

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**KİTOSAN VE KURKUMİN İLE KAPLANAN MİNİ
VİDALARIN OSSEOİNTEGRASYONUNUN HİSTOLOJİK
VE MOLEKÜLER DÜZEYDE İN VİVO RAT MODELİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Elif Banu ÖZKAN

**Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ertan YALÇIN**

**ERZURUM
2021**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik.....	4
2.1.1. Kemik Dokusunun Makroskopik Yapısı	5
2.1.2. Kemik Hücreleri	6
2.1.2.1. Osteoprogenitör Hücreler	6
2.1.2.2. Osteoblastlar	6
2.1.2.3. Osteositler	7
2.1.2.4. Osteoklastlar	7
2.1.3. Kemik Remodelasyon Markerları.....	7
2.1.3.1. Osteoprotegrin	8
2.1.3.2. RANK-RANKL	8
2.1.3.3. RUNX2	11
2.1.3.4. Osteokalsin.....	13
2.2. Titanyum İmplantlar	13
2.3. Kemik-Titanyum İmplant Bağlantısı	14
2.3.1. Osseointegrasyon	14

2.3.1.1. Moleküler Düzeyde Osseointegrasyon	14
2.3.2. Fibroosseöz Retansiyon	16
2.3.3. Biyointegrasyon	17
2.4. Biyomateryaller Ve Fizikokimyasal Özellikleri	18
2.4.1. Kitosan Materyallerin Yapı Ve Özellikleri.....	18
2.4.1.1. Kitosanın Kullanım Alanları.....	19
2.4.1.2. Kemik Remodelasyonu Ve Osseointegrasyon Sürecinde Kitosan	20
2.4.2. Kurkumin Materyallerin Yapı Ve Özellikleri.....	21
2.4.2.2. Kemik Remodelasyonu Ve Osseointegrasyon Sürecinde Kurkumin	22
2.5. Kitosan Ve Kurkumin Materyal İle Titanyum İmplantları Kaplama Yöntemleri ...	23
2.5.1. Çözelti Dökümü.....	23
2.5.2. Silanizasyon	24
2.5.3. Çok Tabakalı Kaplama	25
2.5.4. Elektrokimyasal Depozisyon	26
2.6. Kaplamaların Karakterizasyon Yöntemleri	29
2.6.1. Foton Temelli Yöntemler.....	30
2.6.1.1. X-Işını Kırınımı Analizi (XRD)	30
2.6.2. Mikroskopik Yöntemler.....	31
2.6.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	31
3. MATERYAL METOD	33
3.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması.....	33
3.2. Titanyum Vidaların Yüzey Kaplama İşlemi	34
3.3. Kaplama Yüzeyinin Özelliklerinin Belirlenmesi.....	36
3.4. Cerrahi Yöntem.....	39
3.5. Histolojik İnceleme.....	44

3.6. Moleküler İnceleme	45
3.7. İstatiksel Analiz	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Histolojik Bulgular	48
4.2. Moleküler Analiz Bulguları	56
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR	79
EKLER	101
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	101
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	102

TEŞEKKÜR

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi uzmanlık eğitimimde, bütün akademik faaliyetlerimde ve tezimin hazırlanmasında değerli bilgilerini, tecrübelerini, zamanını ve desteğini benden esirgemeyen, tez çalışmamın her aşamasını titizlikle yöneten saygıdeğer danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ertan YALÇIN'a, eğitimim boyunca her türlü desteği esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, Sayın Prof. Dr. Ümit ERTAŞ'a, Sayın Prof. Dr. Ertunç DAYI'ya, Sayın Doç. Dr. Adnan KILINÇ'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gelengül URVASIZOĞLU'na ve diğer öğretim üyesi hocalarıma, tez çalışmam süresince her türlü bilgi ve desteği sağlayan Sayın Prof. Dr. Zekai HALICI'ya, Sayın Prof. Dr. Tuba ÖZNÜLÜER ÖZER'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Betül GÜNDOĞDU'ya, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D.'da birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma, hayatımın her döneminde varlığını hissettiren ve yol gösteren sevgili aileme ve eşim Dt. Ersel ÖZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dt. Elif Banu ÖZKAN

ÖZET

Kitosan ve Kurkumin İle Kaplanan Mini Vidaların Osseointegrasyonunun Histolojik ve Moleküler Düzeyde in Vivo Rat Modelinde Değerlendirilmesi

Amaç: Deneysel olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın amacı, kitosan ve kurkuminin bir biyoaktif kaplama halinde kullanılarak osseointegrasyona olan etkilerini postoperatif 2. ve 6. haftalarda değerlendirmektir.

Materyal ve Metod: Çalışmada 2.2x4 mm çapında 80 adet standart titanyum mini vida, 80 adet Sprague dawley cinsi ratlara ait femurların facies patellarisin anteromedial bölgesine yerleştirilmiştir. Deney grupları, femur üzerine uygulanan 4 farklı mini vida çeşidine ve 2 ila 6 haftalık takip sürelerine göre belirlenmiştir. Elektrokimyasal depozisyon yöntemiyle titanyum vidalara sırasıyla kitosan (CH-Ti-2h, CH-Ti-6h), kurkumin (CU-Ti-2h, CU-Ti-6h) ve kitosan-kurkumin (CH-CU-Ti-2h, CH-CU-Ti-6h) kaplama yapılmıştır. Kontrol grubu olarak belirlenen deney hayvanlarına yerleştirilmek üzere non-modifiye titanyum vidalar (NM-Ti-2h, NM-Ti-6h) ayrılmıştır. Vida üzerine uygulanan biyoaktif kaplamanın morfolojisi XRD ve SEM yöntemleri ile incelenmiştir. Cerrahi işlem esnasında deneklere %2'lik Ksilazin (10 mg/kg) (Xylazinbio, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) ve %10'luk Ketamin HCl (50 mg/kg) (Ketalar®, Pfizer, New York, ABD) anestezisi uygulanmıştır ve femur yüzeyi açılarak mini vidalar yerleştirilmiştir. Deney hayvanları histolojik ve moleküler incelemelerin yapılması için postoperatif 2. ve 6. haftalarda %100 CO₂ ile sakrifiye edilmiştir.

Bulgular: Vida çevresinden alınan doku örnekleri incelendi. Yeni kemik oluşumunun CH-CU-Ti uygulanan gruplarda ileri seviyede olduğu, osteoklast sayısının en az bu grupta olduğu görüldü (p<0.05). RUNX2 ekspresyon seviyesi CH-Ti uygulanan gruplarda en fazla iken, OPG ve OC ekspresyon seviyeleri en fazla CH-CU-Ti uygulanan gruplarda bulundu. RANKL ekspresyon seviyesi CH-CU-Ti ve CU-Ti uygulanan gruplarda en düşük izlendi (p>0.05). Fibrotik doku yoğunluğu açısından gruplar arasında fark gözlenmedi (p>0.05).

Sonuç: Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre kitosan-kurkumin kaplamanın, kemik remodelasyonunu erken ve geç dönemde etkileyerek, osseointegrasyonu artırdığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Osseointegrasyon, kitosan, kurkumin, elektrokimyasal depozisyon

ABSTRACT

Evaluation of Osseointegration of Mini Screws Coated with Chitosan and Curcumin in In Vivo Rat Model at Histological and Molecular Levels

Objective: The aim of this experimental study is to evaluate the effects of chitosan and curcumin on osseointegration by using a bioactive coating at the 2nd and 6th weeks postoperatively.

Materials and Methods: In the study, 80 standard titanium mini screws with a diameter of 2.2x4 mm were placed in the anteromedial region of the facies patellaris of the femurs of 80 Sprague dawley rats. The experimental groups were determined according to the 4 different types of mini screws applied on the femur and the 2 to 6 weeks follow-up period. Chitosan (CH-Ti-2h, CH-Ti-6h), curcumin (CU-Ti-2h, CU-Ti-6h) and chitosan-curcumin (CH-CU-Ti-2h, CH-CU-Ti-6h), respectively, to titanium screws by electrochemical deposition method. coating has been made. Non-modified titanium screws (NM-Ti-2h, NM-Ti-6h) were reserved for placement in the experimental animals determined as the control group. The morphology of the bioactive coating applied on the screw was examined by XRD and SEM methods. During the surgical procedure, subjects were anesthetized with 2% Xylazine (10 mg / kg) (Xylazinbio, Bioveta, Czech Republic) and 10% Ketamine HCl (50 mg / kg) (Ketalar®, Pfizer, New York, USA) and mini screws were placed after exposing the femoral surface. Experimental animals were sacrificed with 100% CO₂ at postoperative 2nd and 6th weeks for histological and molecular examinations.

Results: Tissue samples taken from around the screw were examined It was observed that new bone formation was advanced in the groups treated with CH-CU-Ti and the number of osteoclasts was the least in this group ($p < 0.05$). RUNX2 expression level was highest in CH-Ti applied groups, OPG and OC expression levels were highest in CH-CU-Ti applied groups. RANKL expression level was the lowest in CH-CU-Ti and CU-Ti groups ($p > 0.05$). There was no difference between the groups in terms of fibrotic tissue density ($p > 0.05$).

Conclusion: According to the findings obtained from our study, it was determined that chitosan-curcumin coating increased osseointegration by affecting bone remodeling in the early and late periods.

Keywords: Osseointegration, chitosan, curcumin, Electrochemical deposition

KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	alkalen fosfataz
ark.	arkadaşları
BMP	kemik morfojenik protein
Ca	kalsiyum
Ch	kitosan
CH-CU-Tİ	kitosan+kurkumin grubu
CH-Tİ	kitosan grubu
ct	cycle threshold/ eşik değeri
Cu	kurkumin
CU-Tİ	kurkumin grubu
EDX	Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi
EPD	Elektrokimyasal depozisyon
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
HA	Hidroksiapatit
mM	milimol
MSC	multipotent mezenkimal kök hücre
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
ng	nanogram
Ni-Ti	nikel-titanyum
Nm	nanometre
NM-Tİ	non-modifiye titanyum grubu
OC	osteokalsin
OCN	osteonektin
OPG	osteoprotegrin
OPN	osteopontin
OSX	Osterix
P	fosfat
RANK	Nükleer faktör kappa-B'nin reseptör aktivatörü
RANKL	RANK ligandı

RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
RUNX2	Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SLA	Sandblasted, Largegrit, Asit etched
TEM	Geçirim Elektron Mikroskobu
Ti	Titanyum
XPS	X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi
XRD	X-Işını Kırınımı Analizi



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. RANK/RANKL etkileşimi ile aktive olan temel sinyal yolları.....	10
Şekil 2.2. OPG-RANKL/RANK etki mekanizmaları.....	11
Şekil 2.3. Osteoblast ve kondrosit farklılaşmasının RUNX2 ile düzenlenmesi	12
Şekil 2.4. Kitin polimerlerinin moleküler yapısı	18
Şekil 2.5. Kitosan polimerlerinin moleküler yapısı	18
Şekil 2.6. Kurkuminin bileşiğinin moleküler yapısı.....	21
Şekil 2.7. Biyoaktif kitosan kaplamalar için çözelti dökümü yöntemi.....	24
Şekil 2.8. Kitosan membranların silanizasyon yoluyla titanyum implantlara bağlanması	25
Şekil 2.9. Çok tabakalı kaplama yöntemi	26
Şekil 2.10. Kitosan kaplamaların elektroforetik birikimi	28
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kitosan ve kurkumin materyaller	34
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bir vidanın teknik çizimi ve görseli	35
Şekil 3.3. Non-modifiye grade 5 titanyum vidanın FESEM görüntüsü	37
Şekil 3.4. Kitosan kaplı titanyum vidanın farklı büyütmelelerdeki FESEM görüntüleri ..	37
Şekil 3.5. Kurkumin kaplı titanyum vidanın farklı büyütmelelerdeki FESEM görüntüleri.....	38
Şekil 3.6. Kitosan-kurkumin kaplı titanyum vidanın farklı büyütmelelerdeki FESEM görüntüleri.....	38
Şekil 3.7. NM-Ti vida (A), Cu-Ti vida (B), CH-Ti vida (C), CH-CU-Ti vida (D) XRD grafığı	39
Şekil 3.8. Çakıştırılmış XRD grafığı	39
Şekil 3.9. İntraperitoneal anestezi uygulamasının gerçekleştirilmesi	40

Şekil 3.10. Vida yerleştirilecek femur yüzeyinin görüntüsü	41
Şekil 3.11. Vida yuvası.....	41
Şekil 3.12. Vida yerleştirilmiş femur yüzeyi	42
Şekil 3.13. Cilt süturasyonu.....	42
Şekil 3.14. Deneklerin özel kafesler içerisinde % 100 CO ₂ ile sakrifiye edilmesi.....	43
Şekil 3.15. Deney hayvanlarının sakrifiye edilmesinden sonra alınan femur örneği	43
Şekil 3.16. cDNA sentezi sıcaklık grafiği	46
Şekil 4.1. Yeni kemik oluşumunun 2. hafta gruplarındaki skorlamasının sütun grafiği	49
Şekil 4.2. Yeni kemik oluşumunun 6. hafta gruplarındaki skorlamasının sütun grafiği	49
Şekil 4.3. Osteoklast sayısının 2. hafta gruplarındaki skorlamasının sütun grafiği.....	50
Şekil 4.4. Osteoklast sayısının 6. hafta gruplarındaki skorlamasının sütun grafiği.....	51
Şekil 4.5. 2. hafta fibrotik doku yoğunluğuna ait sütun grafiği.....	52
Şekil 4.6. 6. hafta fibrotik doku yoğunluğuna ait sütun grafiği.....	52
Şekil 4.7. NM-Ti-2h grubu histolojik kesiti	52
Şekil 4.8. CH-Ti-2h grubu histolojik kesiti	53
Şekil 4.9. CH-Ti-2h grubu histolojik kesiti	53
Şekil 4.10. CU-Ti-2h grubu histolojik kesiti	54
Şekil 4.11. CH-CU-Ti-2h grubu histolojik kesiti	54
Şekil 4.12. NM-Ti-6h grubu histolojik kesiti	55
Şekil 4.13. CH-Ti-6h grubu histolojik kesiti	55
Şekil 4.14. CU-Ti-6h grubu histolojik kesiti	56
Şekil 4.15. CH-CU-Ti-6h grubu histolojik kesiti	56
Şekil 4.16. RANKL ekspresyon seviyeleri.....	57
Şekil 4.17. 2. ve 6. haftalar arasındaki RANKL ekspresyon seviyeleri	57
Şekil 4.18. OPG ekspresyon seviyeleri	58

Şekil 4.19. 2. ve 6. haftalar arasında OPG ekspresyon seviyeleri	59
Şekil 4.20. RUNX2 ekspresyon seviyeleri	59
Şekil 4.21. 2. ve 6. haftalar arasında RUNX2 ekspresyon seviyeleri.....	60
Şekil 4.22. OC ekspresyon seviyeleri.....	60
Şekil 4.23. 2. ve 6. haftalar arasında OC ekspresyon seviyeleri.....	61



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Deney Grupları (Grupların her biri 10 rat içermektedir.)	34
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan grade 5 Ti vidanın boyutları	35
Tablo 3.3. Hematoksilen-eozin boyama protokolü	44
Tablo 3.4. cDNA sentez reaksiyonu	46
Tablo 4.1. Gruplar arası yeni kemik oluşum düzeyinin değerlendirilmesi.	48
Tablo 4.2. Gruplar arası osteoklast sayılarının değerlendirilmesi.....	50
Tablo 4.3. Fibrotik doku yoğunluğunun karşılaştırılması	51

1. GİRİŞ

Tıbbi titanyum ve titanyum alaşımı ortopedi, travmatoloji, maksillofasial cerrahi, plastik cerrahi ve dental implantoloji alanlarında yaygın olarak kullanılan bir biyomalzemedir. Vücut içinde kullanılacak implant malzemeleri, vücudun doğal bir elemanının yerini alacağı için biyolojik olarak vücutla uyumlu (biyouyumlu) olmalıdır. Biyomedikal uygulamalarda en önemli konu; implantların biyouyumluluklarının yüksek olması, vücut içerisinde (in vivo) mükemmel bir korozyon direncine sahip olması ve kemikle hızlı bir şekilde bütünleşerek (osseointegrasyon) kalıcı bir bağlanma sağlanabilmesidir.

Osseointegrasyon terimi, 1976'da Brånemark tarafından ortaya konmuş ve daha sonra ışık mikroskopunun çözünürlük seviyesinde, implantlar ve kemik arasındaki doğrudan temas olarak tanımlanmıştır.¹ İmplantlar kemiğe uygulandıktan sonra, osseointegrasyonu sağlamak için dokuda bir dizi inflamatuvar yanıt görülür. Bu yanıtın anjiyogenez ve osteogenez ile sonuçlanması için biyomalzemelerin birçok faktörü bir arada bulundurması gerekmektedir. Biyomedikal sistemlerin üretiminde kullanılan malzemelerin yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve geliştirilmesi gereksinimi bu nedenle ortaya çıkmaktadır. Bu gereksinim implant malzemesi olarak yaygın bir biçimde kullanılan titanyum ve alaşımları için de söz konusudur. Titanyum ve titanyum alaşımlarına yüzey işlemlerinin uygulanmasını gerektiren farklı nedenler vardır. Bunlar; yüzey özelliklerinin optimize edilerek implant ve kemik dokusu arasında sağlıklı bir mekanik bağlanmanın gerçekleşmesi, üretim sırasında yüzeyde oluşan kirliliğin ve süreksizliklerin giderilerek yüzeyin homojenleştirilmesi, yüzeyin pasifleştirilerek korozyona karşı direncinin artırılması, sertlik artışı ile özellikle aşınma ve yorulmaya karşı direncin artırılması, kemikle tam bütünleşme sağlayacak biçimde yüzeyin pürüzlendirilmesi, kemik dokuda bulunan hücreler ile doğrudan etkileşim sonucu

osteointüktif veya osteokondüktif etkinin sağlanması amacıyla biyoaktif bir yüzey elde edilmesi olarak sıralanabilir. Bu nedenlerin sonucunda titanyum implantların yüzey özelliklerini iyileştirmek amacıyla kumlama, asitle pürüzlendirme, oksitlendirme, titanyum plazma sprej kaplama ve SLA (Sandblasted, Largegrit, Asit-etched) yöntemleri geliştirilmiştir.² Osteointüktif veya osteokondüktif etkinin oluşması içinse biyoaktif kaplama çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmaların sonucunda titanyum yüzeyler, kitosan temelli organik materyallerle kaplandığında, osseointegrasyonun, osteokondüktif etkinin, kitosanın üzerine eklenen maddenin özelliklerine bağı olarak antibakterial, antiinflatuar ve antioksidan özelliklerin arttığı gözlenmiştir.³⁻⁶

Doğal bir polisakkarit olan kitinin deasetile türevi olan biyopolimer kitosan, dental ve ortopedik implantlar için yeni bir potansiyel kaplamadır. Kitinin asetil gruplarının %50'den fazlası deasetilasyon yoluyla uzaklaştırıldığında, N-asetil-glukozamin ve N-glukozamin birimlerinin bir kopolimeri olan moleküle kitosan denir. Kitosan temelli hidrojel ve yara iyileştirme bandajları tıp alanında kullanılmaktadır. Mukoadheziv yapısı ve epiteliyal bağlantıları geçici olarak açma yeteneğı ile kitosan, çeşitli iyi organize olmuş epitellerde (göz, bağırsak vb.) ilaçların verilmesinde kullanılmıştır.^{7, 8} Aynı nedenle çeşitli nanoparçacık temelli formülasyonlarla (kitosan-hidroksiapatit, kitosan-kollojen, kitosan-antioksidan ajanlar, kitosan-büyüme faktörleri...) bir kaplama malzemesi ve kemik grefti olarak da kullanılmıştır.⁹⁻¹¹ Kitosanın bir ilaç taşıyıcı ve kaplama molekülü olarak kullanılmasını sağlayan bir başka özelliğı, kimyasal modifikasyonları kolaylaştıran fonksiyonel grupların mevcudiyetidir.¹²⁻¹⁴ Son çalışmalar, kitosan kaplamaların osseointegrasyonu artırmak için geleneksel kalsiyum fosfat, hidroksiapatit veya gözenekli kaplamalara etkili bir alternatif olabileceğini önermektedir. Özellikle kemik uygulamaları için kitosanın osteojenik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.¹⁵⁻¹⁷

Kemik remodelasyonunun inhibisyonu ve osseointegrasyon kaybı konusundaki araştırmalar, kemik-implant arayüzünde osteolizis oluşumuna neden olan Nükleer faktör kappa-B reseptör aktivatörü (RANK)/RANK ligandı (RANKL) aktivasyonu üzerine yönelmiştir.^{18, 19} Nükleer faktör-kappa B (NF-κB) sinyal yolunun modifikasyonu, söz konusu osteolizis için potansiyel bir terapötik hedeftir.¹⁹

Curcuma longa L.'nin (Zingiberaceae) kök ve sapından elde edilen sarı renkli pigment olan kurkumin; antiinflamatuvar, antiproliferatif, antioksidan ve kemopreventif aktiviteler gibi sayısız biyolojik aktiviteye sahiptir.²⁰ Kurkuminin osteolizis üzerine etkisi, RANK/RANKL sinyal inhibisyonu yoluyla ortaya çıkar. Bu bağlamda kurkuminin NF-κB yoluna müdahale ederek RANKL sinyalini ve osteoklastogenezi baskıladığı gösterilmiştir.²¹ Buna ek olarak mezenkimal kök hücre kültürü üzerinde yapılan bir in vitro çalışmada kurkuminin osteoblast farklılaşması üzerine pozitif etkileri, alkalen fosfataz (ALP) aktivitesindeki artış, Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) ve osteokalsin (OC) mRNA'larındaki artış ile belirlenmiştir.²² Bu noktadan yola çıkarak kurkuminin, kitosan gibi bir taşıyıcı matriks üzerine eklenerek osseointegrasyonu sağlamada başarılı olabileceği düşünölmüştür.

Bu deneysel çalışmada kitosan ve kurkuminin biyoaktif bir kaplama olarak kullanılması ile mini vidaların osseointegrasyonuna olan etkilerinin histolojik ve moleküler düzeyde araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla rat femurlarına mini vida uygulanarak oluşturulan deney modellerinde 2 ve 6 haftalık iyileşme periyodu sonunda oluşan kemik-implant arayüzü incelenerek aradaki farklılıklar ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik

Kemik, mineralize bir doku olup insan yaşamı boyunca modelling ve remodelling olarak bilinen iki temel süreçle değişen, esnek ve canlı bir dokudur.²³ Kemik dokusunun vücutta; vücuda mekanik olarak destek sağlama, önemli hayati organları koruma, kan hücrelerinin oluşumu (hematopoiesis) ve kana verilmesini sağlama, kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) homeostazını düzenleme olmak üzere dört ana işlevi vardır.²⁴ Kemik genel olarak, %67 inorganik yapı ve %33 organik matriksten oluşur.

