

**Metal İyon Katkılı Kalsiyumfosfat Esaslı
Antibakteriyel Seramik Tozun
Karakterizasyonu ve Sitotoksitesinin
Belirlenmesi**

Ceren Pekşen
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Seramik Mühendisliği Anabilim Dalı
Ocak-2006

"Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 050210 nolu proje kapsamında desteklenmiştir."

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ceren PEKŞEN'in "Metal İyon Katkılı Kalsiyumfosfat Esaslı Antibakteriyel Seramik Tozun Karakterizasyonu ve Sitotoksitesinin Belirlenmesi" başlıklı Seramik Mühendisliği Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Aydın DOĞAN
Üye	: Doç. Dr. A.Savaş KOPARAL
Üye	: Doç. Dr. Nusret KÖSE

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

METAL İYON KATKILI KALSİYUMFOSFAT ESASLI ANTİBAKTERİYEL SERAMİK TOZUN KARAKTERİZASYONU VE SİTOTOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ

Ceren PEKŞEN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Seramik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aydın DOĞA
2006, 71 sayfa

Bu çalışmada, biyomalzeme olarak kullanılabilirliği açısından metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun antibakteriyel etkinliği ve sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat sashlı tozun farklı metal iyon içerikleri ile sentezi sonrasında tozun antibakteriyel etkinliğini ölçmek için standart maya (*Candida*) ve bakteriler (*Escherichia Coli (E.coli)*, *P.Aeruginosa*, *S.aeureus*) kullanılmıştır. Sitotoksik etkiyi belirlemek amacı ile MTT testi uygulanmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel, *E.coli*, Ag⁺ iyonu, hidroksiapatit, sitotoksisite

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CHARACTERIZATION AND CYTOTOXICITY OF METAL ION DOPED CALCIUM PHOSPHATE BASED ANTIBACTERIAL CERAMIC POWDER

Ceren PEKŞEN

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Ceramic Engineering Program**

**Supervisor: Prof. Dr. Aydın DOĞAN
2006, 71 pages**

In this study, antibacterial activity and cytotoxicity of metal ion doped calcium phosphate based inorganic powder were investigated. After synthesis of various compositions of metal ions doped antibacterial powder, antibacterial activity analysis were performed by using standard test bacterias (*Escherichia Coli (E.coli)*, *P. Aeruginosa*, *S.aeureus* and *Candida*). Finally, MTT test method was used to determine *in vitro* cytotoxicity effect. The data obtained from cytotoxicity test were evaluated in SPS statistical code and the results were reported.

Keywords: Antibacterial, *E.coli*, Ag⁺ ion, hydroxyapatite, cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılması sırasında göstermiş olduğu yakın ilgi, her türlü yönlendirici yardımdan dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Aydın DOĞAN'a,

Görüş ve önerileri ile çalışmalarına katkıda bulunan Doç. Dr. A. Savaş Koparal, Yrd. Doç. Dr. A. Tansu Koparal ve Doç.Dr. Nusret Köse'ye,

Mikrobiyolojik analizler ve yorumları için göstermiş oldukları ilgiden dolayı 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD öğretim üyeleri Prof. Dr. Ahmet Saniç ve Prof. Dr. Murat Günaydın'a,

Değerli yardımları için Öğr.Gör.A.Erman Üzgür, Araş.Gör. İ.Özgür Özer, Göktuğ Günkaya, Aslan Gençer, Mevlüt Gürbüz, Araş.Gör. Filiz Bayrakçı Karel ve Öğr.Gör. Esra Gerek'e,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürler...

Ceren PEKŞEN
Ocak-2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. İmplant Materyallerinin Çeşitleri	2
1.1.1. Metaller	2
1.1.2. Polimerler	3
1.1.2.1. Doğal Polimerler	4
1.1.2.2. Sentetik Polimerler	4
1.1.3. Seramikler	6
1.1.3.1. Oksit Seramikler	7
1.1.3.1.1. Alümina	7
1.1.3.1.2. Zirkonya	8
1.1.3.1.1. Kalsiyumfosfat Seramikleri	9
1.1.3.1.1. Cam ve Cam Seramikler	10
2. ANTİMİKROBİYAL SİSTEMLER	13
2.1. Genel Tanımlar	13
2.1.1. Bakteriyostatik	13

2.1.2. Bakteriosidal	13
2.1.1. Steril	13
2.1.1. Dezenfektan.....	13
2.1.1. Septik	14
2.1.1. Aseptik	14
2.2. Antimikrobiyal Sistemlerin Hücreleri Etkileme Modelleri.....	14
2.2.1. Protein Pıhtılaşması.....	14
2.2.2. Hücre Zarının veya Çeperinin Bozulması.....	15
2.2.3. Serbest Sülfidril Gruplarının Giderilmesi	15
2.2.4. Kimyasal Zıt Etki (Antagonizm).....	16
2.3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyonda Kullanılan Fiziksel Özellikler.....	17
2.3.1. Isı.....	17
2.3.2. Işınlama	17
2.3.3. Fotokatalitik Etki.....	18
2.4. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyonda Kullanılan Kimyasal Yöntemler	19
2.4.1. Alkoller	19
2.4.2. Fenoller	19
2.4.3. Oksitleyen Etkenler	19
2.4.4. Etilenoksit	20
2.4.5. Deterjanlar.....	20
2.4.6. Metal İyonu İçeren Sistemler	20
3. MİKROBİYOLOJİK ÇALIŞMALAR	22
3.1. Bakterilerle İlgili Genel Bilgiler	22
3.1.1. <i>Escherichia Coli</i>	22

3.1.2. <i>Pseudomonas Aeurigonosa</i>	23
3.1.3. <i>Staphylococcus Aureus</i>	24
3.1.4. <i>Candida Albicans</i>	25
3.2. Mikrobiyolojik Çalışmalar	26
3.2.1. Sterilizasyon	26
3.2.1.1. Isıl İşlem.....	27
3.2.1.2. Işınlama	27
3.2.1.3. Mekanik Yöntemler	27
3.2.1.4. Kimyasal Yollar	27
3.2.2. Besiyeri	28
3.2.3. Mikrobiyolojik Örnek Alma ve Kültür Yapma.....	28
3.2.3.1. Örnek alma ve alınan örneğin inokülasyona hazırlanması	29
3.2.3.1.1. Dilüsyon hazırlama	29
3.2.3.2. Aktarma Teknikleri ve İnokülasyon	30
3.2.3.3. İnkübasyon	31
3.2.4. Bakteri Morfolojisi ve Boyama.....	32
3.2.5. Bakterilerin Sayımı	32
4. SİTOTOKSİSİTE	34
5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	36
5.1. Metal İyon Katkılı Kalsiyumfosfat Esaslı Seramik Tozun Hazırlanması..	36
5.2. Üretilen Tozun Karakterizasyonu	37
5.2.1. XRD analizleri	37
5.2.2. SEM ve EDX analizleri.....	37

5.3. Üretilen Tozun Antibakteriyel Etkinliği	37
5.3.1. Halo Test Methodu.....	38
5.3.2. Agar Dilüsyon Test Methodu.....	38
5.3.3. Zaman-Etkinlik Testleri	39
5.4. Sulu Sistemde Salınım Testleri	39
5.5. Sitotoksosite Testleri.....	39
5.5.1. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Testleri.....	40
6. GENEL SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	41
6.1. Tozun Karakterizasyonu	41
6.1.1. XRD analizleri	41
6.1.2. SEM ve EDX analizleri.....	43
6.2. Üretilen Tozun Antimikrobiyal Etkinliği.....	47
6.2.1. Halo Testi	47
6.2.2. Agar Dilüsyon Testi	50
6.2.3. Zaman-Etkinlik Testi	58
6.3. Sulu Sistemde Salınım Testi Sonuçları	59
6.4. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Testleri.....	60
7. ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	Alümina kalça kemiği protezi	8
1.2.	Seramik–metal protezlerde kalsiyumfosfat uygulamaları.....	9
3.1.	<i>E.coli</i> kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	22
3.2.	<i>P.aeuriginosa</i> kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	23
3.3.	<i>S. Aureus</i> kolonisi taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	25
3.4.	<i>Candida albicans</i> taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	26
3.5.	Kültür elde etme aşamaları.....	29
3.6.	Dilüsyon hazırlanması.....	30
6.1.	A serisi antimikrobiyal tozun XRD analizi sonuçları	41
6.2.	10A için XRD analizi sonuçları	42
6.3.	Z serisi antimikrobiyal tozun XRD analizi sonuçları.....	42
6.4.	10Z için XRD analizi sonuçları.....	43
6.5.a.	35A numunesine ait tane boyut dağılım grafiği	44
6.5.b.	35A numunesine ait SEM görüntüsü	44
6.6.a.	35Z numunesine ait tane boyut dağılım grafiği.....	45
6.6.b.	35Z numunesine ait SEM görüntüsü.....	45
6.7.	A serisi içerisindeki Ag^{+1} iyonu hesaplanan değer ve EDX verilerinin karşılaştırılması	46
6.8.	Z serisi içerisindeki Ag^{+1} iyonu hesaplanan değer ve EDX verilerinin karşılaştırılması	46
6.9.	A serisi için halo test methodu uygulanarak yapılmış mikrobiyolojik analiz sonuçları (a) 0A (b) 05A (c) 10A (d) 20A (e) 35A	48
6.10.	Z serisi için halo test methodu uygulanarak yapılmış mikrobiyolojik analiz sonuçları (a) 00Z (b) 05Z (c) 10 Z (d) 20Z (e) 35Z.....	49
6.11.	%2,5 konsantrasyonda <i>S. aeureus</i> ve <i>E.coli</i> için A serisi agar dilüsyon testi sonuçları (a) 00A (b) 05A (c) 10A (d) 20A (e) 35A	52
6.12.	%2,5 konsantrasyonda <i>Candida</i> ve <i>P. aeruginosa</i> için A serisi agar dilüsyon testi sonuçları (a) 00A (b) 05A (c) 10A (d) 20A (e) 35A.....	53

6.13. %2,5 konsantrasyonda <i>S. aureus</i> ve <i>E.coli</i> için Z serisi agar dilüsyon testi sonuçları (a) 00Z (b) 05Z (c) 10Z (d) 20Z (e) 35Z.....	56
6.14. %2,5 konsantrasyonda <i>Candida</i> ve <i>P. Aeruginosa</i> için Z serisi agar dilüsyon testi sonuçları (a) 00Z (b) 05Z (c) 10Z (d) 20Z (e) 35Z.....	57
6.15. Şahit ve antimikrobiyal tozların zaman-etkinlik testi 15. saniye sonuçları (a) şahit ekim (b) 00A (c) 20A (d) 20Z	58
6.16. 20A için Ag ⁺ sulu sistemden salınım miktarı grafiği	59
6.17. 1000 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri	60
6.18. 100 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri	61
6.19. 10 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri	62
6.20. 1000 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri	63
6.21. 100 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri	64
6.22. 10 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

5.1. Sentezlenen seramik tozun kodları ve metal iyonu içerikleri	37
6.1. 00A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları.....	50
6.2. 05A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları.....	51
6.3. 10A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları.....	51
6.4. 20A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları.....	51
6.5. 35A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları.....	51
6.6. 00Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları	54
6.7. 05Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları	54
6.8. 10Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları	55
6.9. 20Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları	55
6.10. 35Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları	55

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bedensel, ruhsal ve sosyal yönden tam bir iyilik hali olarak tanımlanan “sağlık” kavramını etkileyen üç temel unsur insan, hastalık yapıcı etmenler ve çevredir. İnsanın dışındaki her şey olarak nitelendirilen içinde yaşadığımız çevre, hastalıklara yol açan en önemli etkenlerin başında gelen mikroorganizmalar ile her an temasta bulunduğumuz ortamdır [1]. Günümüzde yaşam koşullarının değişmesi ve bireylerin zamanlarının çoğunu ev dışında geçirmeleri, değişen beslenme alışkanlıkları ve ulaşım olanakları, uluslararası ziyaretler gibi faktörler, mikroorganizmaların, toplu yaşam alanlarında kolayca bireyden bireye geçişine ve bulaşıcı hastalıkların artmasına neden olmaktadır. Mikroorganizma miktarı belli oranın üzerine çıktığı takdirde kişisel ve çevresel özelliklere bağlı olarak değişik şiddetler de bulaşıcı hastalıklara hatta salgınlara (epidemi) yol açabilmektedir. Toplumun sağlıklı olabilmesi için toplumu oluşturan bireylerin sağlıklarının korunması gerekmektedir. Bu nedenle, yaşadığımız mekanlarda, çalıştığımız ortamlarda ve kullandığımız ürünlerde hijyenin sağlanması, yani hastalık oluşturabilecek mikroorganizmalardan arındırılması günlük yaşamımızda giderek önem kazanmaktadır.

Metal iyon katkılı antibakteriyel seramik toz katkısı ile hazırlanan uygulamalar sonucunda hijyenik ortamlar için başarılı sonuçlar elde edilmiş ve antibakteriyel tozun insan vücudunda özellikle enfeksiyon riski taşıyan implant malzemelerine kaplanarak uygulanması gündeme gelmiştir.

Vücut dokularının bir kısmının fonksiyonlarını yerine getiremez duruma girmesi, insanlar tarafından yapay olarak geliştirilen malzemelerin kullanımını gerektirmektedir. Geçici ve/veya daimi, dahili veya harici olarak, tedavi, rekonstrüktif vb. amaçlarla vücuda dahil edilen malzemeler implant malzemeleri olarak adlandırılır [2]. Tıbbın birçok dalında giderek artan oranlarda implant kullanımı değişik sentetik biyomateryalleri ile mümkün olmaktadır.

Malzeme bilimi ve teknolojisindeki gelişmeler ile başarılı implant uygulamaları geçen asırdan itibaren kendini göstermiştir. Son 30 yılda 40’ı aşkın metal, polimer ve seramik malzemeler vücudun 40’dan fazla değişik parçasının onarımı ve yenilenmesi için kullanılmıştır [3].

İdeal bir implantın; yabancı cisim reaksiyonu ve inflamasyona sebep olmaması, alerji ve hipersensitiviteye sebep olmaması, kimyasal olarak inert olması, non-karsinojenik olması, yapısını ve devamlılığını koruyabilmesi, istenilen şekli alabilmesi, sterilize edilebilmesi gerekmektedir [4].

1.1. İmplant Materyallerinin Çeşitleri

Tıbbın bir çok uzmanlık alanında ve diş hekimliğinde giderek artan oranlarda implant kullanımını değişik sentetik materyalleri gündeme getirmiştir. En sık kullanılan implant materyalleri üç grupta toplanabilir:

1. Metaller
2. Polimerler
3. Seramikler

1.1.1. Metaller

Metal ve metal alaşımları biyomalzeme alanında oldukça önemli bir yere sahiptirler. Kristal yapıları ve sahip oldukları güçlü metalik bağlar nedeniyle üstün mekanik özellikler taşıyan metal malzemelerin implant materyali olarak kullanımı yüksektir. Bir yandan ortopedik uygulamalarda eklem protezi ve kemik yenileme malzemesi olarak kullanılırken diğer yandan yüz ve çene cerrahisinde, örneğin diş implantı gibi ya da kalp ve damar cerrahisinde yapay kalp parçaları, kateter, kalp kapakçığı olarak da kullanılmaktadırlar. Metallerin biyomalzeme pazarındaki en büyük payını ise teşhis ve tedavi amaçlı aletlerin metalik aksanlarını oluşturmaktadır [5].

İnsan vücudunda kullanılmak üzere geliştirilen ilk metal “Sherman-Vanadyum Çeliği”dir. Biyomalzeme üretiminde kullanılan, demir, bakır, krom, kobalt, nikel, titanyum, tantal, molibden ve vanadyum gibi çok sayıda metal, az miktarda kullanılmak koşuluyla canlı vücuduna uygunluk gösterirler. Vücut içerisinde fazla miktarda bulunması zararlı olan bu metaller metabolizmik faaliyetler sırasında da oluşabilirler. Kobaltın B12 vitamininden sentezlenmesi

veya demirin hücre fonksiyonu olarak meydana gelmesi örnek olarak gösterilebilir [3, 5].

Diş hekimliği uygulamalarında dental amalgam alaşımları, kalp kapakçığı, eklem protezleri, vida, plak uygulamalarında kobalt-krom alaşımları, ortopedik uygulamalarda titanyum alaşımları, kırık tedavisi ve vasküler stendlerde ise paslanmaz çelik kullanılmaktadır.

Metallerin biyolojik ortama uygunluğu vücut içerisinde korozyona uğramaları ile bağlantılıdır. Korozyon, metallerin çevreleri ile istenmeyen bir kimyasal reaksiyona girerek oksijen, hidroksit ve diğer başka bileşikler oluşturarak bozunmasıdır. İnsan vücudundaki akışkan, su, çözünmüş oksijen, klorür ve hidroksit gibi çeşitli iyonlar içerir. Bu nedenle insan vücudu implant olarak kullanılan metaller için oldukça korozif bir ortamdır. Malzeme, korozyon sonucu zayıflar aynı zamanda korozyon ürünleri doku içerisine girerek hücrelere zarar verirler. Soy metallerin korozyona karşı direnci ise çok yüksektir. Paslanmaz çelik demir ve karbon elementleri ile krom, nikel, mangan, molibden, vanadyum içermektedir. Bu elementler çeliğin korozyon dayanımını arttırmaktadır. Kobalt ve titanyum yüksek korozyon dayanımına sahip olduklarından dolayı eklem protezleri uygulamalarında tercih edilmektedirler [6, 7, 8].

1.1.2. Polimerler

Biyomalzeme alanında polimerik malzemeler yumuşak dokulara benzer fiziksel özelliklere sahip olduklarından dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Polimer; küçük, tekrarlanabilir birimlerin oluşturduğu uzun-zincirli moleküllerdir. Tekrarlanan birimler, “mer” olarak adlandırılır. Senteze başlarken kullanılan küçük molekül ağırlıklı birimler ise “monomer” adı verilir. Polimerizasyon sırasında, monomerler doygun hale gelerek (zincir polimerizasyonu) veya küçük moleküllerin yapıdan ayrılması ile (H_2O veya HCl) değişir ve “mer” halinde zincire katılırlar. Polimerlerin özellikleri, yapı taşları olan monomerlerden büyük farklılık gösterir. Bu nedenle uygulama alanına yönelik olarak uygun polimer seçimi dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Polimerik malzemeler tıbbi cihazlarda, vasküler protezlerde, kontakt lenslerde ve kateter

uygulamalarında geniş bir kullanıma sahiptirler. Biyomalzeme olarak kullanılan polimerleri doğal ve sentetik olarak gruplandırabiliriz [5, 8, 9].

1.1.2.1. Doğal Polimerler

Doğal polimerler biyolojik olarak üretilen ve benzersiz işlevsel özelliklere sahip olan polimerlerdir. Başlıca doğal polimerler; proteinler (örneğin; kollajen, jelatin, elastin, aktin), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) dir. Doğal polimerlerin dezavantajları; yaşayan organizmaların karmaşık yapılarından dolayı üretim maliyetlerinin yüksek olması ve yeterince büyük ölçeklerde üretimin olmamasıdır. Doğal polimerler sahip oldukları işlevsel özellikler nedeniyle değişik kullanım alanlarına sahiptirler. Kalınlaştırıcı, jel yapıcı, bağlayıcı, dağıtma ajanı, kayganlaştırıcı, yapıştırıcı ve implant materyali olarak kullanım alanına sahiptirler.

Doğal polimerler biyomalzeme alanının vazgeçilmez kaynaklarıdır. Biyolojik ortamdaki makromoleküllerin benzeri veya aynısı olduklarından canlı vücudu ile temas ettiklerinde zehir etkisi ve iltihaplanma gibi istenmeyen reaksiyonlar vermezler. Ancak elde edildikleri kaynağa bağlı olarak bileşimlerinin değişmesi, yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve bundan dolayı şekillendirilmede güçlük ve tüm bunların ötesinde immünojenik olmaları önemli dezavantajlarıdır. Enzim varlığında yapılarının bozunması yani biyobozunur olmaları ise geçici uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler için bir avantajdır [5, 6].

1.1.2.2. Sentetik Polimerler

Genellikle monomerler karbon ve hidrojenle oluşurlar ve bu durumda polimer yapısı uzun hidrokarbon zincirine sahip olur. Bu tür monomerlerin en basiti “etilen”dir ($H_2C=CH_2$) ve oluşturduğu polimer “polietilen” olarak adlandırılır. Çok sayıda etilen molekülü yapılarındaki çift bağın açılması sonucu kovalent bağlarla bağlanarak polietilen zincirini oluştururlar. Genellikle polimer denildiği zaman akla gelen hidrokarbon zincirine sahip organik polimerlerdir. Ancak hidrojen ve karbon atomlarından başka atomlardan oluşan polimerlerde bulunmaktadır. Örneğin; silisyum, azot veya fosfor atomlarından oluşan polimer

zincirleri vardır ve “inorganik polimerler” olarak adlandırılır. Polimer zincirleri, doğrusal yapıda olabileceği gibi dallanmış yapıda da olabilir. Bu yapılar, polimer ana zincirine diğer zincirlerin yan dal olarak bağlanması ile oluşur. Bu yan dallar başka bir ana zincirle bağlandığında ise çapraz-bağlı polimerler oluşur. Dallanma, polimerlerin uygun çözücülerdeki çözünürlüğünü zorlaştırır, çapraz-bağlı yapılar ise çözünmeyip, sadece yapılarına çözücüyü alarak şişerler [5, 6].

