlar ile desteklenmektedir.

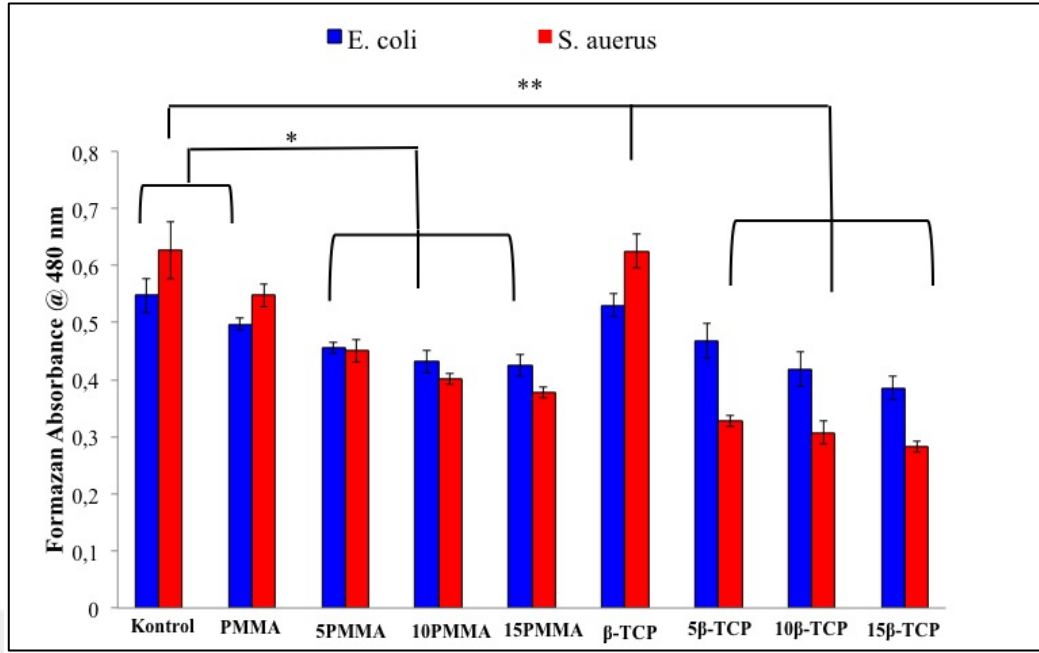


**Şekil 3.8** Sentezlenen PS-AgsboxNPs'in *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesi.

Farklı konsantrasyonlardaki PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktiviteleri ek olarak 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolyum klorit (TTC) reaktifi kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 3.11 PS-AgsboxNPs'in artan konsantrasyonlarını içeren kemik çimentoları ile etkileştirilen *S. aureus* ve *E. coli* kırmızı formazan oluşumuna bağlı olarak absorbans değerlerini göstermektedir. Sonuçlar PS-AgsboxNPs'in test edildiği agar kuyucuk difüzyon sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

PS-AgsboxNPs içerikli kemik çimentolarında canlı hücrelerde önemli bir indirgenme görülmektedir. Artan NPs konsantrasyonu ile birlikte hem PMMA hem de  $\beta$ -TCP numunelerinde kırmızı renk şiddetindeki düşmeden dolayı daha düşük absorbanslar alınmıştır ve daha güçlü bir antibakteriyel etki göstermiştir. PMMA ve  $\beta$ -TCP antibakteriyel aktivite açısından karşılaştırıldığında AgsboxNPs içerikli  $\beta$ -TCP numuneleri özellikle *S. aureus*'a karşı daha güçlü bir cevap oluşturmuştur. Örneğin saf ve 15PMMA için alınan absorbans değerleri sırasıyla  $0.548 \pm 0.02$  ve  $0.378 \pm 0.01$  iken saf  $\beta$ -TCP ve 15 $\beta$ -TCP için bu değerler  $0.625 \pm 0.03$  ve  $0.283 \pm 0.01$  olmuştur. Kontrol grubu ve NPs içerikli olmayan grupların absorbansları dikkate alındığında  $\beta$ -TCP numuneleri PMMA'ya kıyasla *S. aureus*'a karşı daha güçlü bir indirgenme yaratmıştır. Perni ve arkadaşları da propilparaben nanopartikül gömülmüş farklı tipteki kemik çimentolarının [(poli (metil metakrilat) [PMMA], hidroksiapatit (HA), ve bruşit gibi) ortopedik cerrahi sonrası enfeksiyonu nedeni olan *Staphylococcus aureus*, metisilin direçli *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı antibakteriyel aktivitelerini incelemişlerdir. Ağırlıkça %5 nanopartikül içeren HA bazlı kemik çimentosunda bakteri üremesi dururken PMMA kemik çimentosunda nanopartikül içeriği %7 olduğunda büyüme durmuştur [190]. Ayrıca bu çalışmada konsantrasyona bağlı bir antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir ve kalsiyum fosfat bazlı kemik çimentolarında (HA ya da bruşit) akrilik kemik çimentolarına kıyasla (PMMA) daha düşük konsantrasyonlar yeterli olmuştur.

Alınan absorbans değerleri incelendiğinde hem PMMA hem de  $\beta$ -TCP numunelerinde AgsboxNPs konsantrasyonuna bağlı olarak her iki bakteri türünde de antibakteriyel aktivite artmıştır. Rau ve arkadaşları da hazırladıkları gümüş dop edilmiş kalsiyum fosfat (CPC-Ag) kemik çimentolarında inhibisyon zonunun örnekteki  $Ag^+$  konsantrasyonu ile birlikte eşzamanlı olarak arttığını göstermişlerdir[187]. Ek olarak Alt ve arkadaşları da 5-50 nm arası metalik gümüş nanopartikül ile yükledikleri PMMA kemik çimentolarının in vitro sitotoksitesini ve çoklu dirence sahip bakterilere karşı in vitro antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Yüksek NanoSilver konsantrasyonunda NanoSilver katkılı kemik çimentolarının daha yüksek antibakteriyel aktivitesini gözlemlemişlerdir [191]. Ayrıca agar kuyucuk difüzyon testinde alınan sonuçlarda da olduğu gibi *S. aureus*'a karşı olan bu güçlü cevabın nedeni, NPs'in zeta yükünün negatif olmasından kaynaklı olarak pozitif bakteriler ile elektrostatik etkileşimden dolayı daha iyi etkileşebilmesi olarak açıklanabilir.



**Şekil 3.9** Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA (A) ve  $\beta$ -TCP (B) kemik çimentoları ile *S. aureus* ve *E. coli*'nin 2 saat boyunca etkileşimi sonrasında, 480 nm'de oluşan formazanın tanımlanması. n=3; \*\*, p < 0.005, \*, p < 0.05.

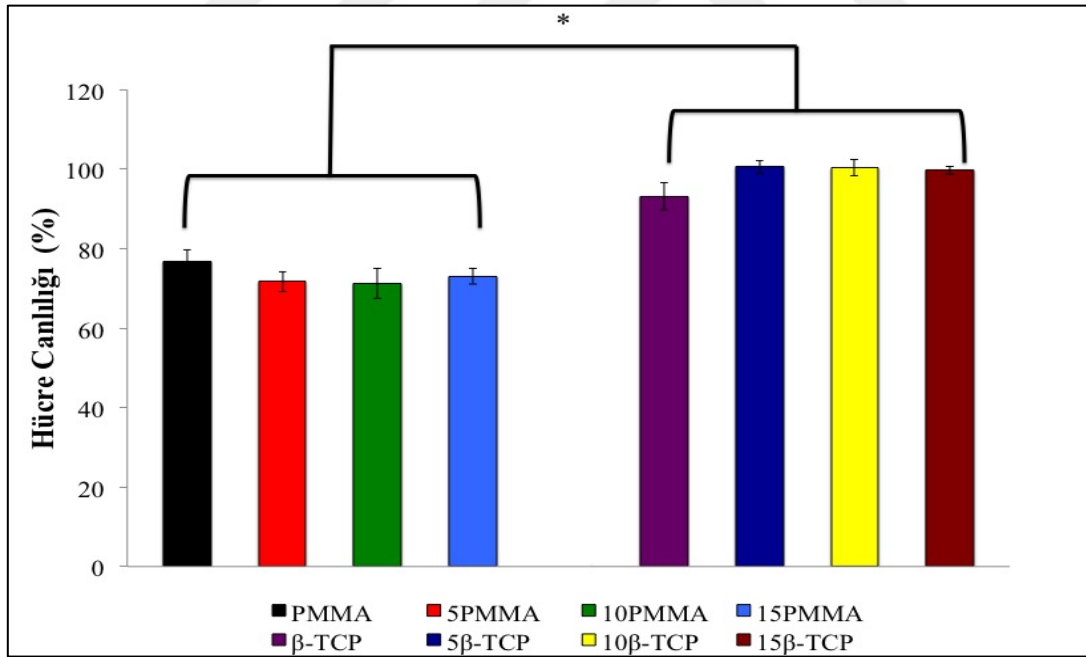
### 3.8 KEMİK ÇİMENTOLARININ İN-VİTRO BİYOUYUMLUKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

PS-AgsboxNPs katkılanmış PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının MC3T3-E1 hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olup olmadığı indirekt MTT testi yapılarak araştırılmıştır. 24 saat sonrasında hücrelerde PS-AgsboxNPs içeriğinden kaynaklı herhangi bir toksisite görülmemiştir. Örneğin saf PMMA'deki hücre canlılığı  $76 \pm 0.5$  iken 15PMMA'da bu değer  $73 \pm 0.3$  olarak bulunmuştur.  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentolarında da PS-AgsboxNPs katkılama sonrası herhangi bir toksisite görülmemiştir; saf  $\beta$ -TCP 'de  $93 \pm 0.6$  iken hücre canlılığı 15 $\beta$ -TCP'de  $99 \pm 0.1$  olmuştur. Benzer olarak Pauksch ve arkadaşları da, PMMA kemik çimentolarını AgNP ile ve/veya gentamisin ile fonksiyonel hale getirdikten sonra kemik hücreleri ile biyoyumluluğunu araştırmışlardır. 21 günün sonunda AgNP yüklü PMMA saf PMMA ya da gentamisin yüklü PMMA ile kıyaslandığında benzer sitokompatibilite göstermiştir. 3 deney grubu için de hücre canlılığı, sayısı ve osteojenik farklılaşma da bir azalma ya da hücre stresini tetikleyici bir belirtiye rastlanmamıştır [192].

PMMA ve  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentoları hücre canlılığı açısından değerlendirildiğinde  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentoları tüm formülasyonlarda  $100\%$ 'e ( $99 \pm 0.1$ , 15  $\beta$ -TCP ) yakın bir

hücre canlılığı sergilemiştir, PMMA formülasyonlarına kıyasla ( $76 \pm 0.5$ , saf PMMA) daha yüksek bir hücre aktivitesi göstermiştir. ( $p < 0.05$ ).