A) İnorganik yapı

Kemiğin en önemli inorganik bileşeni (yaklaşık %65) hidroksiapatittir ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Hidroksiapatit (HA) kristallerinin kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. Kemiğin mineral kısmı, çok miktarda kalsiyum ve fosfatın yanı sıra sitrat, magnezyum, potasyum, klor, demir, karbonat ve florür anyonları da içerir.²⁵

B) Organik matriks

Organik matriks kemiğin kuru ağırlığının %30-35' ini oluşturur. Bunun da %90-95'i su bazlı solüsyonlarla kaynatılınca jelatine dönüşebilen Tip I Kollajen formundadır. Kollajen olmayan önemli organik maddeler arasında ise, kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyalüronik asit gibi glikozaminoglikanlar, osteonektin (OCN), osteokalsin (OC), osteopontin (OPN), kemik sialoproteini gibi glikoproteinler, interlökin 1 ve 6 (IL1,IL6) gibi sitokinler, dönüştürücü büyüme faktör β ailesi (TGF β), koloni uyarıcı faktörler (CSF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) 1 ve 2 gibi büyüme faktörleri bulunur.²⁶

Kemik dokusunda bulunan hücreler; osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve osteoprogenitör hücreler olmak üzere dört çeşittir.^{25, 27} Kemik dokusu, osteoklastlar

tarafından gerçekleştirilen kemik rezorpsiyonu ve osteoblastlar tarafından gerçekleştirilen kemik oluşumu gibi birbirini takip eden uyumlu süreçlerle sürekli olarak yeniden şekillendirilir. Osteosit hücreleri ise kemik remodelasyon sürecinde mekanosensör görevi görür ve bu işlevin yönetilmesinde önemli rol oynar.²⁸⁻³⁰ Sınır hücrelerinin işlevi tam olarak belli olmamakla beraber kemik rezorpsiyonu ve kemik oluşumu arasındaki bağlantıda önemli bir rol oynadığı görülmektedir.³¹ Ayrıca kandaki kalsiyum oranı düştüğünde, kana acil olarak kemikten kalsiyum salımı yapılmasında görev alırlar. Kemikğin remodelasyonunu tetikleyebilecek hormonları ve faktörleri tanıyan reseptörleri vardır.

2.1.1. Kemik Dokusunun Makroskopik Yapısı

A) Kompakt Kemik

Kortikal kemik olarak da adlandırılan kompakt kemik, kemik matriksinin inorganik tuzlarla katı bir şekilde doldurulduğu yoğun kemiktir. Osteositleri veya diğer kemik hücrelerini içeren sadece küçük boşluklar (lakunalar) bırakır. İnsan iskeletinin ağırlığının %80'ini oluşturur. Kemiklerin dış yüzeyinde yer alan ve daha iç kısımdaki trabeküler kemiği saran lameller kemikten oluşan yapıdır. Kompakt kemik osteon veya havers sistemi olarak isimlendirilen silindirik birimlerden oluşur.³²

B) Trabeküler Kemik

Spongioz, kansellöz veya trabeküler kemik, düşük yoğunluklu kemik dokusunun farklı adlarıdır. Tüp veya bar şeklinde osseöz yapılar olan trabeküllerden ve bunların yaptıkları anastomozlardan oluşan kemik türüdür. Düşük yoğunluklu ve boşluklu yapıda olduğundan baskı kuvvetlerine çok iyi direnç gösterir. Çoğunlukla daha parçalı havers lamellerinden ve lakünlerinden yapılmış olan trabeküler kemik ve bunları çevreleyen çok sayıdaki sement çizgilerinin arasında kemik iliğiyle dolu olan geniş boşluklar bulunur.

Trabeküler kemik dokusu kortikal kemiğe kıyasla metabolik bakımdan daha aktiftir ve yoğunluğunu daha hızlı bir şekilde değiştirebilir.³³

2.1.2. Kemik Hücreleri

Dört tip kemik hücresi vardır. Bunlar osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır.³⁴

2.1.2.1. Osteoprogenitör Hücreler

Kemiğin ana hücreleri olup mezenkimal hücrelerden kaynaklanırlar. Bu hücreler kemiğin dış ve iç yüzeylerini örten periosteum ve endosteumda bulunurlar. İnaktif şekillerinin morfolojik olarak tanımlanması güçtür. Genellikle soluk boyanan çekirdekli, asidofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Ancak herhangi bir nedenle kemik yapımı uyarıldığında, hem sayıca artmaları hem de osteoblastlara dönüşmeleri ile ayırt edilebilirler. Yapısal olarak uzun, dar ve mil şeklindedirler.³⁴

2.1.2.2. Osteoblastlar

Osteoblastların morfolojik görüntüleri, sentez durumunda olup olmamalarına bağlıdır. Aktif şekilleri kübiktir, mononükleer hücrelerdir ve bazofil boyanırlar. Kemik yüzeylerinde tek tabaka halinde, epiteloïd biçimde sıralanmışlardır. Osteoblastlar, yüksek protein sentez kapasitesine sahip hücrelerdir. Tip I kollajen ve matriks proteinleri sentezlerler ve matriks mineralizasyonunu düzenlerler. İmplantlarda kemik oluşumu için şart olan kemik onarımı ve yeniden şekillenmesi için osteoklast aktivitesinin sistemik ve fiziksel sinyallerine aracılık ederler. Kemik yapım aktivitelerinin tamamlanmasına yakın bazı osteoblastlar osteositlere dönüşürken, diğerleri kemiğin periosteal ve endosteal yüzeyinde varlıklarını sürdürmeye devam ederler. Osteoblastlar aynı zamanda osteoklastlar aracılığı ile kemik rezorpsiyonunun aktivasyonunda rol oynarlar.³⁴

2.1.2.3. Osteositler

Kemik dokusu oluşumu sırasında kemik matriksi içinde lakünalarda bulunan olgun osteoblast hücreleridir. Her osteosit hücresinde, kan damarlarına veya diğer osteosit hücrelerine, silindirik bir kanal içinde uzanan sitoplazma uzantıları mevcuttur. Osteositler, kalsiyum ve fosfatın ekstrasellüler konsantrasyonunu kontrol ederler. Ayrıca kemik iliği aracılığı ile doku sıvıları ve matriks arasında madde alışverişini sağlayarak, kemik matriksinin vitalitesinin, yapısal ve metabolik bütünlüğünün devamlılığına yardım ederler. Osteositlerin ölümü kemik matriksinin rezorpsiyonuna neden olur.³⁴

2.1.2.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar, hormonal ve hücrel mekanizmalarla kontrol edilen multinükleer, kemik rezorpsiyonunda rol oynayan hücrelerdir. Osteoklastlar mitoz bölünme yapmazlar. Rezorpsiyona uğrattıkları kemik yüzeyinde, hidrolitik enzimler salgılayarak, kemiğin ve kalsifiye olmuş kıkırdığın organik ve inorganik matrikslerini yıkıma uğratırlar. Osteoklastlar, osteoblastlarla birlikte, kemiğin mekanik streslere bağlı olarak şekillenmesini, plastik etkinliğinin en iyi şekilde oluşmasını sağlarlar. Kemikte depolanmış olan kalsiyumu serbestleştirirler. Sayı ve etkinlikleri hormonal denetim altında olup paratiroid ve tiroksin hormonları etkisinde artar, kalsitonin ve östrojen hormonları etkisinde azalır.³⁴

2.1.3. Kemik Remodelasyon Markerları

Kemik remodelasyonu RUNX2 yönetimindeki osteoblastlar, RANK/RANKL ve osteoprotegrin (OPG) yönetimindeki osteoklastlar tarafından düzenlenen bir süreçtir. Bunlara ek olarak kemik remodelasyonunun direkt dokuda veya serumda gözlemlenebilen belirteçleri; osteoblastlardan sentezlenen ALP ve OC, kemik yapımı sırasındaki kollojen yapımına bağlı C-terminal (P1CP), N-terminal (P1NP) propeptitler ve kemik yıkımı sırasında oluşan karboksi terminal telopeptit (CTX) ve katepsin K'dır.³⁵

2.1.3.1. Osteoprotegrin

Osteoklastogenez inhibitör faktörü veya tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesi üyesi 11B olarak da bilinen osteoprotegerin (OPG), TNFRSF11B geni tarafından kodlanan tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin bir sitokin reseptörüdür. OPG, transmembran alanı olmayan ve doğrudan sinyal özelliği olmayan salgılanmış bir protein olması açısından, TNF reseptör ailesinin atipik bir üyesidir.³⁶ OPG ilk önce kemik yoğunluğunun düzenlenmesinde rol oynayan ve daha sonra RANKL için bir reseptör olarak rol aldığı gözlenen TNFR ile ilişkili bir protein olarak keşfedildi.³⁷ Yapılan çalışmaların sonucu; OPG'nin osteoklastların aktivitesini, hayatta kalımını ve kemik yüzeylerine adezyonunu baskıladığını göstermiştir.³⁸⁻⁴⁰ OPG'nin kemik rezorpsiyonunu baskılama ve kemik kütlesini artırma yeteneği, RANKL olarak bilinen TNF ligandı içindeki alanlara bağlanma yeteneği ile ilgilidir.⁴¹

OPG ayrıca TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligandı (TRAIL) bağlar ve tümör hücreleri de dahil olmak üzere spesifik hücrelerin TRAIL kaynaklı apoptozunu inhibe eder.⁴² Diğer OPG ligandları arasında syndecan-1, glikozaminoglikanlar, von Willebrand Faktörü ve Faktör VIII-von Willebrand Faktör kompleksi bulunur.⁴³

2.1.3.2. RANK-RANKL

Nükleer faktör kappa-B reseptör aktivatör ligandı (RANKL), tip II membran proteini olarak bilinir ve tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesinin bir üyesidir.⁴⁴ Mezenkimal kök hücrelerinde bulunan nükleer faktör kappa-B reseptör aktivatörüne (RANK) bağlanır ve osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu için anahtar bir faktör olarak işlev görür. RANKL, osteoblast hücreleri ve aktive T hücreleri dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipi tarafından üretilir.⁴⁵ Membran üzerinde veya çözünmüş halde olmak üzere iki formu vardır. Her iki form da enflamatuar artrit ile ilişkili fokal kemik erozyonlarında rol oynar.^{46, 47} Çözünmüş haldeki RANKL serumda ölçülebilir ve bazı

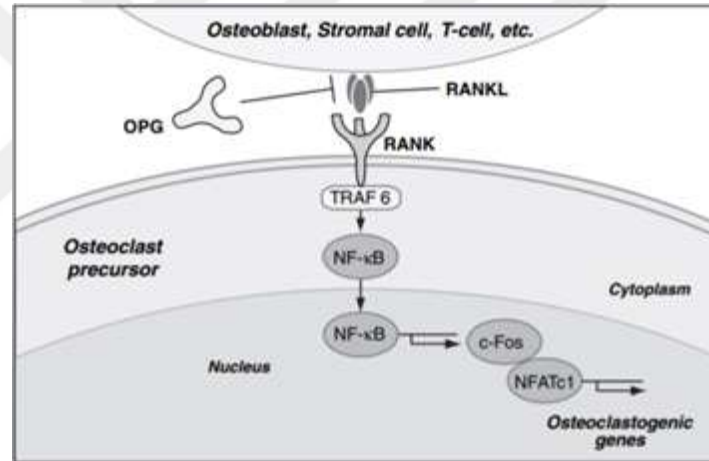
çalışmalarda serum RANKL'ın, uyarılmış kemik rezorpsiyonu ile arttığı gösterilmiştir.⁴⁶

⁴⁸ Osteoblast soyunun hücresi, yüzeylerinde RANKL'ı, preosteoklast hücreden hücreye temas yoluyla in vitro osteoklastogenezi kolaylaştıracak şekilde eksprese edebilir.⁴⁹

RANKL, osteoklast farklılaşması ve işleviyle ilgili birçok basamağı kapsar. RANKL, preosteoklastların çok çekirdekli hücelere füzyonunda, olgun osteoklastlara farklılaşmalarında, kemik yüzeylerine bağlanmalarında, kemiği rezorbe etmek için aktivasyonlarında ve hüceleri apoptozdan koruyarak hayatta kalmasını sağlamada görev alır.^{39, 50, 51} Çoğu durumda, RANKL, makrofaj koloni hüceleri tarafından uyarılan faktöre (M-CSF, aynı zamanda CSF-1 olarak da bilinir) osteoklast farklılaşması için bir kofaktör olarak bağlanır.^{52, 53} Kemik remodelasyonu, osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonunda bu proteinin gen ekspresyonunda artış olduğu ve RANKL olmadığında hiçbir faktörün veya faktör kombinasyonunun kemik rezorpsiyonunu sağlayamadığı bildirilmiştir. RANKL'ın RANK'a bağlanmasını önleyerek güçlü bir osteoklast oluşum inhibitörü etkisi gösteren ve osteoblastik hüceleri tarafından salgılanan bir protein olan osteoprotegerine de bağlanabilir.⁵⁴ RANKL ayrıca bağışıklık sisteminde yardımcı T hüceleri tarafından eksprese edilir ve dentritik hücre olgunlaşmasında rol oynadığı düşünölmektedir. T hücre bağlı immün cevabın düzenlenmesinde görev alır. RANKL, iskelet kası, timus, karaciğer, kolon, ince bağırsak, adrenal bez, osteoblast, meme bezi epitel hüceleri, prostat ve pankreas dahil olmak üzere çeşitli hücre doku ve organlardan salınır.⁵⁵ Çeşitli organlarda RANKL konsantrasyon seviyelerindeki değişim, RANKL'ın doku büyümesinde (özellikle kemik büyümesinde) ve vücuttaki bağışıklık fonksiyonlarındaki önemini doğrular.

RANK'ın bağlanması ve aktivasyonu, trimerik RANKL'ın hücre dışı reseptör bağlanma alanı ile trimerik RANK'ın hücre dışı sisteinden zengin alanları arasındaki doğrudan etkileşimlerini içerir.^{41, 56} Bu etkileşimin RANK'ın oligomerizasyonuna ve

ardından birkaç sinyal iletim yolunun aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Ana sinyal yollarının basitleştirilmiş bir incelemesi Şekil 2.1’de açıklanmaktadır. RANKL’ın RANK’a bağlanması; TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) olarak bilinen bir adaptör proteinin, RANK’ın hücre içi alanı içindeki spesifik bölgelere bağlanmasına yol açar. TRAF 6, çeşitli protein kinaz yollarının yanı sıra NF- κ B dahil transkripsiyon faktörlerini aktive etmek için ikinci bir haberci görevi görür. Aktive edilmiş NF- κ B çekirdeğe translokasyon yapar ve c-Fos ekspresyonunu artırır, bu daha sonra osteoklastojenik genlerin transkripsiyonunu indüklemek için aktive T hücrelerinin nükleer faktörü (NFATc1) ile etkileşime girer. RANK sinyalizasyonu yukarıda tarif edilenden çok daha karmaşık olmasına rağmen özet olarak sunulmuştur.

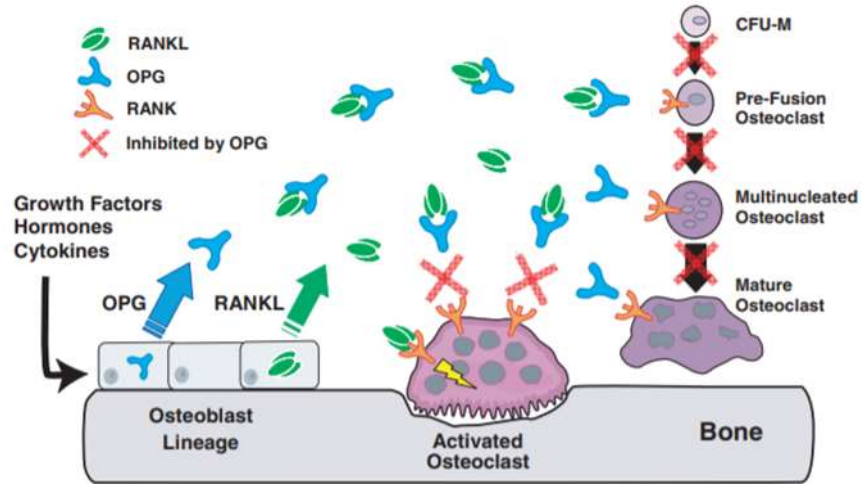


Şekil 2.1. RANK/RANKL etkileşimi ile aktive olan temel sinyal yolları

Osteoblastlar, stromal hücreler, T hücreleri ve diğer hücreler tarafından üretilen RANKL, preosteoklast ve osteoklastların yüzeyindeki RANK’ı etkinleştirir. RANK aktivasyonu, adaptör proteini TRAF 6’nın aktivasyonuna yol açarak, NF- κ B aktivasyonuna ve NF- κ B’nin çekirdeğe translokasyonuna yol açar. NF- κ B, c-Fos ekspresyonunu artırır ve c-Fos, osteoklastojenik genlerin transkripsiyonu için NFATc1 ile etkileşime girer. Bu yolların aktivasyonu, RANKL’ın hücre dışı ortamda RANK’ı aktive etmesini önleyen OPG tarafından doğal olarak engellenir.⁵⁷

OPG, RANK ve RANKL’ın işlevleri ve temel rolleri bilimsel olarak belirtilmiştir.

Bu moleküler üçlü ile ilgili fikir birliği; OPG’nin RANKL’a bağlanarak bir tuzak reseptörü olarak işlev görmesi ve böylece RANKL’ın RANK’ı bağlamasını ve aktive etmesini engellediği yönündedir (Şekil 2.2.). RANKL’ın OPG inhibisyonu; osteoklast oluşumunun durması ve inaktivasyonu ile sonuçlanır.



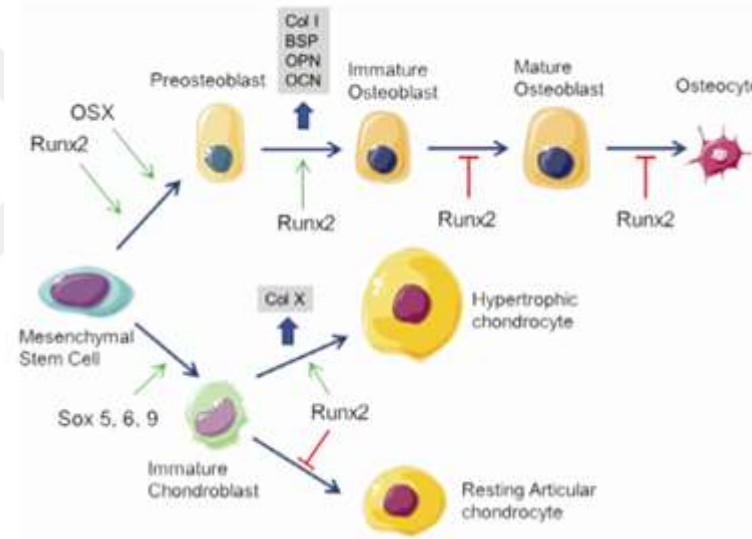
Şekil 2.2. OPG-RANKL/RANK etki mekanizmaları

RANKL; çeşitli proesortif büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin kontrolü altındaki osteoblastlar, kemik iliği stromal hücreleri ve diğer hücreler tarafından üretilir. Osteoblastlar ve stromal hücreler OPG üretirler, bu da RANKL'a bağlanır ve dolayısıyla inaktive eder. OPG yokluğunda RANKL, osteoklastlarda ve preosteoklast öncüllerinde bulunan kendi reseptörü RANK'ı aktive eder. RANK-RANKL etkileşimleri, preosteoklastların çok çekirdekli osteoklastlara dönüşümüne ve osteoklast aktivasyonuna yol açar. Bu RANK aracılı yanıtların her biri, OPG tarafından tamamen inhibe edilebilir.⁵⁷

2.1.3.3. RUNX2

Çekirdek bağlanma faktörü alt birimi alfa-1 (CBF-alfa-1) olarak da bilinen Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2), insanlarda RUNX2 geni tarafından kodlanan bir proteindir. RUNX2, osteoblast farklılaşması ve osteoblastların fonksiyonu için marker gen ekspresyonunun ana düzenleyicisi olarak bilinir. RUNX2, multipotent mezenkimal kök hücrelerden (MSC) osteoblast farklılaşmasını ve bazı kemik ekstraselüler matriks proteinlerinin gen ekspresyonunu aktive etmekten sorumludur. Bu yüzden RUNX2 genellikle kemiğin ana regülatörü olarak adlandırılır.⁵⁸ Osteoblast biyolojisinde RUNX2, osteoblast farklılaşma sürecini farklı aşamalarda düzenler. RUNX2 ile düzenleme, farklılaşmanın erken aşamalarında olumlu bir şekilde gerçekleşirken, sonraki aşamalarda RUNX2 osteoblast farklılaşma sürecini inhibe eder (Şekil 2.3.). Farklılaşmamış bir MSC'den bir osteoblasta kadar olan tüm süreç, farklı aşamalarda meydana gelir ve bu aşamaların her biri, eksprese edilmiş osteoblast marker genlerinin belirli bir modeli ile karakterize edilir. RUNX2, tüm majör osteoblast marker genlerinin

(ALP,OC,COL1,BSP, OPN) promotor bölgesinde bulunan RUNX2 bağlanma bölgesine bağlanarak osteoblast marker genlerinin ekspresyonunu kontrol eder. Osteoblast ve kondrosit farklılaşmasında RUNX2'nin fonksiyonları şekil 2.3'te gösterilmektedir. Osteoblast farklılaşmasında RUNX2'nin rolü, farklılaşmanın aşamasına göre pozitif veya negatif yönde değişim gösterir. Bu değişim RUNX2'nin 2 farklı izoformu olmasıyla açıklanır. RUNX2 tip I izoformu, osteoprogenitör hücrelerde ve preosteoblastlarda mevcuttur.⁵⁹ Bu nedenle, RUNX2 tip I'in erken osteoblastogenezde özel bir role sahip olduğu, RUNX2 tip II'nin ise osteoblastik olgunlaşmanın terminal aşamaları için gerekli olduğu bulunmuştur.^{59, 60}



Şekil 2.3. Osteoblast ve kondrosit farklılaşmasının RUNX2 ile düzenlenmesi

Osteoblast farklılaşması süreci sırasında RUNX2, mezenkimal kök hücrelerden osteoblast olgunlaşması için çok önemlidir ve osteoblast farklılaşmasının erken aşamalarını olumlu yönde etkiler. Osterix (OSX) ise RUNX2 aracılı mezenkimal yoğunlaşmayı takiben osteoblast farklılaşmasında önemli bir rol oynamaya başlar. Osteoblast farklılaşması sürecinde RUNX2 kemik matriks genlerinin (kollojen tip 1(Col1), OPN, OCN, kemik morfojenik protein (BMP)) ekspresyonunda rol oynar. Daha fazla kemik olgunlaşması yani maturasyon safhası için ise RUNX2 gen ekspresyonunun azalması gerekir.⁶¹