PMMA (polimetilmetakrilat), hidrofobik ve doğrusal yapıda bir zincir polimeridir. Oda sıcaklığında camsı halde bulunur. Lucite ve Plexiglass ticari isimleri ile tanınır. Işık geçirgenliği, sertliği ve kararlılığı nedeniyle göz içi lensler ve sert kontakt lenslerde kullanımı yaygındır.

Yumuşak kontakt lensler ise farklı bir polimerden hazırlanırlar. Bu polimer, metilmetakrilatametilol (-CH₂OH) grubunun eklenmesiyle oluşan 2hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerinden sentezlenir. Yumuşak kontakt lensler poli(HEMA)’nın az miktarda etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) ile çapraz bağlanarak hazırlanırlar. Çapraz bağlanma sulu ortamda polimerin çözünmesini engeller ve bu durumdaki polimer şişmiş hidrojel olarak adlandırılmaktadır.

Tıbbi uygulamalarda yüksek yoğunluklu polietilen (PE) kullanılmaktadır. Çünkü düşük yoğunluklu PE sterilizasyon sıcaklığına dayanamaz. PE, tüp formundaki uygulamalarda ve kateterlerde, çok yüksek molekül ağırlıklı PE ise yapay kalça protezlerinde kullanılır. Polietilenin sertliği iyidir, yağlara dirençlidir ve ucuzdur. Polipropilen (PP) polietilene benzer fakat daha serttir. Kimyasal direnci yüksek ve çekme dayanımı iyidir. PE’nin yer aldığı uygulamalarda PP’de kullanılabilir. Politetrafloroetilen (PTFE), teflon ticari adıyla bilinir. PE ile benzeri yapıda olup, PE’deki hidrojenlerin flor atomları ile yer değiştirmesi sonucu sentezlenir. PTFE, hem ısısal hem de kimyasal açıdan çok karardır fakat işlenmesi zor bir polimerdir. Hidrofobiktir ve mükemmel kayganlığa sahiptir. Gore-Tex olarak bilinen formu damar protezlerinde kullanılır [5, 6, 9].

Polivinilklorür (PVC), tıbbi uygulamalarda tüp formunda kullanılır. Bu uygulamalar; kan nakli, diyaliz ve beslenme amaçlı olabilir. PVC, sert ve kırılğan bir malzeme olmasına karşın plastikleştirici ilavesiyle yumuşak ve esnek hale getirilebilmektedir. PVC, uzun dönemli uygulamalarda plastikleştiricinin yapıdan

sızması nedeniyle problemlere yol açmaktadır. Plastikleştiriciler düşük zehirliliğe sahiptir ve yapıdan sızmaları PVC'nin esnekliğini azaltır [5, 6].

Polimetilsiloksan (PDMS) yaygın olarak kullanılan bir diğer polimerdir. PDMS karbon ana zinciri yerine siliyum-oksijen ana zincirine sahiptir. PDMS'nin en önemli özelliği ise diğer kauçuklara nazaran daha az bağımlı olmasıdır. PDMS, drenaj borularında ve kateterlerde, bazı damar protezlerinde ve yüksek oksijen geçirgenliği nedeniyle membran oksijenatörlerde (solunum cihazları) kullanılır. Mükemmel esneklik ve karalığından dolayıysa parmak eklemleri, kan damarları, kalp kapakçıkları, göğüs implantları, dış kulak, çene ve burun implantlarında kullanılır.

Bisfenol A ve fosgenin polimerizasyonu sonucu sert bir malzeme olan polikarbonat sentezlenir. Yüksek çarpma dayanımından dolayı gözlük camlarında ve emniyet camlarında, oksijenatör ve kalp-akciğer makinelerinde kullanılır. Naylon, Du Pont tarafından poliamid ailesine verilen isimdir. Naylonlar, diamminlerin dibazik asitlerle reaksiyonu sonucunda oluşur veya laktomların halka açılması polimerizasyonu ile hazırlanır. Naylonlar ameliyat ipliği olarak kullanılır. Poliüretanlar yumuşak ve sert segmentlerden oluşan blok kopolimerlere denir. Kanla uyuşabilirlikleri çok iyi olduğundan özellikle kalp-damar uygulamalarında tercih edilirler [5,6].

1.1.3. Seramikler

Milyonlarca yıl önce ateşin keşfi ile kilin seramik çanak çömleğe dönüştürülmesi insan topluluklarının göçebe avcılıktan yerleşik tarımsal yaşama geçişinde en büyük faktör olmuştur. Seramiklerin insan yaşamında yarattığı bir diğer büyük devrim ise geçtiğimiz 40 yılda vücudun zarar gören veya işlevini yitiren parçalarının tamiri, yeniden yapılandırılması veya yerini alması için özel tasarımı seramiklerin geliştirilmesi ve kullanımı ile gerçekleşmiştir. Bu amaçla kullanılan seramikler biyoseramikler olarak adlandırılmaktadır. Biyoseramikler; polikristalin yapılu seramik (alümina ve hidroksiapatit), biyoaktif cam, biyoaktif cam seramikler veya biyoaktif kompozitler (polietilen-hidroksiapatit) şeklinde hazırlanabilmektedirler. İnorganik malzemelerin önemli bir grubunu oluşturan bu

malzemeler, sağlık sektöründe çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Bu uygulamalardan bazıları; gözlük camları, teşhis cihazları, termometreler, doku kültür kapları, endoskopide kullanılan fiber optiklerdir.

Çözünmez gözenekli camlar, enzim, antikor ve antijen taşıyıcı olarak da kullanılmaktadır. Mikroorganizmalara, sıcaklığa, çözücülere, pH değişimlerine ve yüksek basınçlara olan dirençleri bu uygulamalar açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Seramikler, diş hekimliğinde dolgu malzemesi, altın-porselen kaplama ve protez parçaları olarak yaygın bir biçimde kullanılmakta ve diş seramikleri olarak adlandırılmaktadırlar. Biyoseramikler diş tedavisi dışında da sert doku implantı olarak da kullanılmaktadırlar [6, 9, 10].

1.1.3.1. Oksit Seramikleri

Bu malzemeler inert yapıda olan ve oksijen iyonlarının oluşturduğu düzlemde metal iyonlarının dağılması ile oluşan polikristalin seramiklerdir[10]. İki önemli çeşidi vardır: Alümina (Al_2O_3) ve Zirkonya (ZrO_2)

1.1.3.1.1. Alümina

Yüksek yoğunluk ve yüksek saflığa (>% 99.5) sahip alümina, korozyon direnci, yüksek mukavemeti, yüksek sürtünme dayanımı ve iyi biyouyumluluk özelliğinden dolayı kalça protezlerinde, diz kapağı protezlerinde ve diş implantlarında yaygın kullanıma sahiptir. Alümina kalça kemiği protezi Şekil 1.1'de görülmektedir. Bu uygulamalarda kullanılan alüminanın çoğu iyi tane yapısına sahip polikristalin $\alpha-Al_2O_3$ 'ün 1600-1700 °C'de preslenmesi ve sinterlenmesi sonucu elde edilir.



Şekil 1.1. Alümina kalça kemiği protezi

Alümina 20 yılı aşkın süredir ortopedik uygulamalarda kullanılmaktadır. Kalça protezlerinde gözlemlenen ana problem birbiri içerisinde hareketlenen parçalardan oluşan yemim kayıplarıdır. Alümina yüksek yemim direncine sahiptir. Bu özellik alüminanın çok düşük yüzey pürüzlüğüne ve yüksek yüzey enerjisine sahip olmasından dolayıdır. Alümina yüksek biyouyumluluğa ve yemim direncine rağmen orta seviyede tokluk ve bükülme mukavemeti göstermektedir [10].

1.1.3.1.2. Zirkonya

Zirkonyada alümina gibi bulunduğu fiziksel ortam üzerinde inert etki göstermektedir. Alümina seramiklere göre avantajı ise çok daha yüksek kırılma tokluğu ve bükülme mukavemetine sahip olmasıdır. Göstermiş olduğu bu üstün özelliklerden dolayı ZrO_2 , uyluk kemiği protezlerinde başarı ile kullanılmaktadır. Ancak uygulamalarında üç önemli problem ile karşılaşmaktadır; fizyolojik sıvılar nedeniyle zamanla mukavemetinin azalması, yemim özelliklerinin zayıf olması ve potansiyel radyoaktif malzemeler içermesidir. ZrO_2 'nin yemim direnci Al_2O_3 'e göre çok düşüktür. Bu sebepten dolayı ZrO_2 , seramik-seramikten oluşan hareketli yüzeylerde kullanılmamalıdır. Zirkonya içerisinde yarılanma ömrü çok uzun olan radyoaktif elementler bulunur (Uranyum, Toryum, vb.). Bu elementleri yapıdan ayırmak çok zor ve pahalı işlemler gerektirmektedir. Zirkonya bazlı seramiklerde 0.5 ppm U^{235} 'e rastlanmış bulunmaktadır. Radyoaktivite α ve γ etkileşimi olarak ortaya çıkmaktadır. α -radyasyonu daha fazladır ve

α -parçacıkları, yüksek iyonlaştırma kapasitesine sahip olduklarından yumuşak ve sert doku hücrelerini tahrip edebilmektedirler. Radyoaktivite düzeyi düşük olduğunda da bu etkinin uzun süreli incelenmesi gerekmektedir [10].

1.1.3.1.3. Kalsiyumfosfat Seramikleri

Kalsiyum ve fosfat atomlarının çoklu oksitleri şeklindeki yapılardır. Hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, trikalsiyumfosfat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ve oktakalsiyumfosfat $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_6$ bu yapılara örnek olarak verilebilir.

Kalsiyumfosfat bazlı biyoseramikler tıbbın çoğu uzmanlık alanında ve diş hekimliğinde 20 yıldan bu yana kullanılmaktadır. Bu malzemeler, ortopedik kaplamalar ve diş implantlarında, yüz kemiklerinde, kulak kemiklerinde, kalça ve diz protezlerinde kemik tozu olarak kullanılmaktadır. Seramik-metal protezlerde kalsiyumfosfat uygulamaları Şekil 1.2’de görülmektedir. Kalsiyumfosfat seramiklerin şekillendirme işlemini takiben sinterlenmesi genellikle 1000-1500°C’de gerçekleşmektedir. Tüm kalsiyum fosfat seramikleri değişen hızlarda biyolojik olarak bozunmaktadırlar [9, 10].



Şekil 1.2. Seramik–metal protezlerde kalsiyumfosfat uygulamaları

Kalsiyum fosfat seramikleri, gözenekli yapıda da hazırlanabilmektedir. Gözenekli seramik implantların en büyük avantajı; kemik, seramik malzemenin gözenekleri içerisinde büyüdüğünde, oluşan ara yüzeyin mekanik açıdan yüksek

kararlılığa sahip olmasıdır. Gözenekli implantlar kemik oluşumu için yapı iskelesi olarak kullanılmaktadır.

Mercanların mikro yapısı, kontrollü gözenek büyüklüğüne sahip seramiklerin oluşturulması açısından en ideal malzeme olmalarını sağlamaktadır. Gözenekli malzemeler, her zaman için yığın formlarında daha zayıflar ve artan gözenekliliğe bağlı olarak, malzemenin dayanımı daha da azalmaktadır. Kemik kırıklarını doldurmak için gözenekli sentetik kalsiyum fosfat seramikler kullanılırken, diş implantlarında kaplama olarak gözenekli hidroksiapatit kullanılmaktadır. Gözenekli hidroksiapatitte gözenek boyutu 500µm'ye kadar çıkabilirken, yoğun hidroksiapatit için bu değer maksimum 1µm civarında olup, toplam hacmin % 5'ini teşkil etmektedir [10].

Hidroksiapatit kemik dolgu malzemesi ve implant malzemelerine kaplanarak kullanılması oldukça yaygın uygulamalardır. Ancak özellikle açık yaralanmalarda kemik dolgu malzemesi olarak ve tümü vücut içinde olmayan ve uzun süre vücutta kalan implant malzemelerinde kaplama malzemesi olarak kullanıldığı durumlarda enfeksiyon riski ortaya çıkmaktadır.

1.1.3.1.4. Cam ve Cam Seramikler

Silika (SiO₂) temelli seramiklerdir. Cam seramikler Lityum/Alüminyum veya Magnezyum/Alüminyum kristalleri içeren camlardır. Cam seramiklerin heterojen yapılarından dolayı uygulama alanları kısıtlıdır. Biyoaktif camlarda ise silika gruplarının bazıları kalsiyum, fosfor veya sodyum ile yer değiştirebilmektedir (SiO₂, Na₂O, CaO, P₂O₅). Böylece doku ve implant arasında kimyasal bağlanma gerçekleşmektedir. Biyoaktif camlar klasik bir üretim süreci ile üretilmelerine rağmen her bir üretim basamağında titiz davranılması gerekmektedir. Bunun sebebi son ürünün insan vücudunda kullanılacak olmasıdır. Kimyasal kirlenmeler minimuma indirilmeli, oksit malzemeler yüksek saflıkta seçilmeli, silika yüksek saflıkta ve flint kalitesinde olmalıdır. Biyoaktif camların en önemli özelliği çok yüksek reaksiyon hızına sahip olup doku ile hızlı bir şekilde bağlanmayı sağlamasıdır. En önemli dezavantajları ise düşük mekanik mukavemete ve düşük kırılma tokluğuna sahip olmalarıdır.

Genel olarak baktığımızda tek fazlı biyoaktif camlar örneğin biyocam insan kemiği uygulamalarında gerekli mekanik mukavemeti göstermezler. Doğal kemik yapısı bir kompozit olup, hidroksiapatit-hidroksikarbonapatit ana dokusundan oluşan ve organik kalojenler tarafından kuvvetlendirilen bir yapıdır. Bu kemik dokusu örnek alınarak wollastonit (CaO.SiO_2) ve silika zincirleri ile kuvvetlendirilmiş bir seramik cam kompozisyonu üretilmiştir. A/W camları $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-CaO.SiO}_2\text{-MgO.CaO.2SiO}_2$ bileşenlerinden oluşan bir faz diyagramında görülmektedir. A/W camları elmas işleme aletleri ile vida dahil birçok değişik şekle getirilebilirler. A/W camları omurlar arası ve kemikler arası dolgu malzemesi olarak kullanılırlar. Diğer bir cam seramik yapısı ise içerisinde mika kristalleri bulunduran ve böylece camın işlenebilirliğini sağlayan işlenebilir ve fosfor içerikli cam seramiklerdir. Bu cam seramikler mikaapatit cam seramikler olarak da adlandırılabilir. Mikaapatit cam seramikleri üç gruba ayrılır; Biyoverit I camları silikofosfat tipi camlardır ve kompozisyonlarında SiO_2 , Al_2O_3 , MgO , Na_2O , K_2O , F , CaO , P_2O_5 bulunmaktadır. Biyoverit II camları silikat cam grubuna girer ve kompozisyonunda $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-F}$ bulunmaktadır. Biyoverit II cam seramikte ana kristal yapı olarak mika kristalleri, ikinci kristal yapı olarak kordiyerit kristalleri bulunmaktadır. Yüksek mika içerdiklerinden dolayı Biyoverit I ve Biyoverit II camları kolay işlenebilen camlardır. Biyoverit III camları ise fosfat cam olup, silika içermezler. Kompozisyonunda $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$, $(\text{ZrO}_2\text{-FeO/Fe}_2\text{O}_3)$ bulunmaktadır. Biyoverit III'ün yapısında apatit, AlPO_4 ve kompleks fosfat yapıları oluşturulur. Biyoverit III'ün diğerlerinden farkı faz seperasyonuna uğramamasıdır [5, 10].

Biyoseramikler, iskeletteki sert bağ dokusunun tamiri veya yenilenmesinde kullanılmaktadır. Bu malzemelere olan gereksinim, özellikle ilerleyen yaşa bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Yaşlılarda kemikler çok kırılabilir olur; çünkü kemik yoğunluğu ve dayanımı 30 yaşından itibaren azalmaktadır. Bunun sonucunda kemik üreten hücreler, yani osteoblastların yeni kemik üretiminde ve kemikte oluşan mikro çatlakların kapanmasındaki üretkenliği azalmaktadır. Ortalama insan ömrü 80 yıl olarak düşünülürse, 60 yaş civarında bağ dokusu için yedek malzeme ihtiyacı başlamakta ve an azından 20 yıl boyunca biyoseramiklere ihtiyaç duyulmaktadır [3].

Biyoseramiklerin kullanımını sınırlayan nedenlerin en önemlileri, bazı klinik uygulamalardaki yavaş ilerleyen çatlaklar, yorulma ve değişik darbe ve basınçlara dayanımlarının tam olarak bilinmemesidir. Bu olumsuzlukları önlemek için kullanılan iki yeni yaklaşımdan birisi, biyoaktif kompozitler, diğeriyse biyoaktif seramiklerle yapılan kaplamalardır.

2. ANTİMİKROBİYAL SİSTEMLER

2.1. Genel Tanımlar

Antimikrobik etkenler ve bunların kullanılışı ile ilgili olarak genellikle kullanılan deyimler şunlardır :

2.1.1. Bakteriyostatik

Bakterilerin çoğalmasını önleyen maddelere denir. Bunların ortadan uzaklaştırılmasından sonra bakteriler yeniden üremeye başlarlar [11].

2.1.2. Bakteriosidal

Bakterileri öldürebilen maddelerdir. Bu etkinin bakteriyostatikten farkı burada işlemin geri dönüşmez olmasıdır. Öldürülmüş bir organizma etkenden tamamen uzaklaştırılsa bile artık üreyemez. Bazı hallerde etken hücreleri eritici etkiye sahiptir. Diğer bazı hallerde hücreler bozulmamış ve hatta metabolik bakımdan aktif halde kalabilirler [11].

2.1.3. Steril

Her şekildeki hayattan arı demektir. Sterilizasyon, süzme suretiyle (özellikle sıvılar ve hava) ya da mikropları öldüren etkenlerle yapılabilir [11].

2.1.4. Dezenfektan

Yüzeylerdeki mikroorganizmaları öldürmek için kullanılan fakat direkt olarak dokulara uygulanamayacak kadar toksik olan maddelerdir [11].

2.1.5. Septik

Canlı dokularda patojen mikropların bulunması ile tanımlanır [11].

2.1.6. Aseptik

Ortamda patojen mikropların bulunmayışı ile tanımlanır [11].

2.2. Antimikrobiyal Sistemlerin Hücreleri Etkileme Modelleri

Antibakteriyel etkenler bakterilere çeşitli şekillerde etki yapabilirler. Bu yollardan birçoğu hakkında bilgiler yetersizdir. Bununla beraber, bazı genelleştirmeler yapılabilir. Yüksek konsantrasyonları halinde birçok etken, hücre proteinlerinin kolloidal durumlarını bozarak bunları pıhtılaştırırlar. Bazı etkenler, belirli şartlar altında özgül olarak hücre zarını parçalarlar. Hücrelerinin temel enzimlerinin birçoğu sülfidril (-SH) grupları taşırlar ve ancak bu gruplar serbest ve redüklenmiş halde bulunursa iş görebilirler. Bunun içindir ki, sülfidril gruplarını oksitleyen veya bunlarla birleşen etkenler, kuvvetli önleyici etki yaparlar. Son olarak, birçok etkenler, zıt kimyasal etkileriyle bir veya birkaç özgül enzimatik reaksiyonu bozmak suretiyle etkili olabildikleri belirtilmektedir [11].

2.2.1. Protein Pıhtılaşması

Çoğu veya hepsi enzimatik yapıda olan hücre proteinlerini, normalde çok ince şekilde dağılmış, kolloidal durumdadırlar. Eğer proteinlerin özellikleri bir antibakteriyel etken tarafından önemli derecede değiştirilirse, bunlar pıhtılaşarak iş göremez hale gelirler. Yumurtanın beyazı ısıtılınca veya süt ekşiyince oluşan değişiklikler, protein pıhtılaşmasına güzel örneklerdir: fakat bu olaylardan önce veya bu olaylara paralel olarak cereyan eden kimyasal değişiklikler hakkında pek az şey bilinmektedir [11].

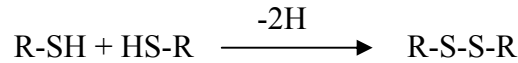
2.2.2. Hücre Zarının veya Çeperinin Bozulması

Hücre zarı, seçici bir baraj olarak iş görür; erimiş bazı maddelerin içeri girmesine izin verdiği halde, diğer bazılarının girişini önler. Bazı bileşikler, zardan aktif olarak geçirilerek hücre içinde yoğun hale gelirler. Halen bu işte rol oynayan mekanizmalar tamamen anlaşılmamışsa da, bu olay için, bozulmamış sağlam bir hücre zarının bulunması gereklidir. Bu nedenle hücrenin yüzeyinde biriken maddeler, zarın fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirip, normal fonksiyonlarını bozarak ya hücreyi öldürür ya da üremesini önleyebilirler [11].

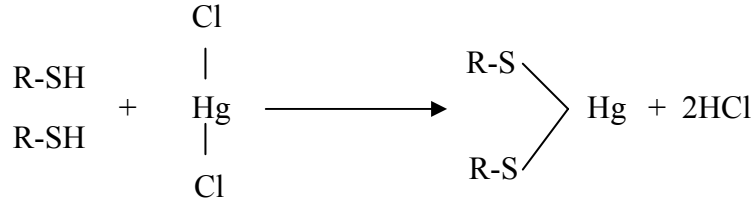
Hücre çeperi, koruyucu bir yapı olarak iş görerek hücreyi osmotik erimeden korur. Bu yüzden, çeperi bozan (örneğin lizozim) ya da normal yapımını önleyen (örneğin penisilin) gibi etkenler, hücrenin erimesine sebep olduğu belirtilmektedir [11].