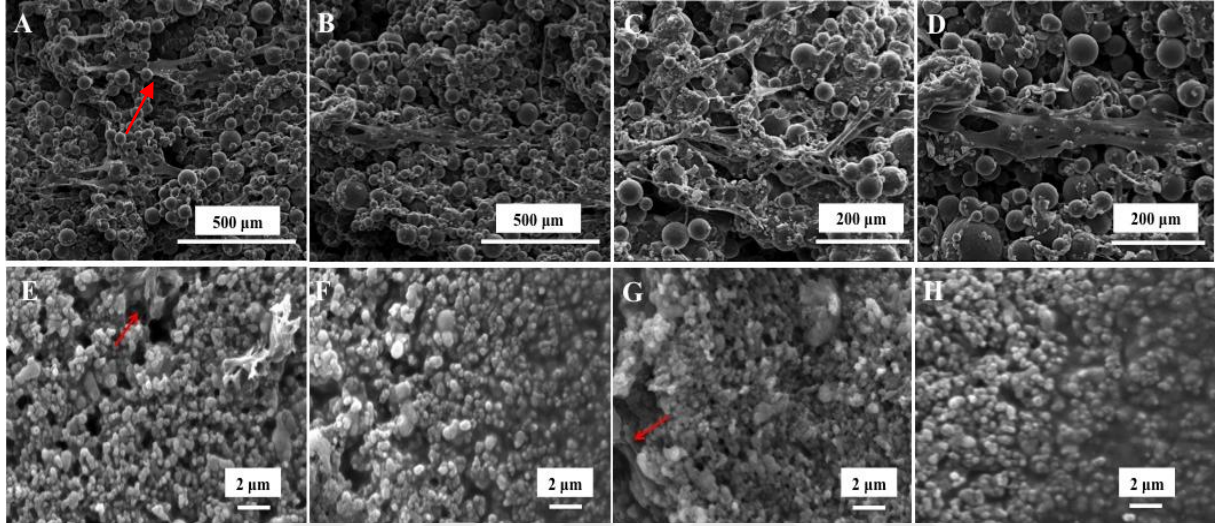
Kang ve arkadaşları PMMA bazlı kemiş çimentosunun osteokonduktif, biyouyumluluk, radyopak özelliklerini iyileştirmek için hidroksiapatit mikroküreler hazırlayarak katkı maddesi olarak kullanmışlardır. Saf PMMA sınırlı bir biyouyumluluk gösterirken MC3T3-E1 hücreleri HA mikrokürelerin üzerine özellikle aktif olarak yapışmıştır. Ayrıca hücreler filopod-benzeri uzantılar göstermiştir, PMMA/HA kemik çimentolarının biyouyumluluk ve osteokonduktif özelliklerinin PMMA'ya kıyasla *in vitro* ve *in vivo* testlerde daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır[193]. Araştırmacılar yaptıkları başka bir çalışmada ise kemik rejenerasyonunda PMMA bazlı kemik çimentolarını implant materyali olarak daha iyi kullanabilmek için hidroksiapatit nanopartiküller ile dekore etmişlerdir. İnsan fetal osteoblast (hFOB5) kullanarak yaptıkları testlerde PMMA ve BaSO<sub>4</sub>/PMMA çimentosu kullanımında hücre canlılığını sırasıyla %66 ve %72 olarak bulurken, HA/PMMA kullanımında bu oran %80'e çıkmıştır[194].



**Şekil 3.10** Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA (A) and β-TCP (B) kemik çimentolarının indirekt MTT yöntemi ile MC3T3-E1 hücresi üzerindeki sitotoksik etkileri.  $n=3$ ; \*,  $p < 0.05$ .

Temsili SEM görüntüleri hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve β-TCP kemik çimentolarının üzerindeki yapışan ve yayılan MC3T3-E1 hücrelerini göstermektedir (Şekil

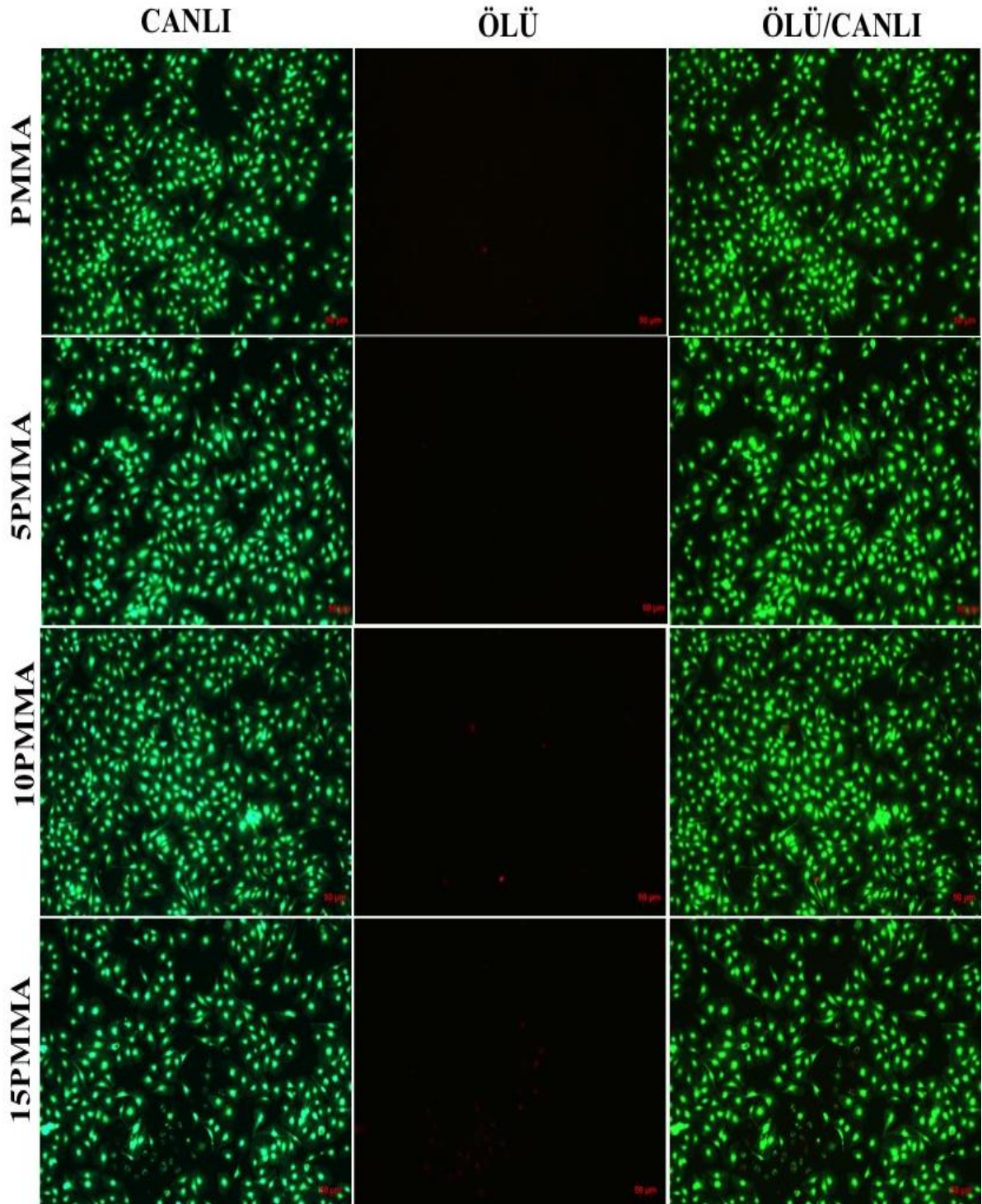
3.13). 24 saat etkileşim sonrasında, hücrelerin çimento tanecikleri üzerinde yayılım gösterdiği ve filopodial uzantılar oluşturarak diğer hücreler ile etkileşime girdiği açıkça görülmektedir. Hücrelerin morfolojisi ve yayılımı PS-AgsboxNPs içeriğinden etkilenmemektedir. Bu alınan SEM görüntüleri PS-AgsboxNPs-katkılı  $\beta$ -TCP-and PMMA-bazlı kemik çimentolarının biyouyumluluğunu kanıtlamaktadır.



**Şekil 3.11** Kemik çimentoları üzerindeki hücre yapışmasının SEM görüntüleri: saf PMMA (A), 5PMMA (B), 10PMMA (C), 15PMMA (D) ve saf  $\beta$ -TCP (E), 5 $\beta$ -TCP (F), 10 $\beta$ -TCP (G), 15 $\beta$ -TCP (H). Kırmızı oklar yapışan MC3T3-E1 hücrelerini göstermektedir.

### 3.9 CANLI/ÖLÜ HÜCRE TESTİ

Hücresel sitotoksosite ile paralel olarak canlı/ölü hücre boyama metodu kullanılarak kıyaslanabilir sonuçlar alınmıştır. Alınan görüntüler Şekil 3.14.'de sunulmuştur. Canlı/ölü hücre boyama metodunda canlı hücreler yeşile boyanırken sitotoksik, membran geçirgenliği bozulmuş hücreler kırmızı ile boyanır. Görüntüler, PS-AgsboxNPs içerikli  $\beta$ -TCP ve PMMA kemik çimentolarında iyileşen hücresel canlılığı ve nispeten azalan sitotoksiteyi göstermektedir. Ayrıca  $\beta$ -TCP ve PMMA kemik çimentolarında artan nanopartikül konsantrasyonu ile birlikte hücresel sitotoksosite değerlerinde bir değişim olmamıştır. Yüksek NPs konsantrasyonlarında bile iyileşen canlı hücre yüzdesi, açıkça gümüş nanopartiküllerin modifikasyonu ile ilişkilidir.  $\text{AgNO}_3$  içeren soya yağının otookside edilerek oluşturulan yeni kopolimer sayesinde hem gümüş nanopartiküllerin özellikleri korunmuş hem de hücre dostu bir materyal haline getirilmiştir. Farklı nanopartikül konsantrasyonları ile modifiye edilen kemik çimentolarında herhangi bir sitotoksik aktiviteye rastlanmamıştır.

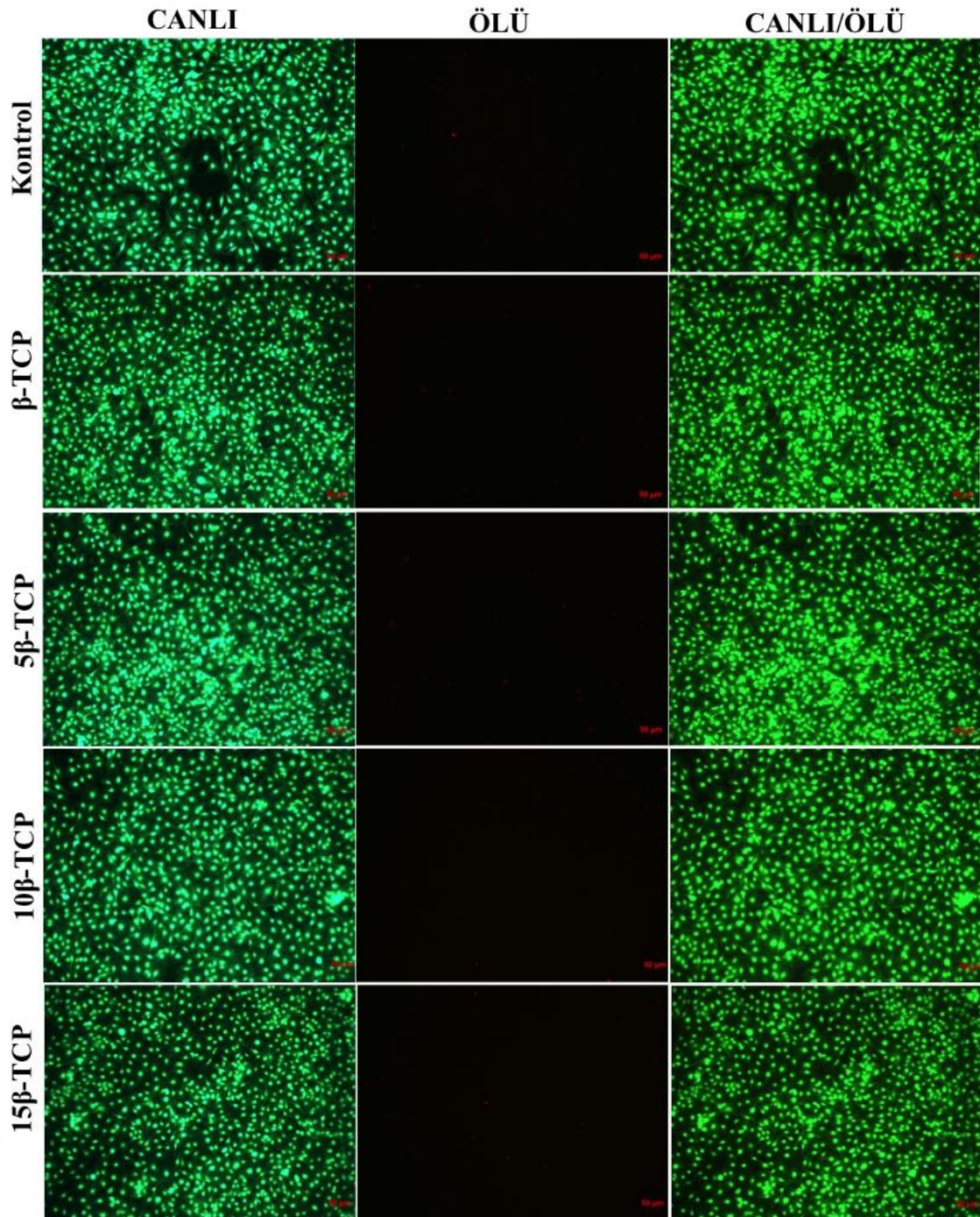


**Şekil 3.12** Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA kemik çimentolarının MC3T3- E1 hücresi ile etkileştirildikten sonra alınan floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu 10  $\mu$ m.