Bunlara ek olarak RUNX2'nin osteoprotegrin geninin ekspresyonunu düzenlediği belgelenmiştir.⁶² Bu bulgular, osteoblastogenez ve osteoklastogenez arasında moleküler bir bağlantı olduğunu gösterir; burada RUNX2, osteoblast farklılaşmasındaki rolüne ek olarak, osteoprotegrini pozitif olarak düzenleyerek osteoklast oluşumunu inhibe eder.⁶²

Ayrıca promotor RANKL proteininin bir RUNX2 bağlanma sahası olduğu ve osteoklastogenezin bu yolla da baskılanabileceği vurgulanmıştır.⁶³

2.1.3.4. Osteokalsin

Kemik gama-karboksiglutamik asit içeren protein (BGLAP) olarak da bilinen osteokalsin, kemik ve dentinde bulunan ve kalsiyum bağlayıcı protein olarak tanımlanan, kollajenöz olmayan bir protein hormonudur.⁶⁴ Omurgalılarda en bol bulunan onuncu proteindir. İnsanlarda osteokalsin, BGLAP geni tarafından kodlanır.⁶⁵ Sadece osteoblastlar tarafından salgılanır ve vücudun metabolik regülasyonunda rol oynadığı düşünülür.⁶⁶ Karboksillenmiş formunda kalsiyumu doğrudan bağlar ve böylece kemikte yoğunlaşır, karboksillenmemiş formunda, osteokalsin vücutta bir hormon görevi görür ve pankreas, yağ, kas, testis ve beyinde sinyal oluşturur.⁶⁷ Osteokalsin osteoblastlar tarafından üretildiğinden, genellikle kemik oluşum sürecinin ve osteoblast aktivitesinin bir belirteci olarak kullanılır.⁶⁸

2.2. Titanyum İmplantlar

İmplantlar, insan vücudundaki eksik bir bölümü restore etmek için doku içerisine yerleştirilen ve eksik bir organ veya dokunun yerini alan aygıtlardır. Cansız dokuların veya biyomateryallerin insan vücudunda çeşitli fonksiyonları yerine getirmek amacıyla canlı dokuya yerleştirilmesine implantasyon denir.⁶⁹

Titanyum ve Ti alaşımları yüksek mukavemet, düşük yoğunluk, yüksek korozyon direnci, vücut dokusunda tam inertlik, kemik ve diğer dokulara entegre olabilme özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilen malzemelerdir. Ayrıca diğer metalik malzemelere göre kemiğe daha yakın elastisite modülüne sahiptirler. Biyomedikal uygulamalar için hazırlanmış, alüminyum (Al), vanadyum (V), molibden (Mo), zirkonyum (Zr), niyobyum (Nb), paladyum (Pd) ve kalay (Sn) gibi elementler içeren pek çok Ti alaşımı bulunmaktadır.⁷⁰ Titanyum ve alaşımları, dental ya da ortopedik

implant alanında 1960'lı yıllardan itibaren kullanılmaya başlanan ve kullanımı günümüze kadar hızla artan malzeme grubunu oluşturmaktadır. 1969'da titanyumun, dental implantlar olarak kullanımı ve ilk bulguların yayınlanması, implant uygulamaları alanında yeni bir çağın başlangıcı sayılmaktadır.⁷¹ O tarihten bu güne kadar bu uygulama devam etmekte ve sadece titanyum implantın şekli ve yüzey özelliklerinin değiştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır.⁷²

2.3. Kemik-Titanyum İmplant Bağlantısı

Yapılan araştırmalar sonucunda, canlı kemik dokusu ile titanyum implantlar arasında meydana gelen rijit bağlantı 'Osseointegrasyon' olarak tanımlanmaktadır.⁷³ Ancak literatür incelendiğinde, titanyum implantların canlı kemikle bağlantısı "1-Osseointegrasyon, 2-Fibröz retansiyon, 3-Biyointegrasyon" olarak 3 ayrı grupta incelenmektedir.⁷⁴

2.3.1. Osseointegrasyon

Osseointegrasyon "Canlı kemikle, okluzal kuvvetler altındaki implant yüzeyi arasında oluşan direkt yapısal ve fonksiyonel bağlantı" olarak tarif edilmektedir.⁷³ Klinik olarak ise direkt olarak bağlantı halinde olduğu kemik içerisinde stabil halde bulunan implantlar osseointegre olmuş olarak kabul edilmektedir.¹ Ayrıca kemik içerisine yerleştirilen ve 1-500 gramlık dikey ve yatay yönde uygulanan kuvvetler karşısında mobilite gözlenmeyen implantların, klinik olarak rijit fiksasyonlarının sağlandığı kabul edilmektedir.⁷⁴

2.3.1.1. Moleküler Düzeyde Osseointegrasyon

Osseointegrasyonun implant yerleştirilmesine bağlı kemik remodelasyonu ile eş anlamlı olduğu düşünülmüştür.⁷³ Kemik remodelasyonu, eski kemiğin yerini yeni kemiğin aldığı veya implant yüzeylerinde yeni kemik matriksi oluşumunu kapsayan bir

süreçtir. Bu süreç, mezenkimal kök hücrelerin, osteoklastların ve osteoblastların entegre ve sıralı etkilerini içeren 5 aşamada gerçekleşir.^{75, 76} Bunlar;

- Aktivasyon fazı (Kemik yüzeyine osteoklastların çekilmesi aşamasıdır.)
- Rezorpsiyon fazı (Osteoklastlar kemik yüzeyinde, aktivasyonun ardından 4-7 günlerde erozyon kavitesi açar.)
- Reversal faz (7-10 günlerde osteoklastik kemik rezorpsiyonunun bitmesi ile kemik formasyonu arasındaki zaman aralığını ifade eder. Mononükleer hücrelerin erozyon kavitesini düzgün hale getirme sürecidir.)
- Formasyon fazı (10-15. günlerde osteoblastlar erode olan yüzeye gelirler ve burada osteoid matriksi sentezlerler.)
- Mineralizasyon fazı (Osteoblastlarca matriks sentezinden birkaç gün sonra yeni oluşturulan osteoid matriks mineralize olur.)

Kemik rezorpsiyonu, osteoklast oluşumu, osteoklast aktivitesi ve kemik remodelasyonu bir TNF ailesi üyesi olan RANKL olarak bilinen sitokine bağlıdır. RANKL'ın katabolik etkileri ise, osteoklastlar üzerinde RANKL'ı bağlayan ve RANK olarak adlandırılan reseptörün aktivasyonunu önleyen yine bir TNF reseptörü ailesi üyesi olan OPG tarafından önlenir. Osteoklast aktivitesi RANKL ve OPG'nin dengesine bağlıdır.^{45, 57} Hayvan modelinde yapılan çok sayıda çalışma, RANKL inhibisyonunun kemik rezorpsiyonunu belirgin bir şekilde azalttığını ve kortikal ve süngerimsi kemik hacmi, yoğunluk ve mukavemetinde artışa neden olduğunu göstermektedir.⁵⁷ Bu bağlamda RANKL inhibisyonun ve osteoklastogenezin baskılanmasının osseointegrasyonda faydalı olabileceği düşünülmektedir.

İmplant yüzeyinde kemik matriksi oluşumu için; fibronektin gibi hücre adezyonunu sağlayan ekstraselüler matriks proteinlerine, MSC'ler integrin reseptörleri yoluyla yapışır. Kemik morfogenezi ve remodelasyonu sırasında, MSC'ler, kemik

morfogenetik proteinle ilişkili Smad fosforilasyonu ve wnt/ β -katenin sinyali gibi RUNX2 transkripsiyon faktörü sentezi ile sonuçlanan bir dizi uyarana maruz bırakılır.^{77, 78} Bu transkripsiyon faktörleri MSC'nin pangenomik ekspresyon modellerini değiştirir ve düzenli osteojenik farklılaşmaya yol açar. RUNX2 transkripsiyon faktörü osteoindüksiyonun anahtarıdır.⁷⁹ Tamamen farklılaşmış osteoblastlar, esas olarak tip I kollajen (Coll), OC, OPN, OCN ve kemik sialoprotein gibi kollajen olmayan moleküllerden oluşan kemik hücre dışı matrisinin (ECM) sentezinden sorumludur. Osteoblast farklılaşması ve kemik oluşumu ile ilişkili embriyonik moleküller ve hücresel olayların implant osteotomi bölgesinde remodelasyon ve osseointegrasyonun oluşmasına neden olduğu ileri sürülmüştür.^{80, 81} Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çalışmaları, implantın yerleştirilmesinden sonraki birkaç gün içinde insanların ve deney hayvanlarının kemik-implant arayüzünde osteoblastik marker gen ekspresyonunun gözlemlendiğini ortaya koymuştur.⁸² Peri-implant dokularında osteoblastik marker gen ekspresyonunun zaman içindeki değişimi ve miktarı genellikle osteoblastik farklılaşma sırasındaki gen ekspresyon paternini takip eder. Bununla birlikte ekspresyonun; implant tipi, malzeme ve implantın yüzey özelliklerinden etkilendiği görülmüştür.⁸³

2.3.2. Fibroosseöz Retansiyon

Fibroosseöz retansiyon teorisine göre; implant ve kemik arasındaki yüzeyde bulunan kollajen lifler, osteojenik etkisi olan bir periimplant membran oluşturur.^{84, 85} Bu hipoteze göre, kansellöz kemiğin trabeküllerinden köken alan kollajen lifler implantı sararak karşı taraftaki trabeküle girer. İmplant üzerine gelen kuvvetler bu liflere bir bası kuvveti (kompresyon) uygular; trabeküle giren liflere ise gerim kuvveti (tension) aktarılır. Bağ doku bileşenlerine uygulanan kompresyon ve gerim kuvvetleri biyoelektrik bir akım oluşturur ve bu akım (piezoelektrik etki) bağ doku bileşenlerini farklılaşmasına neden olarak kemik yapının oluşumunu (osteogenez) sağlar. Bu hipoteze göre iyileşme

sürecinde hiç kuvvet uygulanmaması ankiloza sebep olurken, rölatif kuvvet uygulanması ise implant etrafında, bir periodontal ligament oluşumu sağlayabilir.^{74, 86} Yapılan çalışmalarla; periodontal ligamentlerin doğal dişlerde kök yüzeyine dik seyrederken, implant yüzeyine paralel seyretmesinin kemik-implant ilişkisine zarar verdiği görülmüştür. İmplant etrafında enkapsülasyon oluşturduğu ve implant kaybına sebep olduğu için, bu bağlantı şekli, günümüzde kabul gören bir bağlantı şekli değildir.^{74, 87, 88}

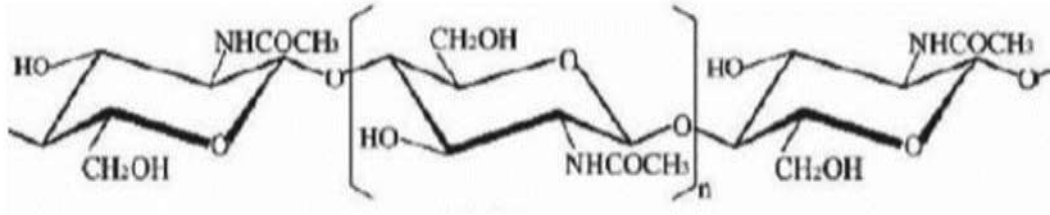
2.3.3. Biyointegrasyon

Titanyum implantlar üzerinde yapılan son çalışmalar, osseointegrasyona ek olarak “biyointegrasyon” terimini gündeme getirmiştir. İmplantın kemiğe entegrasyonu temelde iki süreci içerir: kemik dokusu ile kenetlenme (mekanik retansiyon) ve çevreleyen kemik bileşenleri ile kimyasal etkileşimler (biyoaktif retansiyon).⁸⁹ İki süreç de implant yüzeyinin kimyasal bileşimine ve morfolojisine bağlıdır. Mekanik retansiyon, titanyum ve titanyum alaşımların üzerindeki delikler, boşluklar, oyuklar ve vida yivleri yoluyla titanyum yüzeydeki dioksit tabakası ile kemik arasında gerçekleşen bağlantıdır. Biyoaktif retansiyon ise, çeşitli biyoaktif materyallerin (örn. hidroksiapatit) kimyasal bağlarla direkt olarak kemiğe bağlanması olarak tanımlanır.⁷⁴ Bu retansiyon şeklinde implant yüzeyinde yer alan biyoaktif alanlarla kollajen lifler arasında meydana gelen fizikokimyasal etkileşim ile hidroksiapatit tabakası üzerinde kemik matriksi birikimi görülmektedir.⁷⁴ Biyoaktif materyallerin yeni kemik oluşumu üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalarda, biyointegrasyona bağlı olarak implant stabilizasyonunun daha erken dönemlerde arttığı gösterilmiştir.^{90, 91} Bununla birlikte elektron mikroskopuyla görüntülenebilen ve çeşitli mekanik tutunma mekanizmalarından bağımsız olarak, belirgin bir şekilde kemik ve implant arasında oluşan biyokimyasal bağlantı “biyointegrasyon” olarak tanımlanmıştır.⁹²

2.4. Biyomateryaller Ve Fizikokimyasal Özellikleri

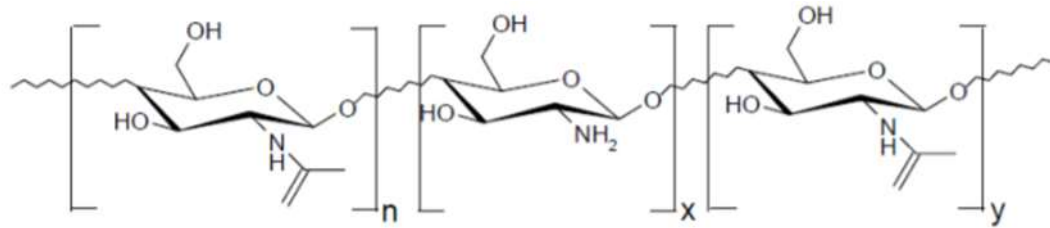
2.4.1. Kitosan Materyallerin Yapı Ve Özellikleri

Kitin, [β -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin], eklem bacaklıların iskeletlerinin esas maddesi olup bazı bakteri ve mantarların hücre duvarında, kelebek kanadında, ıstakozda, mürekkep balığında ve böceklerde bulunur. Şekil 2.4'te moleküler yapısı verilmiştir.



Şekil 2.4. Kitin polimerlerinin moleküler yapısı

Selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci organik bileşik olan kitinin deasetile formu olan kitosan doğal bir karbonhidrat yapıda polimerdir. Kuvvetli baz uygulaması ile kitinin asetil grupları uzaklaştırılarak kitosan (2- amino- 2- deoksi- β - D- glukoz) elde edilir. Aşağıda kitosan polimerinin moleküler yapısı gösterilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kitosan polimerlerinin moleküler yapısı

Kitin ve kitosan arasında N-deasetilasyon derecesine göre keskin bir adlandırma ayrımı yoktur. Genelde %70'in üzerinde deasetilasyon derecesine sahip kitin, kitosan olarak adlandırılır. Kitosan, suda çözünmezken pH'ı 6'dan düşük asidik çözeltilerde çözünür. Asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler kitosanı çözdürmek için kullanılır. Kitosanın inorganik asit çözeltilerinde çözünürlüğü oldukça sınırlıdır. pH

7'den yüksek olduğunda, presipitasyon ve jelleşmeye bağlı olarak kitosan çözeltilerinin stabilitesi düşer. Kitosan, pozitif iyon yüklerine sahiptir ve böylece negatif yüklenmiş yağlar, lipidler, kolesterol, metal iyonları, proteinler ve makromoleküllere kimyasal olarak bağlanabilir. Bu açıdan, kitin ve kitosan biyouyumluluk, biyobozunurluk, adsorbsiyon, film oluşturabilme ve metal iyonlarını şelatlama gibi üstün özellikleriyle ticari olarak oldukça ilgi görmektedir.⁹³

2.4.1.1. Kitosanın Kullanım Alanları

Toksik olmayan ve yüksek molekül ağırlıklı biyobozunur kitosan polimerleri birçok biyomedikal alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında iskelet olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur.⁹⁴⁻⁹⁶ Kemik rejenerasyonunda, osteoblastlar tarafından sentezlenen ekstraselüler matriks proteinlerinin yüzeylere bağlanmasını ve ekspresyonunu artırması özelliklerinden dolayı kitosan ve türevi temelli birçok enjekte edilebilen malzeme kullanılmaktadır. Ayrıca, kıkırdak doku mühendisliği için sentetik hücre iskelelerine iyi bir alternatif olabilir. Gen terapi uygulamalarında vektör olarak kullanılması mümkündür.⁹³ Yapılan klinik ve hayvan çalışmalarında kitosan diyeti uygulamasının plazma kolesterol miktarını etkili şekilde düşürdüğü görülmüştür. Bağırsakta jelleşen kitosan, diyetle alınan kolesterol ve lipidlerin emilimini azaltır.⁹⁷ Kitosanın bağırsak sistemi üzerindeki tek etkisi jel oluşumu değildir. Antimikrobiyal özellik gösteren kitosan, bağırsak florasının değişmesine ve böylece primer safra asitlerinden olan kolik asit ve kemodeksoikolik asidin fekal boşaltımında artışa neden olur. Safra asidi bileşimindeki değişim yağ emulsifikasyonu, sindirilebilirliği ve absorbsiyonunun engellenmesine katkıda bulunabilir.⁹⁸ Kitosanın, en önemli kullanım alanlarından bir diğeri de ilaç endüstrisidir. Farmasötik amaçla, ilaç taşıyıcı temel ve/veya yardımcı materyal olarak tabletler, granüller, hidrojeller, nano ve mikropartiküler sistemlerin hazırlanmasında kitosan kullanımı oldukça yaygındır.^{12, 14}

Çeşitli ilaçlar, kitosan matriksi içerisine (film, mikrokapsül, kaplanmış tablet vb.) yerleştirilmektedir. Farklı şekillerde kitosan içerisine yüklenmiş ilaçlar da bulunmaktadır.⁹⁹ Kitosanın serbest amin grubu, katyonik özellik kazandırması nedeniyle negatif yüklü ilaçlar, polimerler ve biyoaktif moleküllerle etkileşimini sağlamaktadır. Jel oluşturabilmesi, kopolimer gibi çok çeşitli formlarda bulunması ilaç salım sistemlerinde büyük avantaj sağlamaktadır. Midede tahrişi engelleyen antiasit ve antiülser aktivitelere sahip olması da kitosani ideal materyal haline getirmektedir.¹⁰⁰

2.4.1.2. Kemik Remodelasyonu Ve Osseointegrasyon Sürecinde Kitosan

Kemik, hasar gördüğünde dikkat çekici bir şekilde kendi kendini iyileştirme yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte bazı büyük kemik defektlerinin onarımı için greft materyelleri gereklidir. Sentetik greftlerin kullanıldığı kemik dokusu mühendisliği stratejileri otogreft ve allogreftlere umut verici alternatifler sunar. Bununla birlikte, sentetik bir greft, kemik rejenerasyonunu başarılı bir şekilde teşvik etmek için birkaç temel gereksinimi karşılamalıdır. Bunlar;

- 1) Osteokondüktivite; kemik oluşumunu kolaylaştırmak için,
- 2) Gözeneklilik; neovaskülarizasyon/anjiyogenez ve kemik büyümesine izin vermek için,
- 3) Biyomekanik uyumluluk; yeni kemik oluşumu sırasında yapısal bütünlüğün korunması için,
- 4) Biyobozunurluk; implantasyon yerinde kemiğin içe doğru büyümesini desteklemek ve zaman içinde kemik rejenerasyonu ile uyumlu bir oranda bozunmak için.

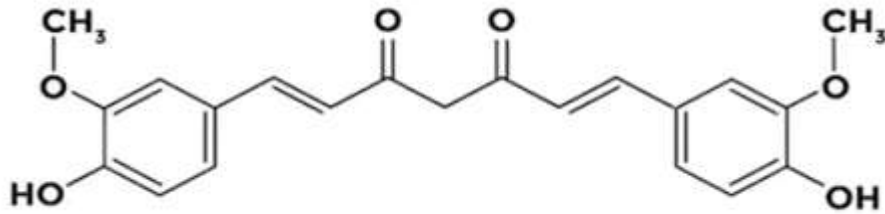
Kitosan, tüm bu özelliklere sahip olması nedeniyle hem büyük kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan sentetik greft materyali olarak hem de biyoaktif bir kaplama materyali olarak titanyum alaşımların yüzey özelliklerini geliştirmek için

kullanılmaktadır. İn vitro çalışmalar kitosan materyallerin, osteoblastlar tarafından sentezlenen ekstraselüler matriks proteinlerinin yüzeylere bağlanmasını ve ekspresyonunu desteklediğini göstermiştir.^{17, 101-104} Çok sayıda in vivo çalışma, kitosan filmlerinin, zarlarının ve jellerinin insan, koyun, köpek ve kemirgen modellerinde kemik rejenerasyonunu ve mineralizasyonunu geliştirme yeteneğini göstermiştir.^{16, 105, 106} Kitosanın kemik remodelasyonunu artırma ve osteogenezi destekleme yeteneği, polimorfonükleer ve progenitör hücre göçünün yara bölgesinde artmasına yardımcı olan katyonik yüküne ve hücre dışı glikoproteinlere yapısal benzerliği ile açıklanır.^{15, 107, 108}

Bu özelliklerden yararlanarak osseointegrasyonu iyileştirmek için maksillofasiyal cerrahi, dental implantoloji ve ortopedi alalarında kullanılan titanyum implantların kitosan ile kaplanması amaçlanmıştır.

2.4.2. Kurkumin Materyallerin Yapı Ve Özellikleri

Curcuma bitki cinsi, yaklaşık 120 türden oluşur ve uzun bir tıbbi uygulama geçmişine sahiptir.^{109, 110} Curcuma türleri arasında Curcuma longa L. (Zingiberaceae) en yaygın olarak tanınanındır; dünyanın birçok bölgesinde sıcak bir iklimde yetişen bir kültür bitkisidir. Curcuma longa L.'nin kök ve sapından elde edilen sarı renkli pigment olan kurkumin, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antioksidan ve kemopreventif aktiviteler gibi sayısız biyolojik aktiviteye sahip polifenolik bir bileşiktir.²⁰ Şekil 2.6'da kurkumin bileşiğinin moleküler yapısı sunulmuştur.