2.2.3. Serbest Sülfidril Gruplarının Giderilmesi

Sistein taşıyan enzim proteinlerinin, sülfidril grupları ile biten yan zincirleri vardır. Bunlardan başka, anahtar enzimlerden en az bir tanesinin bir serbest sülfidril grubu vardır. Bu gibi enzimler, sülfidril grupları serbest ve redüklenmiş durumda olmadıkça iş göremezler. Oksitleyen etkenler, birbirine komşu olan sülfidril gruplarını 'disülfid' bağları haline çevirmek sureti ile, metabolizmayı bozarlar.



Cıva gibi birçok metallerin iyonları, sülfidril grupları ile şu şekilde birleşerek zararlı etki gösterirler [11]:



Hücrede birçok sülfidril enzimleri bulunduğu için, oksitleyici etkenler ve ağır metaller zarara sebep olurlar. Enzimin iş görmesi için serbest sülfidril gruplarının neden gerektiği bilinmemektedir. Koenzim A gibi bazılarında bunlar, muhtemelen altlığın yapışacağı normal bölgeler olarak iş görmektedirler [11].

2.2.4. Kimyasal Zıt Etki (Antagonizm)

Özel bir enzim ile buna ait substrat arasındaki normal reaksiyona kimyasal bir etkenin karışmasına kimyasal zıt etki denir. Böyle maddeler holoenzimin bir parçası ile birleşmek suretiyle, normal substratın holoenzimle birleşmesini önler.

Zıt etki yapan madde, enzimin bir esas bölgesine özel kimyasal ilgisi bulunduğu için enzim ile birleşir. Enzimler katalitik fonksiyonlarını kendi doğal substratlarına ilgileri dolayısıyla yaparlar; bu yüzden, yapısı bakımından bir substrata çok benzeyen herhangi bir bileşikte aynı şekilde enzimin ilgisini çeker. Eğer bu ilgi yeter derecede yüksek ise, yapıcı benzer olan bu madde normal substratın yerini alarak uygun reaksiyonun husule gelmesini önlemiş olur [11].

Birçok holoenzimlerde, ya enzim ile koenzim ya da enzim ile substrat arasında köprü olarak bir mineral iyonu vardır. Bu minerallerle çabucak birleşebilen kimyasal etkenlerde, koenzim veya substratın birleşmesini önler. Örneğin, karbonmonoksit ve siyanür porfirin enzimideki demir atomuna bağlanarak bu enzimin solunumda iş görmesini önlerler.

Zıt etki yapan kimyasal maddeler kolaylık için iki grup halinde gözden geçirilebilirler; enerji oluşturan işlemlerin zıt etkileri ve biyosentetik işlemlerin zıt etkileri. Bu gruplardan ilkinde, karbonmonoksit ve siyanür gibi solunum enzimlerinin zehirleri ve dinitrofenol gibi oksidatif fosforilasyonun zehirleri vardır. İkinci grupta ise, aminoasitler gibi proteinlerin ve nükleotitler gibi nükleik asitlerin yapı taşlarına yapıcı benzer maddeler bulunmaktadır. Bazı hallerde zıt

etkili madde, sadece normal metabolitin birleşmesini önler. Diğer hallerde zıt etkili madde büyük molekülün yapısındaki normal metabolitin yerine geçerek bunun iş göremez hale gelmesine sebep olur [11].

2.3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyonda Kullanılan Fiziksel Yöntemler

2.3.1. Isı

Isı uygulaması maddelerin sterilize edilmesi için en basit yöntemdir. Ancak sterilize edilecek maddelerin ısıya dayanıklı olması gereklidir. 100 °C'lik bir ısı sporlar dışında bütün bakteri şekillerini 2-3 dakika içinde öldürür. Sporları öldürebilmek için 121 °C'lik bir ısının 15 dakikalık bir süre uygulanması gereklidir. Isı ile sterilizasyonda genellikle buhar kullanılır. Çünkü bakteriler nemli ısıda daha kolay ölürler; üstelik buhar ısının sterilizasyon kabının her yanına eşit olarak dağılması için bir aracı işi görür. Kuru kalması için gerekli olan maddelerin sterilizasyonu için kuru ısı ile sterilizasyon yapan elektrikli fırınlar vardır. Kuru ısı, sterilizasyonda daha az etkili olduğundan bunlarda 160-170 °C'lik bir ısının 1 saat veya daha uzun süre uygulanması gerekmektedir.

Yüksek ısıların uzun bir süre uygulanması esasına dayanan sterilizasyon yöntemleri, hücre proteinlerini pıhtılaştırmak ve bütün önemli hücre yapılarını parçalamak sureti ile etki gösterirler [11].

2.3.2. Işınlama

Ultraviyole ışınları bazen sterilize edici etkenler olarak kullanılırlar. Bunların etkisi kısmen besiyerinde peroksitler (R-O-O-R) yapılması suretiyle olup, daha sonra bu maddeler oksitleyen etkenler olarak iş görürler. Röntgen ışınları gibi içlerinden geçtikleri hücre kısımlarını iyonize etmek suretiyle etki gösterirler. Fakat röntgen ışınlarının etkilerinin bir kısmı da –aynı şekilde– ortamda peroksit oluşumu ile açıklanabilir; çünkü; ışınlandırma esnasında oksijenin ortamdaki uzaklaştırılması halinde, hücreler kısmen korunabilirler [11].

Fakat ışınlamanın öldürücü etkisinin çoğu, bu ışınların hücrenin nükleik asitleri üzerine yaptıkları direkt etkinin sonucudur. Değişik bakteri suşlarının ışınlara ve DNA ya doğrudan doğruya zarar veren diğer etkenlere karşı farklı direnç göstermeleri, onarım enzim sistemlerindeki farklılığın bir sonucudur [11].

2.3.3. Fotokatalitik Etki

Fotokatalitik etkiye sahip malzemelerin başında anataz fazında TiO_2 gelmektedir. TiO_2 sistemi kendi kendini temizleyen, dezenfekte eden ve kullanıldığı mekanın havasını ve hijyenik koşullarını geliştiren bir sistemdir. Bünye üstünde nanometre kalınlığında anataz fazında TiO_2 oluşturulur. Bu faz fotokatalitik etkiye sahiptir. Fotokatalitik sistemler, ultraviyole ışığa (UV) ve floresan ışığına maruz kaldığı zaman kimyasal reaksiyona girerek ayrışmaktadır ve aktif oksijen çıkarmaktadır. Aktif oksijen yapı içerisinde organik maddelerin oksitlenmesi, bozundurulması, bakterilerin yok edilmesi, yüzeydeki kirlilik lekelerinin temizlenmesi ve havanın istenmeyen kokulardan arındırılması gibi özelliklere sahiptir [12].

UV ışığı altındaki TiO_2 içeren bir yüzeyde, suyun oluşturduğu temas açısının yavaş yavaş azaldığı ve yeterince UV ışımada 0° ye yaklaştığı belirlenmiştir. Bu olay ıslanma ve bu özelliği gösteren yüzeyde hidrofilik olarak nitelenir. Süper hidrofilik bir yüzey, bütün yüzeye düzgün bir şekilde yayılır. Bu özellik cam ve aynalarda daha açık görüş sağlayacağı gibi su damlalarının neden olduğu lekeleri de önleme özelliğine sahiptir.

Fotokatalitik özellikler; yalnızca güneş ışığı yada floresan ışığı ile aktif hale gelir, mantar ve bakterileri öldürür, çevresel kirlenmeleri (su kirliliği, hava kirliliği, pis kokular, zehirli gazlar, hormonlar, organik atıklar) önler ve su ve yağ direnci sağlar. Çeşitli uygulamalar için farklı uygulamaları bulunmaktadır [13].

2.4. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyonda Kullanılan Kimyasal Yöntemler

En yaygın olarak kullanılan yöntem kimyasal maddelerin yardımıyla gerçekleştirilen arınma yöntemidir. Kimyasal malzemeler sıvı ve gaz formunda kullanılmaktadır. Alkoller, fenol bileşimler, hidrojen peroksit, hipoklorit, klorin, iyot gibi kuvvetli oksitleyici sistemler, etiloksit, lipid içerikli deterjanlar ve cıva, bakır ve gümüş gibi ağır metal tuzları yaygın kullanılan antimikrobiyal kimyasal ajanlardır. Ancak son yıllarda bu kimyasalların insan sağlığı için kanser dahil birçok sağlık sorunlarını yarattığı ve atıklarının çevre kirliliğine yol açtığı bilinen bir gerçektir. Kimyasal ajanlar ile yapılan bakterilerden arındırma işlemi sonrasında, kimyasal etkisi bir süre sonra geçmekte ve yüzeyde tekrar bakteri üreyebilmektedir. Başka bir deyimle sürekli arınma sağlanamamaktadır [14].

2.4.1. Alkoller

Yapıları R-CH₂OH olan bileşikler nispeten yüksek yoğunlukları halinde hücreler için toksiktirler. Etil alkol ve izopropil alkol en çok kullanılan alkollerdir. Genel olarak kullanılan sudaki % 70 lik yoğunluklar proteinleri pıhtılaştırır [11].

2.4.2. Fenol

Fenol ve birçok fenol bileşikleri kuvvetli antibakteriyel etkenlerdir. Genellikle kullanılan %1-2 lik sulu eriyikleri proteinleri pıhtılaştırır. Bu etki asitliklerine bağlı değildir çünkü bu bileşikler çok zayıf asitlerdir [11].

2.4.3. Oksitleyen Etkenler

Kuvvetli oksitleyen etkenler serbest sülfidril gruplarını oksitlemek suretiyle hücreleri inaktive ederler. Oksijenli su, iyod, hipoklorit, klor ve yavaş yavaş klor açığa çıkaran kireç kaymağı gibi etkenler bunların arasındadır [11].

2.4.4. Etilen Oksit

% 90 CO₂ veya bir florakarbon ilavesi ile patlayıcı özelliği giderilen etilen oksit gazı kuru yüzeylerin dezenfeksiyonu için elde bulunan en güvenilir etkidir. Bu gaz cerrahi araçların ve maddelerin dezenfeksiyonunda, özel vakum koşullarında geniş çapta kullanılmaktadır [11].

2.4.5. Deterjanlar

Yüzeyler arasında birikme özelliğini gösteren bileşikleri temizleyen malzemelere yüzey aktif etkenler veya temizleyiciler denir [11].

2.4.6. Metal İyonu İçeren Sistemler

Bilindiği üzere bazı metal iyonları da bakterilerin metabolizmalarına girmekte ve enzimlerini etkisiz hale getirmektedir. Diğer bazı sistemler ise hidrojen peroksit oluşturarak bakterilerin ölmesine sebep olmaktadır. Bu mekanizmaların açıklanması için çalışmalar devam etmektedir.

Metal iyonlarının mikroorganizmalara karşı gösterdikleri direnç sıralaması aşağıda verilmektedir; [15]



Gümüş metalinin diğer metallere göre daha sık kullanılmasının nedenleri;

- Bakterilere karşı en dirençli metal olması
- Vücuda karşı zararlı etkilerinin bulunmaması
- Çoğu malzemeye göre nispeten daha ucuz olması
- Ve kolay üretim işlemidir [15].

Tıbbi klinik ürünlerde en çok kullanılan gümüş bileşimi gümüş nitrattır (AgNO₃). Çünkü AgNO₃ gümüş iyonlarını en çabuk serbest bırakabilen maddedir [15].

Gümüş iyonlarının antimikrobik etki mekanizması onların enzim ve proteinlerindeki tiyol (sulfidril, -SH) gruplarıyla yakın ilişkisine bağlıdır. Bununla birlikte muhtemelen başka hedef yerleri de vardır. *P. aeruginosa*'nın bölünmesini

inhibe eder; hücre zarı ve içeriğini bozar. Virüsit etki –SH gruplarına bağlanma sonucudur. Mantar gruplarına bağlanarak bunlar üzerine etkili olur. Gümüş, mikroorganizmalardan K^+ salınımına neden olur; sitoplazma ve sitoplazma membranındaki pek çok enzim gümüş etkisinin hedef yeridir. Gümüş iyonları nükleik asitlerle de ilişkiye girer [16].

Antibakteriyel seramiklerde bir taşıyıcı bünyenin bulunması ve metal iyonlarının yapıya kolay katılması gereklidir. Taşıyıcı bünye baz alınarak antibakteriyel seramikler; amorf silika, zeolit ve kalsiyum fosfat bünyeli olarak sınıflandırılabilirler [17].

Bu tür seramikler doğrudan insanla temas halinde olabileceklerinden biyolojik uyumluluk göstermelidirler. Daha önce bölümlerde açıklandığı üzere hidroksiapatitin biyoyumluluğu yüksektir. Ameliyatla yapılan birçok implantasyonlarda insan vücudunun çeşitli yerlerinde hidroksiapatit kullanılmaktadır [10]. Ayrıca hidroksiapatitin Ag^+ , Cu^{+2} , Zn^{+2} vb. metal iyonları ile katyon değişim hızı çok yüksektir.

3. MİKROBİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

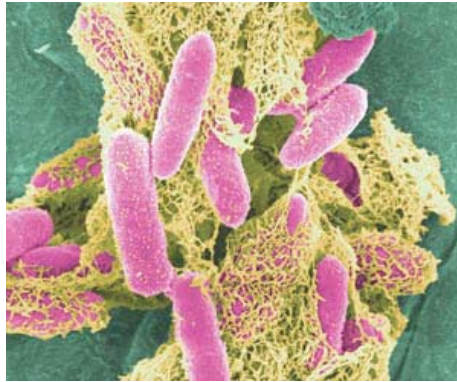
3.1. Bakterilerle İlgili Genel Bilgiler

3.1.1. *Escherichia coli*

E. coli yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda ve 1.0-1.5 µm enine, düz, uçları yuvarlak çomakçık şeklinde bakterilerdir (Şekil 3.1).

Bazı kültürlerde koka benzer küçük ve kısa bazı kültürlerde de normalden uzun hatta Y harfi şeklinde dallanan filamanlı şekiller bulunabilir. Her iki şeklin birlikte bulunması olasıdır. Genellikle etraflarında bulunan kirpikleri aracılığı ile hareketli olmakla beraber hareketleri yavaştır hatta hareketsiz görünebilirler. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar ve gram olumsuzdurlar. Etraflarında kapsül maddeleri bulunmakla beraber organizmada bağırsak dışındaki yerlerden soyutlanan kökenlerin çoğunda kapsül ya da mikrokapsül bulunur [18].

E. coli buyyon ve jeloz gibi genel besiyerlerinde kolayca ürerler. Değişebilen anaerop olup, optimal üreme ısısı 37 °C dir. 15-45 derecelerde üreyebilirler. Özellikle 45 °C de üreyebilmeleri benzer bazı bakterilerden ayırt edici bir özelliktir. Ortalama pH 7.2 de iyi ürerler. E.coli ısıya karşı oldukça dirençli bir bakteridir. 60 °C ısıda 30 dakika, oda ısısına uygun ortamda olmak koşulu ile uzun süre canlı kalabilir. Soğuğa dirençlidir. Dezenfektanlara karşı dirençsizdir [18].



Şekil 3.1. *E.coli* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [19].

3.1.2. *Pseudomonas Aeruginosa*

Uzunlukları çok değişik olmakla beraber *pseudomonas aeruginosa* 1.5-3 µm uzunluğunda ve 0.5 µm kadar genişliğinde, bazen çift çift ve bazen de kısa zincirler halinde görülen sporsuz, kapsülsüz çomakçık yapısındadırlar (Şekil 3.2). Çoğu kez bir uçlarında bir, nadiren iki-üç adet kirpiği vardır ve çok hareketlidirler. Kolay boyanırlar ve gram negatiftirler.

Genel kullanım besiyerlerinde kolaylıkla optimal 30-37 °C lerde ve hafif alkali ortamda bol olarak ürerler. 41°C de üreyebilme yeteneği *pseudomonas aeruginosa* için önemli bir özellik olup arka arkaya üç pasajla 42°C de üreyebilmesi *Pseudomonas fluorescens*'den ayırt edici bir özelliğidir. Aerop olmakla beraber denitrifikasyon özelliğinde olduklarından anaerop üreyebilen türlerine de rastlanır [18].



Şekil 3.2. *P.aeruginosa* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [20].

Pseudomonas'lar ısıya dirençsizdirler. 55 °C de 1 saat ve 60°C de 15 dakikada ölrler. Çevre ısısı koşullarında sularda aylarca canlı kalırlar. Su damlacıklarında iken havada kurutulduklarında büyük bir çoğunluğu ölür, ancak az bir kısmı uzun süre bu kuru ortamda toz ve toprakta canlı kalırlar. Kurutulduktan sonra canlı kalmış bakterilerden üretilen kökenler yeniden kurutulduklarında daha çok sayıda ve daha uzun süre canlılıklarını korurlar [18].

Pseudomonas aeruginosa'lar özellikle hastanelerde daha kolay barınma ortamı bulurlar. Hastanedeki çeşitli çevre örneklerinin % 5 inde *pseudomonas* izole etmek olasıdır. Bu olasılık hastanede uygulanan temizliğe ve incelenen

bölgenin niteliğine göre artabilir. Cerrahi, doğum servisinde ve özellikle yanık koğuşlarında bu bakteriye rastlanma olasılığı artmaktadır. Bu ünitelerde zemin, oda, ve hasta eşyaları ve ortamlarında bakterilerin barınabileceği organik dökümlerin (kan, irin, yanık eskarları vb.) bulunması önemli bir faktördür. Bu ortamlarda kuruyan bakteriler uzun süre canlılıklarını korurlar. Hastanelerde kullanılan krem, merhem ve sıvılarda kolayca barınırlar. Steril saf su içinde bile ve oda derecesinde üremeye alıştıkları bilinmektedir. İyi muhafaza edilmeyen ağız açık antiseptiklerin ve hatta pseudomonasların kısmen direnç gösterdikleri dörtlü amonyum bileşikleri kökenli dezenfektanların bu bakteriler için bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldıkları bildirilmiştir [18].

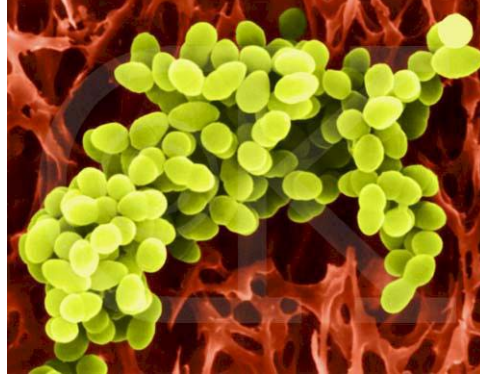
3.1.3. *Staphylococcus Aureus*

Staphylococcus Aureus adı altında anılan tür özellikte koagüler olumlu, mannitolu aerop ve anaerop koşullarda asit oluşturarak parçalayan alfa toksin yapan, novobiocine duyarlı, insan ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda geniş çapta piyogen toksik ve besin zehirlenmesi niteliğinde enfeksiyonlara etken olan stafilokoklar toplanır [18].

Doğada oldukça yaygın olan, tozda, toprakta, eşya üzerinde, insan ve hayvan deri, burun mukozası, ağız ve nazofarinks floralarında bulunan *staphylococcus aureus* bakterilerinin, günümüz için en önemli yönleri kullanılmakta olan kemoterapötik maddelerin bir çoğuna hızla dayanıklılık kazanmaları ve bu nedenle eskiye oranla enfeksiyonlarına daha sık rastlanmasıdır.

Teker teker incelendikleri zaman stafilokok hücreleri diğer koklara göre daha çok olmak üzere tam yuvarlağa yakın şekildedir. Ayrıca gerek aynı ve gerekse çeşitli kültürlerden elde edilen stafilokoklar hücre görünümü bakımından birbirinden önemli bir ayırım göstermezler. Stafilokoklar yaklaşık olarak 1 µm çapındadırlar. Üreme esnasında bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirinden ayrılmazlar ve üç boyut yönünce çoğaldıklarından üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar. Şekil 3.3'de *S.aureus* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü verilmektedir. Stafilokoklar çeşitli bakteriyolojik boyalarla

kolay boyanırlar ve gram pozitiflerdir. Eski kültürlerde bazı koklar çabuk renksizleşerek gram negatif gibi görünürler [16].



Şekil 3.3. *S. Aureus* kolonisi taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [20].

Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzlerdir. Bazı kökenlerinde belirgin ve polisakkarid yapısında bir kapsül ya da bir mukus katmanı olur.

Stafilokoklar basit besiyerleri dahil birçok besiyerlerinde ürerlerse de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalırlar. Fakültatif anaeropturlar. Oksijenli ortamda üremeyi tercih etselerde belli miktarda oksijenli ve hatta tamamen oksijensiz ortamda bile üreyebilirler [18].

Optimal olarak 37 °C de ve pH 7.4 de ürerler. Jeloz besiyerinde bolca ürer ve yuvarlak kenarlı mat, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler yaparlar. Uygun ortamda koloniler 6-8 mm çapına ulaşabilirler.

Stafilokoklar oldukça dayanıklı bakterilerdir. Diğer bakterilerin çoğu 60 °C de 30 dakika bekletilmekle öldükleri halde stafilokoklar 1 saat süre sonra bile canlılıklarını saklı tutabilirler. Aynı şekilde sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa karşı dayanıklılıkları da fazladır. İrin içerisinde kurutulurlarsa haftalarca canlı kalırlar [18].