Gonzalez-Sanchez ve arkadaşları kemik greft materyali olarak, hazırladıkları yeni akrilat bazlı nanokompoziti rapor etmektedirler. AgNPs'in antibiyotik bazlı olmayan antibakteriyel aktivitesinden faydalanmak için polimerik mineralize matriks ile kompozit haline

getirmişlerdir. Farklı oranlarda AgNPs içeren hidrojellerin osteoblast hücreleri üzerindeki sitotoksitesini araştırmak için yaptıkları MTT analizi sonucunda, adsorpsiyon süresince kullanılan nanopartikül miktarı ve çapraz-bağlanma konsantrasyonu ile alakalı osteoblast hücreleri üzerinde zararlı bir etkisine rastlanmamıştır [195]. Yu ve arkadaşları ise AgNPs'in sentezinde stabilizör olarak poliglutamik asit (PGA) kullanarak dekstrozun kimyasal indirgenmesi ile nanoboyutta gümüş kolloitler sentezlemişlerdir. Hazırladıkları malzemenin L929 kullanarak hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini alınan mikroskop görüntüleri ile incelemişlerdir. 1 ve 5 ppm arasında Ag+ solüsyonunun toksisitesine baktıklarında %70'den daha fazla bir hücre lizisi ve hücre tek tabakasında tamamına yakın bir parçalanma gözlemlenmiştir. PGA/Ag0 üzerinde kültüre edilen hücreler hücre-substrat, hücre-hücre etkileşimlerini oluşturmak için sayısız hücresel uzantı geliştirmişlerdir, yüzey sürekli bir hücre tabakası ile kaplanmıştır. PGA/Ag0 hücre lizisi ya da toksisitesine dair herhangi bir kanıt sunmamıştır. Görülmektedir ki hücre uyumlu PGA'nın varlığı L929 fibroblast proliferasyonunu iyileştirmiştir [196].

Yapılan çalışmada da hem alınan MTT hem de floresan mikroskop sonuçları soya yağı ile modifiye edilerek hazırlanan nanopartiküllerin konsantrasyona bağlı olarak da MC3T3-E1 hücreleri üzerinde herhangi bir toksisiteye neden olmadığını kanıtlar niteliktedir.



**Şekil 3.13** Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının MC3T3-E1 hücresi ile etkileştirildikten sonra alınan floresan mikroskopi görüntüleri.

### 3.10 KEMİK ÇİMENTOLARININ ALP AKTİVİTESİ

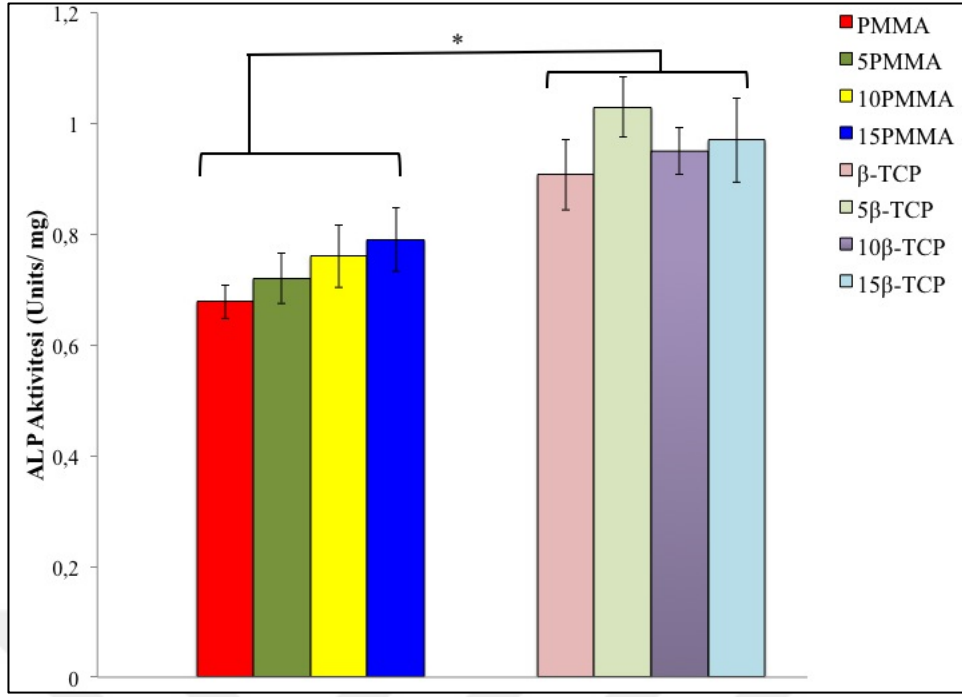
Çalışmada preosteoblastlardan osteoblastlara hücre farklılaşması ALP aktivitesi olarak tanımlanmıştır. ALP enzimi yıllardır osteoblastik aktivitenin göstergesi olarak kullanılmaktadır. MC3T3-E1 hücresi yeni doğmuş fare kafatası kökenlenen klonal bir preosteoblastik hücre hattıdır. Hücreler osteojenik ortamda 7 günden fazla farklılaşarak ALP

aktivitesinde dramatik bir artışa neden olur. Çalışmada hücreler 7 gün kültüre edildikten sonra PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarına yapışan hücrelerin ALP aktivitesi p-nitrofenil fosfat (pNPP) kullanılarak tanımlanmıştır. PNPP'in, ALP varlığında p-nitrofenol'e (pNP) dönüşümü ALP aktivitesi ile doğru orantılıdır. pNP üretimi 405 nm'de mikropilaka okuyucu kullanılarak tanımlanır ve ALP aktivitesi protein içeriğine normalize edilir.

PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarına yapışan hücrelerin ALP aktivitesi ünite/mg olarak Şekil 3.16'de verilmiştir. Sonuçlara göre  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının üzerindeki hücrelerin 7 günlük kültürün sonunda PMMA'ya kıyasla daha yüksektir ( $p < 0.05$ ). ALP aktivitesi üzerinde çimento formülasyonunun etkisi görülmektedir. PMMA çimento üzerinde kültüre edilen hücreler  $\beta$ -TCP formülasyonlarına kıyasla daha düşük ALP aktivitesi göstermektedir. Aynı şekilde, Palmer ve arkadaşları kalsiyum fosfat (CPC) kemik çimentolarının ve kollajen-CPC kompozitinin biyolojik özelliklerini in vitro ortamda insan kemik iliği stromal hücreleri kullanarak değerlendirmişlerdir ve PMMA bazlı kemik çimentoları, CaP bazlı kemik çimentolarına kıyasla daha düşük ALP aktivitesi göstermiştir [197].

Zhang ve arkadaşları da PMMA ile bifazik kalsiyum fosfatı (BCPx) kombine ettikleri çalışmalarında tüm BCPx/ PMMA gruplarının alkalen fosfataz aktivitelerinin 14. Günde 7.güne kıyasla daha fazla ekprese edildiklerini göstermişlerdir. ALP aktivitesinin  $\beta$ -TCP içeriğine bağlı olduğu sonucuna varmışlar ve en yüksek ekspresyonu 14 günlük inkübasyon sonunda BCP7/PMMA grubunda gözlemlemişlerdir. Bu bulgu açıkça çimentodaki BCP içeriğinin sıçan kemik iliği mezenşimal kök hücrelerinin farklılaşmasını uyardığını ortaya koymuştur [198].

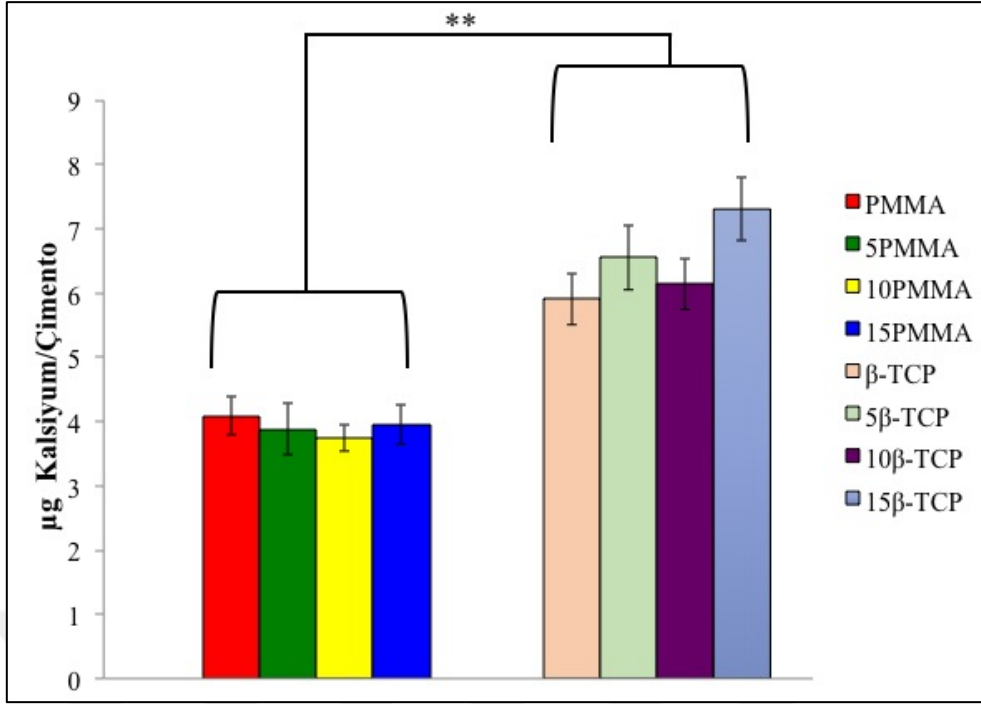
Ayrıca alkalen testinden alınan sonuçlar in vitro sitotoksitesite sonuçlarını doğrular niteliktedir. Farklı PS-AgsboxNPs içerikli kemik çimentolarının ALP aktiviteleri arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.