Şekil 2.6. Kurkuminin bileşiğinin moleküler yapısı

Kurkumin genellikle 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dionu ifade etmesine rağmen, bileşik aynı zamanda "curcumin I" olarak da bilinir. Kısaca

kurkumin; kristalin, sarı-turuncu renkli, moleküler ağırlığı 368,39 g/mol, erime sıcaklığı 183 ° C ve kimyasal formül C₂₁H₂₀O₆ olan bir diferuloilmetandır. Kimyasal olarak keto-enol tautomerizmi sergiler, yani nötr ve asidik solüsyonlarda baskın bir keto formuna sahipken, katı halde ve alkali solüsyonda baskın form daha stabil enol formudur.¹¹¹ Kurkumin olarak bilinen iki bileşik daha vardır, bunlar kurkumin II [demetoksikurkumin,1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-7-(4-hidroksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion] ve kurkumin III [bisdemetoksikurcumin, 1,7-bis (4-hidroksifenil) -1,6-heptadien-3,5-dion].¹¹² Kurkuminin tıbbi uygulamaları, zayıf çözünürlüğü ve düşük oral biyoyararlanımı nedeni ile sınırlıdır. Tipik bir oral kurkumin dozunun yaklaşık %80'i gastrointestinal sistemden değişmeden geçer ve emilen bileşiğin çoğu bağırsak mukozasında ve karaciğerde metabolize olur.¹¹³ Düşük emilim oranı ve zayıf suda çözünürlüğü nedeniyle, kurkumin genellikle biyoyararlanımını artırmak ve terapötik uygulamalarda kullanmak için uygun hale getirilmek üzere özel olarak tasarlanmış taşıyıcılar ile birlikte formüle edilir. Serbest kurkumin ile karşılaştırıldığında, kurkuminin polimerlerle kapsüllenmesi veya polimer taşıyıcılara yüklenmesi, biyoyararlanımını önemli ölçüde arttırmakla kalmaz, aynı zamanda kurkumini fizyolojik degradasyondan korur.¹¹⁴

2.4.2.2. Kemik Remodelasyonu Ve Osseointegrasyon Sürecinde Kurkumin

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kurkuminin kemik dokusu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. İnflamatuvar kemik hastalıkları, kemik doku kanserleri ve periodontitis konularında çalışmalar yapılmıştır.¹¹⁵ Yapılan çalışmalar ışığında kurkuminin kemik dokusu üzerindeki etkisinin osteoklastogenizin inhibisyonu ile olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmalar kurkuminin RANK/RANKL sistemini baskılayarak osteoklastogenezi inhibe ettiği yönündedir.^{21, 116} Kurkumin uygulamasından sonra OPG'nin protein ve mRNA ekspresyon seviyelerinde artış bulunmuştur. Bu artışa bağlı olarak RANK/RANKL sinyal

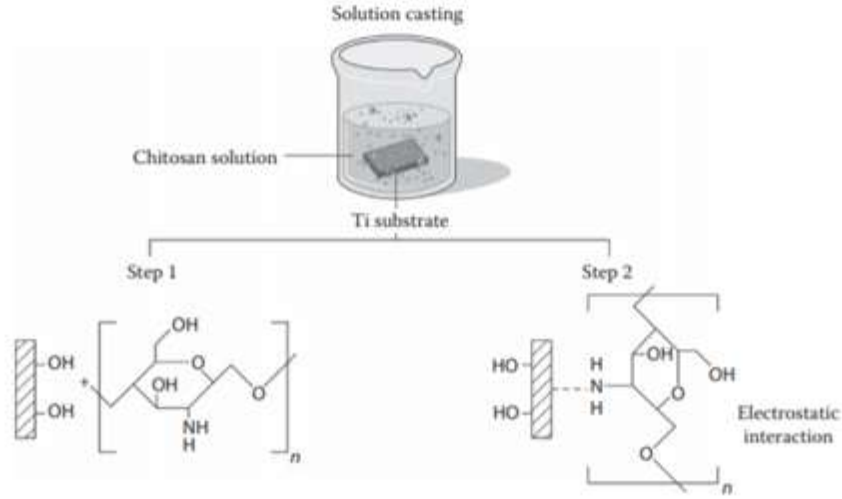
yolunda inhibisyon meydana gelir. Kurkumin uygulaması ile osteoklastogenezin baskılanması yoluyla kemik rezorpsiyonunun önüne geçildiği bulunmuştur. Buna ek olarak mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalarda kurkuminin, osteoblast diferansiyasyonu üzerine etkileri de araştırılmıştır. Kurkuminin osteojenik genlerin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi histolojik ve moleküler düzeyde belirlenmiştir. Genel olarak, bu çalışmaların sonucu; kurkuminin RUNX2, ALP ve OC gibi osteojenik genlerin ekspresyonunu artırarak osteoblast farklılaşmasına neden olduğu yönündedir.¹¹⁷

2.5. Kitosan Ve Kurkumin Materyal İle Titanyum İmplantları Kaplama Yöntemleri

Günümüzde titanyum implantlarda kitosan ile biyoaktif kaplama sağlanmasında kullanılan dört ana teknik vardır. Bunlar: çözelti dökümü, silanizasyon, çok tabakalı kaplama ve elektrokimyasal depozisyon yöntemleridir.¹¹⁸

2.5.1. Çözelti Dökümü

Çözelti dökümü, katyonik yüklü kitosan ile titanyum yüzeylerdeki oksit tabakası arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanan basit bir daldırma yöntemidir (Şekil 2.7.).¹¹⁹ Kitosan gibi polielektrolit film kaplamalar, titanyum oksit tabakası üzerinde ince bir tabaka olarak oluşturulur. Bu film tabakasının oluşumu farklı yük etkileşimlerinden kaynaklanan elektrostatik kuvvet ile sağlanır. Çözelti döküm yöntemleri, maliyet düşüklüğü, hızlı gerçekleştirilmesi ve özel ekipman gerektirmemesi gibi nedenlerle tercih edilebilir. Kaplama çözeltisinin pH'ı ve tuz koşullarının değiştirilmesi kaplama prosedürünü değiştirebilir.¹²⁰ Yapılan çalışmalarla kaplamanın titanyum yüzeye bağlanma gücü, klinik uygulamalar için yeterli bulunmamıştır. Bu yüzden bu yöntemin kullanımı gözenekli, yivli, implantlardan ziyade diskler gibi karmaşık olmayan implant şekilleriyle sınırlıdır.¹⁰¹

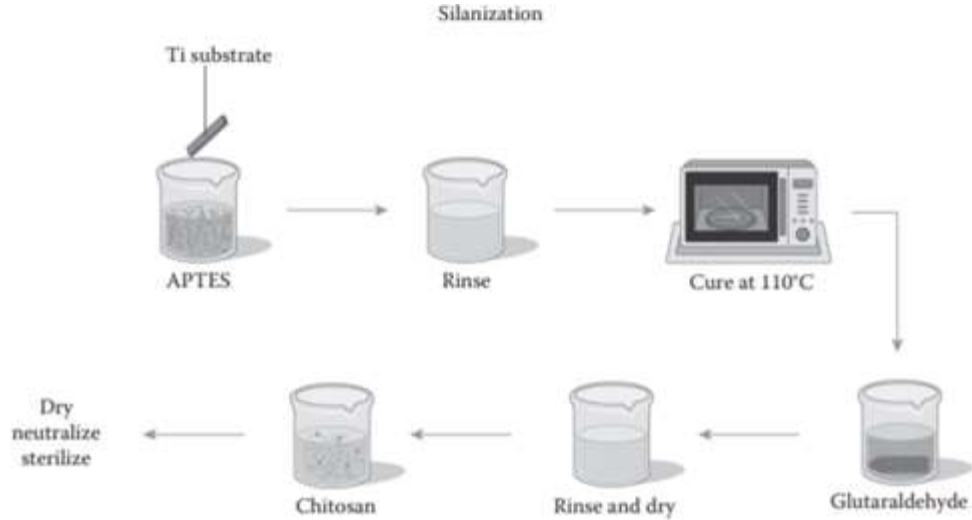


Şekil 2.7. Biyoaktif kitosan kaplamalar için çözelti dökümü yöntemi

Katyonik kitosan ile titanyum implant yüzeylerindeki oksit tabakası arasındaki elektrostatik etkileşimler, basit bir daldırma yönteminde kullanılır. Kitosan çözeltisine daldırıldıktan sonra, karmaşık olmayan implant şekilleri hızla kaplanır, ancak kaplamanın bağlanma gücü klinik uygulamalar için yetersizdir.¹²¹

2.5.2. Silanizasyon

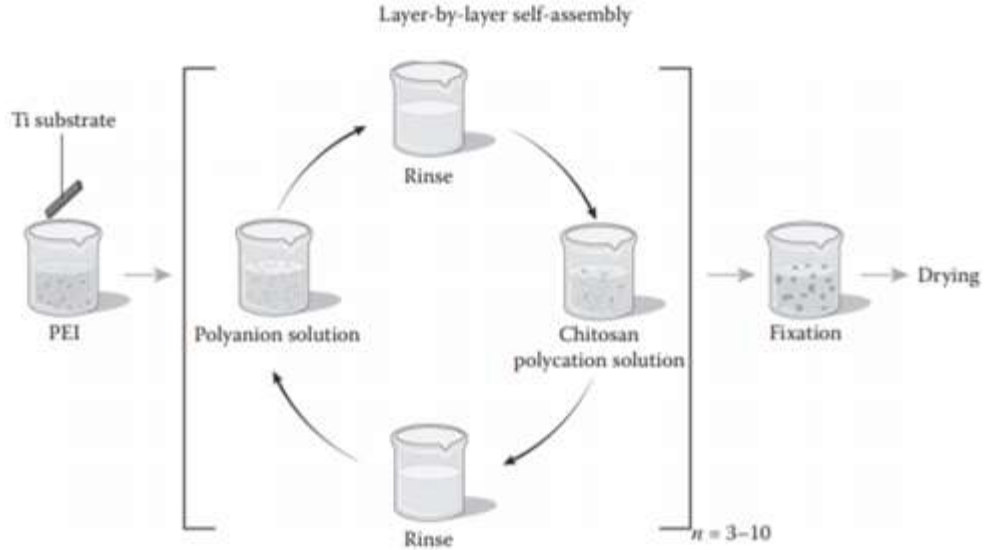
Silanizasyon, bir amino silanın titanyum oksit tabakası ile reaksiyonuna dayanan ve kovalent bağlarla sonuçlanan kimyasal bir bağlanma işlemidir. Bu kaplama yöntemi için deasetile kitosan, glutaraldehit ve silan ajanı içeren bir solüsyon kullanılır (Glutaraldehit, biyomedikal uygulamalarda materyallerle çapraz bağlanma veya reaksiyona girme için yaygın olarak kullanılan bir materyaldir. Kitosan molekülleri ve aminosilan ile kovalent bağlar oluşturmak için reaktif aldehit grupları sağlar.). Solüsyon içerisine dahil edilen titanyum yüzey, silan ve kitosan ile çapraz reaksiyona girer (Şekil 2.8.).¹⁰² Bu işlem deasetilasyon derecesinden bağımsızdır, çözelti döküm yöntemlerine kıyasla önemli ölçüde daha üstün bağlanma kuvveti ile sonuçlanır ve kaplama kalınlığının doğrudan kontrolüne izin verir.^{102, 122} Bununla birlikte, kaplamanın doku içerisinde biyolojik olarak parçalanması sırasında oluşan glutaraldehit kalıntıları salınabilir ve çevredeki dokuya zarar verebilir.¹²³



Şekil 2.8. Kitosan membranların silanizasyon yoluyla titanyum implantlara bağlanması
Önceden işlenmiş titanyum implantlar, bir amino-silan solüsyonuna daldırılır (örneğin APTES (3-aminopropil-trietoksisilan)), reaksiyona girmemiş reaktif kalıntıları çıkarmak için durulanır ve daha sonra kovalent bağ oluşumunu indüklemek için kurlenir. Glutaraldehit çözeltisine daldırmanın ardından, yüzeye bağlı amino-silanın birincil amin grubu, glutaraldehitin aldehit gruplarından biriyle reaksiyona girer. İkinci aldehit grubu aracılığıyla ise kitosan yüzeye kovalent olarak bağlanır. Son aşamada, kaplanmış implant yüzeyi kurutulur, nötralize edilir ve sonraki kullanım için sterilize edilir.¹²¹

2.5.3. Çok Tabakalı Kaplama

Çok tabakalı kaplama yöntemi, çözelti döküm yöntemine alternatif olarak, titanyum yüzeyin negatif yüklü bir biyomateryal çözeltinin ardından pozitif yüklü bir kitosan çözeltisine daldırılması ile elde edilir. Geleneksel çözelti dökümüne benzer şekilde bu yöntem de pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü biyomateryal çözelti arasındaki elektrostatik etkileşime dayanmaktadır (Şekil 2.9).¹²⁴ Ortaya çıkan kaplama tabakaları, yivli veya karmaşık şekle sahip implantların kullanımına izin verecek şekilde nispeten stabil ve üniformdur. Çok tabakalı kaplama, özel ekipman veya potansiyel olarak toksik kimyasalların kullanılmasını gerektirmeyen ucuz ve basit bir yöntemdir.¹²⁵ Kalınlık ve yüzey topografyası, yöntemin parametrelerinin değiştirilmesi ile istenilen şekilde iyileştirilebilir, bu da değişken özelliklere sahip biyoaktif kaplama katmanları ile sonuçlanır.¹²⁶ Yine de, bu yöntem iki farklı biyomalzemenin doğru kombinasyonuna ve optimal depozisyon için çözeltinin tuz koşullarının doğru belirlenmesine bağlıdır.¹²⁷



Şekil 2.9. Çok tabakalı kaplama yöntemi

Poli(etilenimin) (PEI) çözeltisine daldırılarak titanyum implant yüzeyine stabil bir pozitif yük verilir. Bu pozitif yük, negatif yüklü bir polianyon çözeltisi ile elektrostatik etkileşimlere izin verir. Şimdi tersine çevrilmiş yüzey yükü, pozitif yüklü kitosan çözeltisi ile reaksiyon için kullanılabilir. Bu döngü, implant yüzeyinde istenen miktarda çift katman birikene kadar tekrarlanır. Son olarak çok tabakalı kaplı implant sabitleme solüsyonuna daldırılır ve kurutulur.¹²¹

2.5.4. Elektrokimyasal Depozisyon

Uzun süredir kullanılmakta olan elektro-kaplama teknolojisi, yüksek çözünürlüğe sahip elektrolit ve metal tuzları içeren, yüksek iletme yeteneğine sahip sulu çözeltilerin kullanımı esasına dayanmaktadır. Elektrokimyasal depozisyon (EPD), kararlı bir süspansiyondan gelen yüklü parçacıkların, zıt yüklü bir substrat yüzeyinde, doğru akım altında depolanmasını içeren kolloidal oluşum tekniği olarak tanımlanabilir. EPD yöntemi ile toz halindeki malzemenin karmaşık yapılı elektrotlar üzerine homojen birikmesi sağlanabilir.¹²⁸ Organik monomerlerin elektrokimyasal depozisyonu ile hazırlanan iletken, yarı iletken ve yalıtkan filmler son yıllarda çok sayıda araştırma çalışmasının konusu olmuştur. Bu filmlerin kalınlığının ve elektriksel iletkenlik özelliklerinin kontrol edilebilirliği, gelişmiş özelliklere sahip polimer modifiye elektrotların üretilerek mikroelettronik, fotoelektrokimya, elektrokataliz, enerji depolama ve yüzey koruması gibi çeşitli uygulamalarda kullanımına imkân sağlar.¹²⁹

Büyük ölçüde aromatik bileşiklerin anodik oksidasyonuna dayanan elektrodpozisyon, çeşitli substratlar üzerinde polimer biriktirilmesinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Bu işlem oldukça karmaşıktır ve örnek olarak verilen reaksiyonda mevcut E1 potansiyelinde aromatik bir hidrokarbondan (AR) katyon radikal oluşumuna yol açan elektron transferi gerçekleşir (Reaksiyon 1.1). Bu aşamayı, E2 potansiyelinde oksitlenen bir dimer (D) oluşturmak (Reaksiyon 1.2) için, başka molekül veya radikal içeren ve oldukça hızlı gerçekleşen bir kimyasal reaksiyon (Reaksiyon 1.3) izler. Reaksiyonlara ait denklemler aşağıda verilmiştir: $AR +$

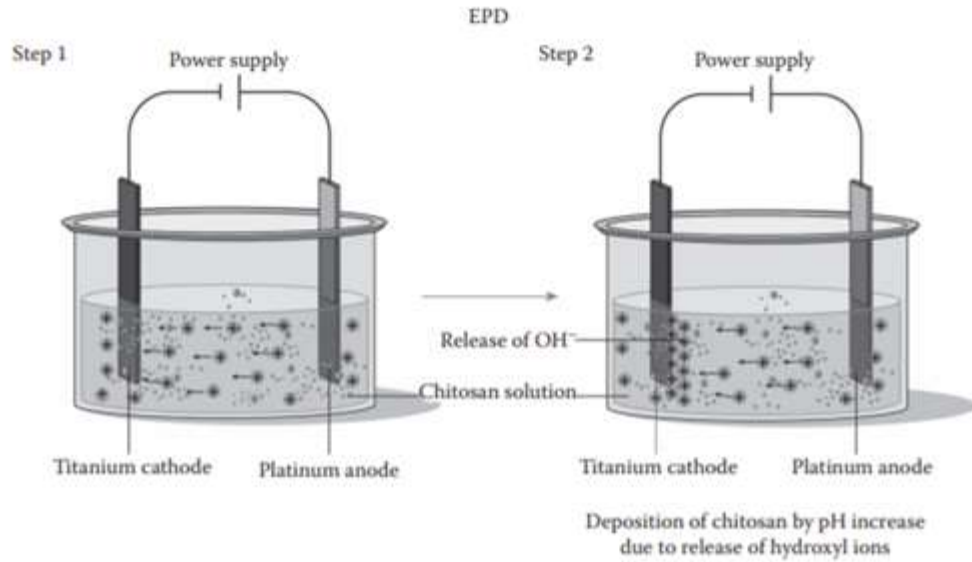


(ne^- : transfer edilen elektron sayısı)

Polimer zincirinin büyümesi, tekrarlanan bir elektrokimyasal reaksiyon işlemi (Örneğin; dönüşümlü voltametri (CV)) yoluyla gerçekleşir. Bununla birlikte, katyon radikali, polimer zincirinin büyümesini sona erdirmek için çözücü bir molekülle veya çözeltideki başka bir molekül ile reaksiyona girebilir. Bu durum monomer molekülüne, çözücü tipine, çözeltideki diğer bileşenlere, ortam sıcaklığına ve elektrodpozisyon potansiyel aralığı gibi çeşitli reaksiyon koşullarına bağlıdır.¹²⁹

Elektrotta, hidrojen gazı salımı pH'ı yükseltir ve ince bir biyofilmin birikmesine neden olur (Şekil 2.10.).¹³⁰ Diğer kaplama teknikleriyle kolayca ulaşılamayacak derecede stokiyometrik yüksek saflıkta malzeme birikmesine olanak sağlaması ve metal fiber ağ yapıları gibi karmaşık yapılar üzerine kaplama yapılabilmesi sebebiyle biyomedikal uygulamalar için elektrodpozisyon önemli bir avantaj oluşturmaktadır.¹³¹ EPD'yi diğer yöntemlerden ayıran özelliklerin başında, oda sıcaklığında uygulanabilmesi ve elektrokimyasal potansiyeli ya da elektrolit derişimi değiştirilerek yüzey morfolojisini

kontrol etmenin mümkün olmasıdır.¹³² Ayrıca basit, ekonomik ve hızlı bir yöntem olması; film kalınlığının ve birikme hızının kontrol edilebilirliği, yüzey kaplama işlemi için EPD'yi cazip hale getirmiştir.¹³³



Şekil 2.10. Kitosan kaplamaların elektroforetik birikimi

Titanyum implant yüzeyi, pozitif yüklü kitosan solüsyonuna batırılmış iki elektrotlu bir hücre sisteminde elektrot olarak kullanılır. Bir elektriksel uyarı uygulandığında, pozitif yüklü parçacıklar elektroda doğru hareket eder. Elektrotta hidrojen gazının salınması nedeniyle, pH yerel olarak artar ve titanyum yüzeyinde ince bir kitosan tabakasının birikmesine neden olur.¹²¹

Tekniğin avantajları;

1. Elde edilen kaplama yüzeyi incedir ve kompozisyonu varyasyon gösterir; kristal boyutu ve kimyasal özellikleri de kemiğe yakındır,
2. Kaplamanın kalınlığı ve kimyasal kompozisyonu, submikron düzeyinde kontrol edilebilmektedir,
3. Hem poröz yüzeylerde hem de düzensiz yüzeye sahip substratlarda, mükemmel homojeniteye sahip kaplamalar elde edilebilmektedir,
4. Yüksek spesifik yüzey alanı olan kaplamaların üretimi mümkündür,
5. Diğer kaplamaların süresiyle kıyaslandığında, daha kısa sürede kaplama yapılabilir.

6. Uygun pH, sıcaklık ve solüsyon kullanılarak çeşitli biyomateryeller kaplanabilmektedir,
7. Sıcaklığın substrat materyali üzerinde olumsuz etkisi bulunmamaktadır,
8. Tekniğin uygulanışı yüksek enerji gerektirmemektedir,
9. Yapılan işlemin maliyeti düşüktür.

Tekniğin Dezavantajları;

1. Elde edilen kaplama materyalinin tutunma dayanımının düşük olması nedeniyle, üretilen kaplama yüzeylerinin aniyodik olarak oksit tabakası ile kombine edilmesi gerekmektedir,
2. Kaplama materyali veya kaplanan yüzeyler elektriği ileten bir substrat olmalıdır,
3. Yüksek akım yoğunluğu veya uzun süreli polarizasyon gerektiren çeşitli elektrokimyasal ortamlarda, metalik substratların hidrojen kırılgenliğinde artış meydana gelebilme riski bulunmaktadır.

Elektrodepozisyonu Etkileyen Parametreler

EPD tekniği ile elde edilen ince filmin kalitesini etkileyen bazı parametreler vardır. Bu parametreler değiştirilerek istenen özelliklere sahip ince film üretmek mümkündür. EPD'yi etkileyen parametreler şu şekilde sıralanabilir: depozisyon potansiyeli, çözelti pH'ı, akım yoğunluğu, elektrolit sıcaklığı, çözelti içine katılan kimyasal maddeler.¹³³⁻¹³⁵

2.6. Kaplamaların Karakterizasyon Yöntemleri

Titanyum alaşımların kitosan temelli biyoaktif kaplamalarının ve diğer biyomateryallerin geliştirilebilmesi ve sahip oldukları eksikliklerin giderilebilmesi amacıyla, bu yapıların içeriklerinin, yapısal özelliklerinin ve mekanik dirençlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Yüzey değerlendirmeleri genellikle sadece yüzey kimyasını,

topografyasını ve ıslanabilirliğini değil, aynı zamanda biyomateryalin polimer kristallliğini, matriks protein adsorpsiyonu ve bozunma hızı değerlendirmelerini de içerir.¹³⁶ Bu amaçla her biri avantaj ve dezavantajlara sahip, çeşitli inceleme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler in vivo ve in vitro çalışmalarda, titanyum vidaların biyoaktif kaplamalarının incelenmesinde ve değerlendirilmesinde uygulanmaktadır.¹³⁷ Bu yöntemlere genel olarak aşağıdaki örnekler verilebilir:

1. Foton Temelli Yöntemler: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Raman spektroskopisi, X-Işını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ve X-Işını kırınımı analizi (XRD),
2. Mikroskopik Yöntemler: Tarama elektron mikroskopisi (SEM), Enerji dağıtıcı X-Işını spektroskopisi, Transmission (Geçirim) elektron mikroskopisi (TEM).