3.1.4. *Candida albicans*

En önemli fırsatçı mantarlardır. Maya mantarlarından olan bu canlı, deride enfeksiyona neden olur. Normalde sağlıklı insanın derisinde, solunum, sindirim ve üreme bölgelerinin mukoza zarlarında bulunur. Bağışıklık sistemi zayıfladığında

çoğalır ve enfeksiyon oluşur. Tomurcuklanarak çoğalan, oval şekilli, tek hücreli bir asalaktır (Şekil 3.4). Candidaların yüzden fazla türleri vardır. Ancak 10-15 tanesi insanda patojendir [21].



Şekil 3.4. *Candida albicans* taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [20].

3.2. Mikrobiyolojik Çalışmalar

Mikrobiyoloji çalışmalarında önemli olan adımlar sırayla aşağıdaki gibidir;

1. Sterilizasyon
2. Ortam
3. Mikrobiyolojik örnek alma ve bakteri ekimi (kültivasyon)
4. Bakteri morfolojisi ve bakterileri boyama
5. Mikroorganizmanın tanımlanması
6. Mikrobiyolojik sayım yöntemi [22].

3.2.1. Sterilizasyon

Sterilizasyon genelde bir ortamdaki bütün organizmaların öldürme yada ortamdaki uzaklaştırma işlemi olarak tanımlanır. Mikrobiyoloji uygulamaları dikkate alındığında sterilizasyon; laboratuvar ekipmanlarının ve besiyerlerinin, bilinen herhangi bir yöntemle üzerinde veya içinde bulunan mikroorganizmaların öldürülmesi yada ortamdaki uzaklaştırılması işlemidir. Sterilizasyon işlemi uygulanmış materyale steril denir. Bazı mikroorganizmaların iki şekli vardır; ve

jetatif formlar nispeten kolay öldürülebilmekte, dayanıklı spor formlarını ise öldürmek ise daha zor olmaktadır. Başarılı sterilizasyon tekniği, en dayanıklı spor formunu bile öldürmeyi amaçlar. Ancak her zaman mutlak bir sterilizasyon olmayabilir [23].

Sterilizasyon yöntemleri; ısıı işlem uygulaması, ışınlama ile sterilizasyon, mekanik yöntemlerle sterilizasyon, kimyasal yolla sterilizasyon olarak adlandırılmaktadır.

3.2.1.1. Isıl İşlem

Hücrelerin yanma ve oksidasyon ile tahrip edilmesidir. Sırası ile aşağıda verilen işlemler yapılmaktadır.

- Alevden geçirmek
- Alevde tutmak
- Kuru sıcak havada bekletmek
- Basınçlı buhar (Otoklav)
- Basınçsız buhar

3.2.1.2. Işınlama

- İyonize olmayan ışınlar (UVJR)
- İyonize ışınlar

3.2.1.3. Mekanik Yöntemler

- Filtrasyon
- Santrifügasyon
- Ultrasonik vibrasyon

3.2.1.4. Kimyasal Yollar

- Dezenfektanlar

- Kemoterapötikler [23]

3.2.2. Besiyeri

Mikroorganizmaların laboratuvar koşullarında üretilmeleri, saf olarak elde edilmeleri, çeşitli özelliklerinin incelenmesi, biyolojik olarak ve metabolik ürünlerin elde edilmesi için çeşitli besleyici ortamlar kullanılır.

Bakterilerin büyük bir çoğunluğu ve mantarlar cansız ortamlarda üretilmektedirler. Bu gibi mikroorganizmaların üretilmeleri, saf olarak elde edilmeleri, koloni ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, biyolojik ürünlerin elde edilmesi için onları organizmanın dışında üretmek amacı ile kullanılan cansız, besleyici ortamlara besiyeri adı verilir [24].

Besiyerleri mikroorganizmaların gereksinim duyduğu temel bazı maddeleri içerecek şekilde düzenlenmelidir :

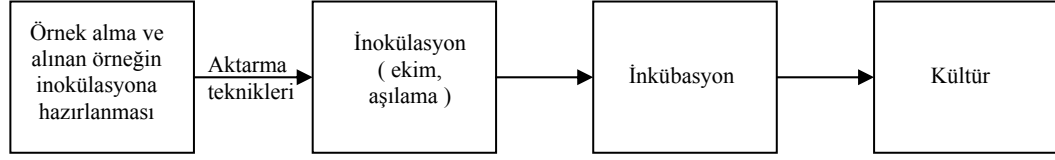
- Su
- Karbon ve enerji kaynağı maddeler (çeşitli karbonhidratlar, karbonhidratların yokluğunda da proteinler)
- Azot kaynağı maddeler (proteinler, peptonlar, aminoasitler, KNO_3)
- İnorganik maddeler
(Makro elementler; Na, K, Cl, P, S, Ca, Mg, Fe
Mikro elementler; Zn, Mn, Br, B, Cu, Co, Mo, V, Sr vb.)
- Üreme faktörleri (vitaminler, aminoasitler, pürn ve pirimidin) [23]

3.2.3. Mikrobiyolojik Örnek Alma ve Kültür Yapma

Üzerinde veya içinde mikroorganizma üretilmiş (ya da üremiş) besiyerleri kültür olarak adlandırılır. Besiyerinde bir mikroorganizma türü üretilmiş ise bu saf kültürdür.

Kültür yapma, mikroorganizmaların buldukları ortamdan belirli tekniklerle alınarak, uygun bir besleyici ortama aktarılması ve burada

gelişmelerinin sağlanması aşamalarını içerir [24, 25]. Şekil 3.5’de kültür elde etme aşamaları verilmektedir.



Şekil 3.5. Kültür elde etme aşamaları

Ancak kültür yapmadaki bu aşamalardan önce bir takım ön hazırlıkların gerçekleştirilmesi gerekir. Bu amaçla yapılacak ilk işlem steril besi yerinin hazırlanmasıdır. Bunun için önce kültürü yapılacak örneğe veya incelenecek mikroorganizmaya ya da mikroorganizma grubuna uygun bir besiyerinin seçimi yapılır. Daha sonraki aşamada ise bu besiyeri usulüne uygun olarak hazırlanır ve sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilir [25].

3.2.3.1. Örnek Alma ve Alınan Örneğin İnokülasyona Hazırlanması

Örnek alma ve alınan örneğin inokülasyona hazırlanması kültür yapmadaki en önemli aşamalardan birisidir. Her zaman olduğu gibi, bu aşamada da aseptik koşullara tümüyle uyulmalıdır. Bu amaçla, örneğin alınmasında kullanılan malzemeler ile örneğin aktarılacağı örnek kapları daha önceden sterilize edilmelidir. Örneğin alınması ve örnek kabına aktarılması sırasında bunzen bek alevi altında çalışılmalıdır [25].

Alınan örnek bir takım ön işlemlerden geçirilerek inokülasyona hazır hale getirilir. Özellikle mikrobiyolojik sayımlarda, incelenecek örneğin dilüsyonları yapılır. Dilüsyon yapma aslında bir seyreltme işlemidir. Bu amaç için uygun dilüsyon sıvıları kullanılır.

3.2.3.1.1. Dilüsyon Hazırlama

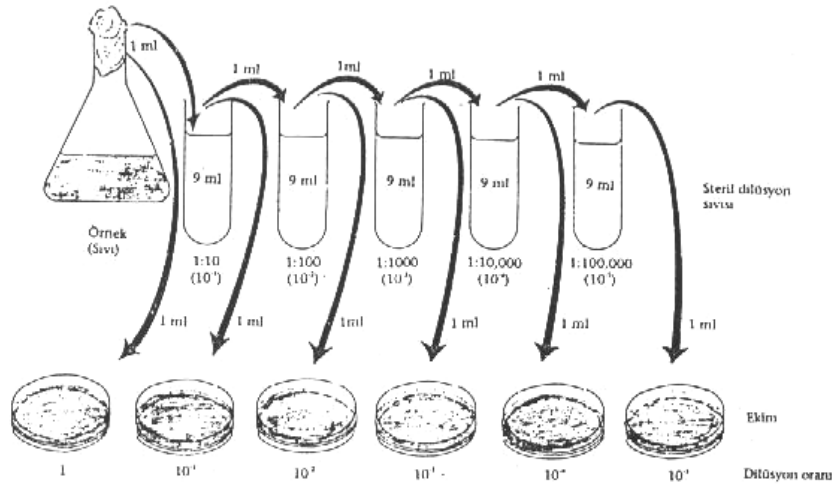
Kültürel sayım yapılacak bir örneğin ml’sinde binlerce hatta milyonlarca mikroorganizma bulunabilir. Bu nedenle, incelenecek örneğin uygun seri

dilüsyonları hazırlanır. Dilüsyon hazırlama, mikrobiyolojik yönden incelemeye alınacak orijinal örnek içindeki mikroorganizma sayısının belli oranlarda daha aza indirilmesini sağlayan bir işlemdir.

Damıtık su, serum fizyolojik, tamponlu fosfat dilüsyon sıvısı ve nutrient broth gibi bazı sıvı besiyerleri en sık kullanılan dilüsyon sıvılarıdır. Dilüsyon sıvıları ekimler öncesi hazırlanarak sterilize edilmelidir.

Dilüsyon sıvıları ondalıklı, iki katlı ya da dört katlı dilüsyon serileri şeklinde hazırlanabilir. Ancak en sık kullanılan ondalıklı dilüsyon serileridir.

Ondalıklı dilüsyon serilerinde, dilüsyon sıvıları her bir deney tüpünde 9 ml dilüsyon sıvısı olacak şekilde hazırlanır. Dilüsyon sırasında her bir tüpten bir sonrakine 1 ml örnek aktarılır. Bu şekilde her bir aktarmada örnek on kat seyrelmiş olur (Şekil 3.6) [25].



Şekil 3.6. Dilüsyon hazırlanması [25]

3.2.3.2. Aktarma Teknikleri ve İnokülasyon

İnokülasyon, incelenecek örneğin steril bir besi yerinin üzerine ya da içine, aktarma tekniklerinden yararlanılarak, uygun bir şekilde aktarılması olayıdır.

Aktarma sırasında kullanılacak olan öze ve pipet gibi gereçler mutlaka steril olmalıdır. Hiçbir şekilde, incelenecek olan örneğe veya aktarma yapılacak olan steril besiyerine sterilize edilmemiş öze veya pipet daldırılmamalıdır.

Aktarma işlemi tamamlandıktan sonra, pipetler içinde dezenfektan çözeltisi bulunan uygun bir kaba konurlar. Öze işlem bittikten sonra alevde tutularak sterilize edilir [25].

Aktarma işlemleri gerçekleştirilirken, aktarılabacak örnek ve aktarma yapılacak steril besiyerini içeren tüp veya balon gibi cam kapların ağız kısımları, işlemler öncesi ve sonrası ayrı ayrı olmak üzere mutlaka bunzen beki alevinden geçirilir. Bu işlem ile kapların ağız kısımlarındaki boşluklarda konveksiyon akımları yaratılmakta ve böylece kapların ağız kısımlarından hava yoluyla girebilecek mikroorganizmalar çevreden uzaklaştırılabilir. Aktarma tamamlandıktan sonraki alevden geçirme işlemiyle, aktarma anında kapların ağız kısımlarına herhangi bir şekilde mikroorganizmaların kontamine olmasının önlenmesi amaçlanır.

Alevden geçirme sırasında, tüp balon veya erlenmayer gibi kapların ağızlarındaki pamuk tıkaç, öze pipet tutan elin parmaklarıyla çıkarılır. Bu sırada , pamuk tıkaç hiçbir şekilde, kontaminasyon kaynağı olabilecek yüzeylere temas ettirilmez veya yüzeylere bırakılmaz. Aktarma işlemi seri bir şekilde gerçekleştirildikten sonra kabın ağız kısmı alevden geçirilir ve pamuk tıkaç kabın ağızına tekrar yerleştirilir [25].

3.2.3.3. İnkübasyon

Kültür elde etmedeki son aşamadır. İnkübasyon, ekim yapılmış besiyerini içeren kabın, uygun bir inkübatörde, belli bir sıcaklıkta belli bir süre tutulması işlemidir [25].

Petri kutuları, inokülasyonu takiben belli bir süre bekledikten sonra, örnek absorpsiyonu ve agarın katılaşması için ters çevrilerek inkübatöre yerleştirilir. Böylece, petri kutusu içinde oluşabilecek su buharını kapakta kondense olup besiyerine damlayarak kültürün kontaminasyonu ile olduğundan daha fazla sayıda veya büyük koloni oluşumu risklerinin önüne geçilmiş olur.

İnkübasyon sıcaklığı ve süresi, ekim yapılan örnek veya çalışılan mikroorganizmanın özelliği ya da çalışmanın amacına göre belirlenir.

3.2.4. Bakteri Morfolojisi ve Boyama

Koloni; bir bakteri hücrelerinin katı bir besiyerinde düştüğü herhangi bir noktada çok sayıda bölünmeler geçerek oluşturduğu ve çıplak gözle görülebilen hücre topluluğu şeklinde bir yapı olarak tarif edilebilir. Bu durumda kolonide sadece belli bir bakteri türüne ait hücreler bulunur. Koloni sayımlarında da bu tanımdan hareketle, bir koloninin bir hücreye eşdeğer olduğu varsayılır. Her bakteri belli besi yerinde, koşullar değişmediği sürece kendine özgü karakterde koloniler oluşturur. Aynı bakteri değişik besi yerine ekildiğinde ise farklı bir koloni morfolojisi gösterir. Bakterilerin boyanması ile morfolojileri ve dizilişleri daha iyi gözlemlenebilir. Bakterilerin boyanması hem fiziksel hem kimyasal bir olaydır [23].

3.2.5. Bakterilerin Sayımı

Katı (agarlı) besiyerinde sayım, canlı hücrelerin koloni oluşturması ve bu kolonilerin sayılarak "her canlı hücre bir koloni oluşturur" prensibi ile materyaldeki canlı hücre sayısının hesaplanması esasına dayanır. Bu amaçla sayım yapılacak materyalden belli bir miktar alınır ve besiyerine aktarılır. Koloni oluşması için inkübasyon süresinin sonunda petri kutusundaki koloniler sayılarak materyaldeki canlı hücre sayısı hesaplanır. Ölü hücreler üreyip koloni meydana getiremeyeceği için bu yöntemde sadece canlı hücreler sayılır [26]. Canlı mikroorganizma sayısı yüksek olan örneklerde sayım, dilüsyon tekniği ile yapılır. Hesaplamalarda kolaylığın ve standartlığın sağlanması amacıyla dilüsyon genellikle 1:9 oranı ile yapılır. Dilüsyon tekniği ile bir seri tüp kullanılarak tüplerdeki canlı hücre sayısı giderek 10' ar misli seyreltilmektedir.

Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra besiyerine ekim yapılır. Eğer materyaldeki mikroorganizma yükü tahmin edilebiliyorsa, tüm dilüsyonlarda ekim yapmaya gerek yoktur. Ekim bittikten sonra vakit kaybetmeden petri kutuları inkübasyona bırakılmalıdır. İnkübatöre petri kutuları, kapakları alta gelecek şekilde yerleştirilir. Bunun amacı, oluşan su buharlarının yoğunlaşınca besiyeri üzerine değil kapağa damlamamasının sağlanmasıdır. Aksi halde (kondense suyun besi yeri üzerine damlamaması halinde) olduğundan fazla sayıda ve /veya büyük koloni oluşarak sayım hataları ortaya çıkabilir. Gereğinden uzun yada kısa

inkübasyon süreleri sayımda yanıltıcı sonuçların alınmasına yol açabilir. İnkübasyon bittiğinde oluşan kolonilerin hemen sayılması gerekmektedir. Ancak herhangi bir nedenle koloniler hemen sayılamıyorsa Petri kutuları en çok 24 saat süre ile buzdolabında (+4°C) depolanır [26].

4. SİTOTOKSİSİTE

İmplantların toksisiteleri çoğu zaman biyolojik sisteme karşı salınan maddelere bağlıdır. Metallerin oksitlenmesi, polimerlerin filtrasyonu ve seramiklerin parçalanması potansiyel olarak biyoaktif elementlerin ve moleküllerin ortaya çıkmasına neden olur. Doku kültür sistemleri kullanılarak yapılan *in vitro* testleri sitotoksik etkileri saptamak açısından duyarlıdır. Fakat biyolojik çevre ve materyal arasında etkileşimden kaynaklanan biyoaktif maddeler salınıyorsa test hatalı sonuç verebilir. Hataları önlemek için uygulanan en güvenilir ve yaygın testler laboratuvar hayvanlarına cerrahi implantasyondan sonra histolojik incelemeye dayalıdır [6].

Biyomalzemenlerin *in vitro* sitotoksik değerlendirilmesinde ilk adım biyoyumluluk çalışmasıdır. Sitotoksosite deneyleri *in vitro* toksikoloji çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma genellikle ölümsüz hücre ırklarının kullanıldığı, materyallerin doğrudan ya da dolaylı teması ile gelişmenin engellendiği ve hücre hasarın morfolojik olarak değerlendirildiği çalışmalarla gerçekleştirilir. Hücrelerin test materyali ile doğrudan teması hücrelerin gelişimini engelliyorsa bu toksik etkiyi göstermektedir [27]. Hücre kültürü çalışmaları, biyomalzemelerin kullanılabilirliği hakkında bilgi edinmek amacıyla pek çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır [28]. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) testi, hücreler toksik maddelere maruz bırakıldıktan sonra uygulanan, sitotoksitenin saptanmasında çok sık kullanılan hücre canlılık testidir [29]. Bu testin mitokondriyal enzim sistemleri tarafından katalize edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayandığı ve hücre büyümesi ve ksenobiyotik sitotoksitesini yansıttığı bir çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir.

Metal iyon katkılı kalsiyum fofat esaslı tozun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesinde kantitatif bir metod olan MTT yöntemi kullanılmaktadır [30, 31]. MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde ve özellikle metabolik olarak aktif hücreler için kullanılmaktadır. Deney metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondriilerindeki süksinat dehidrogenaz enzimi ile metabolize olan, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium

tuzu MTT'in mor renkli suda çözünmeyen formazana çevrilmesine dayanmaktadır [32, 33].

5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada amaç; metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun enfeksiyon riski taşıyan biyomalzeme uygulamalarında kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun insan vücudunda kullanılabilmesi için son pH 5.5 olacak şekilde farklı metal iyon oranları ile sentezlenmesi sonrasında enfeksiyon riskini ortadan kaldırabilmesi için antimikrobiyal etkinliğinin standart maya ve bakteriler ile test edilmesi ve biyoyoumluluk açısından sitotoksosite testleri yapılmıştır.

5.1. Metal İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat Esaslı Tozun Hazırlanması

Yapılan çalışmalarda, metal iyon katkılı kalsiyum fosfat tozu hazırlanmasında yaş kimyasal yöntem kullanılmıştır. Bu süreçte ilk önce, metal iyonları aynı miktardaki saf suda tamamen çözüldürülmüş ve kalsiyum hidroksite eklenerek süspansiyon hazırlanmıştır. Daha sonra ortofosforik asit, yavaşça ilave edilerek kimyasal reaksiyona sokulmuş ve bu esnada çözelti manyetik çubuk yardımıyla karıştırılmıştır. Stokiyometrik hidroksiapatit yapısına yakın bir yapı oluşturabilmek için pH sürekli kontrol edilmiştir. Reaksiyon esnasında oluşan çökelti filtreden geçirilip 80 °C’de kurutulmuştur.

Toz üretimi farklı oranlarda metal iyonu ilavesi ile son pH 5.5 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Üretilen tozlar ağırlıkça farklı metal iyonu içeriklerine göre Çizelge 5.1’de sınıflandırılmıştır. Ag⁺ iyonu içeren A serisi tozlar kurutma işlemini takiben öğütülmüştür. Ag⁺ ve Zn⁺² içeren Z serisi tozlar ise kurutma işlemlerini takiben yüksek sıcaklıkta ısı işleme tabi tutulduktan sonra öğütülmüş ve belirli bir tane boyutuna indirilmiştir. Öğütülen tozların elek analizleri yapılmış ve toz -38 µm, -38 µm + 75 µm, +75 µm aralıklarında tane boyutlarına ayrılmıştır.

Çizelge 5.1. Sentezlenen seramik tozun kodları ve metal iyonu içerikleri

Toz kodları	Metal iyon içerikleri (% ağırlık)
00A	Şahit kompozisyon
05A	%0.5 Ag ⁺¹ içeren kompozisyon
10A	%1 Ag ⁺¹ içeren kompozisyon
20A	%2 Ag ⁺¹ içeren kompozisyon
35A	%3.5 Ag ⁺¹ içeren kompozisyon
00Z	Zn ⁺² içeren şahit kompozisyon
05Z	%0.5 Ag ⁺¹ içeren kompozisyon (+ Zn ⁺²)
10Z	%1 Ag ⁺¹ içeren kompozisyon (+ Zn ⁺²)
20Z	%2 Ag ⁺¹ içeren kompozisyon (+ Zn ⁺²)
35Z	%3.5 Ag ⁺¹ içeren kompozisyon (+ Zn ⁺²)

5.2. Üretilen Tozun Karakterizasyonu

5.2.1. XRD Analizleri

X-ışınları difraktometresi (XRD, Rigaku-Rint 2200) kullanılarak üretilen tozların faz analizi gerçekleştirilmiştir. XRD analizleri 10-80° açıları arasında 2 °/dk hız ve 10-50° açıları arasında 0,1 °/dk hız ile yapılmıştır.