**Şekil 3.14** Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının M C3T3-E1 hücreleri ile 7 gün kültürü sonrası in vitro osteoindüktif aktivitesi. n=3; \*,  $p < 0.05$ .

### 3.11 KALSİYUM TESTİ

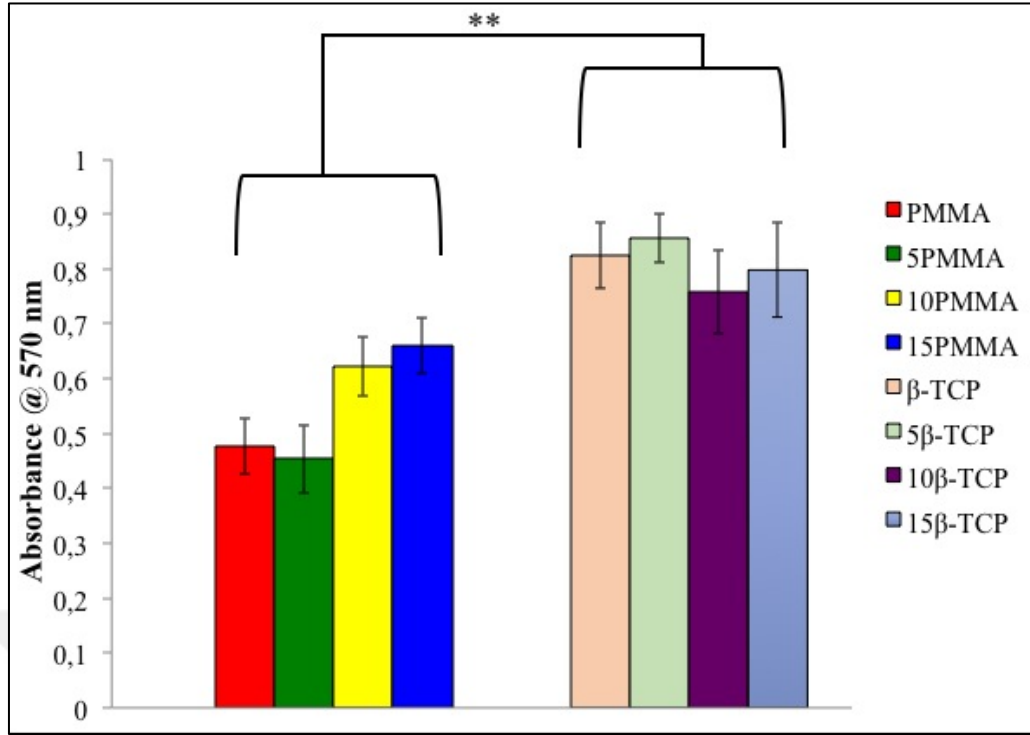
Kalsiyum analizi kemik çimentoları üzerindeki mineralize matriks oluşumunu değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Mineralize matriks oluşumunun bir göstergesi olan sentezlenen kalsiyum miktarları Şekil 3.17’de verilmiştir. Nicel analiz,  $\beta$ -TCP kemik çimentoları üzerinde ortalama kalsiyum birikiminin önemli ölçüde PMMA kemik çimentolarından yüksek olduğunu göstermektedir ( $p > 0.05$ ). 10PMMA grubu üzerinde  $3.73 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{çimento}$  biriktiren 10 $\beta$ -TCP  $6.14 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{çimento}$  oluşumu görülmüştür.  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının tüm grupları ortalama olarak PMMA numunelerinin 2 katı kadar kalsiyum birikimi sağlamıştır. En yüksek kalsiyum birikimi  $7.30 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{çimento}$  ile 15 $\beta$ -TCP’de görülmüştür. PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının içerisindeki farklı PS-AgsboxNPs içerikleri ile kalsiyum birikimindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



**Şekil 3.15** Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarında MC3T3-E1 hücreleri ile 7 gün kültürü sonrası kalsiyum birikimi. n=3; \*\*, p < 0.005.

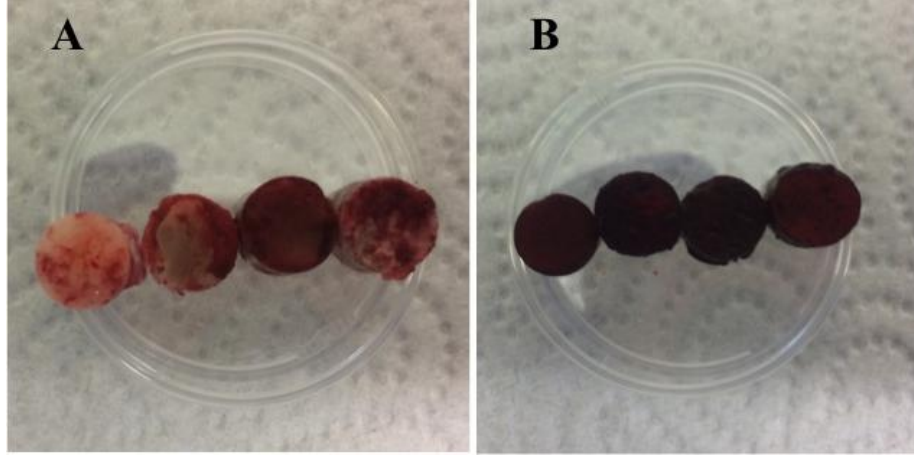
Velu ve arkadaşları da PMMA'yı farklı oranlarda  $\beta$ -TCP ile kombine etmişlerdir ve sinterlenmiş örneklerin in vitro osteoblast fonksiyonunu yapışma, yayılma, proliferasyon ve MG-63 hücrelerinin osteojenik farklılaşması yolu ile incelemişlerdir. Kalsiyum birikimini Alizarin boyama ile analiz ettiklerinde kompozit örneklerin saf PMMA'ya kıyasla daha iyi boyandıklarını görmüşlerdir. Yüksek  $\beta$ -TCP içeriği daha iyi boyanma sağlamıştır. Bu sonuç lazer ile sinterlenmiş PMMA-bazlı kompozitlerde artan  $\beta$ -TCP içeriği daha iyi bir mineralizasyon sağlamaktadır [199].

Kalsiyum içeren kemik benzeri mineralize matriksin birikimi uzayan osteojenik olgunlaşmanın bir göstergesidir. Kemik çimentolarının üzerindeki kalsiyum birikimi ek olarak Alizarin boyama metodu ile de incelenmiştir ve Şekil 3.18 ve görsel olarak 19'da verilmiştir. Kemik çimentolarından alınan absorbans değerlerine bakıldığında <. PS-AgsboxNPs içeriğinin artması, hücrelerde herhangi bir toksik etkiye neden olmadığından bu artış korunmuş ve osteojenik aktivite desteklenmiştir.



**Şekil 3.16** Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarında MC3T3-E1 hücreleri ile 7 gün kültürü sonrası alizarin kırmızısı ile boyama sonrasında elde edilen kalsiyum birikimi. n=3; \*\*, p < 0.005.

Zhang ve arkadaşları, in vivo osteogenezisi düzenlemek için PMMA içerisinde farklı oranlarda BCP emilimini sağlamışlardır. In vitro ve in vivo BCPx/PMMA kemik çimentolarının hücresel cevabını detaylı olarak incelemişlerdir. 14 günlük inkübasyonun sonunda, çok zayıf bir pozitif boyanma gözlemlerken BCPx/PMMA daha güçlü bir pozitif boyanma göstermiştir ve matriks birikimi ve kalsiyum mineral nodülleri  $\beta$ -TCP içeriği ile birlikte artmıştır. Bu boyanmadaki dikkat çekici artış BCP7/PMMA kemik çimentosunun yüzeyinde gerçekleşmiştir ve özellikle  $\beta$ -TCP mineral birikimini etkili bir biçimde desteklemiştir[198].



**Şekil 3.17** Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA (A) ve  $\beta$ -TCP (B) kemik çimentolarında MC3T3-E1 hücreleri ile 7 gün kültürü sonrasında Alizarin kırmızısı ile biomineralizasyonun görselleri.

## BÖLÜM 4

### SONUÇLAR

- Sentezlenen AgNPs katkılı (Agsbox) polimerik otookside soya yağının (Psbox) karakterizasyonunu daha önce ki çalışmalarda gerçekleştirilmiştir.  $^1\text{H}$  NMR spektroskopisinde soya yağına ve PS'e ait karakteristik pikler gözlemlenmiştir. PS-Agsbox graft kopolimerinin FT-IR spektrumunda gözlemlenen pikler, soya yağının açıkça otookside olduğunu göstermiştir[171-172].
- Farklı çalışma parametrelerinin nanopartiküllerin boyut ve boy-boy dağılımı üzerine etkisi incelendiğinde; polimer miktarını arttırmanın polimerin daha fazla çökmesine sebep olup nanopartikül boyutunu da arttırdığı gözlemlenmiştir. Bir başka parametre olan karıştırma hızı yükseldikçe nanopartikül boyutunda küçülme gözlemlenmiştir. Sürfektan olarak kullanılan Tween-80'nin miktarı arttıkça daha çok yüzey alanına sahip, daha kararlı, daha küçük nanoparçacıklar elde edilmiştir. Fakat belli bir değerden sonra nanopartikül boyutunda ki küçülme durmuştur. Farklı parametreler değiştirilerek elde edilen sonuçlara göre; düşük konsantrasyonda polimer kullanımı (1 mg), yüksek homojenizasyon değeri (%90 amplitud ) ve Tween-80'nin 0.06 mL kullanımıyla optimize edilen ideal, kararlı nanopartiküllerin boyutu  $193\pm 2$  nm; çoklu dağılım indeksi  $0.020\pm 0.010$  ve yüzey yükü -  $31.9\pm 0.15$  mV olarak bulunmuştur. Optimize edilen nanopartiküllerin SEM ve AFM görüntüleri alınarak yüzey morfolojisi incelenmiş, yaklaşık 40-50 nm arasında boyutlara sahip küresel formda nanoparçacıklar elde edildiği gözlemlenmiştir.
- Bu çalışmada PMMA ve biyoaktif olan  $\beta$ -TCP kemik çimentoları kullanılmıştır. PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP çimentoların SEM görüntüleri incelendiğinde, partiküller PMMA matriks ile tamamen entegre olmuşken  $\beta$ -TCP kemik çimentolarında yapıyla bütünleşmiş gözükmemektedir. Nanopartiküllü kemik çimentolarının por yapısı ve porların dağılımın incelendiğinde  $\beta$ -TCP bazlı kemik çimentolarında makroporlar gözlemlenirken PMMA kemik çimentoları daha küçük porlara sahiptir. Civa porozimetresinde bakılan porlar ortalama 10-200  $\mu\text{m}$  çapındadır. Homojen dağılım gösteren porların çaplarının değişiklik gösterdiğini söyleyebiliriz.

- PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP çimentolarının su alımı incelendiğinde; PS-AgsboxNPs içeren  $\beta$ -TCP ve içermeyen  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının PS-AgsboxNPs içeren ve içermeyen PMMA kemik çimentolarına kıyasla önemli ölçüde daha iyi su absorbe ettiği gözlemlenmiştir. PS-AgsboxNPs içerikli  $\beta$ -TCP çimentolarının ise 19 gün boyunca en yüksek su alımı davranışı gösterdiğini ve naopartikül eklenen  $\beta$ -TCP çimentosunun su alımının daha iyi olduğunu söyleyebiliriz.
- Hazırlanan kemik çimentolarıyla yapılan sıkıştırma testinde PS-AgsboxNPs ekli 5PMMA kemik çimentosunun sıkıştırma dayanımının  $236.79 \pm 2$  MPa'a yükselerek en iyi dayanım gösterdiği gözlemlenmiştir.  $\beta$ -TCP çimentosu incelendiğinde ise 5  $\beta$ -TCP kemik çimentosu  $8.28 \pm 0.2$  Mpa dayanım göstererek nanopartikül ekli PMMA kemik çimentosuna göre çok düşük bir değerde kaldığı açıkça görülebilmektedir.
- Kemik çimentolarından gümüş iyonu salımı incelendiğinde ise nanopartikül içeren  $\beta$ -TCP çimentosunun PMMA çimentosuna göre 1. günden 9. güne kadar sabit bir şekilde artan Ag iyonu konsantrasyonu gözlemlenmiştir.
- Hazırlanan PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyel etkileri karşılaştırılmış olup PS-AgsboxNPs içeren  $\beta$ -TCP kemik çimentolarında, PMMA örneklerine kıyasla daha belirgin olarak inhibisyon zonları görülmüştür. Ayrıca nanopartikül içermeyen saf PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının etrafında herhangi bir zon gözlemlenmemiştir. Ayrıca farklı konsantrasyonlardaki nanopartikül içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktiviteleri ek olarak 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolyum klorit (TTC) reaktifi kullanılmıştır. PS-AgsboxNPs'in artan konsantrasyonlarını içeren kemik çimentoları ile etkileştirilen *S. aureus* ve *E. coli* 'nin kırmızı formazan oluşumuna bağlı olarak absorbans değerleri incelendiğinde hem PMMA hem de  $\beta$ -TCP numunelerinde kırmızı renk şiddetindeki düşmeden dolayı daha düşük absorbanslar alınmış olup daha güçlü bir antibakteriyel etki göstermiştir. PMMA ve  $\beta$ -TCP çimentoları antibakteriyel aktivite açısından karşılaştırıldığında ise AgsboxNPs içerikli  $\beta$ -TCP numunesi özellikle *S. aureus*'a karşı güçlü etki göstermiştir. 15PMMA 'dan alınan absorbans değeri  $0.378 \pm 0.01$  iken 15 $\beta$ -TCP'den alınan değer  $0.283 \pm 0.01$  olmuştur. Ayrıca  $\beta$ -TCP numuneleri PMMA'ya kıyasla *S. aureus*'a karşı daha güçlü bir indirgenme yaratmıştır.
- Hazırlanan nanopartikül içerikli kemik çimentolarının biyoyumluluklarının araştırılması adına MTT testi yapılarak MC3T3-E1 hücreleri üzerinde sitotoksik etki olup olmadığına

bakılmıştır. 24 saat sonrasında saf  $\beta$ -TCP 'de  $93\pm0.6$  iken hücre canlılığı  $15\beta$ -TCP'de  $99\pm0.1$  olmuş olup yaklaşık  $100$ 'e yakın bir hücre canlılığı göstermiştir. Saf PMMA'deki hücre canlılığı ise  $76\pm0.5$  iken  $15\text{PMMA}$ 'da bu değer  $73\pm0.3$ 'tür. Bu sonuçlar PMMA ve özellikle  $\beta$ -TCP çimentolarına PS-AgsboxNPs katılanmasının herhangi bir toksisiteye sebep olmadığını göstermiştir.

- Sitotoksik etkiyi incelemek adına yapılan bir diğer metod canlı/ölü hücre boyama metodudur. Canlı/ölü hücre boyama metodunda canlı hücreler yeşile boyanırken membran geçirgenliği bozulmuş hücreler kırmızı ile boyanır. Elde edilen görüntüler incelendiğinde  $\beta$ -TCP ve PMMA kemik çimentolarında artan nanopartikül konsantrasyonu ile birlikte hücresel sitotoksite değerlerinde bir değişme olmamıştır. Otokside edilerek oluşturulan  $\text{AgNO}_3$  içerikli soya yağından oluşturulan kopolimer sayesinde hem gümüş nanopartiküllerin özellikleri korunmuş hem de hücrede sitotoksiteye sebep olmayan bir materyal haline gelmiştir. Ayrıca PS-AgsboxNPs içerikli PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının 24 saatlik etkileşimden sonra alınan SEM görüntüleri MC3T3-E1 hücrelerinin çimento tanecikleri üzerinde yayılım gösterdiğini, filopodial uzantılar oluşturarak diğer hücreler ile etkileşime girdiğini ve bu durumda gümüş nanopartikül katkılı  $\beta$ -TCP-and PMMA-bazlı kemik çimentolarının biyouyumluluğunu bize açıkça göstermektedir.
- Osteoblastik aktivitenin göstergesi olan ALP enzimi kullanılarak kemik çimentolarının ALP aktivitesine bakılmıştır. MC3T3-E1 hücresi 7 gün kültüre edildikten sonra PMMA ve  $\beta$ -TCP kemik çimentolarına yapışan hücrelerin ALP aktivitesi p-nitrofenil fosfat (pNPP) kullanılarak incelenmiştir. ALP varlığıyla doğru orantı gösteren p-nitrofenol'e (pNP) dönüşümü, 405 nm'de mikropilaya okuyu kullanılarak bakılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde ise 7 günlük kültürün sonunda  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının üzerinde ki hücreler PMMA'ya kıyasla daha yüksek çıktığı gözlemlenmiştir. Farklı oranda gümüş nanopartikül içeren kemik çimentolarının ALP aktiviteleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu testten alınan sonuçlar ise in vitro sitotoksite sonuçlarının doğru olduğunu gösterir bir niteliktedir.
- Kemik çimentolarının üzerinde ki mineralize matriks oluşumunu değerlendirmek için kalsiyum analizi gerçekleştirilmiştir.  $10\text{PMMA}$  grubu üzerinde  $3.73\pm0.2$   $\mu\text{g}/\text{çimento}$  biriktirirken  $10\beta$ -TCP  $6.14\pm0.4$   $\mu\text{g}/\text{çimento}$  oluşumu görülmüştür. En yüksek kalsiyum birikimi  $7.30\pm0.5$   $\mu\text{g}/\text{çimento}$  ile  $15\beta$ -TCP'de görülmüştür.  $\beta$ -TCP kemik çimentolarının tüm grupları ortalama olarak PMMA numunelerinin 2 katı kadar kalsiyum birikimi sağlamıştır. Ek olarak kemik çimentolarında biriken kalsiyum miktarına Alizarin boyama

metoduyla bakıldığında da PS-AgsboxNPs içermeyen PMMA  $0.47 \pm 0.051$ 'lik bir absorbans verirken  $\beta$ -TCP'de bu değer  $0.825 \pm 0.06$  olmuş ve  $\beta$ -TCP ve kullanımıyla biomineralizasyon artışı 2 kat fazla kaydedilmiştir.