2.6.1. Foton Temelli Yöntemler

2.6.1.1. X-Işını Kırınımı Analizi (XRD)

X-Işını kırınım analizi ya da X ışını kristalografisi bir kristalin atomik ve moleküler yapısını incelemek için kullanılan ve kristalleşmiş atomların bir X-ışını demetindeki ışınların kristale özel, çeşitli yönlerde kırınımı olayına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem farklı materyallerin nitelik ve nicelik yönünden incelenebilmelerine olanak sağlar. İşlem esnasında materyale zarar vermeyen bir yöntemdir. Bu yöntemde incelenecek materyallerin kristal yapıya sahip olması gerektiğinden, bu teknik çeşitli organik materyallerin sıvı örneklerinin incelenmesinde uygun değildir. Ancak incelenmesi uygun görünmeyen materyallerin kristal haldeki türevleri, sahip oldukları benzer karakteristik özellikleri sayesinde bu yöntemle incelenabilmektedir.¹³⁸ Bir X-ışını kırınım ölçümünde bir açılçerin üzerine yerleştirilen kristal, yavaş yavaş döndürülürken X-ışınlarıyla bombardımana tabi tutulması neticesinde kırınımına uğrayan ışınlar yansımalar olarak bilinen düzenli aralıklarla dizilmiş

bir spot deseni oluşturur. Değişik açılardan elde edilen iki boyutlu görüntüler, matematiksel Fourier dönüşüm yöntemi kullanılarak ve kullanılan numunenin bilinen kimyasal verileriyle birleştirilerek kristaldeki elektronların üç boyutlu modeli elde edilir. Günümüzde bu yöntemle katı materyallerin ve ince film şeklindeki kaplama yüzeylerinin kristallografik yapısı, kimyasal kompozisyonu ve fiziksel özellikleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir.^{139, 140}

2.6.2. Mikroskobik Yöntemler

2.6.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu veya SEM (scanning electron microscope), odaklanmış bir elektron demeti ile numune yüzeyini tarayarak görüntü elde eden bir elektron mikroskobu tipidir. Elektronlar numunedeki atomlarla etkileşerek numune yüzeyindeki topografi ve kompozisyon hakkında bilgiler içeren farklı sinyaller üretir. Elektron demeti raster tarama ile yüzeyi tarar ve demetin konumu, algılanan sinyalle eşleştirilerek görüntü oluşturulur. SEM ile 1 nanometreden daha yüksek çözünürlüğe ulaşılabilir. Standart SEM cihazları yüksek vakumda, kuru ve iletken yüzeyleri incelemek için uygundur. Tarama elektron mikroskobunun geliştirilmesiyle, 1950'lerin başından itibaren, tıp ve fizik alanıyla ilgili bilim dallarında yeni araştırma alanları ortaya çıkmıştır.

Tarama elektron mikroskobunda, elektron tabancasından çıkan elektronlar, yüksek voltaj altında hızlandırılarak çeşitli elektromanyetik lenslerin de yardımıyla, numune yüzeyine odaklanmaktadır. Bu işlem cihaz içerisinde yer alan sapıtma bobinleri yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Numunenin yüzeyinden yansıyan elektronların meydana getirdiği sinyaller ise uygun dedektörler vasıtasıyla bir araya getirilip, güçlendirilmiş bir halde katot ışın tüpünde görüntülenmektedir. Numune yüzeyinden yansıyan sekonder elektronlardan alınan bilgi neticesinde, numunenin yüzey morfolojisi hakkında yüksek çözünürlükte görüntü alınabilirken; yansıyan geri saçılan elektronlar

vasıtasıyla da, numunenin elemental değişkenleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Bu sistemde numune yüzeyine gönderilen hızlandırılmış elektronlar, numune yüzeyinde elektriksel olarak negatif yüklenmeye neden olmaktadır. Meydana gelen yük değişimi, gönderilmekte olan elektronların sapmasına ve elde edilen görüntüde distorsiyona sebep olmaktadır (Yük etkisi). Bu durumun etkilerini en aza indirebilmek amacıyla, kitosan kaplı yüzeyler, polimerler ve biyolojik materyaller inceleme öncesinde yaklaşık 10 nm kalınlığındaki karbon veya altın iletken yüzeyle kaplanmaktadır. Ayrıca konvansiyonel tarama elektron mikroskoplarında, elektronların numune yüzeyine ulaşmadan önce ortam şartlarından etkilenmemeleri amacıyla işlem vakumlu ortam içerisinde sürdürülmek zorundadır. Bu zorunluluk sebebiyle, numune içerisinde bulunabilen ve yüksek vakumlu ortamda buharlaşabilen materyallerin, inceleme öncesinde numuneden uzaklaştırılması gerekmektedir. Uzaklaştırılması gereken materyaller genellikle biyolojik ürünler, su ve çeşitli çözücü materyallerden oluşmaktadır.¹⁴¹ Literatür incelendiğinde, kitosan kaplamalarının yapı ve morfolojilerinin incelenmesinde tarama elektron mikroskobu analizi sıklıkla kullanılmaktadır.⁴ Kaplamanın kalınlığı ve kompozisyonu dışında in vitro ve in vivo çalışmalarda kaplama yüzeyinde oluşan mikrobiyolojik aktivite ile birlikte kaplama yüzeyinde hücre kültürü sonrasında oluşan kemik matriksinin değerlendirilmesi amacıyla da sıklıkla başvurulmuş bir analiz yöntemidir.^{5, 102, 142}

3. MATERYAL METOD

3.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup 12.04.2021 tarih ve sayılı oturumunda, 57 nolu karar ile tez projesi olarak onaylanmıştır ve Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğünün TDH-2020-8525 proje numarası ile desteklenerek gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalarımız Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Çalışmamızda denek olarak Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilen Sprague dawley ırkı 80 adet erkek rat kullanıldı. Denekler 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık siklusu uygulanarak ortam sıcaklığı 24-26°C olacak şekilde paslanmaz tel kapakları olan plastik kafesler içerisinde, üzeri hava alabilecek şekilde tutuldu. Çalışma süresince kafesler 3 günde bir düzenli olarak temizlendi. Hayvanlar çalışmada kullanılmadan önce veteriner hekim tarafından kontrol edildi ve genel sağlık durumlarının normal olduğu onaylandı.

Erken ve geç dönem osseointegrasyonun ve zaman bağımlı olarak kitosanın dokudaki kurkumin salımına etkisinin anlaşılması amacıyla her biri 20 rattan oluşan 4 grup deney hayvanı kendi grupları içinde 2. ve 6. haftalık incelemeler için randomize olarak ikiye ayrıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Deney Grupları (Grupların her biri 10 rat içermektedir.)

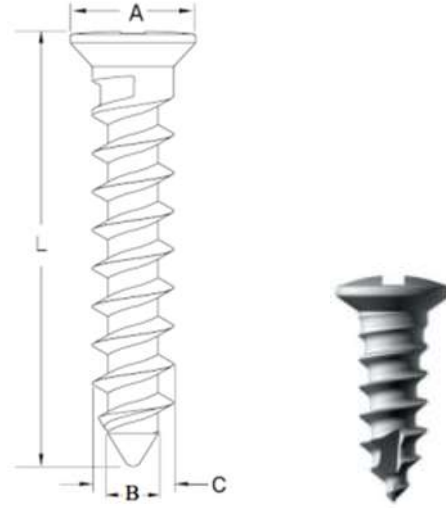
2. HAFTA TAKİP	6. HAFTA TAKİP
NM-Ti-2h grubu(n=10)	NM-Ti-6h grubu(n=10)
CH-Ti-2h grubu(n=10)	CH-Ti-6h grubu(n=10)
CU-Ti-2h grubu(n=10)	CU-Ti-6h grubu(n=10)
CH-CU-Ti-2h grubu (n=10)	CH-CU-Ti-6h grubu(n=10)

3.2. Titanyum Vidaların Yüzey Kaplama İşlemi

Çalışma için Trimed® Self Tapping Mikro Titanium grade 5 mini vidalar (California, ABD), Sigma-Aldrich (Missouri, ABD) orta moleküler ağırlıklı kitosan (deasetilizasyon derecesi %85), Sigma-Aldrich kristalize kurkumin (saflık derecesi %80) kullanılmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Tablo 3.2).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kitosan ve kurkumin materyaller



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bir vidanın teknik çizimi ve görseli
A: Vidanın kafa çapı, B: Vidanın iç çapı, C: Vidanın dış çapı, L: Vida boyu

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan grade 5 Ti vidanın boyutları

Dış Çapı (C)	İç Çapı (B)	Boy (L)	Kafa Çapı (A)
1.8 mm	1.6 mm	4 mm	2.2 mm

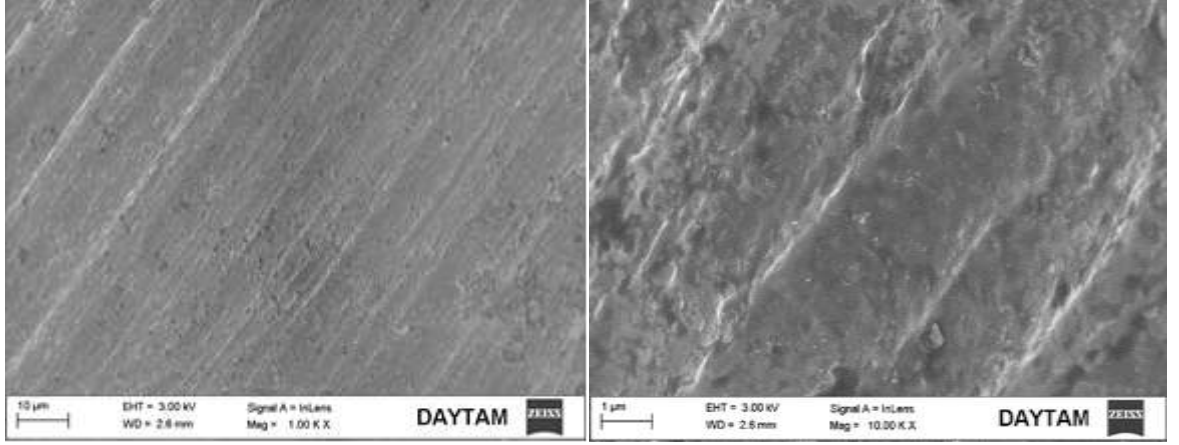
Çalışma için kullanılacak olan titanyum mini vidalar 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubunda bulunan vidalara herhangi bir yüzey işlemi uygulanmamıştır. Bu grup non-modifiye titanyum grubu (NM-Ti) olarak ayrılmıştır. Diğer 3 grup ise kaplama materyaline göre sırasıyla kitosan grubu (CH-Ti), kurkumin grubu (CU-Ti) ve kitosan-kurkumin grubu (CH-CU-Ti) olarak belirlenmiştir. EPD yöntemiyle yüzey kaplama işlemi Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır. EPD işlemleri öncesinde substrat olarak kullanılan grade 5 titanyum (Ti-6Al-4V) vidalar, yüzeyinde bulunabilecek organik artıkların uzaklaştırılabilmesi adına sırasıyla %99,8'lik etanol ve saf su içerisinde 15 dakika sonike edilerek temizlenmiş ve argon (Ar) gazı ile kurutularak elektrokimyasal depozisyon işlemine hazır hale getirilmiştir. Kitosan depozisyonu için, asetik asit içerisinde çözdürülen kitosan ile 1mM kitosan hidroklorür + 0.1M KCl (potasyum klorür) çözeltisi kullanılmıştır. Elektrokimyasal reaksiyon için 3 elektrotlu hücre sistemi seçilmiştir. Hücre sisteminde

Çalışma elektrodu Ti vida, karşıt elektrodu platin (Pt) tel (yaklaşık %99,95 saflıkta, 0,5 mm çapında ve 5 cm uzunluğunda) ve referans elektrodu olarak da gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) kullanılmıştır. Kitosanın, Ti vida elektrotlar yüzeyinde elektrodpozisyonu - 0,5 V ile +1,5 V aralığında 25 çevrim sayısında tekrarlayan dönüşümlü voltamogram kullanılarak yapılmıştır. Kurkuminin elektrodpozisyonu için ise %99,8 saf etanol içerisinde disperse edilmiş 10 mM kurkumin (0.05 mg/ml kurkumin-etanol çözeltisi) kullanılmış ve -0,2 V ile +0,8 V aralığında 30 çevrim sayısında tekrarlayan dönüşümlü voltamogram uygulanarak titanyum vidalar kurkumin ile kaplanmıştır. Son olarak kitosan-kurkumin çift tabakalı kaplama için sırasıyla her iki polimer için de belirtilen elektrodpozisyon sentez adımları uygulanmıştır. Titanyum vidalara, yüzey modifikasyon işlemi sonrası kaplamanın morfolojisinin belirlenmesi için SEM ve XRD analizleri yapılmıştır.

3.3. Kaplama Yüzeyinin zelliklerinin Belirlenmesi

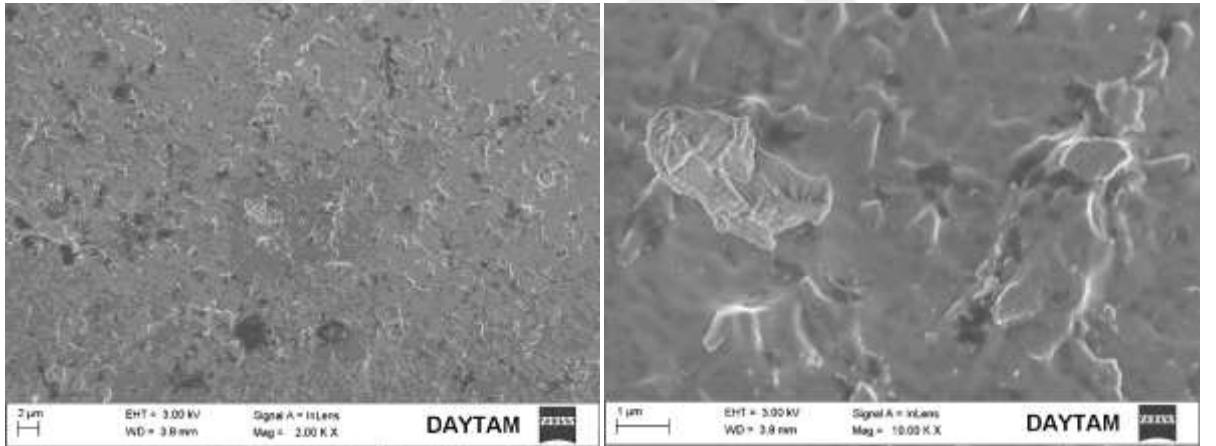
Kaplama işlemi tamamlanan Ti mini vidalar yeterli sürede deiyonize su ve etanol ile durulandıktan sonra havada kurutuldu. Atatürk Üniversitesi DAYTAM'da FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscope, Zeiss, Jena, Almanya) cihazı kullanılarak yüzey morfolojisi değerlendirildi.

Temizleme prosedürü uygulanan non-modifiye Ti vidaların FESEM görüntüleri kurkumin ve kitosan modifikasyonu sonrasında yapılacak morfolojik analizlerde referans olması amacı ile şekil 3.3'te verilmiştir. FESEM görüntüleri mikro boyutta pürüzsüz bir metalik yzeze işaret etmektedir.



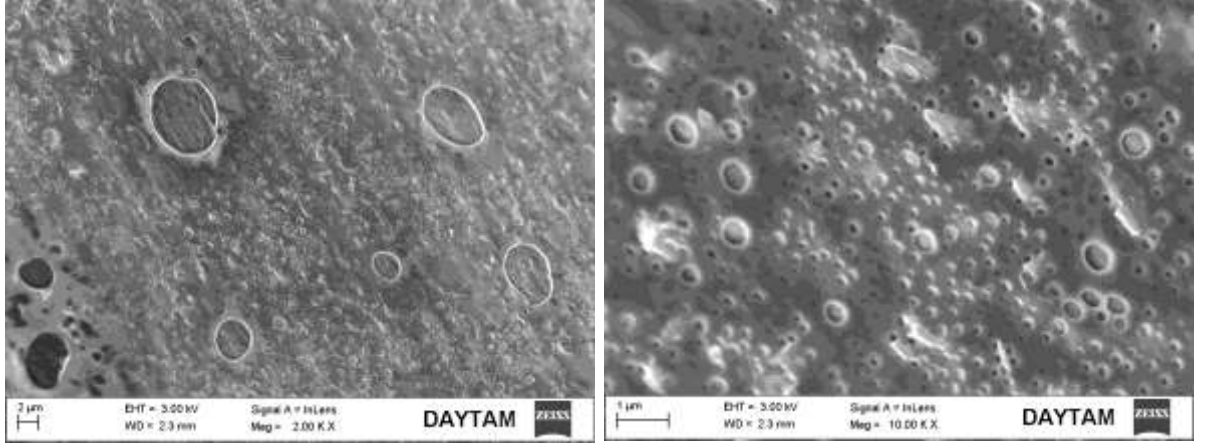
Şekil 3.3. Non-modifiye grade 5 titanyum vidanın FESEM görüntüsü

Kitosan kaplı Ti vidaların Şekil 3.4’te verilen FESEM görüntüleri yüzeyin ince bir film ile kaplandığını, artan büyütme oranıyla birlikte non-modifiye Ti vidaya oranla yüzey pürüzsüzlüğünün değiştiğini ve titanyum üzerinde kitosan tabaka oluşumunu göstermektedir.



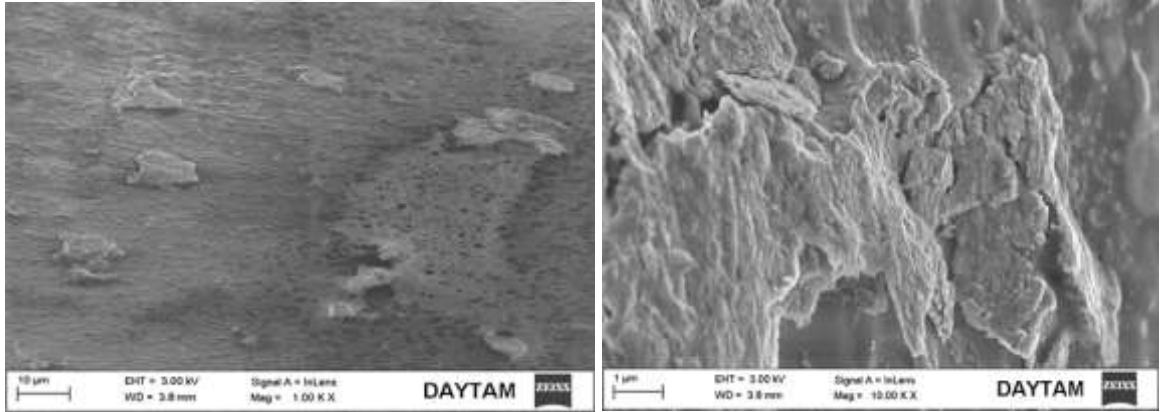
Şekil 3.4. Kitosan kaplı titanyum vidanın farklı büyütmelerdeki FESEM görüntüleri
Vida yüzeyinde kitosan film görülmekte.

Kurkumin modifiye Ti vidaların FESEM görüntüleri Şekil 3.5’te verilmiştir. İncelenen FESEM görüntüleri yine non-modifiye Ti vida referans alındığında yüzeyde ince film tabakası oluştuğunu göstermektedir. Vidanın farklı bölgelerinden alınan görüntülerde yüzeyin homojen olduğu ve oldukça gözenekli bir morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir.



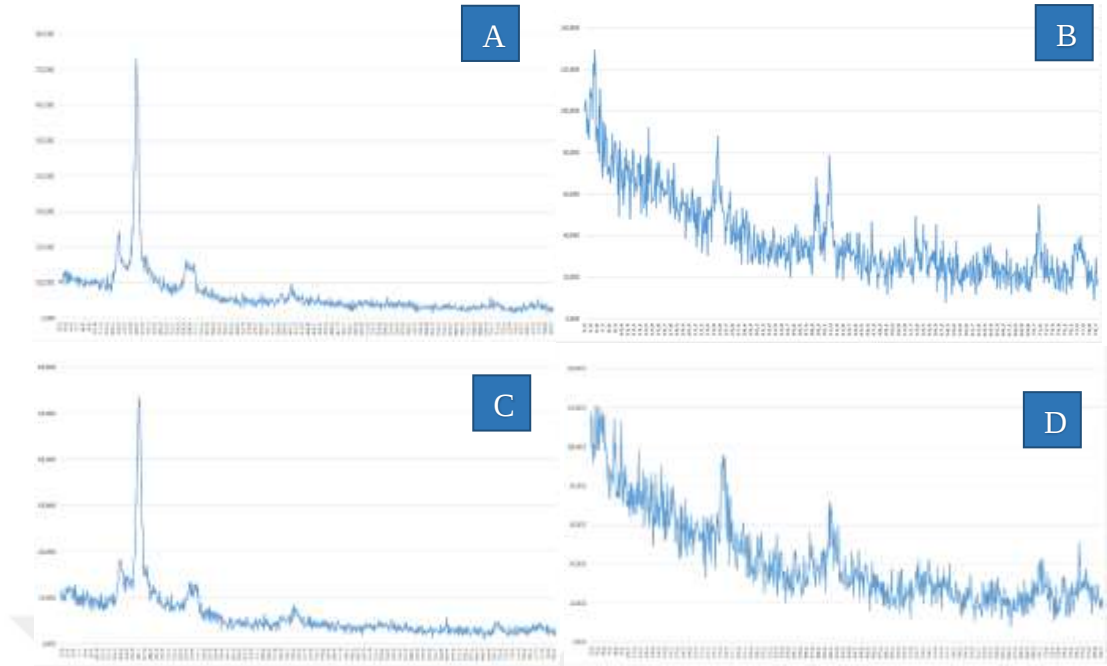
Şekil 3.5. Kurkumin kaplı titanyum vidanın farklı büyütmelelerde FESEM görüntüleri
Vida yüzeyinde kurkumin partikülleri görülmekte.

Non-modifiye titanyum vida yüzeyine elektrodpozit edilen kitosan-kurkumin film için de modifiye titanyum vidanın yüzey morfolojisi FESEM ile araştırılmıştır. FESEM görüntüleri Şekil 3.6’da görüldüğü gibi yalnızca kurkumin depozit edilen elektroda benzer şekilde porlu ve yalnızca kitosan kaplı elektroda benzer şekilde ince bir filmin oluştuğunu göstermektedir.