5.2.2. SEM ve EDX Analizleri

Üretilen tozların morfolojisi görüntülemek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Zeiss Supra V50) ve ağırlıkça metal katyonu miktarlarını ve metal katyon salınımlarını belirlemek üzere Enerji Saçınımlı X-ışınları Spektrofotometresi (EDX, Oxford Instruments) kullanılmıştır. EDX ile elde edilen değerler toz üretiminde hesaplanan değerlerle karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda tozların tane boyut dağılımı lazer difraksiyon methodu (Malvern NanoZS 2000) ile ölçülmüştür.

5.3. Üretilen Tozun Antimikrobiyal Etkinliği

Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun antimikrobiyal etkinliğini belirlemek amacı ile halo test methodu ve agar dilüsyon test methodu olmak üzere iki farklı test yöntemi kullanılmıştır. Aynı zamandan tozun antibakteriyel etkinlik–zaman testleri belirli zaman aralıkları için yapılmıştır.

Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun ürün bünyelerine katıldıktan sonra antibakteriyel etkinliğinin saptanması için ise halo test methodu, kontakt test methodu ve sallamalı erlen test methodları kullanılmaktadır.

5.3.1. Halo Test Methodu

Halo test methodunda; petri kapları ve toz numuneler 200 °C'de 2 saat süre ile steril edilmiştir. Katı besiyerinde bulunan saf *E. Coli* kültüründen öze ucu ile bir miktar alınarak sıvı besiyerine (nutrient broth) aktarılmış ve sıvı besiyeri 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek kültür hazırlanmıştır. Öze ucunun ve deney tüpünün ağız kısmı ateşten geçirilerek steril edilmiştir. Bu bakteri kültüründen 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} oranlarında dilüsyon hazırlanmıştır. Her bir deney tüpünden diğerine aktarım yapılırken vorteks tüp karıştırıcı kullanılarak sıvı besiyerinin homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Besiyerleri (nutrient agar) malzemeler üzerinde ince bir film tabakası oluşturacak şekilde dökülüp, hazırlanan dilüsyonlardan 200 µl lik bakteri ekimi yapılmıştır. Ekim steril dragalski öze kullanılarak yüzeye yayma yöntemi ile yapılmıştır. Petriler ters çevrilerek 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiş, petriler sıcak hava sirkülasyonu engellenmeyecek şekilde yerleştirilmiştir.

5.3.2. Agar Dilüsyon Methodu

Agar dilüsyon metodunda Müller Hinton Agar'ın içinde tozun son konsantrasyonu % 10, % 5, % 2.5, % 1.25, % 0.625, % 0.313 olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Ayrıca testin kontrolü (şahit) için toz bulunmaksızın hazırlanmış Müller Hinton Agar hazırlanmıştır. Bu karışım sıcaklığı 40-42 °C'ye ulaştığında besiyeri miktarının 1/100'ü oranında McFarland 0.5 bulanıklığına sahip bakteri süspansiyonundan eklenmiş, bakteri ve etkin maddenin homojen dağılımının sağlanması için köpük oluşmayacak hızda çalkalanmış ve petri kutusuna dökülmüştür. Petri içindeki besiyerleri oda ısısında soğumaya bırakılmış, besiyeri katılaştıktan sonra 37 °C'de etüvde inkübe edilmiş ve 24. ve 48. saatte besiyerinde koloni oluşup oluşturmadıkları araştırılmıştır. Ayrıca Gram boyası ile sonuç teyit edilmiştir.

5.3.3. Zaman-Etkinlik Testleri

Antibakteriyel etkinlik–zaman testlerinde antibakteriyel tozun ne kadar süre içinde etkin olduğunun anlaşılması için yapılmıştır. Bu method manyetik karıştırıcıda 100 ml steril su, 1 gr toz ve 1000 µl 10^{-3} dilüsyonluk *E.coli* karışımından belirli zaman aralıklarında 300 µl örnek alınması ve alınan örneklerin ekimi ile gerçekleştirilmiştir. Petriler ters çevrilerek 37 °C’de 24 saat süre ile inkübe edilmiş ve petriler sıcak hava sirkülasyonu engellenmeyecek şekilde yerleştirilmiştir.

5.4. Sulu Sistemde Salınım Testleri

Geliştirilen antimikrobiyal malzemenin biyomalzeme uygulamaları düşünülerek katı sistemden sıvı sisteme iyon geçiş miktarını belirlemek üzere denemeler sonucunda uygulama potansiyeli en yüksek olarak belirlenen 20A tozu seçilmiş ve salınım deneyleri yapılmıştır. Toz saf su ile karıştırılarak süspansiyon haline getirilmiş ve beher içerisinde denemeler süresince karıştırılmıştır. Belirli günlerde alınan tozlar kurutulmuş ve EDX analizleri ile metal iyon katkılı kalsiyumfosfat esaslı antimikrobiyal seramik tozdan suya Ag^{+1} iyonu salınım miktarları belirlenmiştir.

5.5. Sitotoksosite Testleri

Sitotoksosite testleri için test edilecek metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı antibakteriyel toz örnekleri, cam petriler içine koyularak, 180 °C’de 2 saat kuru hava sterilizatöründe tutularak steril hale getirilmişlerdir. Hücre kültürü V79 (Chinese Hamster Akciğer Fibroblast benzeri) hücreleri Institute of Fermentation, Osaka (IFO, Japan) dan satın alınmıştır. V79 hücreleri, Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma), ısı ile inaktif hale getirilmiş % 10’luk Fetal Bovine Serum (Sigma), Penicillin-Streptomycin (Sigma) ve sodium hidrojen karbonat içeren besiyerinde büyütülmüşlerdir. Hücreler 37°C’de, nemli bir atmosferde, % 5’lik (v/v) CO_2 ’li bir ortamda inkübe edilmişlerdir.

5.5.1. *In vitro* Sitotoksisite Testi

Test edilecek toz örneklerinin, büyüme engelleyici etkilerinin olup olmadığı MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] testi ile araştırılmıştır. Hücreler deneyler için yeterli sayıya eriştiklerinde tripsinlenerek toplanmış ve Trypan Blue ile boyanarak, Thoma lamı ile sayılmış ve mililitrede 1×10^4 hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra, hücreler 96 kuyucuklu plakalara (Techno Plastic Products AG) 0,1 ml hücre süspansiyonu (1×10^3) olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin kuyucuklara yapışmaları için 24 saat beklenmiştir. Ardından besiyeri hücreler üzerinden uzaklaştırılmış ve hücreler farklı konsantrasyonlarda yeni hazırlanmış test maddeleri ile muamele edilmişlerdir. Test maddeleri, hücrelerin büyüdüğü besiyerinde seyreltilerek uygulanmıştır. İnkübasyon hacimleri; birinci gün için 100 µl, ikinci gün için 200 µl ve üçüncü ve dördüncü gün için 300 µl'dir. Test maddeleri 1000 µg/ml, 100 µg/ml ve 10 µg/ml olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. Hücreler test maddeleri ile 37°C'de, % 5 CO₂'li nemli ortamda 1, 2, 3 ve 4 gün inkübe edildikten sonra MTT testi uygulanmıştır. Hücrelerin inkübe edildiği test maddelerini içeren besiyerleri hücreler üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklara MTT çalışma solüsyonundan 100 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Plakalar % 5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde 2 saat bekletilmişlerdir. Bu sürenin sonunda MTT içeren besiyeri hücreler üzerinden uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 100 µl dimetil sülfoksida (DMSO, Riedel de Haen) ilave edilmiş ve bu şekilde 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELİSA plaka okuyucuda (Bio-Tek, ELX808IU, USA) 570 nm de ölçülmüştür. Tüm deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

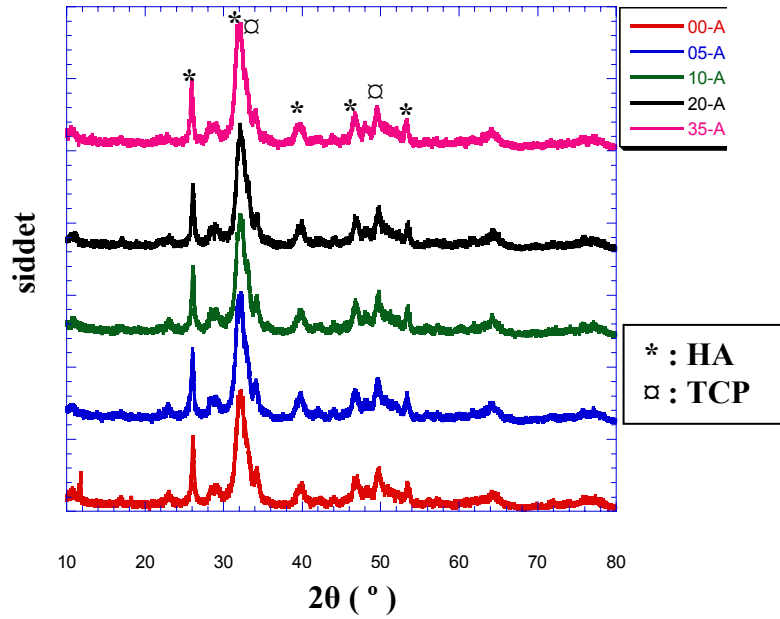
MTT testinin istatistiksel değerlendirilmeleri için SPSS programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

6. GENEL SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

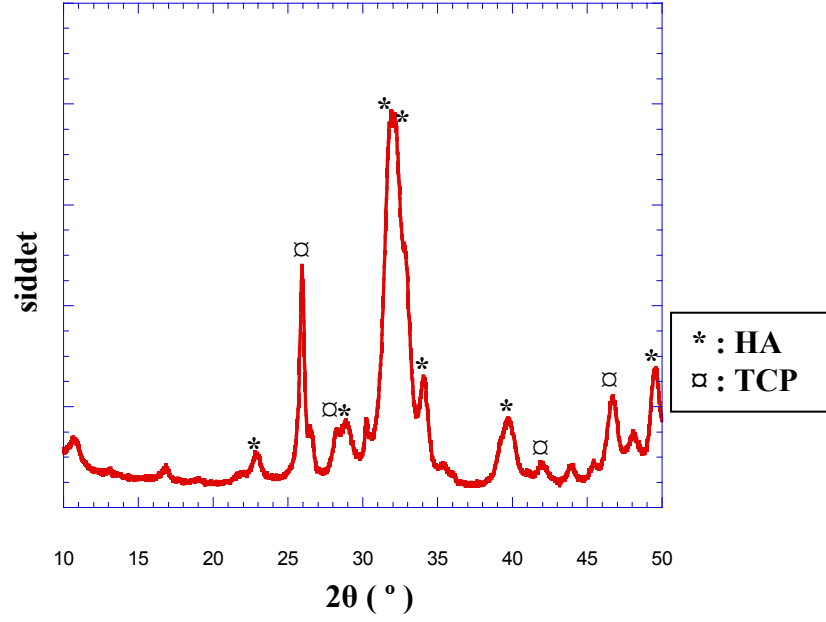
6.1. Tozun Karakterizasyonu

6.1.1. XRD analizi

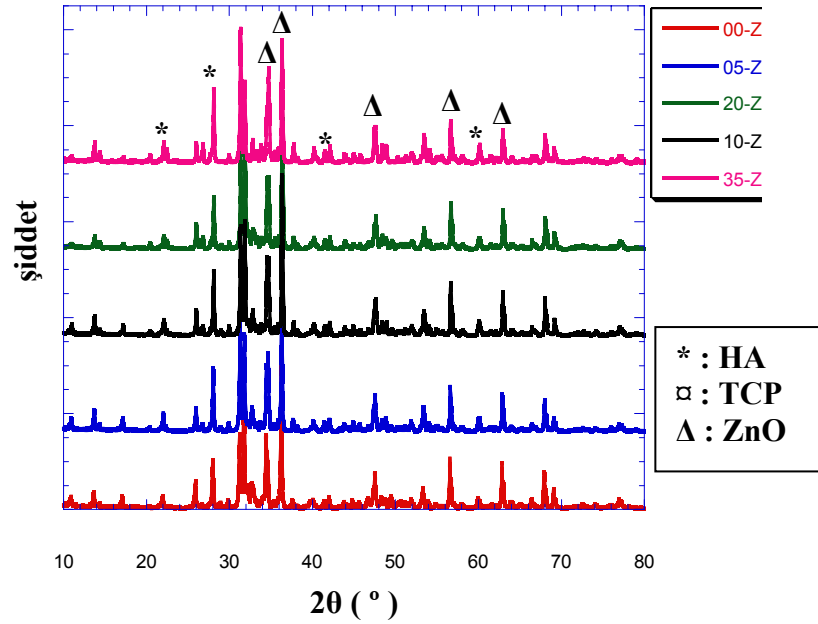
A serisi için 10-80° açıları arasında 2 °/dk hızla çekilen XRD analizi sonucunda elde edilen grafiklerdeki piklerin JCPDS kataloğundaki verilerle karşılaştırılmış ve yapının trikalsiyum fosfat (TCP) ve hidroksiapatit (HA) karışımından oluşan kalsiyum fosfat yapısında olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.1). serisinde ise HA ve TCP fazlarının dışında ayrık fazda çinko oksit yapısının olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.3). Piklerin ayırt edilebilmesi için 10-50° açıları arası 0,1 °/dk hızla tekrar analiz yapılmıştır (Şekil 6.2, Şekil 6.4).



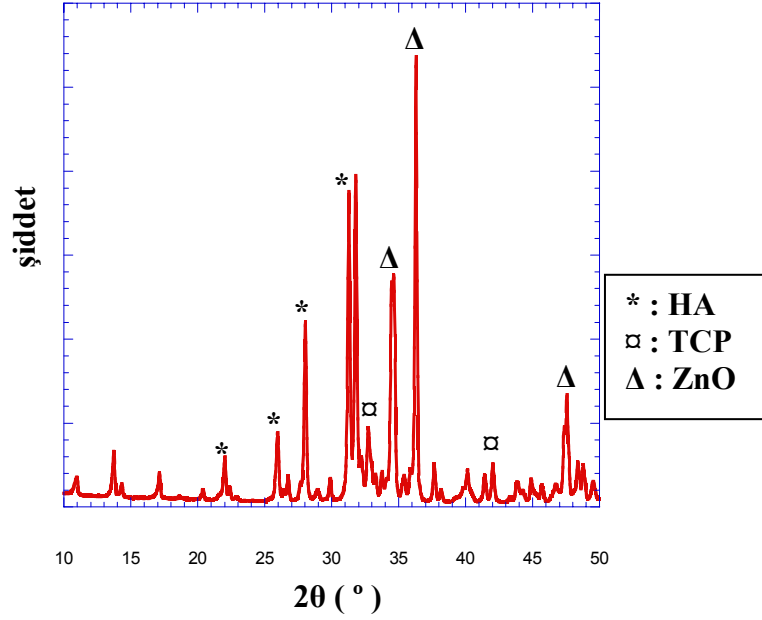
Şekil 6.1. A serisi antimikrobiyal tozun XRD analizi sonuçları



Şekil 6.2. 10A için XRD analizi sonuçları



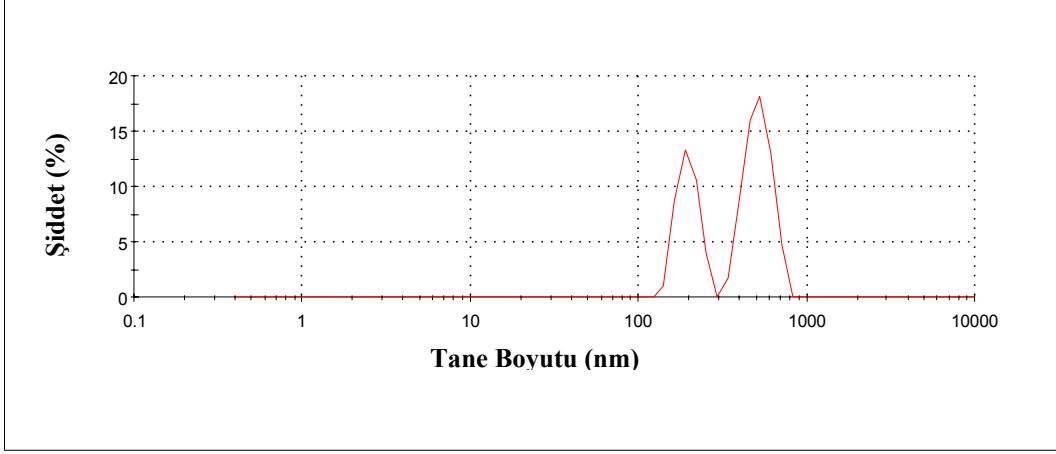
Şekil 6.3. Z serisi antimikrobiyal tozun XRD analizi sonuçları



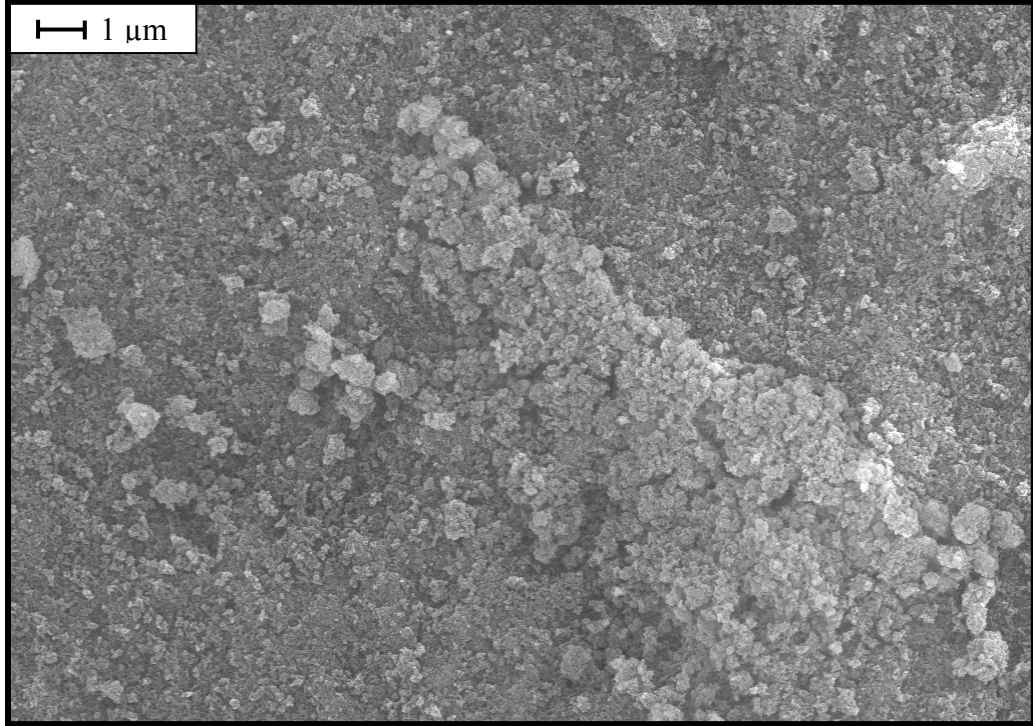
Şekil 6.4. 10Z için XRD analizi sonuçları

6.1.2. SEM ve EDX analizleri

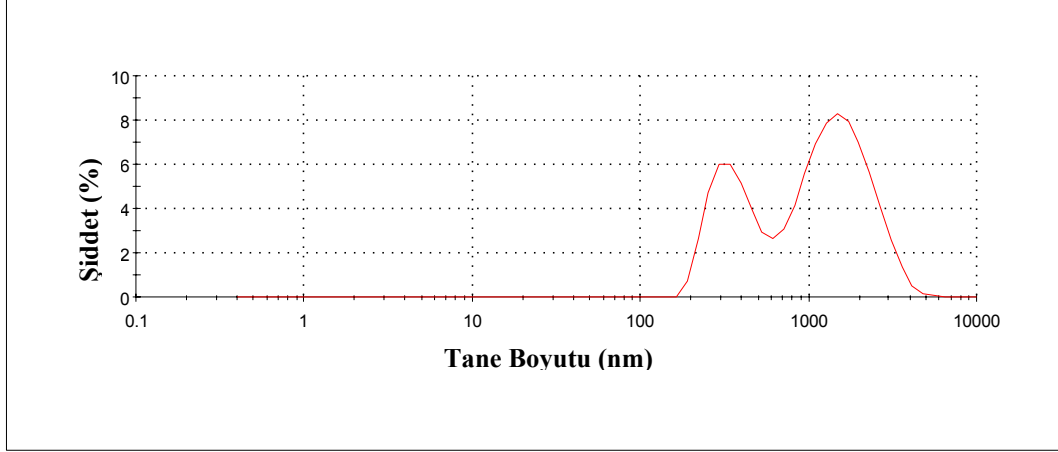
Sentezlenen antimikrobiyal toz kimyasal destekli öğütme işleminden sonra tane boyu analizi ve SEM analizleri yapılmıştır. Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun taramalı elektron mikroskobunda ikincil elektron görüntü alma tekniği ile alınan görüntülerde A serisinde sadece gümüş içeren tozun morfolojik olarak daha kesin hatlara sahip olmasına karşın, Z serisinde çinko içeren tozlar ince ve yuvarlak hatlara sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda tozların nanometre boyutunda olduğu ve tozlarda aglomerasyon eğilimi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.5, Şekil 6.6). SEM analizleri tane boyut analizleri ile desteklenmiştir. Tane boyut analizleri sonucunda A serisi tozların tane boyutu 200 nm, Z serisi tozların tane boyutu ise 300 nm olduğu belirlenmiştir.