## KAYNAKLAR

- [1] **Buckwalte J A, Glimcher M J, Cooper R R, and Recker R.**(1996). Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional Course Lectures*, 45: 371–386.
- [2] **Downey P A, and Siegel M I** (2006). Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Physical Therapy*, 86(1): 77–91.
- [3] **Webster T J, and Ahn E S** (2007). Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 103(1): 275–308.
- [4] **Rho J Y, Kuhn-Spearing L, and Zioupos P** (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering and Physics*, 20(2): 92–102.
- [5] **Robling A, Castillo A, and Turner C** (2006). Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8(1): 455–498.
- [6] **Datta H K, Ng W F, Walker J A, Tuck S P, and Varanasi S S** (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, 61(5): 577-587.
- [7] **Clarke B** (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3: 131-139.
- [8] **Bonewald L F** (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2): 229–238.
- [9] **Everts V, Delaissié J M, Korper W, Jansen D C, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, and Beertsen W** (2002). The bone lining cell: Its role in cleaning Howship’s lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(1): 77–90.
- [10] **Rimondini L, Fini M, and Giardino R** (2004). The microbial infection of biomaterials: A challenge for clinicians and researchers. A short review. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics : JABB*, 3(1): 1–10.
- [11] **Olson M E, Garvin K L, Fey P D and Rupp M E** (2006). Adherence of staphylococcus epidermidis to biomaterials is augmented by PIA. In *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 451: 21–24.
- [12] **Higashi J M, Wang I W, Shlaes D M, Anderson J M and Marchant R E** (1998). Adhesion of Staphylococcus epidermidis and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39(3): 341–350.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [13] Cerca N, Pier G B, Vilanova M, Oliveira R and Azeredo J (2005). Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in Microbiology*, 156(4): 506–514.
- [14] Lentino J R (2003). Prosthetic Joint Infections: Bane of Orthopedists, Challenge for Infectious Disease Specialists. *Clinical Infectious Diseases*, 36(9): 1157–1161.
- [15] Kurtz S M, Lau E, Schmier J, Ong K L, Zhao K and Parvizi J (2008). Infection Burden for Hip and Knee Arthroplasty in the United States. *Journal of Arthroplasty*, 23(7): 984–991.
- [16] Saldarriaga Fernández I C, Mei H C, van der Metzger S, Grainger D W, Engelsman A F, Nejadnik M R and Busscher H J (2010). In vitro and in vivo comparisons of staphylococcal biofilm formation on a cross-linked poly(ethylene glycol)-based polymer coating. *Acta Biomaterialia*, 6(3): 1119–1124.
- [17] Langer R and Vacanti J P (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110): 920–926.
- [18] Hench L L (2002). Third-Generation Biomedical Materials. *Science*, 295(5557): 1014–1017.
- [19] Kretlow J D, and Mikos A G (2007). Review: mineralization of synthetic polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng*, 13(5): 927–938.
- [20] Liu C Z, and Czernuszka J T (2007). Development of biodegradable scaffolds for tissue engineering: a perspective on emerging technology. *Materials Science and Technology*, 23(4): 379–391.
- [21] Zijdeveld S A, Zerbo I R, van den Bergh J P, Schulten E A and ten Bruggenkate C M (2005). Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20(3): 432–440.
- [22] Oonishi H, Kushitani S and Iwaki H (1995). Comparative bone formation in several kind of bioceramic granules. In: *Bioceramics*, Tokyo, Japonya, In 8th International Symposium on Ceramics in Medicine, Wilson J, Hench LL, Greenspan D (Ed.) Elsevier Science, 137–144.
- [23] Stevens M M, Marini R P, Schaefer D, Aronson J, Langer R and Shastri V P (2005). In vivo engineering of organs: The bone bioreactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32): 11450–11455.
- [24] Cushing M C, and Anseth K S (2007). Hydrogel Cell Cultures. *Material Science*, 316(5828): 1133–1134.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [25] **Stevens M M, Qanadilo H F, Langer R and Shastri V P** (2004). A rapid-curing alginate gel system: Utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 25(5): 887–894.
- [26] **Lutolf M P, Lauer-Fields J L, Schmoekel H G, Metters A T, Weber F E, Fields G B and Hubbell J A** (2003). Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9): 5413–5418.
- [27] **Lutolf M P, Weber F E, Schmoekel H G, Schense J C, Kohler T, Müller R and Hubbell J A** (2003). Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nature Biotechnology*, 21(5): 513–518.
- [28] **Linhart W, Peters F, Lehmann W, Schwarz K, Schilling A F, Amling M and Epple M** (2001). Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54(2): 162–171.
- [29] **Liao S S, Cui F Z and Zhu Y** (2004). Osteoblasts Adherence and Migration through Three-dimensional Porous Mineralized Collagen Based Composite: nHAC/PLA. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 19(2): 117–130.
- [30] **Pereira M M, Jones J R, Orefice R L and Hench L L** (2005). Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(11): 1045–1050.
- [31] **Giannoudis P V, Dinopoulos H, and Tsiridis E** (2005). Bone substitutes: An update. *Injury*, 36(3): 20–27.
- [32] **Hing K A** (2005). Bioceramic bone graft substitutes: Influence of porosity and chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. 2(3):187-189.
- [33] **Meeder P J and Eggers C** (1994). 1. The history of autogenous bone grafting. *Injury*, 25: 2-3.
- [34] **Navarro M, Michiardi A, Castan O and Planell J A** (2008). Review. Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface*, 5: 1137–1158.
- [35] **Charnley J** (1970). Acrylic cement in orthopaedic surgery. *British Journal of Surgery*, 57(11): 874–874.
- [36] **Gomes F O, Pires R A and Reis R L** (2013). Aluminum-free glass-ionomer bone cements with enhanced bioactivity and biodegradability. *Materials Science and Engineering C*, 33(3): 1361–1370.
- [37] **Karimzadeh A and Ayatollahi M R** (2012). Investigation of mechanical and tribological properties of bone cement by nano-indentation and nano-scratch experiments. *Polymer Testing*, 31(6): 828–833.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [38] **Tanner K E, Wang J S, Kjellson F and Lidgren L** (2010). Comparison of two methods of fatigue testing bone cement. *Acta Biomaterialia*, 6(3): 943–952.
- [39] **Michael F M, Khalid M, Walvekar R, Ratnam C T, Ramarad S, Siddiqui H and Hoque M E** (2016). Effect of nanofillers on the physico-mechanical properties of load bearing bone implants. *Materials Science and Engineering C*.67: 792-876.
- [40] **Kim S Y and Jeon S H** (2012). Setting properties, mechanical strength and in vivo evaluation of calcium phosphate-based bone cements. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(1): 128–136.
- [41] **Khandaker M and Meng Z** (2015). The effect of nanoparticles and alternative monomer on the exothermic temperature of PMMA bone cement. *In Procedia Engineering*. 105: 946–952.
- [42] 11. ISO 5833.(2002), Cerrahi İmplantlar-Akrilik Reçine Kemik Çimentoları. *Uluslararası Standartlar Örgütü*.
- [43] **Rodrigues D C, Ordway N R, Ru-Jyu Ma C, Fayyazi A H and Hasenwinkel J M** (2011). An ex vivo exothermal and mechanical evaluation of two-solution bone cements in vertebroplasty. *Spine Journal*, 11(5): 432–439.
- [44] **Nottrot M** (2010). Acrylic bone cements: influence of time and environment on physical properties. *Acta Orthopaedica. Supplementum*, 81(341): 1–27.
- [45] **Kuhn K-D** (2009). Properties of Bone Cement: What is Bone Cement? Berlin, Almanya, *In The Well-cemented Total Hip Arthroplasty: Theory and Practice*, Breusch S and Malchau H, Springer, e-book, 52–59.
- [46] **Arora M** (2013). Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature. *World Journal of Orthopedics*, 4(2): 67.
- [47] **Charnley J** (1960). Anchorage of the Femoral Head Prosthesis to the Shaft of the Femur. *Br J Bone Jt Surg*, 1: 28–30.
- [48] **Charnley J** (1970). Acrylic cement in orthopaedic surgery. *British Journal of Surgery*, 57(11): 874–874.
- [49] **Waugh W** (1990) *John Charnley-The Man and the Hip*. 1st ed., Springer, Almanya, 1-2686.
- [50] **Öztürk Ö C** (2005) Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Hidroksiapatit ve Antibiyotik Katkısının Kemik Çimentosunun Dayanımına Etkisinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 177 s.
- [51] **Marangoz S** (2011). Kemik Çimentosu. *Totbid Dergisi*, 10(2):103-108.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [52] **Harper E J** (1998). Bioactive bone cements. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, *Part . Journal of Engineering in Medicine*, 212(2): 113–120.
- [53] **Dunne N and Clements J** (2008). Acrylic Cements For Bone Fixation In Joint Replacement, *Joint Replacement Technology Chapter:8*, Second Edition, Woodhead Publishing Limited, UK. 34(5): 737-744.
- [54] **Matsuo H, Suenaga H, Takahashi M, Suzuk, O, Sasaki K and Takahashi N** (2015). Deterioration of polymethyl methacrylate dentures in the oral cavity. *Dental Materials Journal*, 34(2): 234–239.
- [55] **Wen J, Jiang F, Yeh C K and Sun Y** (2016). Controlling fungal biofilms with functional drug delivery denture biomaterials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140: 19–27.
- [56] **Padovani G C, Feitosa V P, Sauro S, Tay F R, Durán G, Paula A J and Durán N** (2015). Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. *Trends in Biotechnology*, 33: 621-636.
- [57] **Wang W, Liao S, Zhu Y, Liu M, Zhao Q and Fu Y** (2015). Recent applications of nanomaterials in prosthodontics. *Journal of Nanomaterials*, 11 pp/s.
- [58] **Brown W E and Chow L C** (1983) A new calcium phosphate setting cement. *Journal of Dental Research*, 62: 672–679.
- [59] **Barinov S M and Komlev V S** (2011). Calcium phosphate bone cements. *Inorganic Materials*, 47(13): 1470–1485.
- [60] **Gelibolu N** (2005) Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Hidroksiapatit Katkısının Kemik Çimentosunun Dayanımına Etkisinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, 153 s.
- [61] **Gao C, Wei D, Yang H, Chen T and Yang L** (2015). Nanotechnology for treating osteoporotic vertebral fractures. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 5139–5157.
- [62] **Ginebra M P** (2009). Cements as bone repair materials. *Bone Repair Biomaterials*, Planell J.A, Best S.M, Lacroix D and Merolli A.(Ed), ISBN:978-1-84569-385-5, Woodhead Publishing, 271–308.
- [63] **Khairoun I, Boltong M G, Driessens F C M and Planell J A** (1998). Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9(8): 425–428.
- [64] **Bohner M and Baroud G** (2005). Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials*, 26(13): 1553–1563.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [65] **Ishikawa K, Karashima S, Takeuchi A and Matsuya S** (2008). Apatite Foam Fabrication Based on Hydrothermal Reaction of  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate Foam. *Key Engineering Materials*, 363: 319–322.
- [66] **Lewis G** (2006). Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: State-of-the-art review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 76: 456–468.
- [67] **Ginebra M P, Traykova T and Planell J A** (2006). Calcium phosphate cements: Competitive drug carriers for the musculoskeletal system. *Biomaterials*, 27(10):2171–2177.
- [68] **Canal C and Ginebra M P** (2011) Fibre-reinforced calcium phosphate cements: A review. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(8):1658–1671.
- [69] **Ginebra M, Canal C, Espanol M, Pastorino D and Montufar E.** (2012), Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(12): 1090–1110.
- [70] **Hench L L, Splinter R. J, Allen W C and Greenlee T K** (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 5(6): 117–141.
- [71] **Cao W and Hench L L** (1996). Bioactive materials. *Ceramics International*, 22(6): 493–507.
- [72] **Grover L M, Knowles J C, Fleming G J P and Barralet J E** (2003). In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 24(23): 4133–4141.
- [73] **Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Böhner M and Von Rechenberg B** (2005). Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 26(21): 4383–4394.
- [74] **Frankenburg E P, Goldstein S a, Bauer T W, Harris S a and Poser R D** (1998). Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 80(8): 1112–1124.
- [75] **Wenisch S, Stahl J-P, Horas U, Heiss C, Kilian O, Trinkaus K and Schnettler R** (2003). In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: Fine structural microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research*, 67(3): 713–718.
- [76] **Khairoun I, Boltong M G, Driessens F C and Planell J A** (1997). Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 38(4): 356–360.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [77] **Fernandez E, Planell J A and Best S M** (1999). Precipitation of carbonated apatite in the cement system  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ - $\text{CaCO}_3$ . *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(4): 466–471.
- [78] **Driessens F C, Planell J a, Boltong M G, Khairoun I and Ginebra M P** (1998). Osteotransductive bone cements. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, *Journal of Engineering in Medicine*, 212(6): 427–435.
- [79] **Deb S and Koller G** (2008). Acrylic bone cement: Genesis and evolution. In *Orthopaedic Bone Cements*, Deb S. (Ed), 1st edition, ISBN: 978-184-56-9517-0, Woodhead Publishing, e-book, 167–182.
- [80] **Larsson S and Bauer T W** (2002). Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (395): 23–32.
- [81] **Khandaker M and Meng Z** (2015). The effect of nanoparticles and alternative monomer on the exothermic temperature of PMMA bone cement. In *Procedia Engineering*, 105: 946–952.
- [82] **Rodrigues D C, Ordway N R, Ru-Jyu Ma C, Fayyazi A H and Hasenwinkel J M** (2011). An ex vivo exothermal and mechanical evaluation of two-solution bone cements in vertebroplasty. *Spine Journal*, 11(5): 432–439.
- [83] **Sanz-Ruiz P, Paz E, Abenojar J, del Real J C, Forriol F and Vaquero J** (2014). Influence of the physiological medium on the mechanical properties of bone cement: Can current studies be extrapolated. *Revista Española de Cirugía Ortopédica Y Traumatología*, 58(1): 3–10.
- [84] **Gutiérrez-Mejía A, Herrera-Kao W, Duarte-Aranda S, Loría-Bastarrachea M I, Canché-Escamilla G, Moscoso-Sánchez F J and Cervantes-Uc J M** (2013). Synthesis and characterization of core-shell nanoparticles and their influence on the mechanical behavior of acrylic bone cements. *Materials Science and Engineering C*, 33(3): 1737–1743.
- [85] **Zhang Y, Wang D, Wang F, Jiang S and Shu Y** (2015). Modification of dicalcium silicate bone cement biomaterials by using carboxymethyl cellulose. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 426: 164–168.
- [86] **Tanner E** (2012). Optimising the properties of injectable materials for vertebroplasty and kyphoplasty. In *Biomaterials for Spinal Surgery*, 2012: 385–403.
- [87] **Khaled S M Z, Charpentier P A and Rizkalla A S** (2010). Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate)-based experimental bone cements reinforced with  $\text{TiO}_2$ -SrO nanotubes. *Acta Biomaterialia*, 6(8): 3178–3186.
- [88] **Nien Y-H and Huang C** (2010). The mechanical study of acrylic bone cement reinforced with carbon nanotube. *Materials Science and Engineering: B*, 169(1): 134–137.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [89] Lewis G, Xu J, Madigan S and Towler M R (2007). Influence of strontia on various properties of Surgical Simplex®P acrylic bone cement and experimental variants. *Acta Biomaterialia*, 3(6): 970–979.
- [90] Hernández L, Gurruchaga M and Goñi I (2009). Injectable acrylic bone cements for vertebroplasty based on a radiopaque hydroxyapatite. Formulation and rheological behaviour. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(1): 89–97.
- [91] Ormsby R, McNally T, Mitchell C and Dunne N (2010). Incorporation of multiwalled carbon nanotubes to acrylic based bone cements: Effects on mechanical and thermal properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 3(2): 136–145.
- [92] Ormsby R, McNally T, O'Hare P, Burke G, Mitchell C and Dunne N (2012). Fatigue and biocompatibility properties of a poly(methyl methacrylate) bone cement with multi-walled carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia*, 8(3): 1201–1212.
- [93] Slane J, Vivanco J, Meyer J, Ploeg H-L and Squire M (2014). Modification of acrylic bone cement with mesoporous silica nanoparticles: Effects on mechanical, fatigue and absorption properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 29: 451–461.
- [94] 11. ISO 5833.(2002), Cerrahi İmplantlar-Akrilik Reçine Kemik Çimentoları. *Uluslararası Standartlar Örgütü*.
- [95] Tozzi G, Zhang Q H and Tong J (2014). Microdamage assessment of bone-cement interfaces under monotonic and cyclic compression. *Journal of Biomechanics*, 47(14): 3466–3474.
- [96] Ayre W N, Denyer S P and Evans S L (2014). Ageing and moisture uptake in polymethyl methacrylate (PMMA) bone cements. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 32: 76–88.
- [97] Slane J, Vivanco J, Ebenstein D, Squire M and Ploeg H L (2014). Multiscale characterization of acrylic bone cement modified with functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 37: 141–152.
- [98] Yu W, Wang X, Zhao J, Tang Q, Wang M and Ning X (2015). Preparation and mechanical properties of reinforced hydroxyapatite bone cement with nano-ZrO<sub>2</sub>. *Ceramics International*, 41(9): 10600–10606.
- [99] Barandehfard F, Kianpour Rad M, Hosseinnia A, Khoshroo K, Tahriri M, Jazayeri H E and Tayebi L (2016). The addition of synthesized hydroxyapatite and fluorapatite nanoparticles to a glass-ionomer cement for dental restoration and its effects on mechanical properties. *Ceramics International*, 42(15): 17866–17875.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [100] Massazza G, Bistolfi A, Verné E, Miola M, Ravera L and Rosso F (2014). Antibiotics and cements for the prevention of biofilm-associated infections. In *Biomaterials and Medical Device - Associated Infections*, 2014: 185–197.
- [101] Miola M, Bruno M, Maina G, Fucale G, Lucchetta G and Verné E (2014). Antibiotic-free composite bone cements with antibacterial and bioactive properties. A preliminary study. *Materials Science and Engineering C*, 43: 65–75.
- [102] Matos A C, Gonçalves L M, Rijo P, Vaz M A, Almeida A J and Bettencourt A F (2014). A novel modified acrylic bone cement matrix. A step forward on antibiotic delivery against multiresistant bacteria responsible for prosthetic joint infections. *Materials Science and Engineering C*, 38(1): 218–226.
- [103] Slane J, Vivanco J, Rose W, Ploeg H L and Squire M (2015). Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 48: 188–196.