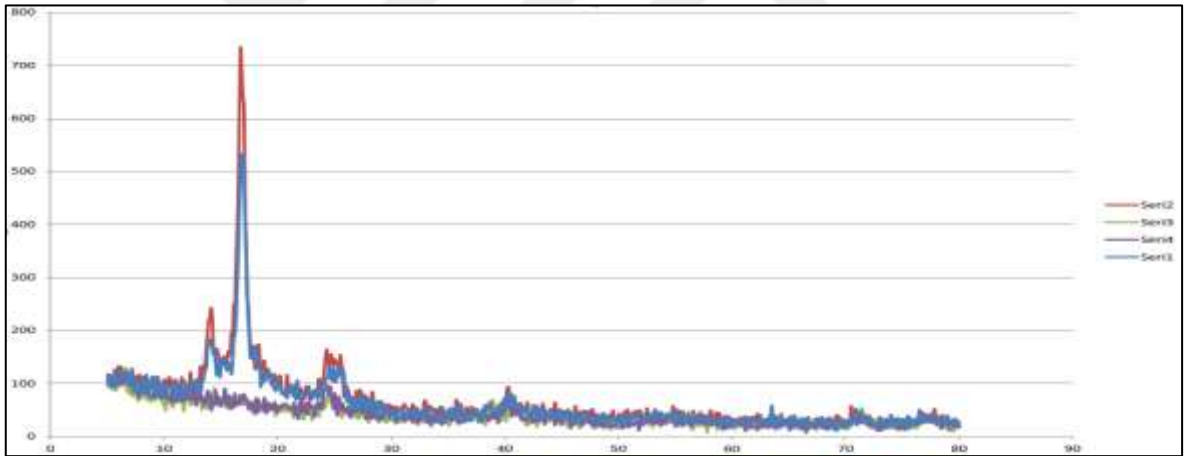


Şekil 3.6. Kitosan-kurkumin kaplı titanyum vidanın farklı büyütmelelerde FESEM görüntüleri
Vida yüzeyinde kitosan film yapısı ve kurkumin partikülleri beraber görülmekte.

SEM görüntülerine ek olarak vidalara uygulanan XRD (PANalytical Empyrean, Malvern, Birleşik Krallık) analizleri şekil 3.7’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.7. NM-Ti vida (A), Cu-Ti vida (B), CH-Ti vida (C), CH-CU-Ti vida (D) XRD grafiği



Şekil 3.8. Çakıştırılmış XRD grafiği

Grafikler çakıştırıldığında elde edilen görüntüde kaplanan yüzeylerde titanyumun oluşturduğu pikteki değişimler gözlenmektedir (Seri1 CH-Ti vida, Seri2 NM-Ti vida, Seri3 CU-Ti vida, Seri4 CH-CU-Ti vidayı ifade eder.)

3.4. Cerrahi Yöntem

Deney hayvanları, ketamin hidroklorür (500mg/10ml Ketalar, Pfizer, New York, ABD) ve ksilazin (XYLAZINBIO %2 çözelti. Bioveta, Çek Cumhuriyeti) kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyon ile genel anesteziye alındı (Şekil 3.9). Anestezi derinliği, göz kapağı refleksinin kaybolması ve enjeksiyon yapılmayan taraftaki

ayağın çimdiklenmesiyle oluşan tepkiye göre değerlendirildi. Ayağında tepki görülen deneklerde anestezinin derinleşmesi için beklenerek tekrar test yapıldı. Tepki vermeye devam eden hayvanlara ek anestezi verildi.



Şekil 3.9. İntraperitoneal anestezi uygulamasının gerçekleştirilmesi

Cerrahi işlem uygulanacak alanın antisepsi işlemi %10'luk povidon iyot solüsyonu (Dermosept®, Baticonol, ALG İlaç Sanayi, Türkiye) ile gerçekleştirildi.

Daha sonra 15 nolu bistüri ile femur medialinden longitudinal bir cilt insizyonu yapıldı ve periost elevatörü ile periost kaldırılarak kemik yüzeyi açığa çıkarıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Vida yerleştirilecek femur yüzeyinin görüntüsü

Sağ femurda, facies patellarisin anteromedial kısmına, her bir hayvanda kortikal kemiğe bir adet 2.2 mm çapında 4 mm uzunluğunda vidaların yerleştirileceği vida yuvaları oluşturuldu (Şekil 3.11). Bu işlem irrigasyon ile çalışan tur motoru ve 1.6 mm çapında mini dril ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.11. Vida yuvası

Vida yuvalarının açılmasının ardından, yuvalar serum fizyolojikle yıkanıp kanama kontrolü sağlandıktan sonra deney gruplarına uygun olarak NM-Ti, CH-Ti, CU-Ti, CH-CU-Ti vidalar torklu tornavida ile yerleştirildi (Şekil 3.12.). Vidaların yerleştirilmesi sırasında maksimum 2,5 N/cm tork uygulandı.



Şekil 3.12. Vida yerleştirilmiş femur yüzeyi

Cilt insizyonu 3/0 ipek suturelarla primer kapatıldı (Şekil 3.13.). Operasyonlar sırasında deney hayvanlarının vücut sıcaklığı korundu. Deneklere postoperatif 3 gün süresince günde iki kere seftriakson 1 gr/kg IM/IV ve analjezik olarak da metamizol sodyum 1 gr/2 ml IM/IV intramuskuler yolla verildi. Denekler, operasyonu takiben standart rat yemi ve suyla beslendi ve her gün klinik takipleri yapıldı.



Şekil 3.13. Cilt sutureasyonu

Operasyon sonrası ikinci ve altıncı haftalarda, hayvanlar CO₂ ünitesinde inhalasyon yoluyla aşırı dozda CO₂ verilerek sakrifiye edildi (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Deneklerin özel kafesler içerisinde % 100 CO₂ ile sakrifiye edilmesi

Ti vidaları içeren femur örnekleri alındı (Şekil 3.15.). Bu örneklerin yarısı histolojik inceleme için %10'luk tamponlu formalin (0,1M, pH 7,4) solüsyonuna alındı. Diğer yarısı ise moleküler incelemeler için -80° derecede muhafaza edildi.



Şekil 3.15. Deney hayvanlarının sakrifiye edilmesinden sonra alınan femur örneği

3.5. Histolojik İnceleme

6. hafta sonunda alınan doku örnekleri histolojik incelemeye alınmıştır. %10'luk tamponlu formalin çözeltisinde 1 hafta süre ile tespit yapılan dokular, %20'lik formik asit solüsyonunda 5 gün boyunca dekalsifiye edilmiştir. Daha sonra sırasıyla %50 alkolle 30 dakika, %60 alkolle 60 dakika, %70 alkolle 75 dakika, %80 alkolle 75 dakika, %95 alkolle 90 dakika dehidratasyon işlemi uygulanmıştır. Şeffaflaştırma işlemi için 3 set, sırasıyla 40, 60 ve 60 dakika ksilen uygulanmıştır. İnfiltrasyon işlemi için dokular, 40 dakikalık 4 set ile parafine gömülmüştür. Dokular uygun kalınlıkta kesilerek lamlara kesit alınmıştır. Deparafinizasyon için lamalar etüvde 30 dakika boyunca 70 derecede bekletilmiştir. Deparafinizasyonun 2. aşaması için 3 aşamalı olarak 15 dakika boyunca ksilen uygulanmıştır. Rehidratasyon işlemi için dokulara %100 alkol 30 dakika, %90 alkol 30 dakika uygulanmıştır. Akarsuda 5 dakika yıkanan örnekler hematoksil-eozin boyama prosedürüne alınmıştır. Boyama protokolü tablo 3.3'te gösterildiği gibidir.

Tablo 3.3. Hematoksil-eozin boyama protokolü

YIKAMA	AKARSU	5 dakika
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	10 dakika
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1 saniye
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
BOYAMA	EOZİN	2 dakika
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
	% 80 ALKOL	1 saniye
	%96 ALKOL	1 saniye
	% 96 ALKOL	1 saniye
	KSİLEN	1 saat
KAPAMA	ENTELLAN	

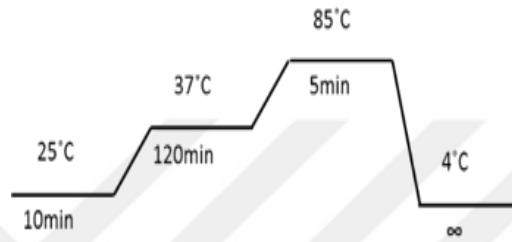
Yeni kemik oluşumu, osteoklast aktivitesinin belirlenmesi ve fibrotik doku oluşumu açısından her deneğin; Axio Scope A1 mikroskop (Zeiss, Jena, Almanya) x40 ve x100'lük büyütme altında, vida etrafındaki alan incelenerek gerçekleştirilmiştir. Önceki çalışmalara benzer şekilde örneklerin incelenmesi sonucu ortaya çıkan yeni kemik oluşumu, 2 haftalık grupların incelemesinde formasyon derecesine göre: yok (-), zayıf (+), orta (++), ileri düzey (+++) ve 6 haftalık grupların incelemesinde maturasyon derecesine göre: yok (-), zayıf (+), orta (++), ileri düzey (+++) olarak derecelendirilmiştir. Osteoklast aktivitesinin sayısal değerlendirilmesi ise şu şekildedir: vida etrafında görülen osteoklast sayısına göre; yok (0), 1-2 adet (1), 3-4 adet (2), 5 adetten fazlası (3) olarak değerlendirilmiştir. Fibrotik doku yoğunluğu da aynı şekilde derecelendirilmiştir: yok (-), zayıf (+), orta (++), ileri düzey (+++).

3.6. Moleküler İnceleme

RANKL, OPG, RUNX2 ve OC mRNA seviyelerinin değerlendirmesi, alınan peri-implant kemik numunelerinin RT-PCR yöntemiyle ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Periimplant kemik doku Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazında homojenize edildi ve QIAcube (Qiagen, Hilden, Almanya) RNA izolasyon cihazında RNA ekstraksiyonu üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde sürdürüldü. Total RNA miktarı Nanodrop spektrofotometri (EPOCH, Biotek, Vermont, ABD) ile 260nm'de ölçüldü. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) enzimi kullanımı ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı (Tablo 3.4). Her reaksiyon 10 µL RNA ile gerçekleştirilerek cDNA sentezi aşağıdaki sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, California, ABD) ile sağlandı (Şekil 3.16.). cDNA miktarı nano drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek, Vermont, ABD) ile belirlendi ve -20°C'de saklandı.

Tablo 3.4. cDNA sentez reaksiyonu

Total RNA	10 µl
10 X RT Buffer	2 µl
25 X dNTPs mix	0.8 µl
10 X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
DEPC-H ₂ O	4.2 µl

**Şekil 3.16.** cDNA sentezi sıcaklık grafiği

Vida etrafındaki kemik doku RNA'larından elde edilen cDNA'lardan RANKL (Rn00589289), OPG (Rn00563499), RUNX-2 (Rn01512298) ve OC (Rn01455285) mRNA ekspresyonu, TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) kiti kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazında yapıldı. Referans gen olarak β -actin (Rn00667869) kullanıldı. Her doku için 9 µl cDNA (100 ng), 1 µl Primer Perfect Probe karışımı ve 10 µl QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak total volüm her ölçümde 20 µl olacak şekilde düzenlendi. Prosedüre uygun olarak Applied Biosystems StepOnePlus Real Time PCR cihazının plakaları 50°C'de 2 dakika ve 95°C'de 10 dakika ısıtıldı ve ardından 94°C'de 15 saniyelik ve 60°C'de 60 saniyelik 45 döngü uygulandı. Tüm veriler, $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanılarak kontrol grubuna kıyasla kat değişimi olarak ifade edildi.

3.7. İstatiksel Analiz

Çalışma sonucu elde edilen veriler IBM SPSS V23 ile analiz edildi. Histolojik inceleme verilerinin, gruplara göre kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Moleküler inceleme verilerinin gruplara göre kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Veriler arasındaki zamansal farklılığın anlamlılık derecesi ise çift yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. Önem düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.



4. BULGULAR

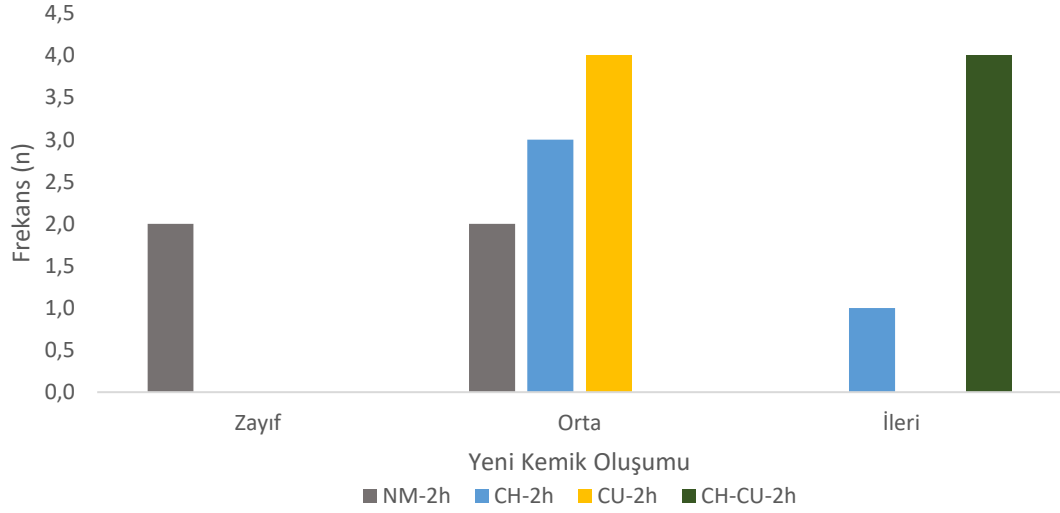
4.1. Histolojik Bulgular

Elde edilen bulgular ışığında, tüm gruplar arasında kontrol grubuna göre 2. hafta formasyon durumları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,005$). NM-Ti-2h grubunun %50'sinin 2. hafta formasyonu zayıf ve %50'sinin 2. hafta formasyonu orta, CH-Ti-2h grubunun %75'inin orta, CU-Ti-2h grubunun %100'ünün orta ve CH-CU-Ti-2h grubunun %100'ünün formasyonu ileri düzey olarak elde edilmiştir. Gruplar arasında 6. hafta maturasyon durumları kontrol grubuna göre CU-Ti-6h ve CH-CU-Ti-6h gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,014$). NM-Ti-6h grubunun %50'sinin 6. hafta maturasyonu zayıf ve %50'sinin 6. hafta maturasyonu orta, CH-Ti-6h grubunun %50'sinin zayıf ve %50'sinin orta, CU-Ti-6h grubunun %100'ünün ileri ve CH-CU-Ti-6h grubunun %100'ünün maturasyonu ileri düzey olarak elde edilmiştir (Tablo 4.1.). Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de yeni kemik oluşumu skorlamasının gruplar arasındaki değişimi gösterilmiştir.

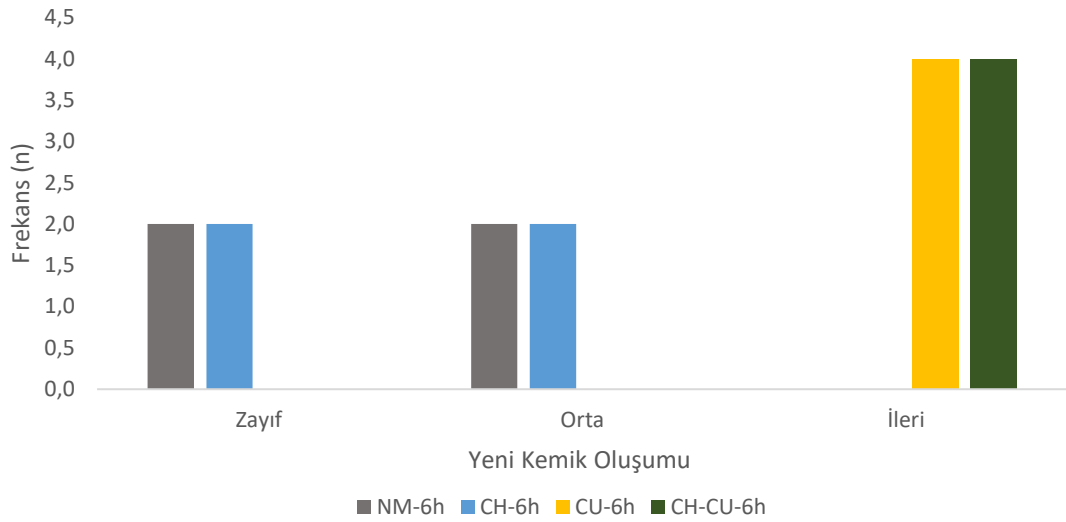
Tablo 4.1. Gruplar arası yeni kemik oluşum düzeyinin değerlendirilmesi.

2. hafta formasyon				6.hafta maturasyon				p ¹	p ²
Grup	Zayıf	Orta	İleri	Grup	Zayıf	Orta	İleri		
NM-Ti-2h	2 (50)	2 (50) ^{ab}	0 (0) ^a	NM-Ti-6h	2 (50)	2 (50)	0 (0) ^a	0,005	0,014
CH-Ti-2h	0 (0)	3 (75) ^{ab}	1 (25) ^{ab}	CH-Ti-6h	2 (50)	2 (50)	0 (0) ^a		
CU-Ti-2h	0 (0)	4 (100) ^b	0 (0) ^a	CU-Ti-6h	0 (0)	0 (0)	4 (100) ^b		
CH-CU-Ti-2h	0 (0)	0 (0) ^a	4 (100) ^b	CH-CU-Ti-6h	0 (0)	0 (0)	4 (100) ^b		

*Ki-kare testi, p¹: 2. hafta yeni kemik formasyonuna ait p değeri, p²: 6. hafta yeni kemik maturasyonuna ait p değeri, a-b: Aynı harfe sahip gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



Şekil 4.1. Yeni kemik oluşumunun 2. hafta gruplarındaki skorlamasının sütun grafiği



Şekil 4.2. Yeni kemik oluşumunun 6. hafta gruplarındaki skorlamasının sütun grafiği

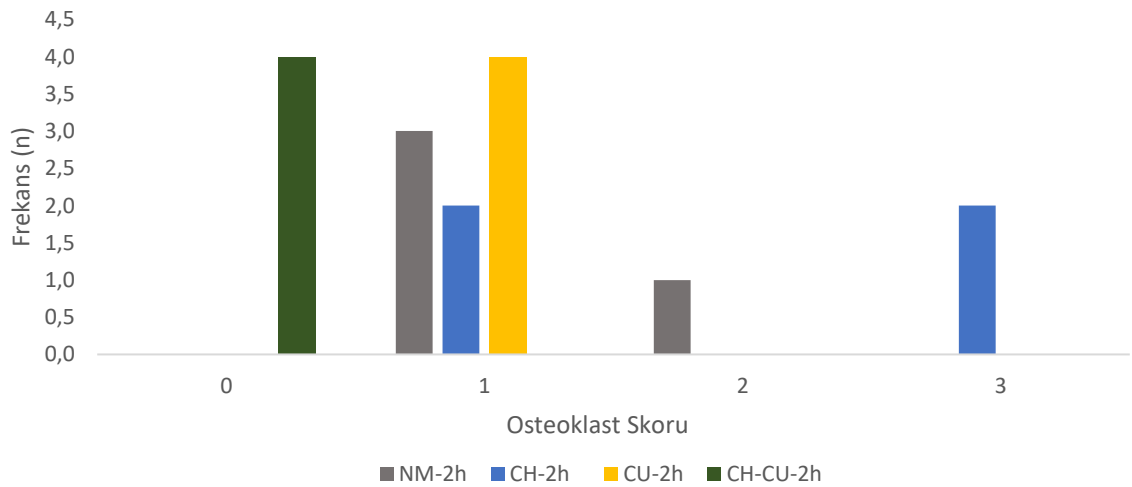
İkinci hafta grupları arasında osteoklast sayısının dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,003$) (Tablo 4.2.). 2. haftada kontrol grubunun %75'inin osteoklast skoru 1, CH-Ti-2h grubunun %50'sinin osteoklast skoru 1 ve %50'sinin osteoklast skoru 3, CU-Ti-2h grubunun %100'ünün osteoklast skorunun 1 olduğu görülmüştür. CH-CU-Ti-2h grubunda osteoklast izlenmemiştir. Grupların 6. hafta histolojik incelenmesinde gruplar arasında osteoklast skorları arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir. Maturasyon evresinde osteoklast sayısının formasyon

evresine göre düşük olması beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte kontrol grubunun %25'inde osteoklast skoru 1, CH-Ti-6h grubunun %25'inin osteoklast skoru 1, %25'inin osteoklast skoru 3, %50'sinin osteoklast skoru 0'dur. Histolojik kesitler incelendiğinde CH-Ti-6h grubunda bazı kesitlerde yabancı cisim reaksiyonu izlenmiştir ve yine bazı kesitlerde vida çevresinde kartilaj doku görülmüştür. CU-Ti-6h ve CH-CU-Ti-6h gruplarında osteoklast skoru 0'dır. Şekil 4.3, Şekil 4.4'te ve Tablo 4.2'de osteoklast sayısının gruplar arasındaki değişimi gösterilmiştir.