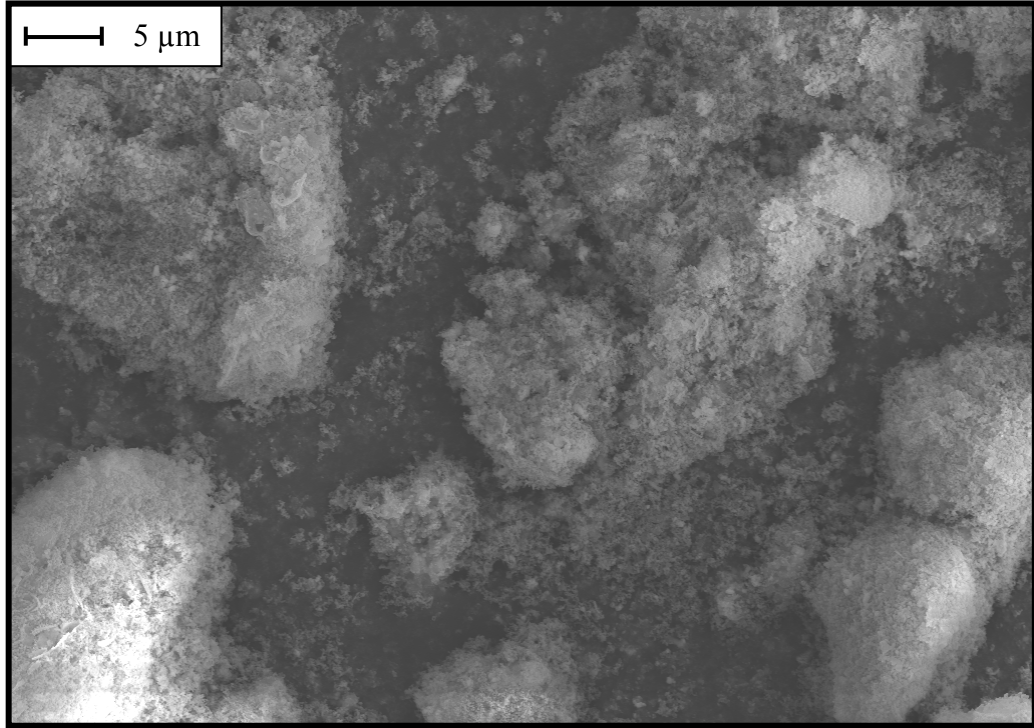
Şekil 6.5.a. 35A numunesine ait tane boyut dağılım grafiği



Şekil 6.5.b. 35A numunesine ait SEM görüntüsü

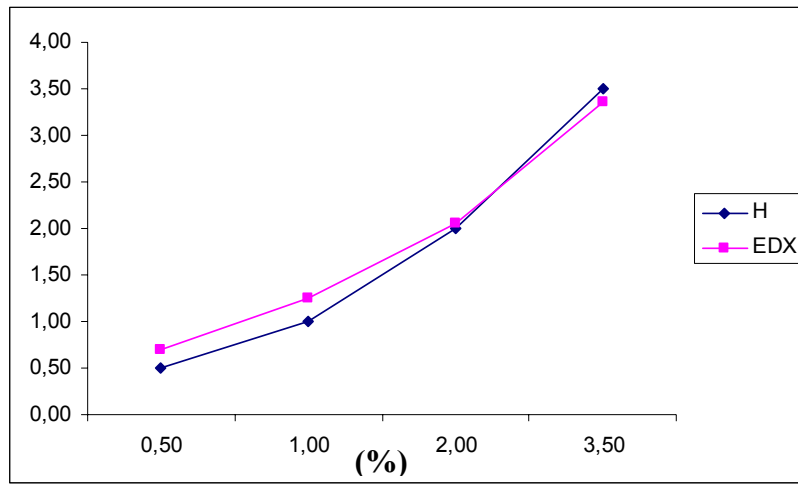


Şekil 6.6.a. 35Z numunesine ait tane boyut dağılım grafiği

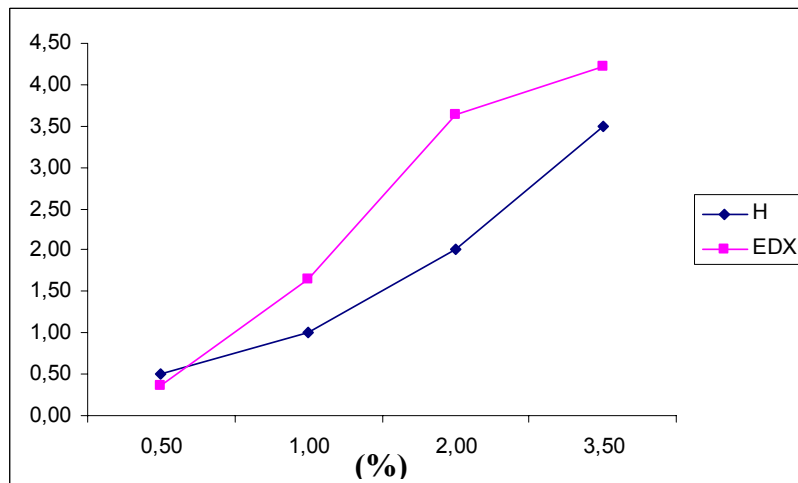


Şekil 6.6.b. 35Z numunesine ait SEM görüntüsü

Üretilen tozların kristal yapısı içerisinde hapsedilen etkin antimikrobiyal ajanların yani metal katyonların miktarlarını belirlemek üzere Enerji saçınımlı X-ışınları spektrofotometresi (EDX) kullanılmıştır. EDX ile elde edilen değerler toz üretiminde sırasında yapılan sitokiyometrik olarak hesaplanan değerlerle karşılaştırılmıştır. A serisinde yakın sonuçlar çıkmasına karşın (Şekil 6.7), Z serisinde farklı değerler gözlemlenmektedir (Şekil 6.8). Bu farklılık yaş kimyasal yöntemlerle yapılan toz sentezi sonrasında ısıl işlem sırasındaki kızdırma kayıpları olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 6.7. A serisi içerisindeki Ag⁺¹ iyonu hesaplanan değer ve EDX verilerinin karşılaştırılması

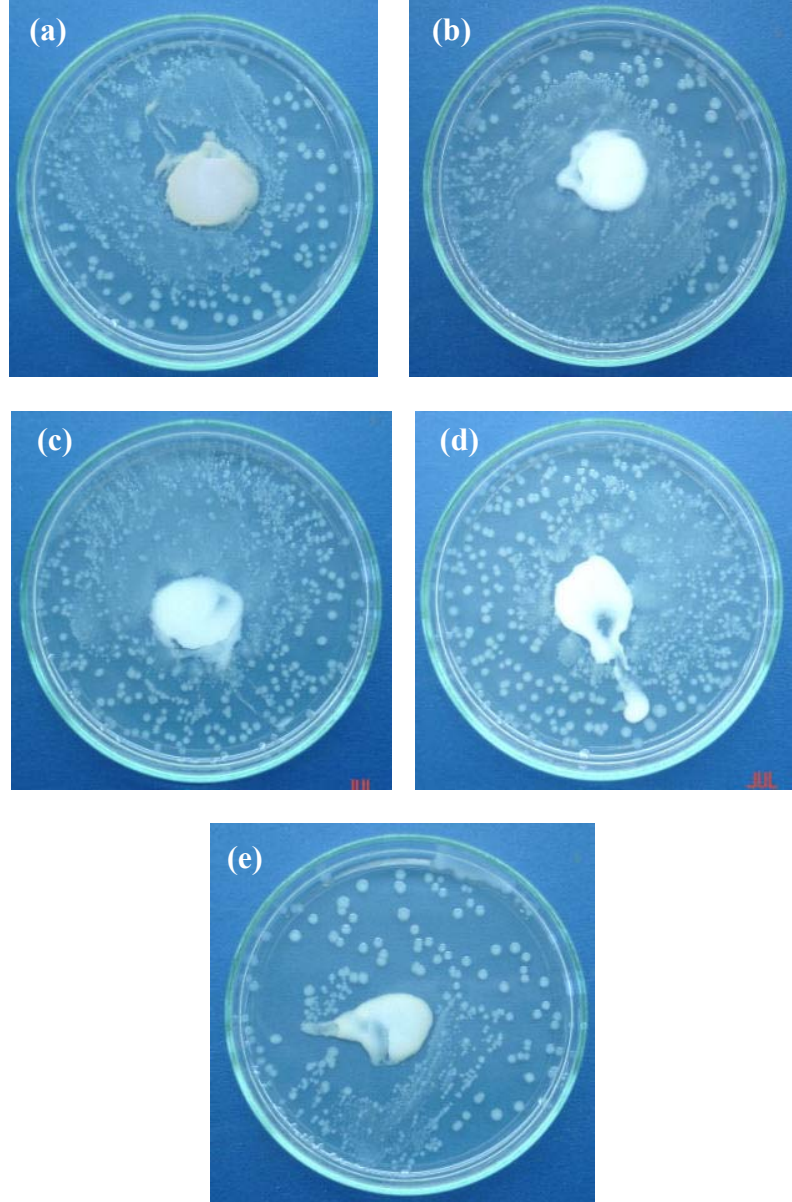


Şekil 6.8. Z serisi içerisindeki Ag⁺¹ iyonu hesaplanan değer ve EDX verilerinin karşılaştırılması

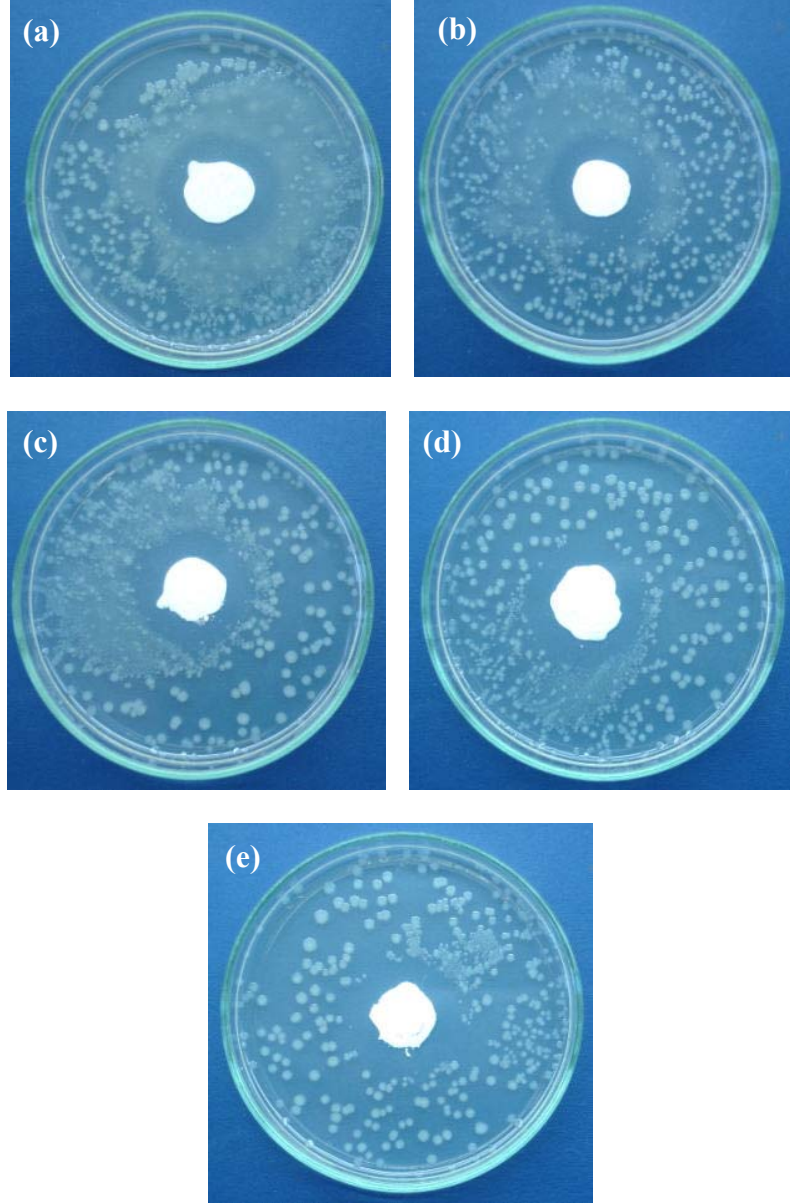
6.2. Metal İyon Katkılı Tozun Antimikrobiyal Etkinliği

6.2.1. Halo Testi

Halo test methodu kullanılarak metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozların *E.coli* bakterisine karşı antibakteriyel etkinliği saptanmıştır. Metal iyon katkısı arttıkça antibakteriyel etkinlikte artış gözlemlenmiştir. Halo test methodu sonuçları Şekil 6.9 ve Şekil 6.10 ile verilmektedir. Halo testi sonuçlarında antimikrobiyal tozun etrafında oluşan hare, bakteri büyümeyen alan, ve genel bakteri yoğunluğu görsel açıdan antimikrobiyal etkiyi göstermektedir. Tozun etrafında oluşan hare difüze olup dışarı saçılan antimikrobiyal ajanlarının (Ag^{+1} , Zn^{+2}) yayılım mesafesini ve miktarını göstermektedir.



Şekil 6.9. A serisi için halo test methodu uygulanarak yapılmış mikrobiyolojik analiz sonuçları (a) 0A (b) 05A (c) 10A (d) 20A (e) 35A



Şekil 6.10. Z serisi için halo test methodu uygulanarak yapılmış mikrobiyolojik analiz sonuçları (a) 00Z (b) 05Z (c) 10 Z (d) 20Z (e) 35Z

6.2.2. Agar Dilüsyon Testi

Agar dilüsyon methodu kullanılarak metal iyon katkılı tozun standart maya ve bakteriler (*P.aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 43300, *C.albicans* ATCC 10231) ile antimikrobiyal etkinliği saptanmıştır. Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun % 10, % 5, % 2,5, % 1,25, % 0,625 ve % 0,3125 dilüsyonları için antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. Antimikrobiyal etkinlik yüksek dilüsyonlarda şahit kompozisyon hariç diğer tozlarda saptanırken, metal iyonu katkısı arttıkça düşük dilüsyonlarda bile antimikrobiyal etkinlik görülmüştür.

Agar dilüsyon testi sonucunda A serisi için en etkin toz 35A olduğu saptanırken, 00A'nın % 10'luk konsantrasyonu *S.aureus*'a, % 10 ve % 5'lik konsantrasyonu *C.albicans*'a etkili olduğu gözlenmiş (Çizelge 6.1), 05A'nın % 10, % 5 ve % 2,5'luk konsantrasyonu tüm bakterilere, % 10, % 5, % 2,5 ve % 1,25'lik konsantrasyonlarının *C.albicans*'a etkili olduğu gözlenmiş (Çizelge 6.2), 10A'nın % 10, % 5, % 2,5 ve % 1,25'lik konsantrasyonu tüm bakterilere, kullanılan tüm konsantrasyonları *C.albicans*'a etkili olduğu gözlenmiş (Çizelge 6.3), 20A'nın % 10, % 5 ve % 2,5, % 1,25'lik konsantrasyonu tüm bakterilere, kullanılan tüm konsantrasyonlarının *C.albicans*'a etkili olduğu gözlenmiş (Çizelge 6.4) ve 35A'nın kullanılan tüm konsantrasyonlarının kullanılan bakterilerin tümüne ve *C.albicans*'a etkili olduğu gözlenmiştir (Çizelge 6.5). % 2.5 konsantrasyonda A serisi tozların standart maya ve bakterilerle yapılmış agar dilüsyon test methodu sonuçları Ekil 6.11 ve 6.12 ile verilmektedir.

Çizelge 6.1. 00A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa</i> – 24. saat	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> – 48. saat	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> - 24. saat	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> - 48. saat	+	+	+	+	+	+
<i>S.aeureus</i> -24. saat	-	+	+	+	+	+
<i>S.aeureus</i> -48. saat	-	+	+	+	+	+
<i>Candida</i> – 24. saat	-	-	+	+	+	+
<i>Candida</i> – 48. saat	-	-	+	+	+	+

Çizelge 6.2. 05A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa – 24. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa – 48. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli - 24. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli - 48. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>S.aureus -24. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>S.aureus -48. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Candida – 24. saat</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Candida – 48. saat</i>	-	-	-	-	+	+

Çizelge 6.3. 10A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa – 24. saat</i>	-	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa – 48. saat</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli - 24. saat</i>	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli - 48. saat</i>	-	-	-	-	+	+
<i>S.aureus -24. saat</i>	-	-	-	-	-	+
<i>S.aureus -48. saat</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Candida – 24. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida – 48. saat</i>	-	-	-	-	-	-

Çizelge 6.4. 20A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

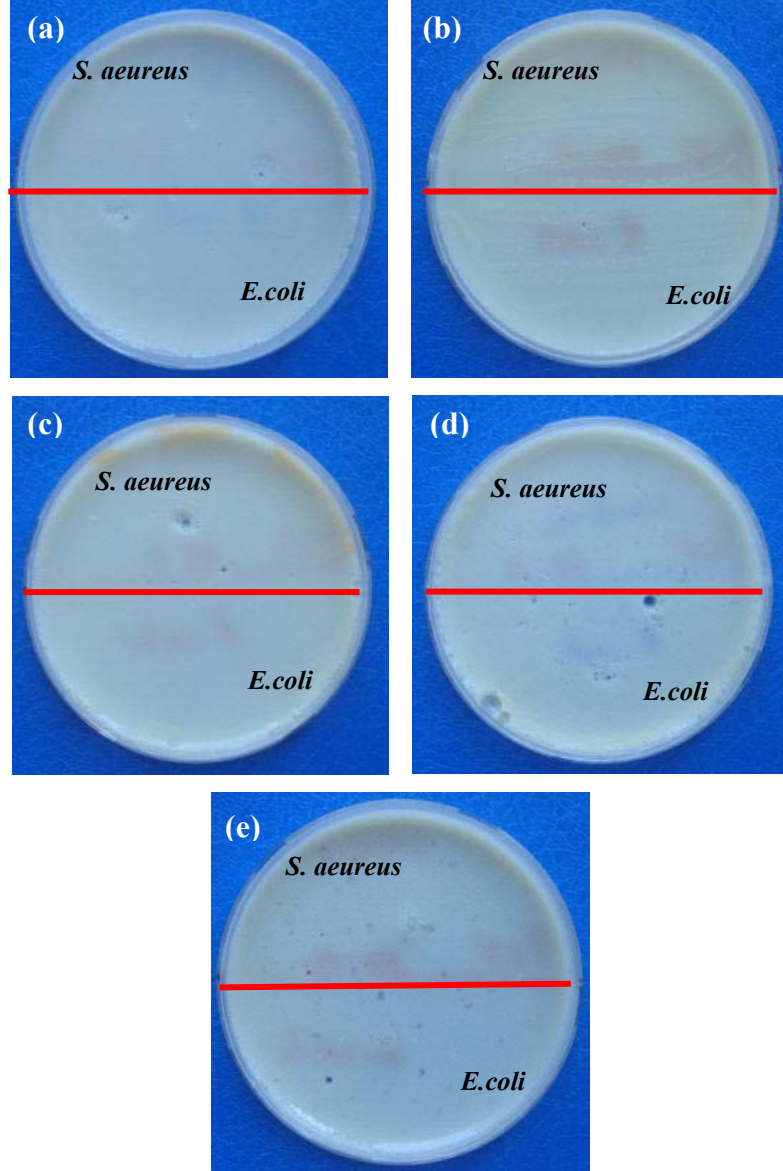
(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa – 24. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa – 48. saat</i>	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli - 24. saat</i>	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli - 48. saat</i>	-	-	-	-	-	+
<i>S.aureus -24. saat</i>	-	-	-	-	-	+
<i>S.aureus -48. saat</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Candida – 24. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida – 48. saat</i>	-	-	-	-	-	-

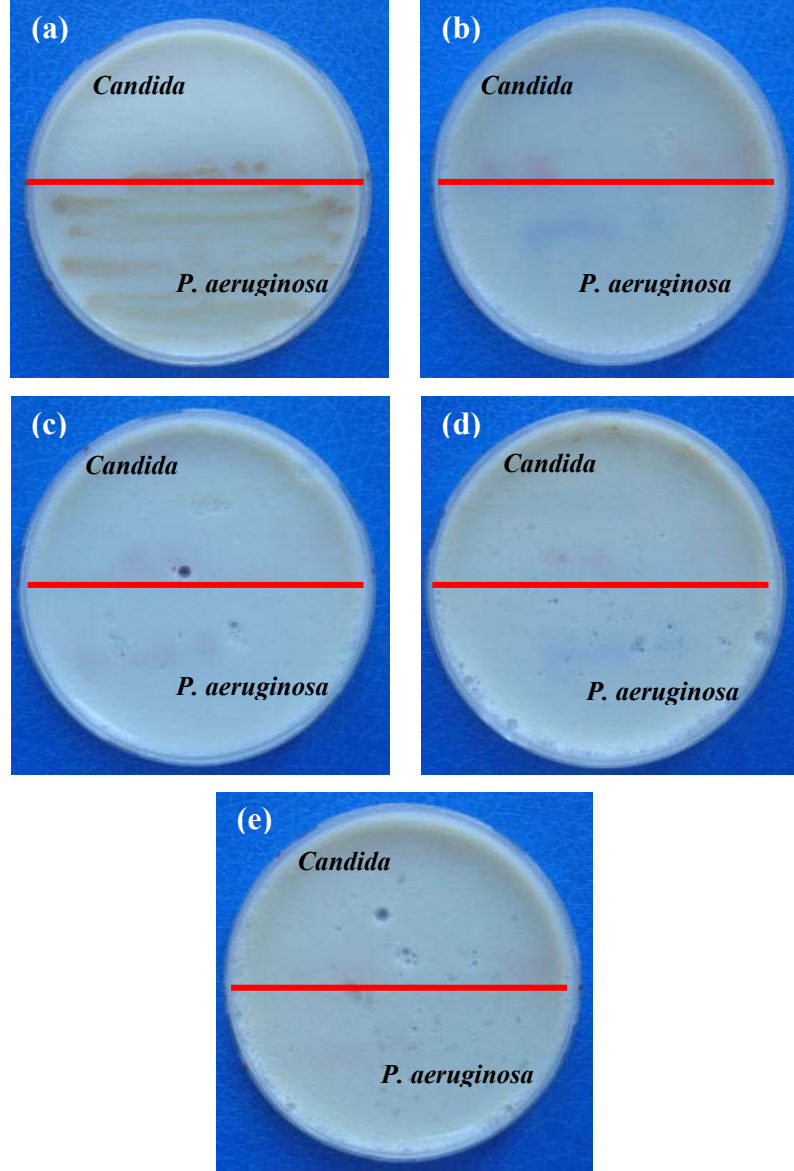
Çizelge 6.5. 35A için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa – 24. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa – 48. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli - 24. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli – 48. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus -24. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus -48. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida – 24. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida – 48. saat</i>	-	-	-	-	-	-