- [104] Paz E, Sanz-Ruiz P, Abenojar J, Vaquero-Martín J, Forriol F and Del Real J C (2015). Evaluation of Elution and Mechanical Properties of High-Dose Antibiotic-Loaded Bone Cement: Comparative ‘In Vitro’ Study of the Influence of Vancomycin and Cefazolin. *Journal of Arthroplasty*, 30(8): 1423–1429.
- [105] Verné E, Bruno M, Miola M, Maina G, Bianco C, Cochis A and Rimondini L (2015). Composite bone cements loaded with a bioactive and ferrimagnetic glass-ceramic: Leaching, bioactivity and cytocompatibility. *Materials Science and Engineering C*, 53: 95-103.
- [106] Seçkin F, Akman Ş, Uzun M, Öztürk M ve Bozda E (2013). Antibiyotikli kemik çimentosunun ‘0. Gün’ ve ‘15. Gün’ yorulma dayanımı. *Nobel Medicus*, 9(3): 92–97.
- [107] Göksan S B Şener N, Tözün İ.R ve Göksan M.A (1997). Antibiyotikli kemik çimentosunun mekanik dayanımı: Cemex kemik çimentosu, teikoplanin ve tobramisin ile biyomekanik çalışma. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 31: 245-249.
- [108] Buchholz H W, Elson R A and Heinert K (1984). Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (190): 96–108.
- [109] Klemm K W (1993). Antibiotic bead chains. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (295): 63–76.
- [110] Vaishya R, Chauhan M and Vaish A (2013). Bone cement. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*. 4(4): 157-163.
- [111] Lautenschlager E P, Marshall G W, Marks K E, Schwartz J and Nelson C L (1976). Mechanical strength of acrylic bone cements impregnated with antibiotics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 10(6): 837–845.
- [112] Breusch S J and Kühn K-D (2003). [Bone cements based on polymethylmethacrylate]. *Der Orthopade*, 32(1): 41–50.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [113] **Kuehn K, Ege W and Gopp U** (2005). Acrylic bone cements: composition and properties. *The Orthopedic Clinics of North America*, 36(1): 17–28.
- [114] **Staden V and Preez A D** (2011). Developing bone Cement Implants Impregnated with Bacteriocins for Prevention of Infections. *Master Thesis*, Stellenbosch Univ, Faculty of Science, Department of Microbiology, 142 pp/s.
- [115] **Aslan T.T.** (2008) Siprofloksasin ile Hazırlanan Antibiyotikli Kemik Çimentosunun Mekanik Dayanıklılığının Biyomekanik Olarak Araştırılması.Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Sivas, 50 s.
- [116] **Cui Q, Mihalko W M, Shields J S, Ries M and Saleh K J** (2007). Antibiotic-impregnated cement spacers for the treatment of infection associated with total hip or knee arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 89(4): 871–882.
- [117] **Lautenschlager E P, Marshall G W, Marks K E, Schwartz J and Nelson CL** (1976). Mechanical strength of acrylic bone cements impregnated with antibiotics. *J Biomed Mater Res*. 10: 837-45.
- [118] **Bargar L , Martin B, deJesus R and Madison T** (1986). The addition of tobramycin to contrast bone cement: Effect on flexural strength. *The Journal of Arthroplasty*, 1(3): 165-168.
- [119] **Göğüş A, Akman Ş, Göksan B ve Bozdağ E** (2002) Antibiyotikli Kemik Çimentosunun 0 ve 15.Günlere Mekanik Dayanımı. *Acta Orthopaedica*. 36: 63-71.
- [120] **Richter-Hintz, D Rieker, J Rauch, L and Homey, B** (2004). Sensitivity to constituents of bone cement in a patient with joint prosthesis. *Hautarzt*, 55(10): 987-989.
- [121] **Isefuku S, Joyner C J and Simpson A H R W** (2001). Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells. *Journal of Orthopaedic Research* ,19(5): 950-954.
- [122] **Van de Belt, H, Neut D, Schenk W, Van Horn, J R, Van Der Mei, H C, Busscher H J and Van Horn J R** (2001). Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements A review. *Acta Orthop Scand*, 72(6): 557–571.
- [123] **Anagnostakos K and Kelm J** (2009). Enhancement of antibiotic elution from acrylic bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 90(1): 467-475.
- [124] **Tan H, Peng Z, Li Q, Xu X, Guo S and Tang T** (2012). The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Biomaterials*, 33(2): 365–377.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [125] Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E and Schnettler R (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 25(18): 4383–4391.
- [126] Russell A D and Hugo W B (1994). Antimicrobial Activity and Action of Silver. *Progress in Medicinal Chemistry*, 31: 351–370.
- [127] Atiyeh B S, Costagliola M, Hayek S N and Dibo S A (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*, 33(2): 139-148
- [128] Van De Voorde K, Nijsten T, Schelfhout K, Moorkens G and Lambert J (2005). Long term use of silver containing nose-drops resulting in systemic argyria. *Acta Clinica Belgica*, 60(1): 33–35.
- [129] Sudmann E, Vik H, Rait M, Todnem K, Andersen K J, Julsham K and Rungby J (1994). Systemic and local silver accumulation after total hip replacement using silver-impregnated bone cement. *Medical Progress through Technology*, 20: 179–184.
- [130] Vik H, Andersen K J, Julshamn K and Todnem K (1985). Neuropathy Caused By Silver Absorption From Arthroplasty Cement. *The Lancet*, 1(8433): 872.
- [131] Bilgili B (2014) Gümüş Nanopartiküllerin (AgNP) Sentezi ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Muğla, 130 s.
- [132] Bulut E (2007) Gümüş Nanopartiküllerin Polifenollerle Sentezi ve Karakterizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Sakarya, 61 s.
- [133] Üreyen ME, Çavdar A, Koparal AS ve Doğan A (2009) Yeni Geliştirilen Gümüş Katkılı Antimikrobiyal Tekstil Kimyasalı ve Bu Kimyasal ile İşlem Görmüş Kumaşların Antibakteriyel Performansları. *Tekstil ve Mühendis Dergisi*, 15(69): 25-31.
- [134] Van de Belt H, Neut D, Schenk W, Van Horn J R, Van der Mei H C and Busscher H J (2001). Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 72(6): 557-571.
- [135] Ovington L G (2004). The truth about silver, *Ostomy/wound Management*, 50(9): 1–10.
- [136] Panáček A, Kvítek L, Prucek R, Kolář M, Večeřová R, Pizúrová N and Zbořil R (2006). Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(33): 16248–16253.
- [137] Alt V, Bechert T, Steinrücke, P, Wagener M, Seidel, P, Dingeldein, E and Schnettler R.(2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 25(18): 4383–4391.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [138] **Silver S, Phung L T and Silver G** (2006). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *In Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33: 627-634.
- [139] **Duncan T V** (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1): 1–24.
- [140] **Chaloupka K, Malam Y and Seifalian A M** (2010). Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28(11): 580-588.
- [141] **Feng Q L, Wu J, Chen G Q, Cui F Z, Kim T N and Kim J O** (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4): 662–668.
- [142] **Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, Holt K, Kouri J B, Ramírez J T and Yacaman M J** (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10): 2346–2353.
- [143] **Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H and Che C-M** (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4): 527–534.
- [144] **Wang L, Hu C and Shao L** (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12: 1227-1249.
- [145] **Kreutzer J, Schneider M, Schlegel U, Ewerbeck V and Breusch S J** (2005). Cemented total hip arthroplasty in Germany-an update. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 143(1): 48–55.
- [146] **Nowinski R J, Gillespie R J, Shishani Y, Cohen B, Walch G and Gobeze R** (2012). Antibiotic-loaded bone cement reduces deep infection rates for primary reverse total shoulder arthroplasty: A retrospective, cohort study of 501 shoulders. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 21(3): 324–328.
- [147] **Zhou Y, Li L, Zhou Q, Yuan S, Wu Y, Zhao H and Wu H** (2015). Lack of Efficacy of Prophylactic Application of Antibiotic-Loaded Bone Cement for Prevention of Infection in Primary Total Knee Arthroplasty: Results of a Meta-Analysis. *Surgical Infections*, 16(2): 183–187.
- [148] **Hinarejos P, Guirro P, Leal J, Montserrat F, Pelfort X, Sorli M L and Puig L** (2013). The Use of Erythromycin and Colistin-Loaded Cement in Total Knee Arthroplasty Does Not Reduce the Incidence of Infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 95(9): 769–774.
- [149] **Pelgrift R Y and Friedman A J** (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14): 1803-1818.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [150] **Miola M, Fucale G, Maina G and Verné E** (2015). Antibacterial and bioactive composite bone cements containing surface silver-doped glass particles. *Biomedical Materials* (Bristol), 10(5).
- [151] **Kose N, Çaylak R, Pekşen C, Kiremitçi A , Burukoglu D, Koparal S ve Doğan A.** (2016). Silver ion doped ceramic nano-powder coated nails prevent infection in open fractures: in vivo study. *Injury*. 47(2): 320–324.
- [152] **Alt V, Bechert I, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E and Schnettler R** (2004). Nanoparticulate silver. A new antimicrobial substance for bone cement. *Orthopade*, 33(8): 885-892.
- [153] **Prokopovich P, Köbrick M, Brousseau E and Perni S** (2015). Potent antimicrobial activity of bone cement encapsulating silver nanoparticles capped with oleic acid. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 103(2): 273–281.
- [154] **Ebnesajjad S** (Ed) (2012). *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications*. 1st edition, ISBN: 9781455730032, William Andrew, e-book, 472.
- [155] **Hazer B** (2011) *Biyobozunur Plastik Ambalaj Malzemeleri*, 05 Ocak 2011, Zonguldak, 7 s.
- [156] **Park S Bin Lih E, Park K S, Joung Y K and Han D K** (2017). Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Progress in Polymer Science*, 68: 77-105.
- [157] **Du Y, Li S, Zhang Y, Rempel C and Liu Q** (2016). Treatments of protein for biopolymer production in view of processability and physical properties: A review. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(17): 1-13.
- [158] **Lligadas G, Ronda J C, Galià M and Cádiz V** (2007). Poly(ether urethane) networks from renewable resources as candidate biomaterials: Synthesis and characterization. *Biomacromolecules*, 8(2): 686–692.
- [159] **Miao S, Sun L, Wang P, Liu R, Su Z and Zhang S** (2012). Soybean oil-based polyurethane networks as candidate biomaterials: Synthesis and biocompatibility. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(10): 1165–1174.
- [160] **Sharma V and Kundu P P** (2006). Addition polymers from natural oils-A review. *Progress in Polymer Science* (Oxford), 31(11): 983-1008.
- [161] **Çakmaklı B, Hazer B, Tekin İ Ö ve Cömert F B** (2005). Synthesis and Characterization of Polymeric Soybean Oil- g -Methyl Methacrylate (and n -Butyl Methacrylate) Graft Copolymers: Biocompatibility and Bacterial Adhesion. *Biomacromolecules*, 6(3): 1750–1758.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [162] Khot S N, Lascala J J, Can E, Morye S S, Williams G I, Palmese G R and Wool R P (2001). Development and application of triglyceride-based polymers and composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 82(3): 703–723.
- [163] Hazer B, Hazer D B ve Çoban B (2010). Synthesis of microbial elastomers based on soybean oil. Autoxidation kinetics, thermal and mechanical properties. *Journal of Polymer Research*, 17(4): 567–577.
- [164] Miao S, Wang P, Su Z and Zhang S (2014). Vegetable-oil-based polymers as future polymeric biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 10(4): 1692-1704.
- [165] Gupta P ve Nayak K K (2015). Characteristics of protein-based biopolymer and its application. *Polymer Engineering and Science*, 55(3): 485-498.
- [166] Li F, Hanson M. V and Larock R C (2001). Soybean oil-divinylbenzene thermosetting polymers: Synthesis, structure, properties and their relationships. *Polymer*, 42(4): 1567–1579.
- [167] Li F and Larock R C (2001). New soybean oil-styrene-divinylbenzene thermosetting copolymers-III. Tensile stress-strain behavior. *Journal of Applied Polymer Science*, 39: 60-77.
- [168] Li F and Larock R C (2002). New soybean oil-styrene-divinylbenzene thermosetting copolymers-IV. Good damping properties. *Polymers for Advanced Technologies*, 13(6): 436–449.
- [169] Li F and Larock R C (2002). New soybean oil-styrene-divinylbenzene thermosetting copolymers. V. Shape memory effect. *Journal of Applied Polymer Science*, 84(8): 1533–1543.
- [170] Sharma V and Kundu P P (2006). Addition polymers from natural oils-A review. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(11): 983-1008.
- [171] Hazer B ve Kalaycı Ö A (2017). High fluorescence emission silver nano particles coated with poly (styrene-g-soybean oil) graft copolymers: Antibacterial activity and polymerization kinetics. *Materials Science and Engineering C*, 74: 259–269.
- [172] Can A, Sivrikaya H, Hazer B (2018). Fungal inhibition and chemical characterization of wood treated with novel polystyrene-soybean oil copolymer containing silver nanoparticles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 133: 210-215.
- [173] Iler R K (1971). Relation of particle size of colloidal silica to the amount of a cationic polymer required for flocculation and surface coverage. *Journal of Colloid And Interface Science*, 37(2): 364–373.
- [174] Sharma N, Madan P and Lin S (2016). Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3): 404–416.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [175] **Hotze E M, Phenrat T and Lowry G V** (2010). Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment. *Journal of Environment Quality*, 39(6): 1909-1924.
- [176] **Baroud G, Nemes J, Heini P F and Steffen T.** (2013) Load shift of the intervertebral disc after a vertebroplasty: a finite-element study. *European Spine Journal*, 12(4): 421-426.
- [177] **Tai C L, Lai P L, Lin W D ,nTsai, T T, Lee Y C, Liu M Y and Chen, L H.** (2016) Modification of Mechanical Properties, Polymerization Temperature, and Handling Time of Polymethylmethacrylate Cement for Enhancing Applicability in Vertebroplasty, *BioMed Research International*, 8 pp/s.
- [178] **He Q, Chen H, Huang L ,Dong J, Guo D, Mao M, Kong L , Li Y , Wu Z and Lei W** (2012) Porous Surface Modified Bioactive Bone Cement for Enhanced Bone Bonding. *Plos one*, 7(8).
- [179] **El-Fiqi A, Kim J H, Perezab R A and Kim H W** (2014) Novel bioactive nanocomposite cement formulations with potential properties: incorporation of the nanoparticle form of mesoporous bioactive glass into calcium phosphate cements. *Journal of Material Chemistry B*, 2015(3): 1321-1334.
- [180] **Moussa S H, Tayel A A, Al- Hassan A A, Farouk A** (2013). Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *The Journal of Mycology*, 2013: 1-7.
- [181] **Varaprasad K, Murali Mohan Y, Ravindra S, Narayana Reddy N, Vimala K Monika K, Sreedhar B and Mohana Raju K** (2009) Hydrogel–Silver Nanoparticle Composites: A New Generation of Antimicrobials. *Wiley InterScience*, 115(2): 1199-1207.
- [182] **N'Diaye M, Pascaretti-Grizon F, Massin P, Baslé M F and Chappard D** (2012). Water absorption of poly(methyl methacrylate) measured by vertical interference microscopy. *Langmuir*, 28(31): 11609-11614.
- [183] **Daglilar S , Erkan M E , Gunduz O , Ozyegin L S , Salman S , Agathopoulos S ve Oktar F N** (2007). Water resistance of bone-cements reinforced with bioceramics, *Materials Letters*, 61(11-12): 2295-2298.
- [184] **Hamedirad F, Ghaffari T, Rezaii F and Ramazani A** (2014). Effect of nanosilver on thermal and mechanical properties of acrylic base complete dentures. *Journal Dentistry* 11(5): 495-505.
- [185] **Ghaffari T, Hamedirad F, and Ezzati B** (2014). In Vitro Comparison of Compressive and Tensile Strengths of Acrylic Resins Reinforced by Silver Nanoparticles at 2% and 0.2% Concentrations. *Journal Dental Research Dental Clinics Dental Prospect*, 8(4): 204–209.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [186] Roy E, Patra S, Saha S, Madhuri R and Sharma P K (2015) . Shape-specific silver nanoparticles prepared by microwave-assisted green synthesis using pomegranate juice for bacterial inactivation and removal. *RSC Advances* , 5: 95433-95442.
- [187] Rau J V, Fosca M , Graziani V , Egorov A A, Zobkov Y V, Fedotov A Y, Ortenzi M , Caminiti R , Baranchikov A E and Komlev V S (2016) Silver-Doped Calcium Phosphate Bone Cements with Antibacterial Properties. *Journal of Functional Biomaterials*, 7(2): 10.
- [188] Perni S, Thenault V, Abdo P, Margulis K, Magdassi S and Prokopovich P. (2015) Antimicrobial activity of bone cements embedded with organic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 6317-6329.
- [189] Vanaja M and Annadurai G (2012) Coleus aromaticus leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Applied Nanoscience* , 3(3): 217–223 .
- [190] Perni S, Thenault V, Abdo P, Margulis K, Magdassi S and Prokopovich P (2015). Antimicrobial activity of bone cements embedded with organic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 6317–6329.
- [191] Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E and Schnettler R (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement, *Biomaterials*, 25(18): 4383–4391.
- [192] Pauksch L, Hartmann S, Szalay G, Alt V and Lips K S (2014). In Vitro Assessment of Nanosilver Functionalized PMMA Bone Cement on Primary Human Mesenchymal Stem Cells and Osteoblasts. *Plos One*, 9(12).
- [193] Kang I G, Park C I , Lee H , Kim H E and Lee S M (2018). Hydroxyapatite Microspheres as an Additive to Enhance Radiopacity, Biocompatibility, and Osteoconductivity of Poly(methyl methacrylate) Bone Cement. *Materials*, 11(2): 258.
- [194] Kang T, Hua X, Liang P, Rao M, Wang Q, Quan C, Zhang C and Jiang Q (2016). Synergistic reinforcement of polydopamine-coated hydroxyapatite and BMP2 biomimetic peptide on the bioactivity of PMMA-based cement. *Composites Science and Technology*, 123: 232-240.
- [195] González-Sánchez M I, Perni S, Tommasi G, Morris N G, Hawkins K, López-Cabarcos E and Prokopovich P (2015). Silver nanoparticle based antibacterial methacrylate hydrogels potential for bone graft applications. *Materials Science and Engineering C*, 50: 332–340.
- [196] Yu D-G (2007). Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na<sup>+</sup>–poly(γ-glutamic acid)–silver nitrate complex via chemical reduction process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(2): 171–178.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [197] **Palmer I, Nelson J, Schatton, W, Dunne N J, Buchanan F J and Clarke S A** (2016). Biocompatibility of calcium phosphate bone cement with optimized mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 104(2): 308–315.
- [198] **Zhang X, Kang T, Liang P, Tang Y and Quan** (2018). C .Biological Activity of an Injectable Biphasic Calcium Phosphate/PMMA Bone Cement for Induced Osteogenesis in Rabbit Model. *Macromolecular Bioscience*, 18(3): 1700331.
- [199] **Velu R, Kamarajan B, Ananthasubramanian M, Ngo T and Singamnemi S** (2018). Post-process composition and biological responses of laser sintered PMMA and  $\beta$ -TCP composites. *Journal of Materials Research*, 33(14): 1987-1998.