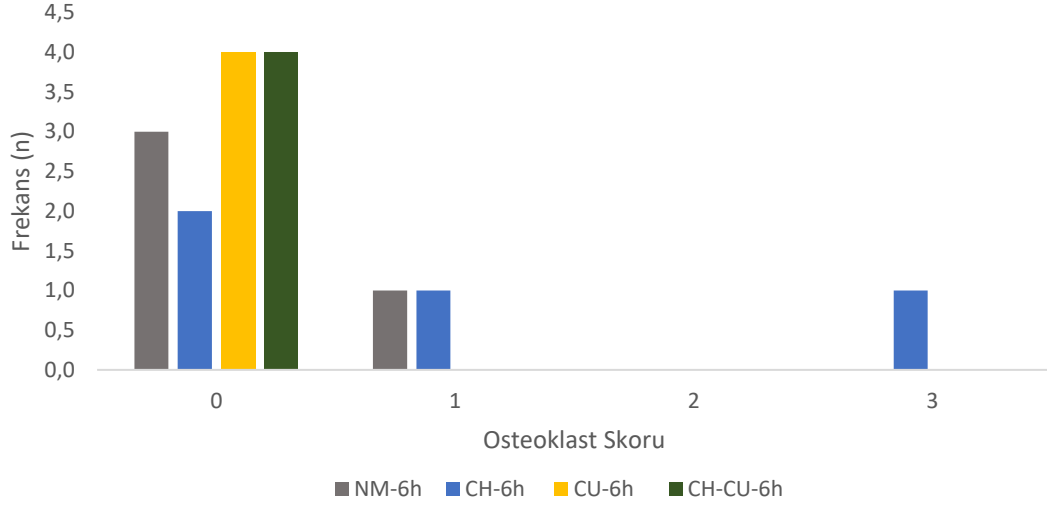
Tablo 4.2. Gruplar arası osteoklast sayılarının değerlendirilmesi

	(0)Yok	1(1-2)	2(3-4)	3(4>)	p ¹	p ²
NM-Ti-2h	0 (0) ^a	3 (75) ^{ab}	1 (25)	0 (0)	0,003	0,006
CH-Ti-2h	0 (0) ^a	2 (50) ^{abc}	0 (0)	2 (50)		
CU-Ti-2h	0 (0) ^a	4 (100) ^b	0 (0)	0 (0)		
CH-CU-Ti-2h	4 (100) ^b	0 (0) ^c	0 (0)	0 (0)	0,441	
NM-Ti-6h	3 (75) ^b	1 (25) ^{ac}	0 (0)	0 (0)		
CH-Ti-6h	2 (50) ^{ab}	1 (25) ^{ac}	0 (0)	1 (25)		
CU-Ti-6h	4 (100) ^b	0 (0) ^c	0 (0)	0 (0)		
CH-CU-Ti-6h	4 (100) ^b	0 (0) ^c	0 (0)	0 (0)		

*Ki-kare testi, a-c: Aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur, p²: Grup ve zaman etkileşimine ait p değeri, p¹: 2. ve 6. haftaya ait p değerleri



Şekil 4.3. Osteoklast sayısının 2. hafta gruplarındaki skorlamasının sütun grafiği



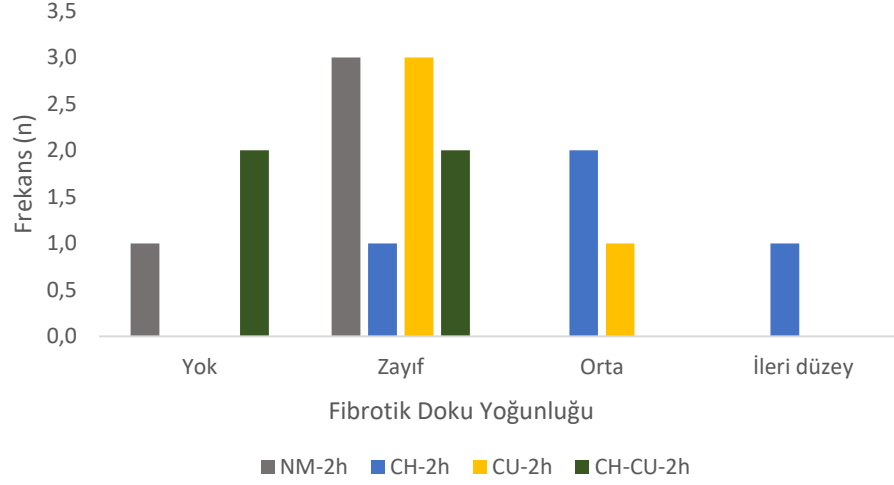
Şekil 4.4. Osteoklast sayısının 6. hafta gruplarındaki skorlamasının sütun grafiği

Alınan kesitler fibrotik doku yoğunluğu açısından histolojik olarak incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (p değerleri sırasıyla 0,240, 0,321).(Tablo 4.3, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6)

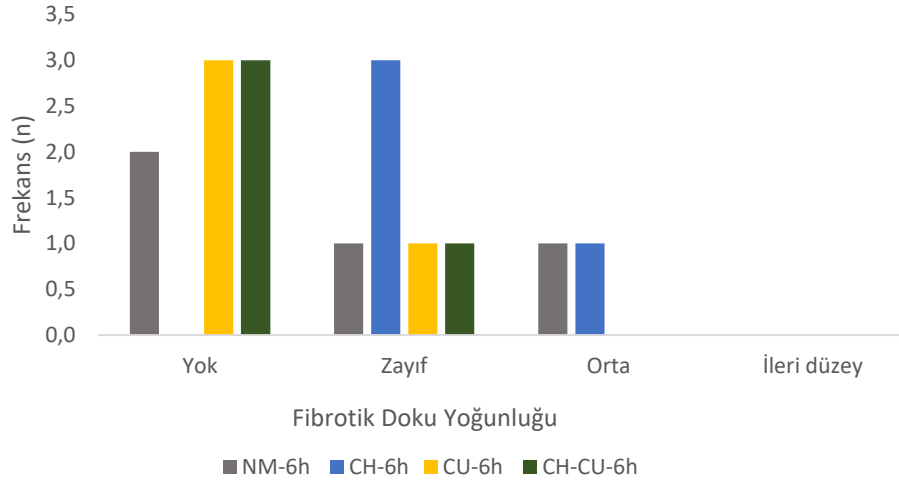
Tablo 4.3. Fibrotik doku yoğunluğunun karşılaştırılması

	Yok	Zayıf	Orta	İleri düzey	p ¹	p ²	
NM-Ti-2.h	1 (25)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	0,240	0,226	
CH-Ti-2.h	0 (0)	1 (25)	2 (50)	1 (25)			
CU-Ti-2.h	0 (0)	3 (75)	1 (25)	0 (0)			
CH-CU-Ti-2.h	2 (50)	2 (50)	0 (0)	0 (0)			
NM-Ti-6.h	2 (50)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	0,321		
CH-Ti-6.h	0 (0)	3 (75)	1 (25)	0 (0)			
CU-Ti-6.h	3 (75)	1 (25)	0 (0)	0 (0)			
CH-CU-Ti-6.h	3 (75)	1 (25)	0 (0)	0 (0)			

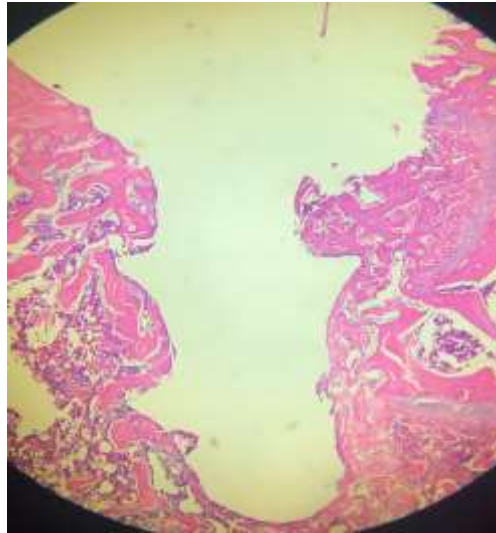
*Ki-kare testi, p²: Grup ve zaman etkileşimine ait p değeri, p¹: 2. ve 6. haftaya ait p değerleri



Şekil 4.5. 2. hafta fibrotik doku yoğunluğuna ait sütun grafiği

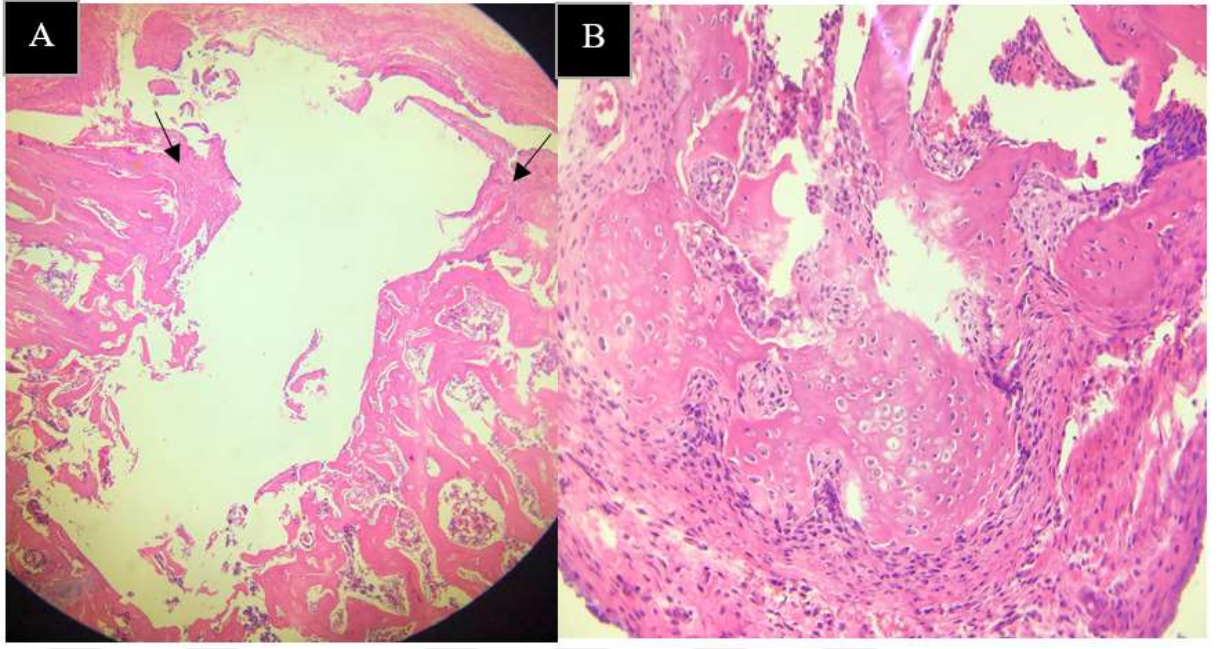


Şekil 4.6. 6. hafta fibrotik doku yoğunluğuna ait sütun grafiği



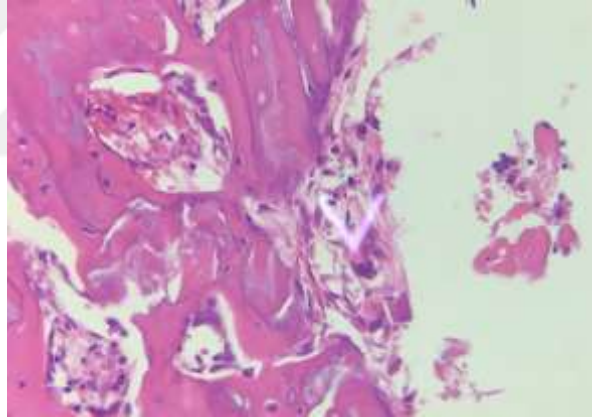
Şekil 4.7. NM-Ti-2h grubu histolojik kesiti

Zayıf-orta düzeyde yeni kemik formasyonu, osteoklast skoru 1, fibrotik doku yoğunluğu zayıf. x10 (Hematoksilen Eozin)



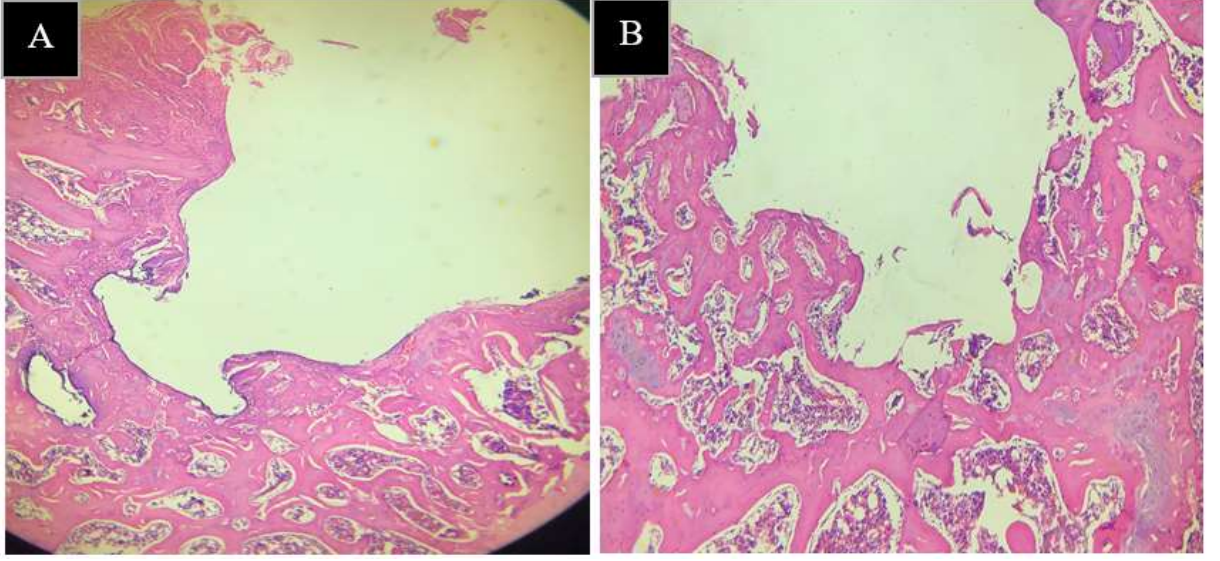
Şekil 4.8. CH-Ti-2h grubu histolojik kesiti

Orta düzeyde yeni kemik formasyonu ile birlikte vida çevresinde kartilaj formasyonu izlendi (Ok işaretleri ve görsel B). Fibrotik doku yoğunluğu orta olarak görüldü. x10, x100 (Hematoksilen Eozin)



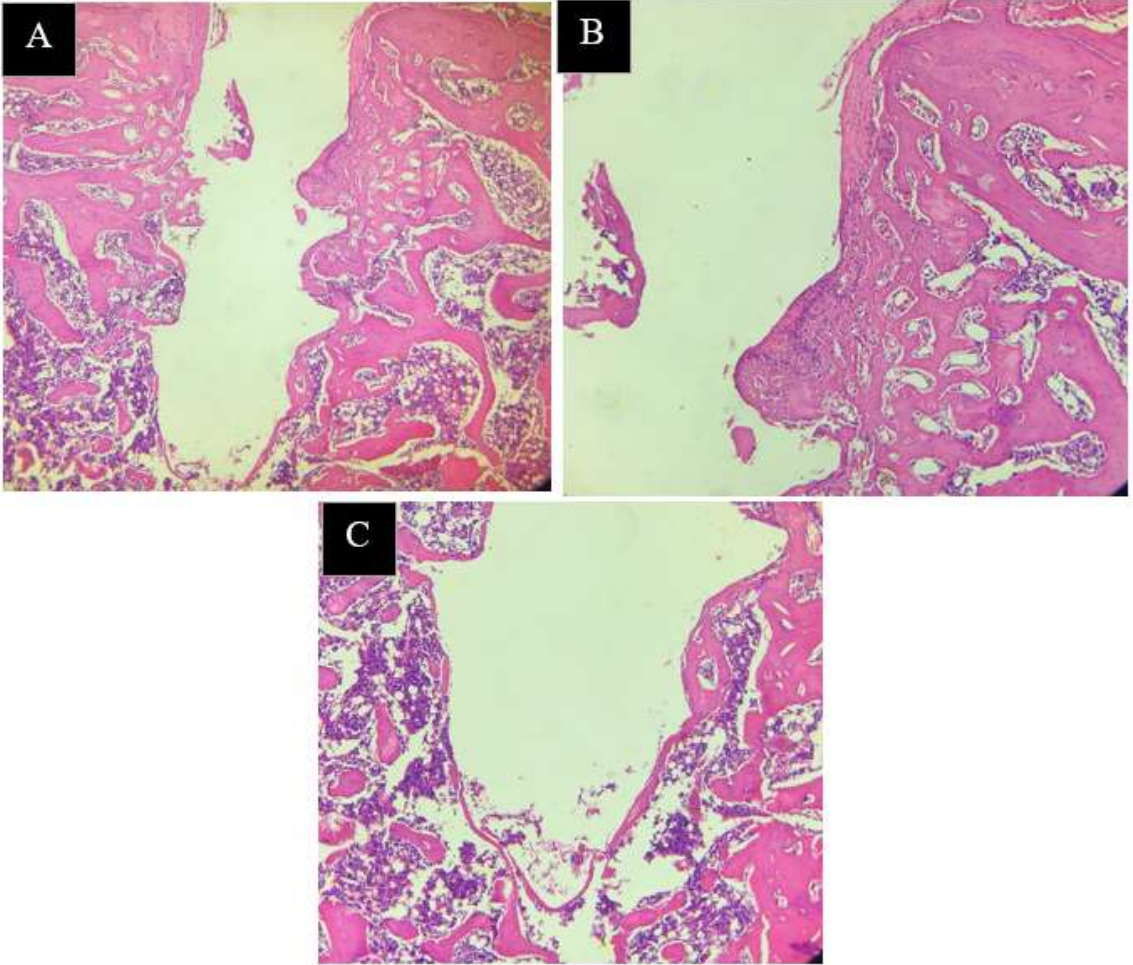
Şekil 4.9. CH-Ti-2h grubu histolojik kesiti

Osteoklast skoru 2. Ok işaretleri vida çevresindeki osteoklastı göstermekte. x100 (Hematoksilen Eozin)



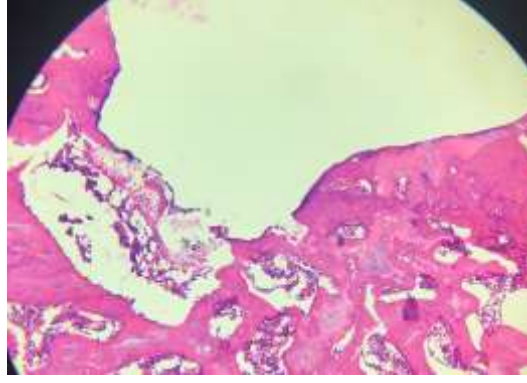
Şekil 4.10. CU-Ti-2h grubu histolojik kesiti

Vida çevresinde orta seviyede yeni kemik formasyonu, fibrotik doku yoğunluğu zayıf, osteoklast skoru 1. x10, x40 (Hematoksilen Eozin)



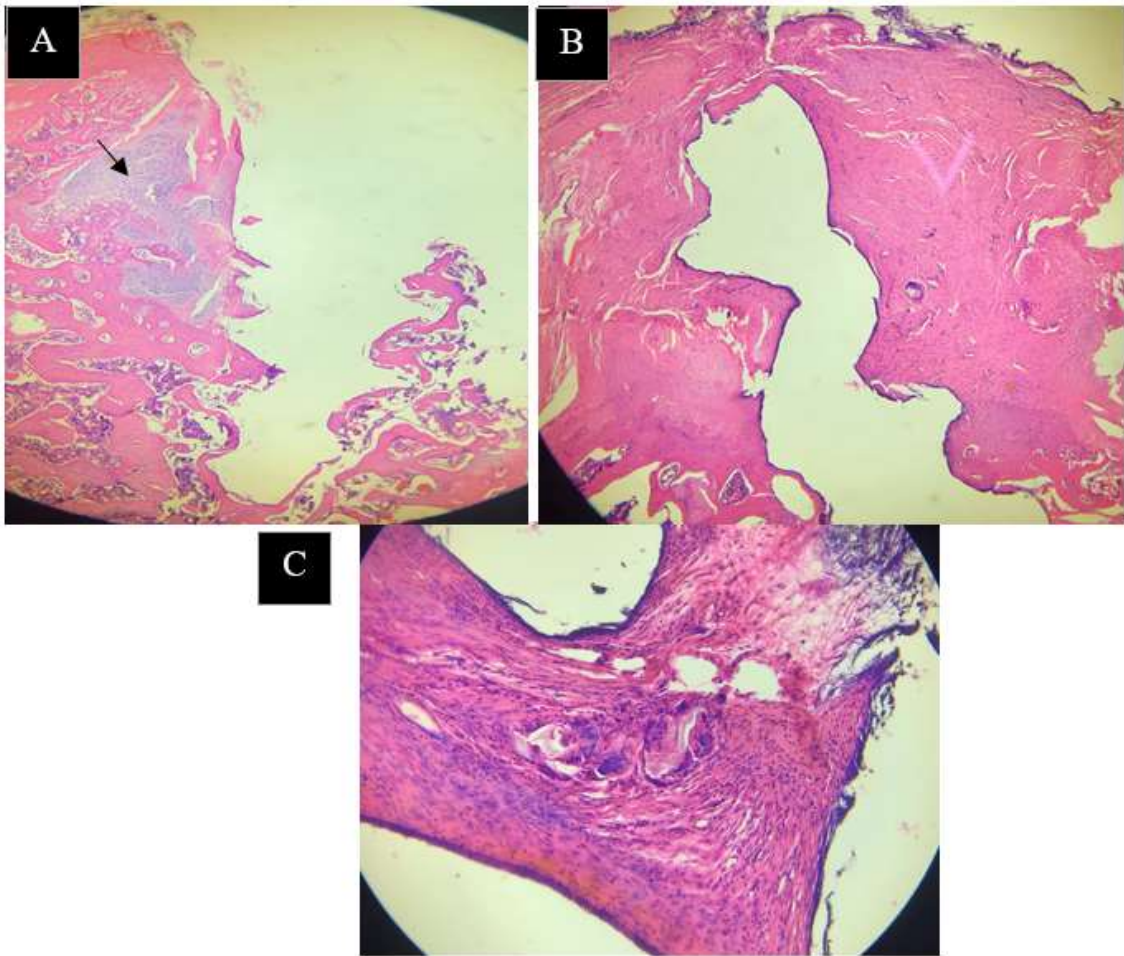
Şekil 4.11. CH-CU-Ti-2h grubu histolojik kesiti

Vida etrafında ileri düzeyde yeni kemik formasyonu, osteoklast skoru 0, zayıf düzeyde fibrotik doku yoğunluğu görülmekte. Vida boynu etrafında yeni kemik oluşumu devam ederken (B) vida alt ucunda matür kemik oluşumu (C) gözlenmiştir. x10, x40 (Hematoksilen Eozin)



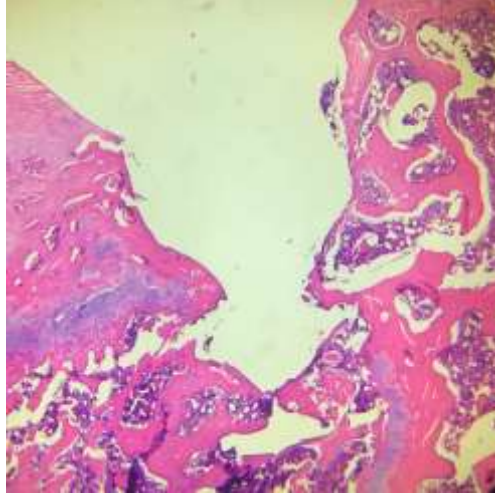
Şekil 4.12. NM-Ti-6h grubu histolojik kesiti

Vida etrafında eski kemiğe benzer görünüm, kemiğin maturasyon derecesi zayıf, fibrotik doku yoğunluğu zayıf, osteoklast skoru 0. x10 (Hematoksilen Eozin)



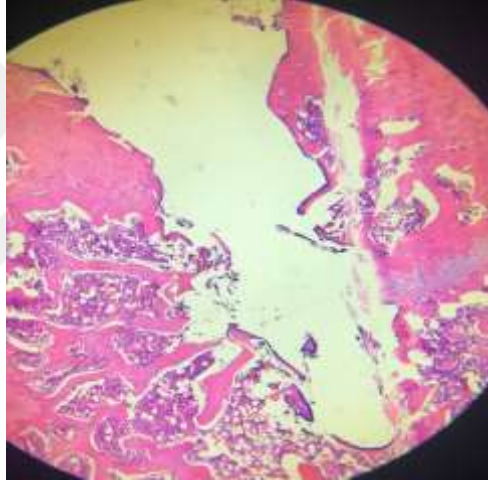
Şekil 4.13. CH-Ti-6h grubu histolojik kesiti

Vida etrafında kartilaj doku görülmekte (A-B görselleri ok işaretleri), vida etrafındaki kemiğin maturasyon derecesi orta, fibrotik doku yoğunluğu orta, gruptaki bazı örneklerde vida etrafında yabancı cisim reaksiyonu oluştuğu görüldü (C). x10, x100 (Hematoksilen Eozin)



Şekil 4.14. CU-Ti-6h grubu histolojik kesiti

Vida etrafında oluşan yeni kemiğin maturasyonu son aşamada, fibrotik doku gözlenmedi, osteoklast skoru 0. x40 (Hematoksilen Eozin)



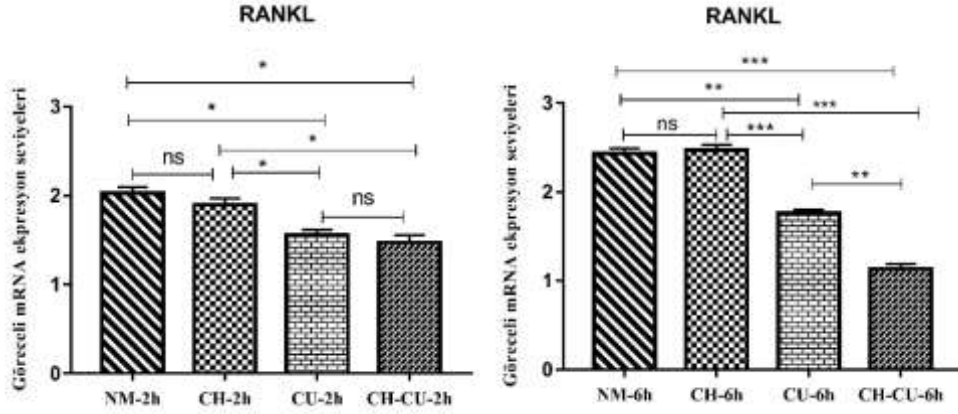
Şekil 4.15. CH-CU-Ti-6h grubu histolojik kesiti

Vida etrafında oluşan yeni kemiğin maturasyonu son aşamada, fibrotik doku gözlenmedi, osteoklast skoru 0. X10 (Hematoksilen Eozin)

4.2. Moleküler Analiz Bulguları

RT-PCR yöntemi ile değerlendirilen RANKL, OPG, RUNX2 ve OC genlerinin ekspresyon seviyeleri 2. ve 6. haftalar için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Osteoblastik aktiviteyi ifade eden gen ekspresyon seviyelerinin CH-CU-Ti uygulanan gruplarda NM-Ti uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu, osteoklastik aktiviteyi ifade eden gen ekspresyon seviyelerinin ise daha düşük olduğu gözlenmiştir.