Şekil 6.11. %2,5 konsantrasyonda *S. aureus* ve *E. coli* için A serisi agar dilüsyon testi sonuçları (a) 00A (b) 05A (c) 10A (d) 20A (e) 35A



Şekil 6.12. %2,5 konsantrasyonda *Candida* ve *P. aeruginosa* için A serisi agar dilüsyon testi sonuçları (a) 00A (b) 05A (c) 10A (d) 20A (e) 35A

Agar test methodu sonucunda Z serisi için en etkin tozun 35Z olduğu saptanırken, 00Z'nin % 10 ve % 5'lik konsantrasyonu *E.coli*'ye, % 10, % 5,

% 2,5'lik konsantrasyonu *S.aureus*'a ve *C.albicans*'a etkili olduğu gözlenmiş (Çizelge 6.6), 05A'nın % 10, % 5 ve % 2,5'lik konsantrasyonu tüm bakterilere, % 10, % 5, % 2,5 ve % 1,25'lik konsantrasyonlarının *C. albicans*'a etkili olduğu gözlenmiş (Çizelge 6.7), 10Z'nin % 10, % 5'lik konsantrasyonu *P.aeruginosa* ve *E.coli*'ye, % 10, % 5, % 2,5'lik konsantrasyonu *S.aureus*'a, % 10, % 5, % 2,5 ve % 1,25'lik konsantrasyonu *C.albicans*'a etkili olduğu gözlenmiş (Çizelge 6.8), 20Z'nin % 10, % 5, % 2,5'luk konsantrasyonu tüm bakterilere, % 10, % 5, % 2,5 ve % 1,25'lik konsantrasyonu *C.albicans*'a etkili olduğu gözlenmiş (Çizelge 6.9) ve 35Z'nin % 10, % 5, % 2,5'luk konsantrasyonu *P.aeruginosa*'ya % 10, % 5, % 2,5 ve % 1,25'lik konsantrasyonu *E.coli*'ye, % 10, % 5, % 2,5, % 1,25 ve % 0,625'lik konsantrasyonu *C.albicans*'a, kullanılan tüm konsantrasyonlarının *S.aureus*'a etkili olduğu gözlenmiştir (Çizelge 6.10). % 2.5 konsantrasyonda Z serisi tozların standart maya ve bakterilerle yapılmı̇ agar dilüsyon test methodu sonuçları 6.13 ve 6.14 ile verilmektedir.

Çizelge 6.6. 00Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa – 24. saat</i>	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa – 48. saat</i>	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli - 24. saat</i>	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli - 48. saat</i>	-	-	+	+	+	+
<i>S.aureus -24. saat</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus -48. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Candida – 24. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Candida – 48. saat</i>	-	-	-	+	+	+

Çizelge 6.7. 05Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa – 24. saat</i>	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa – 48. saat</i>	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli - 24. saat</i>	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli - 48. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>S.aureus -24. saat</i>	-	-	-	-	+	+
<i>S.aureus -48. saat</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Candida – 24. saat</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Candida – 48. saat</i>	-	-	-	-	+	+

Çizelge 6.8. 10Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa</i> – 24. saat	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> – 48. saat	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i> - 24. saat	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> - 48. saat	-	-	+	+	+	+
<i>S.aureus</i> -24. saat	-	-	-	-	-	+
<i>S.aureus</i> -48. saat	-	-	-	+	+	+
<i>Candida</i> – 24. saat	-	-	-	-	-	+
<i>Candida</i> – 48. saat	-	-	-	-	+	+

Çizelge 6.9. 20Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

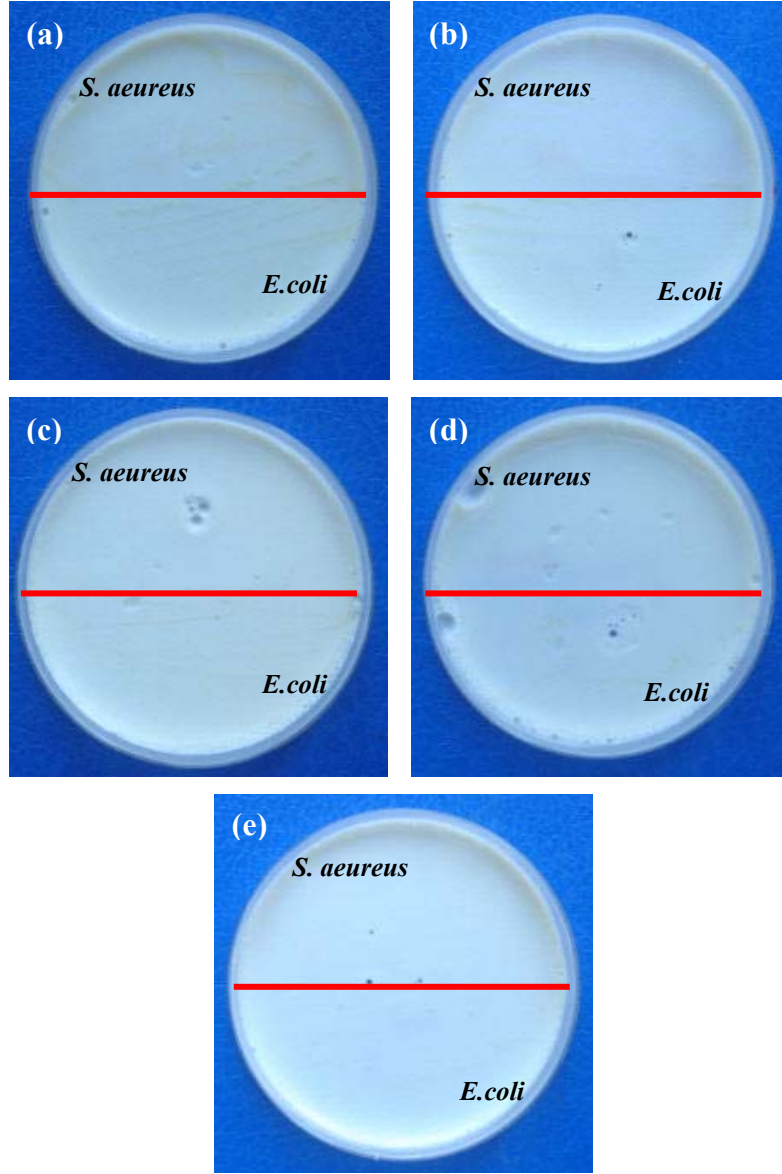
(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa</i> – 24. saat	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> – 48. saat	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> - 24. saat	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> - 48. saat	-	-	-	+	+	+
<i>S.aureus</i> -24. saat	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> -48. saat	-	-	-	+	+	+
<i>Candida</i> – 24. saat	-	-	-	-	-	+
<i>Candida</i> – 48. saat	-	-	-	-	-	+

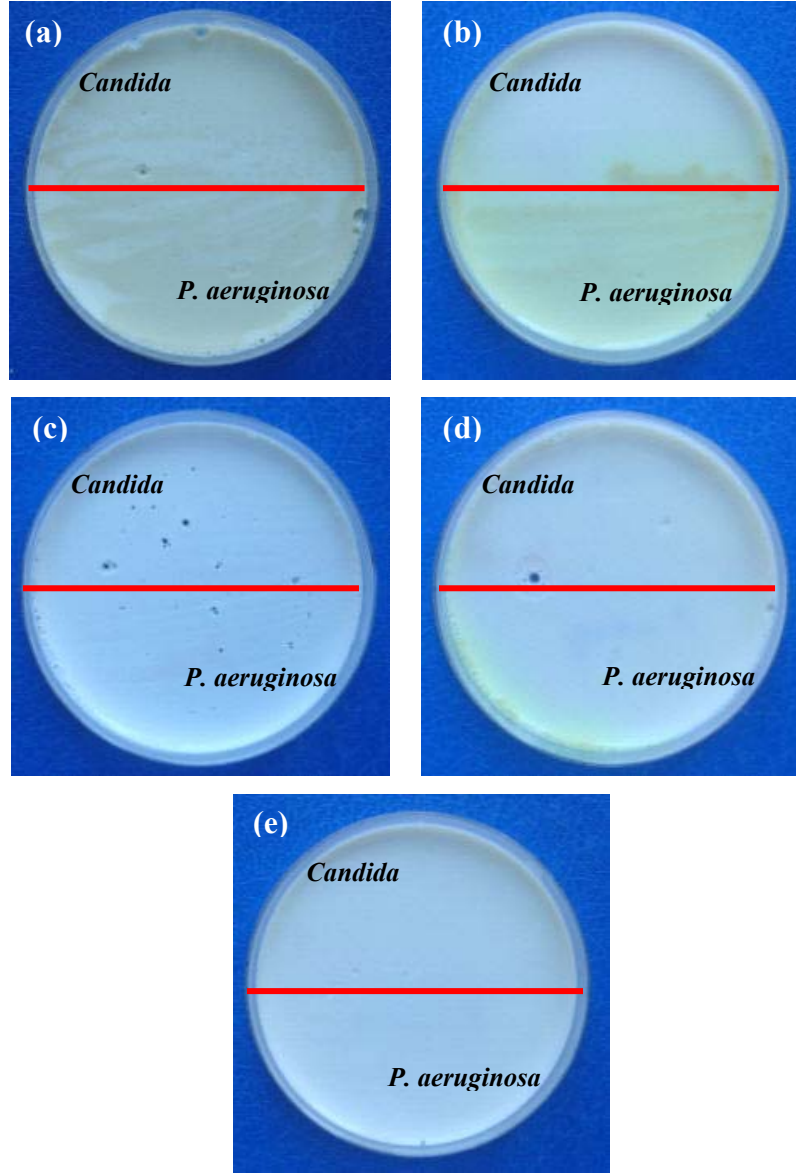
Çizelge 6.10. 35Z için agar dilüsyon methodu ile antimikrobiyal etkinlik sonuçları

(+ : bakteri üremesi gözlemlenmiştir. - : bakteri üremesi gözlemlenmemiştir)

	% 10	% 5	% 2,5	% 1,25	% 0,625	%0,3125
<i>P. aeruginosa</i> – 24. saat	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> – 48. saat	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> - 24. saat	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> – 48. saat	-	-	-	-	+	+
<i>S.aureus</i> -24. saat	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> -48. saat	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> – 24. saat	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> – 48. saat	-	-	-	-	-	+



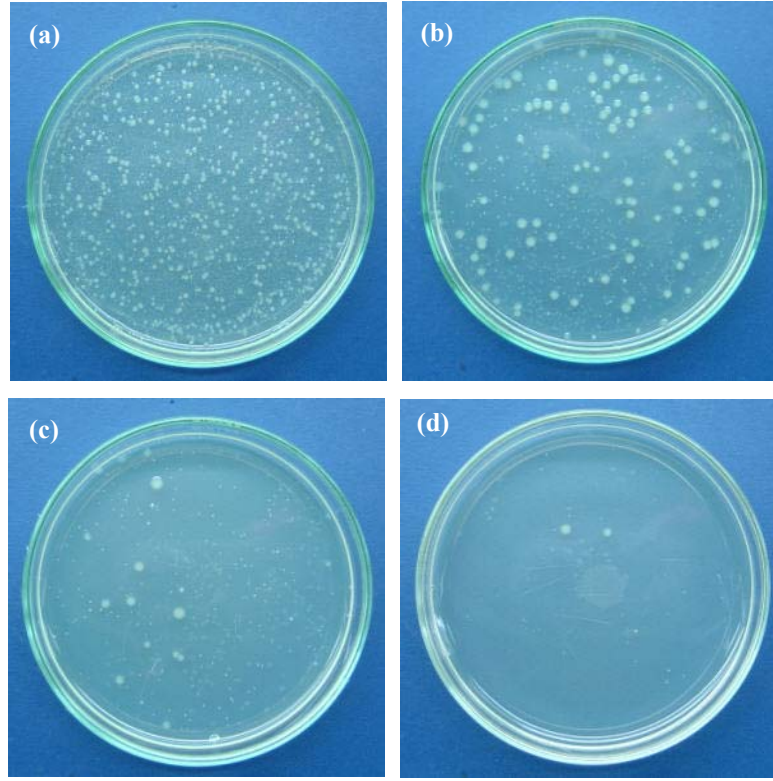
Şekil 6.13. %2,5 konsantrasyonda *S. aureus* ve *E. coli* için Z serisi agar dilüsyon testi sonuçları (a) 00Z (b) 05Z (c) 10Z (d) 20Z (e) 35Z



Şekil 6.14. %2,5 konsantrasyonda *Candida* ve *P. Aeruginosa* için Z serisi agar dilüsyon testi sonuçları (a) 00Z (b) 05Z (c) 10Z (d) 20Z (e) 35Z

6.2.3. Zaman-Etkinlik Testleri

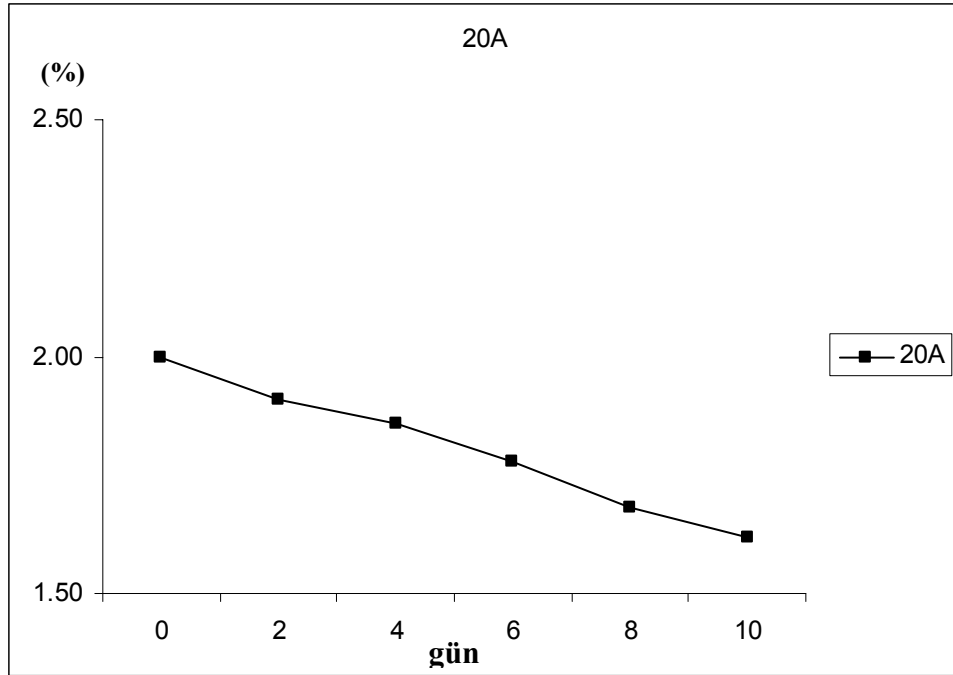
Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun etkinlik süresini belirlemek için yapılan mikrobiyolojik analizlerde tozun 1., 2., 3., 4., 5., 7., 9., 10., 15. ve 30. dakikalarda etkinliği araştırılmış ve tozun 1.dakikadan itibaren antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Zaman aralıklarının kısaltılıp implant malzemesi kaplaması olarak kullanılması düşünölen % 2 Ag⁺ içeren toz (20A) ve % 2 Ag⁺-Zn⁺² içeren tozlar (20Z) için test tekrarlanmış ve 15 saniyede antimikrobiyal etkinlik gösterdikleri gözlemlenmiştir (şekil 6.15).



şekil 6.15. şahit ve antimikrobiyal tozların zaman-etkinlik testi 15. saniye sonuçları (a) şahit ekim (b) 00A (c) 20A (d) 20Z

6.3. Sulu Sistemde Salınım Testinin Sonuçları

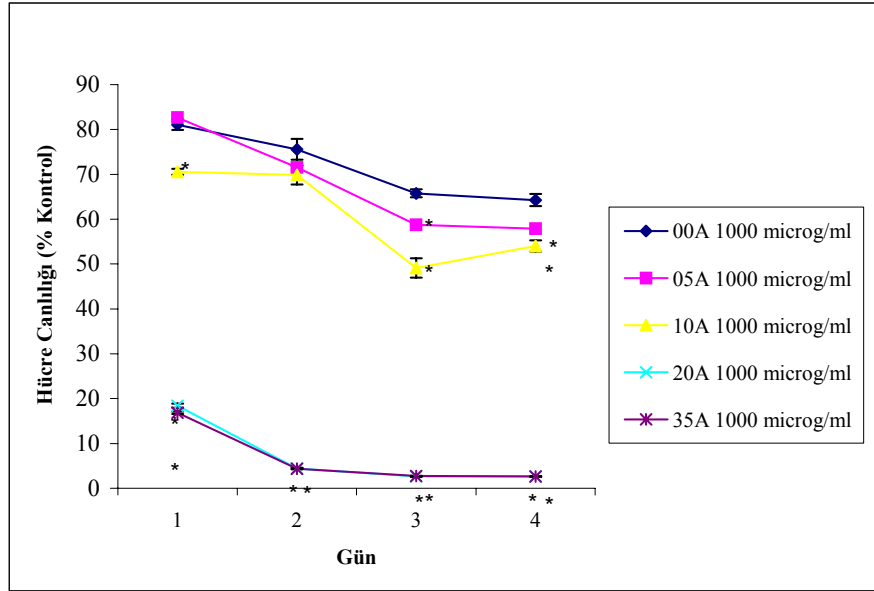
Sulu sisteme Ag^{+1} iyonu salınım miktarını belirlemek amacıyla % 2 Ag^{+1} içeren 20A tozu kullanılmış ve EDX analizleri yapılmıştır. Saf su ile karıştırılarak süspansiyon haline getirilmiş tozlardan, 2.,4.,6.,8. ve 10. gün için alınan ve kurutulan toz örneklerinin içerdiği Ag^{+1} miktarı belirlenmiştir. Ag^{+1} iyonunun sistemden kontrollü olarak salınımı söz konusudur. 10 günlük çalışma periyodunda Ag^{+1} başlangıç değerinden % 1.62 değerine düşmüş ve çalışma periyodunda lineer bir azalma gözlemlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda uzun çalışma periyotları ile lineerlik kontrol edilmeli ve buna göre Ag^{+1} için sistemden salınım sabitinin belirlenmesi gerekmektedir. Simüle edilmiş vücut sıvısında da benzer çalışmaların yapılması biyomalzeme uygulamalarında kullanılabilirlik açısından gerekmektedir. 10 gün süre ile Ag^{+1} için sistemden kaybolma miktarları Şekil 6.16 ile verilmektedir.



Şekil 6.16. 20A için Ag^{+1} sulu sistemden salınım miktarı grafiği

6.4. *In vitro* Sitotoksosite Testinin Sonuçları

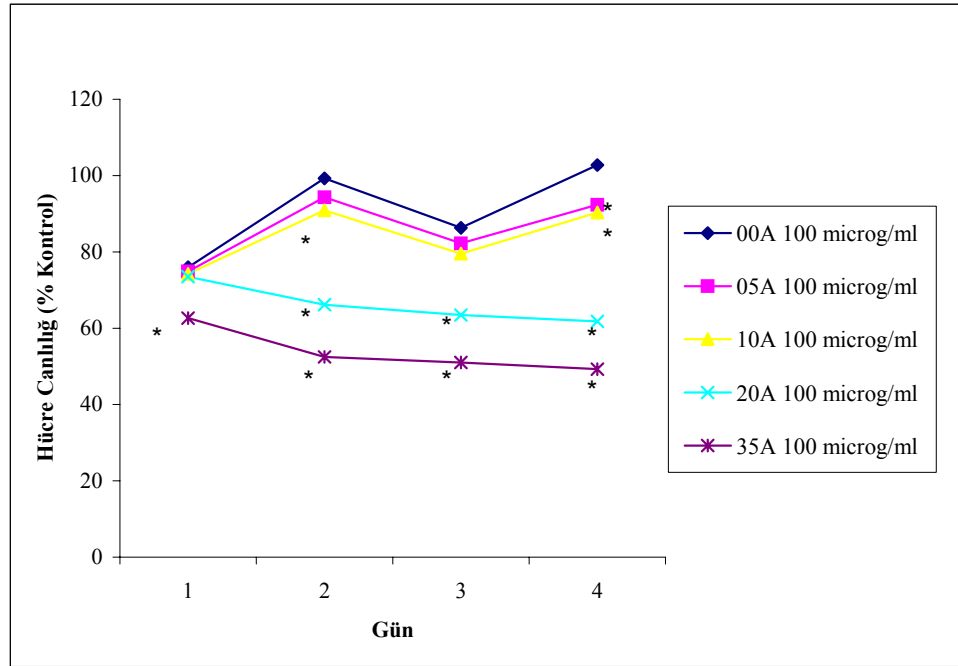
1000 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile doza bağlı sitotoksosite eğrilerinin 1, 2, 3 ve 4 günlük değerlendirilmeleri Şekil 6.17’de verilmektedir. % 0,5 Ag⁺¹ içeren kompozisyon ve şahit kompozisyonun 1000 µg/ml’lik dozu, V79 hücrelerinde ikinci günden itibaren çok düşük seviyede hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. % 1 Ag⁺¹ içeren kompozisyon birinci günden itibaren hücre sayısında düşüşe yol açmıştır. % 2 Ag⁺¹ ve % 3.5 Ag⁺¹ içeren kompozisyonların 1000 µg/ml’lik dozları 1.günden itibaren önemli sitotoksik etki göstermiştir.