## **ÖZGEÇMİŞ**

1990 yılında Üsküdar'da doğdu. İlköğrenimini Mardin/ Mazıdağı Atatürk İlköğretim Okulu'nda ve Bursa/Orhangazi Ahmet Yesevi İlköğretim Okulu'nda, Liseyi Orhangazi Öğretmen Eyüp Topçu Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında girdiği Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Matematik Bölümü Lisans Programı'nı 2009 yılında terk etti. 2010 yılında Fatih Üniversitesi Mühendislik Fakültesi tam burslu Genetik ve Biyomühendislik bölümüne başlayıp 2014 yılında mezun oldu. 2012 yılında Fatih Üniversitesi Hastanesinde Genetik, Biyokimya, Mikrobiyoloji ve Patoloji laboratuvarlarında Laborant olarak bir ay süreyle staj yaptı. 2013 yılında Selçuk Ecza Deposu A.Ş'de satış, satın alma, operasyon ve lojistik departmanlarında İşletme stajını tamamladı. Kasım 2014' te Farmasina Tıbbi ve Kimyevi Ürünler Limited A.Ş' de Satış Destek Elemanı olarak işe başladı. 2015 yılında işinden ayrıldı. 2016 yılında Bilgisayar Kullanımı ve Office Programları kursuna giderek sertifika aldı. 2015 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına başladı.

### **ADRES BİLGİLERİ:**

Adres: Merkez Mah., Ömer Muhtar Sok., Özgüven Sitesi, B:Blok Daire:1 Alaplı / ZONGULDAK

Tel: 0505 358 4724

E-posta: eliffguven@gmail.com