Şekil 6.17. 1000 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri.

(* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir.)

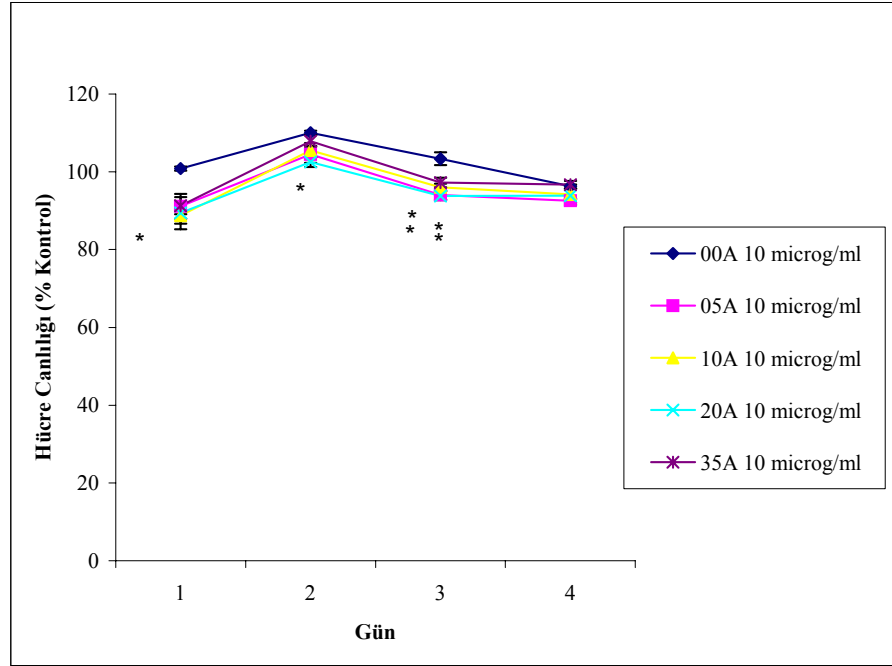
100 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile doza bağlı sitotoksosite eğrilerinin 1, 2, 3 ve 4 günlük değerlendirilmeleri Şekil 6.18’de verilmiştir. Şahit kompozisyon, % 0,5 Ag⁺¹ ve % 1 Ag⁺¹ içeren kompozisyonların 100 µg/ml’lik dozları hücre sayısında düşük oranda azalmaya neden olmuştur. % 2 Ag⁺¹ içeren kompozisyonda ise hücre sayısında azalma görülmektedir. % 3.5 Ag⁺¹ içeren kompozisyonlarda doz artışına bağlı olarak ikinci günden itibaren deney süresi boyunca sitotoksosite saptanmıştır.



Şekil 6.18. 100 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri.

(* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir.)

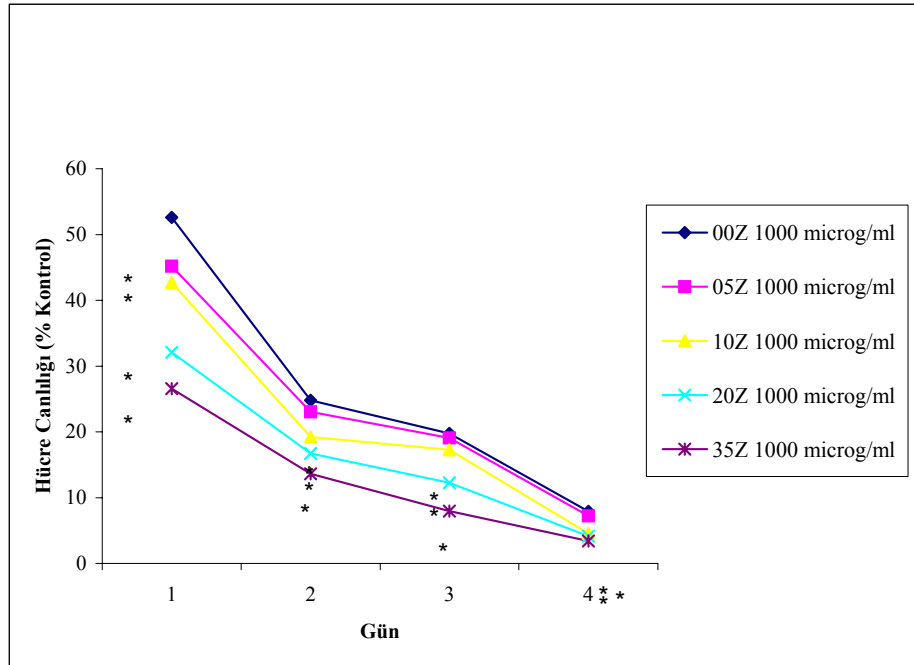
10 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile doza bağlı sitotoksosite eğrilerinin 1, 2, 3 ve 4 günlük değerlendirilmeleri Şekil 6.19'da verilmiştir. Ag⁺ içeren şahit kompozisyon ve diğer kompozisyonların 10 µg/ml'lik dozları hücre sayısında çok düşük sayıda azalmaya neden olmuştur. Bu dozlarda sitotoksik etki gözlenmemiştir.



Şekil 6.19. 10 µg/ml A serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri.

(* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir.)

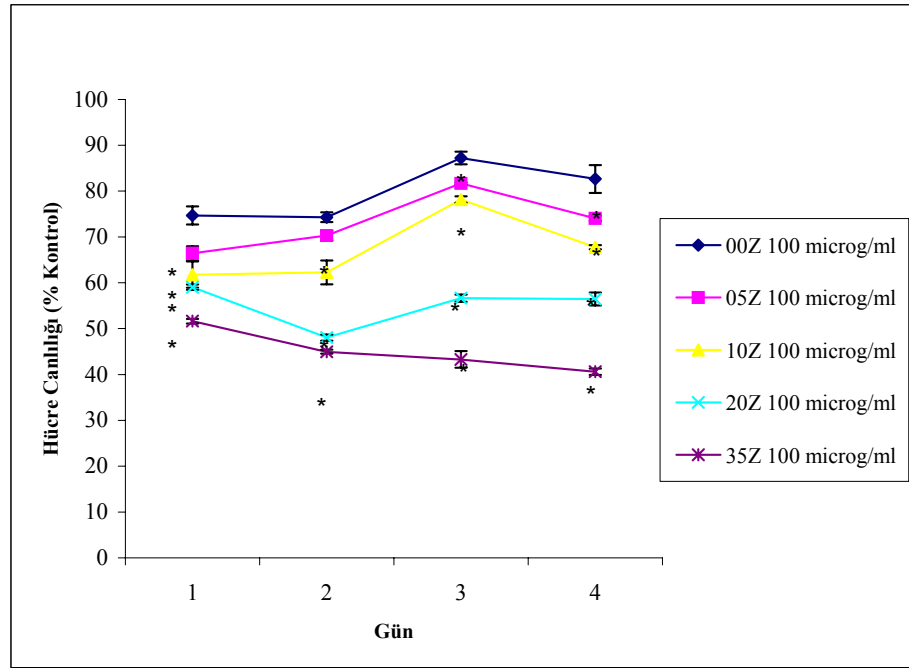
1000 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile doza bağlı sitotoksosite eğrilerinin 1, 2, 3 ve 4 günlük değerlendirilmeleri Şekil 6.20’de verilmiştir. Ag⁺¹-Zn⁺² içeren tüm kompozisyonların 1000 µg/ml’lik dozları, V79 hücreleri üzerinde dört günlük deney süresince, doz artışına bağlı olarak sitotoksik etki meydana getirdiği MTT testinin sonuçlarından belirlenmiştir. Çinko içeren şahit kompozisyon ve diğer dört kompozisyonun 1000 µg/ml’lik dozları ikinci günde hücre sayısında % 50 düşüşe neden olurken, bu etki üçüncü ve dördüncü günde de artarak sürmüştür.



Şekil 6.20. 1000 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri.

(* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir.)

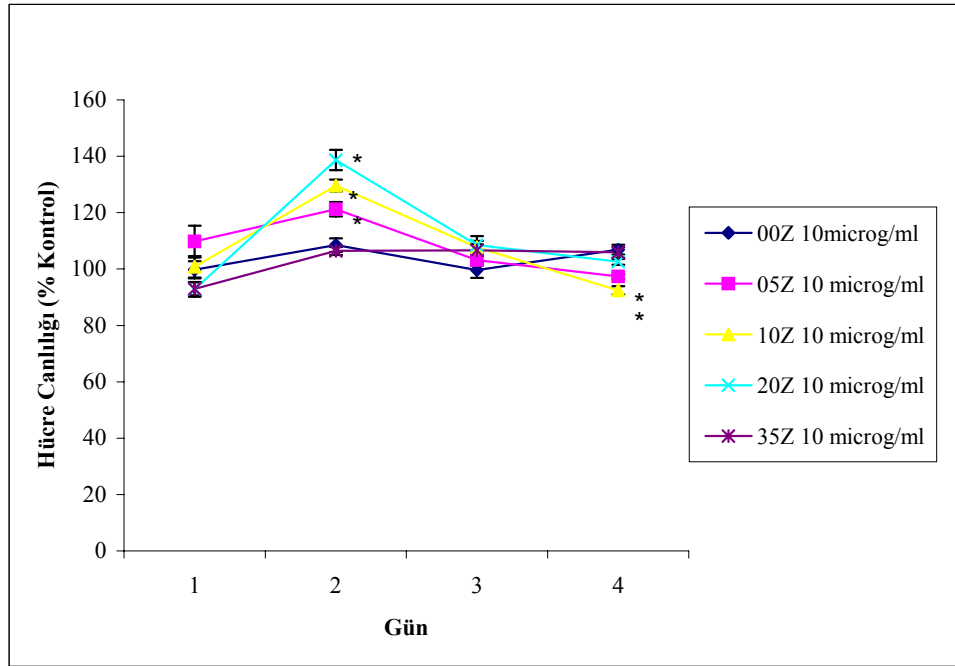
100 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile doza bağlı sitotoksosite eğrilerinin 1, 2, 3 ve 4 günlük değerlendirilmeleri Şekil 6.21’de verilmiştir. % 2 Ag⁺¹-Zn⁺² içeren kompozisyonda 100 µg/ml’lik dozda V79 hücreleri üzerinde, hücre sayısında azaltıcı etki gözlenirken, % 3.5 Ag⁺¹-Zn⁺² içeren kompozisyonda ikinci günden itibaren sitotoksik etki saptanmıştır.



Şekil 6.21. 100 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri.

(* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir.)

10 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile doza bağlı sitotoksosite eğrilerinin 1, 2, 3 ve 4 günlük değerlendirilmeleri Şekil 6.22’de verilmiştir. % 3.5 Ag⁺-Zn²⁺ içeren kompozisyon hariç diğer Ag⁺-Zn²⁺ içeren kompozisyonların 10 µg/ml’lik dozlarının, birinci ve ikinci gün hücrelerde proliferasyona sebep olduğu gözlenmiştir. Üçüncü ve dördüncü günde hücre proliferasyonu son bulmuştur. 10 µg/ml’lik dozlarda sitotoksik etki gözlenmemiştir.



Şekil 6.22. 10 µg/ml Z serisi kompozisyonların V79 hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmeleri.

(* Kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir.)

Ishikawa ve Ark. [33] tarafından yapılan bir çalışmada insan osteoblastik hücreleri üzerinde % 0.31 oranında Zn²⁺ içeren % 5’lik apaptit yapının hücrelerde sitotoksik etkiye neden olmaksızın çoğalmaya neden olduğu fakat % 0.62 oranında Zn²⁺ içeren % 10’luk apaptit yapının hücreler üzerinde sitotoksik bir etkiye yol açtığı rapor edilmiştir. Ag⁺-Zn²⁺ içeren kompozisyonların 10 µg/ml’lik dozlarının V79 hücreleri üzerinde meydana getirdiği etki, Ishikawa ve arkadaşlarının % 0.31 oranında Zn²⁺ içeren % 5’lik apaptit yapının hücrelerde

meydana getirdiği etki ile uyuşmaktadır. Doz artışına bağlı olarak meydana gelen sitotoksik etki de sonuğlarımızı desteklemektedir.

7. ÖNERİLER

Yapılan çalışmalarda metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı toz farklı oranlarda metal iyonu içeriği ile son pH 5.5 olacak şekilde sentezlenmiştir. Tozun karakterizasyonu sonucunda metal iyonu olarak sadece Ag^{+1} içeren A serisi tozların hidroksiapatit ve trikalsiyumfosfat fazlarını içerdiği belirlenmiştir. Tane boyut analizleri ile desteklenen SEM görüntüleri sonucunda tozun tane boyutu 200 nm olduğu belirlenmiştir. A serisi tozların mikrobiyolojik analizleri sonucunda ise standart maya ve bakterilerle yapılan testler ile antimikrobiyal etkinlik saptanmıştır. Metal iyonu katkısı arttıkça antimikrobiyal etkinlik artmaktadır. Sitotoksikite deneyleriyle A serisi tozların belirli dozların altında sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Metal iyonu olarak Ag^{+1} ve Zn^{+2} içeren Z serisi tozların karakterizasyonları sonucunda hidroksiapatit ve trikalsiyumfosfat fazlarının yanı sıra çinko oksit fazı görülmüştür. SEM görüntülerinde tozun tane boyutunun nanometre seviyelerinde olduğu görülmüş ve tane boyut analizi neticesinde tozun tane boyutunun 300 nm olduğu belirlenmiştir. Z serisi tozların mikrobiyolojik analizleri sonucunda standart maya ve bakterilerle yapılan testler ile antimikrobiyal etkinlik saptanmıştır. Metal iyonu katkısı arttıkça antimikrobiyal etkinlik artmaktadır. Sitotoksikite deneyleriyle Z serisi tozların belirli dozlarda hücre büyümesine sebep olduğu ve sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

İleriki çalışmalarda implant malzemelerinden eksternal fiksatörlerin kemiğe sabitlenmesi için kullanılan çivilerin tümünün vücut içerisinden olmaması ve uzun süre insan vücudunda kaldığı düşünülerek, bu çivilerin metal katyon katkılı hidroksiapatit esaslı seramik toz ile farklı kaplama yöntemi kullanılarak kaplanması ve tavşanlar üzerinde deneysel çalışmaların yapılması planlanmaktadır. Eksternal fiksasyon tellerinin metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı seramik toz ile kaplanması, eksternal fiksasyonun en ciddi ve sık görülen komplikasyonları olan çivi yolu enfeksiyonu ve tel gevşemesi sorununu azaltabileceği düşünülmektedir. Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun vücut içi difüzyon oranlarının belirlenmesi ve hayvan deneylerinin yapılması gerekmektedir. Hidroksiapatit implantın sıkıca kemiğe tutunmasını sağlarken

içeriğindeki metal katkısı ile amaçlanan antimikrobiyal etkinlik sağlanıp, enfeksiyon riski önlenileceği düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] AKDUR, R., *Çağdaş Sağlık ve Sağlık Hizmetleri Kavramları, Bu Kavramlara Etki Eden Dinamikler*, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları (1998).
- [2] ÜÇİŞİK, H. A., *Klinik Gelişim*, İstanbul Tabip Odası, 7, 12, 3375-3378 (1994).
- [3] GÜMÜŞDERELİOĞLU, M., *Bilim ve Teknik*, Temmuz, 1-23 (2002).
- [4] ALTINTAŞ, M., *Klinik Gelişim*, İstanbul Tabip Odası, 7, 12, 3408-3412 (1994).
- [5] RATNER, D. B., HOFFMAN S. A., SCHOEN J. F. ve LEMONS E.J., *Biomaterials Science*, Academic Press, USA (1996).
- [6] HOLMES, E. R., *Plastic Surgery*, 1, Saunders Company, USA (1990).
- [7] DUCHEYNE, P. ve HASTINGS, W. G., *Metal and Ceramic Biomaterials*, 1, CRC Press, USA (1984).
- [8] SILVER, H. F. ve CHRISTIANSEN L. D., *Biomaterials Science and Biocompatibility*, Springer, USA (1999).
- [9] KATTI, S. K., *Biomaterials in total joint replacement*, Colloids and Surfaces B:Biointerfaces, 39, 133-142 (2004).
- [10] HENCH, L. ve WILSON, J., *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, Singapore (1993).
- [11] AKMAN, M. ve GÜLMEZOĞLU, E., *Tıbbi Mikrobiyoloji*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları (1976).
- [12] http-1: http://www.TiO2_Centre_files\TiO2_Centre.htm
- [13] http-2: <http://www.dscera.co.kr>
- [14] BROOKS, G. F., BUTEL, J. S., ORNSTON, L. N., JAWESTZ, E., MELNICK J.L. ve ADELBERG, E. A., *Medical Microbiology*, (1991).
- [15] ZHAO, G. ve STEVENS, S. E., *Multiple Parameters for the Comprehensive Evaluation of the Susceptible of Escherichia_coli to the Silver Ion*, Biomaterials, 11, 27-32 (1998).

- [16] ÖZTÜRK, R., *Antiseptik ve Dezenfektan Maddeler Karşı Direnç Sorunu*, Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları, Simad Yayınları, **1**, 41-60 (2004).
- [17] KAWASHITA, M., TSUNAYAMA, S., MIYAJI, F., KOKUBO, H., KOZUKA, H. ve YAMAMOTO, K., *Antibacterial Silver-Containing Silica Glass Prepared by Sol-Gel Method*, Biomaterials, **21**, 393-398 (2000).
- [18] BİLGEHAN, H., *Klinik Mikrobiyoloji*, Barış Yayınları (2000).
- [19] [http-3: www.lbl.gov](http://www.lbl.gov)
- [20] [http-4: www.astrographics.com](http://www.astrographics.com)
- [21] HÖKELEK, M., *Hastanede Sorun Olan Mikroorganizmalar : Parazit ve Mantarlar*, 3.Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kongre Kitabı, 408-419 (2003).
- [22] BAŞARAN, A., *Tıbbi Biyoloji*, (1985).
- [23] TEMİZ, A., *Genel Mikrobiyoloji Teknikleri*, Hatipoğlu Yayınevi (1996).
- [24] BİLGEHAN, H., *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, Barış Yayınları (1992).
- [25] MURRAY, R.P., BARON, J. E., PFALLER, A. M., JORGENSEN, H. J. ve YOLKEN, H. J., *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, (2003).
- [26] GÜRGÜN, V. ve HALKMAN, A., *Mikrobiyolojik Sayım Yöntemleri*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, (1990).
- [27] GROTH, T., FALCK, P. ve MIETHKE, R. R., *Cytotoxicity of Biomaterials-Basic Mechanisms and In Vitro Test Methods: A Review*, ATLA, **23**, 790-799 (1995).
- [28] GERMAIN, M.A., HATTON, A., WILLIAMS, S., MATTHEWS, J.B., STONE, M.H., FISHER, J. ve INGHAM, E., *Comparison of the cytotoxicity of clinically relevant cobalt-chromium and alumina ceramic wear particles in vitro*, Biomaterials, **24**, 469-479 (2003).
- [29] FOTAKIS, G. ve TIMBRELL, J.A., *In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*, Toxicology Letters, **160**, 171-177 (2006).

- [30] MARQUES, A.P., REIS, R.L. ve HUNT, J.A., *The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies*, *Biomaterials*, **23**, 1471-1478 (2002).
- [31] WU, C., CHANG, J., WANG, J., NI, S. ve ZHAI, W., Preparation and characteristics of a calcium magnesium silicate (bredigite) bioactive ceramic, *Biomaterials*, **26**, 2925-2931 (2005).
- [32] MOSSMANN, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, *J Immunol Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- [33] VISTIKA, D.T., SKENAN, P., SCUDIERO, D., MONKS, A., PITTMANN, A. ve BOYD, M.R., *Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production*, *Cancer Res*, **51**, 2515-2520 (1991).
- [34] ISHIKAWA, K., MIYAMOTO, Y., YUASA, T., ITO, A., NAGAYAMA, M. ve SUZUKI, K., *Fabrication of Zn containing apatte cement and its initial evaluation using human osteoblastic cells*, *Biomaterials*, **23**, 423-428 (2002).