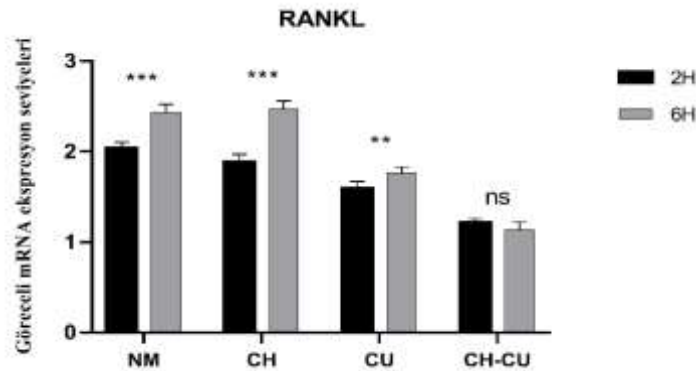
2. ve 6. haftadaki RANKL gen ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki farklılıkları Şekil 4.16’da gösterilmiştir. NM-Ti uygulanan grup ile CU-Ti ve CH-CU-Ti uygulanan gruplar arasında, özellikle 6. haftada daha belirgin istatistiksel olarak anlamlı farklar elde edilmiştir.



Şekil 4.16. RANKL ekspresyon seviyeleri

0.05= p <0.1(*) Sınırdan anlamlılık, 0.01= p <0.05(**) İstatistiksel anlamlılık, 0.001= p <0.01(***) Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık, p >0.10 (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

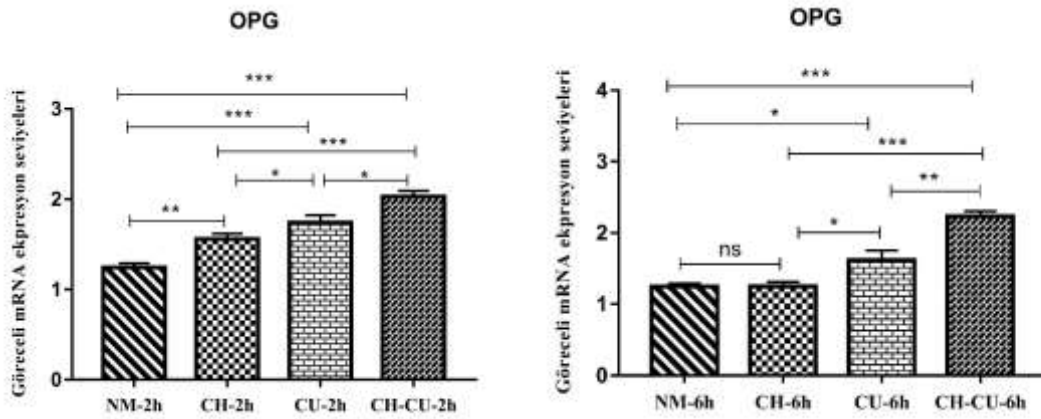
RANKL ekspresyon seviyesinin 2. ve 6. hafta arasındaki değişimi Şekil 4.17’de gösterilmiştir. CH-CU-Ti uygulanan grupta 2. ve 6. haftalar arasında RANKL ekspresyon seviyesinde anlamlı fark bulunmamıştır. NM-Ti, CH-Ti ve CU-Ti uygulanan gruplarda, RANKL ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür.



Şekil 4.17. 2. ve 6. haftalar arasındaki RANKL ekspresyon seviyeleri

0.01= p <0.05(**) İstatistiksel anlamlılık, 0.001= p <0.01(***) Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık, p >0.10 (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

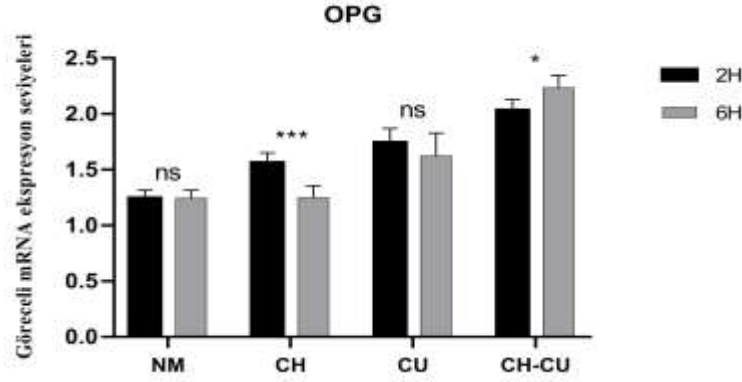
2. ve 6. haftadaki OPG gen ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki farklılıkları Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Formasyon evresinde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar elde edilmişken maturasyon evresinde bu, gruplar arasında değişkenlik göstermiştir. NM-Ti-6h grubu ile CH-Ti-6h grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. OPG ekspresyon seviyesi CU-Ti-6h grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Bununla birlikte CH-CU-Ti-6h grubu diğer gruplara kıyasla yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık göstermiştir.



Şekil 4.18. OPG ekspresyon seviyeleri

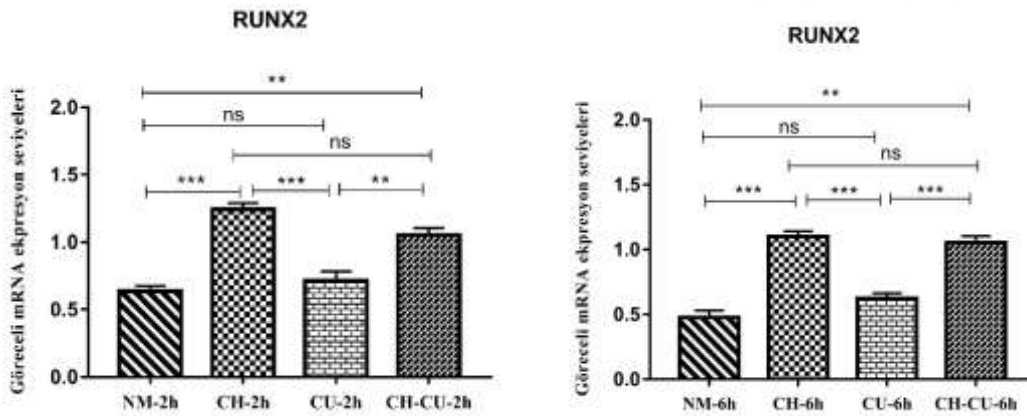
0.05= p <0.1(*) Sınırdan anlamlılık, 0.01= p <0.05(**) İstatistiksel anlamlılık, 0.001= p <0.01(***) Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık, p >0.10 (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

OPG ekspresyon seviyesinin 2. ve 6. hafta arasındaki değişimi Şekil 4.19’da gösterilmiştir. CH-Ti uygulanan grupta OPG seviyelerinde azalma ve RANKL seviyelerinde artma görülmektedir. CU-Ti uygulanan grupta OPG seviyesinde değişiklik görülmemiştir. CH-CU-Ti uygulanan grupta ise OPG seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken RANKL seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik yoktur.



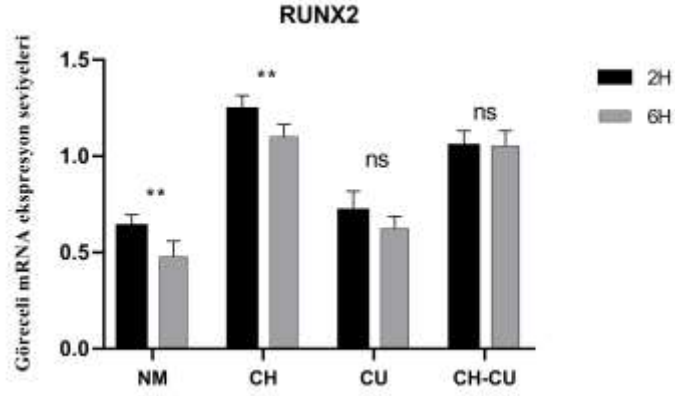
Şekil 4.19. 2. ve 6. haftalar arasında OPG ekspresyon seviyeleri
 $0.05 \leq p < 0.1$ (*) Sınırdaki anlamlılık, $0.001 \leq p < 0.01$ (***) Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık, $p > 0.10$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

2. ve 6. haftadaki RUNX2 gen ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki farklılıkları Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla CH-Ti ve CH-CU-Ti grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık mevcuttur. Bununla birlikte CU-Ti uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. CH-Ti ve CH-CU-Ti uygulanan grupların RUNX2 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılığı bulunmamaktadır.



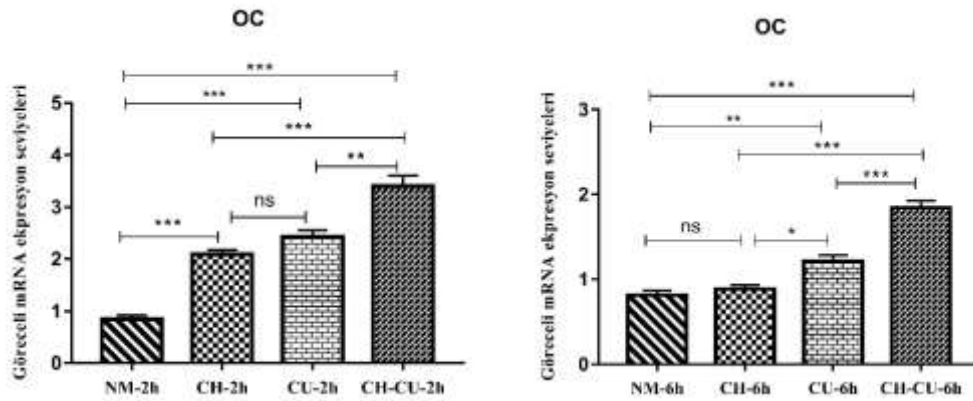
Şekil 4.20. RUNX2 ekspresyon seviyeleri
 $0.01 \leq p < 0.05$ (**) İstatistiksel anlamlılık, $0.001 \leq p < 0.01$ (***) Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık, $p > 0.10$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Şekil 4.21 RUNX2 gen ekspresyonunun 2. ve 6. haftalar arasındaki değişimini göstermektedir.



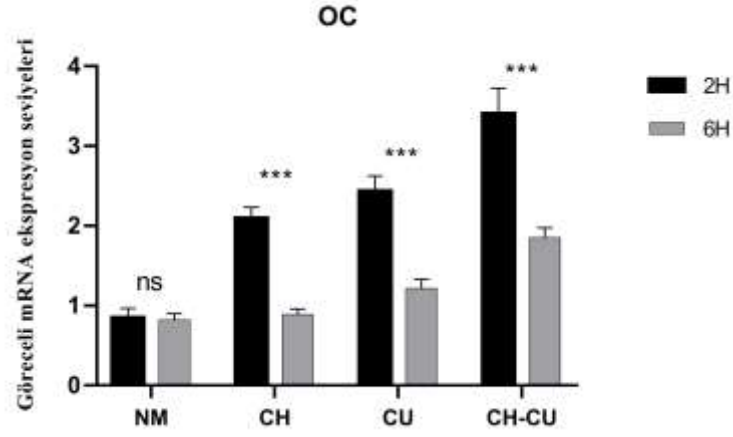
Şekil 4.21. 2. ve 6. haftalar arasında RUNX2 ekspresyon seviyeleri
 $0.01 \leq p < 0.05$ (**) İstatistiksel anlamlılık, $p > 0.10$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

2. ve 6. haftadaki OC gen ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki farklılıkları Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Formasyon evresinde kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir. Maturasyon evresinde ise CH-CU-Ti-6h grubunda, kontrol ve diğer gruplara göre yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık mevcuttur.



Şekil 4.22. OC ekspresyon seviyeleri
 $0.05 \leq p < 0.1$ (*) Sınırdan anlamlılık, $0.01 \leq p < 0.05$ (**) İstatistiksel anlamlılık, $0.001 \leq p < 0.01$ (***) Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık, $p > 0.10$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Şekil 4.23 OC gen ekspresyonunun 2. ve 6. haftalar arasındaki değişimini göstermektedir. Maturasyon evresinde tüm gruplarda OC seviyelerinde düşüş görülmektedir. Buna rağmen CH-CU-Ti-6h grubunda diğer gruplara göre OC seviyesi istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlılık gösterir.



Şekil 4.23. 2. ve 6. haftalar arasında OC ekspresyon seviyeleri
0.001≤p<0.01(***) Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık, p>0.10 (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Ortopedi, travmatoloji, plastik cerrahi ve dental implantoloji alanlarındaki biyomedikal uygulamalarda en önemli konu; implantların biyouyumluluklarının yüksek olması, vücut içerisinde mükemmel bir korozyon direncine sahip olması ve kemikle hızlı bir şekilde bütünleşerek osseointegrasyon sağlayabilmesidir. Osseointegrasyon, özellikle dental implantların klinik başarısı için çok önemlidir. Günümüzde yapılan çalışmalarda da osseointegrasyon düzeyini ve hızını artırarak, dental implantların klinik başarısını artırmak, yükleme öncesi bekleme süresini kısaltmak ve kemik hacminin yetersiz olduğu durumlarda daha kısa implantların kullanılabilmesinin önünü açmak amacıyla birçok yeni yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmaların bir kısmı implantın yiv karakteri ve şekli üzerinde dururken; diğer bir kısmı da implantın yüzey özelliklerini değiştirerek, implantların klinik başarısını artırmayı amaçlamaktadır.^{143, 144} Kemik içi implant yerleştirilmesini takiben iyileşme süresini kısaltmak, materyalin biyouyumluluğunu artırmak ve daha iyi bir osseointegrasyon düzeyine ulaşabilmek amacıyla yapılan araştırmalar, biyoaktif özellikteki çeşitli biyolojik veya kimyasal ürünlerle, implant yüzeyinin kaplanması veya bu ürünlerin lokal veya sistemik uygulamalarını içermektedir. Bu amaçla literatürde trombositten zengin plazma, simvastatin, rekombinant insan kemik morfogenetik proteini-2 (rhBMP-2) ve melatoninle birlikte rekombinant fibroblast büyüme faktörü-2 (rhFGF-2) gibi materyaller kullanılmıştır.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸

Son çalışmalar ise; kitosan kaplamaların, osseointegrasyonu sağlamak için geleneksel kalsiyum fosfat ve hidroksiapatit kaplamalara veya yüzey pürüzlülüğünü artıran işlemlere etkili bir alternatif olabileceğini önermektedir.⁴ Çalışmamızda kitosanın, osteojenik ve bakteriyostatik özelliklerinin yanı sıra kemik-implant arayüzünde osseointegrasyonun sağlanması için antibiyotikleri, biyoaktif ajanları, büyüme

faktörlerini ve bazı iyonları taşıması ve bunların kontrollü salımını gerçekleştirme potansiyelinden yararlanıp kurkumin ile kombine ederek, bu biyoaktif polimerlerin histolojik ve moleküler düzeyde osseointegrasyona etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

Literatürde, kitosan veya kurkuminin; kemik üzerine olan biyolojik etkilerinin ve osseointegrasyonun değerlendirilmesi amacıyla yapılan prelinik in vivo çalışmalarda çoğunlukla ratlar ve tavşanlar tercih edilmiştir.^{4, 149-151}

Sendyk ve ark. yapmış olduğu; kemik implant temasının (BIC), mekanik testlerin ve histolojik verilerin değerlendirildiği sistematik review çalışmasında, kriterlere uygun olarak değerlendirmeye dahil edilen 17 hayvan çalışmasından %82'sinin (14 çalışma) ratlar üzerinde, %18'inin (3 çalışma) tavşanlar üzerinde olduğu görülmüştür. Ratlarda yapılan bu çalışmalar; tibia üzerine 1.0 mm kalınlığında 1.5 mm genişliğinde titanyum plakların yerleştirildiği, 2 ve 4 haftalık takipleri içeren araştırmalardır.¹⁵²

Histing ve ark. deney hayvanlarından rat ve farelerin, boyutsal olarak küçük ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle avantajlı laboratuvar hayvanları olduklarını belirtmişlerdir. Aynı zamanda oda sıcaklığı, nem ve yem standardizasyonunun sağlanabilmesi yönüyle de laboratuvar hayvanlarının kullanımları çalışmalarda kolaylık sağlamaktadır.¹⁵³

Dereka ve ark. osteoporotik ve/veya osteopenik bir grup ve sağlıklı bir kontrol grubu içeren, dental implant osseointegrasyonunda BIC değerlerinin histolojik olarak değerlendirildiği sistematik review çalışmasında, en yaygın deneysel modelin 41 çalışmada (% 71.93) kullanılan rat modeli olduğu belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan hayvanların yaşının heterojen olarak, 30 günden 11 aya kadar değiştiği, 1 çalışmada implantların femur medüller kanalına, 3 çalışmada iyileşmiş post-ekstraksiyon soketlerine ve 1 çalışmada da maksiller ark içine yerleştirildiği rapor edilmiştir.¹⁵⁴

AbuMoussa ve ark. yaptığı bir çalışmada otuz üç ratın femur bölgesine bilateral olarak 20 mm uzunluk, 1.2 mm çapta titanyum grade 5 implantlar yerleştirilmiştir. İmplantasyondan önce vida boşluğu, kontrol grubu 0.1 ml salin, tedavi grupları 1 mM asetazolamid solüsyonu veya 0.7 mM zoledronik asit solüsyonu ile yıkanmıştır. 4 haftalık takip sonrası ötenazi yapılarak femurlar mekanik ve radyografik değerlendirme için izole edilmiştir. Çalışma sonuçları zoledronik asit enjeksiyonunun implantlarının osseointegrasyonunu iyileştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.¹⁵⁵

Berley ve ark. subkütanöz yerleştirilmiş mini-ozmotik pompalarla verilen yüksek seviyelerde plazma nikotininin, hem kısa hem de uzun vadede rat femurlarında, titanyum implantların osseointegrasyonun ve kemik gelişimi üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığını araştırdıkları çalışmada, 30 adet rat 4 gruba ayrılarak her bir ratın femur bölgesine, 1 mm çapında ve 2 mm uzunluğunda, kumlanmış, asitle pürüzlendirilmiş yüzeye sahip dişsiz silindirik implantlar yerleştirilmiştir. 2 ve 4 haftalık takiplerin ardından ötenazi uygulanarak rat femurları, biyomekanik testler ve mikro-CT değerlendirilmesi için alınmıştır. Bulgular, sistemik nikotine maruz kalma sonucu kemik gelişimi ve remodelasyonda önemli bir fark olmamasına rağmen, implant yerleştirilmesinden 2 ve 4 hafta sonra özellikle titanyum implantların osseointegrasyonunun olumsuz yönde etkilediği yönündedir.¹⁵⁶

Siqueira ve ark. 2.2 mm çap ve 4 mm uzunluktaki titanyum implantları rat mandibulalarına yerleştirerek 2 ve 4 haftalık kontrol sonrası histolojik inceleme ile kemik-implant arayüzünü değerlendirmişlerdir. Kronik fiziksel stresin implant osseointegrasyonu üzerine etkilerinin incelendiği bu çalışmada, osseointegrasyonun erken dönemlerinde kronik fiziksel stresin etkili olabileceği, osseointegrasyonun son sürecinin ise bu durumdan etkilemediği sonucuna varılmıştır.¹⁵⁷

Literatürde femur üzerine yerleştirilen vida boyutuyla ilgili farklılıklar bulunmaktadır. Çalışmamızda 2.2x4 mm boyutlarında titanyum grade 5 vidalar rat femurlarına uygulanmıştır. Kemik remodelasyonunun formasyon aşamasına ek olarak kurkuminin etkinliğinin maturasyon aşamasındaki devamlılığını görmek için 2 ve 6 haftalık takip periyodu uygun görülmüştür.

Kitosan, biyomateryal araştırmalarında kullanılan umut verici doğal maddelerden biridir ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanım için birkaç temel özellik sağlar (biyolojik olarak parçalanabilir, biyouyumlu, bakteriyostatik vb).¹⁵⁸ Bu polimer, hemen hemen her uygulama için diğer biyomateryaller ile kolayca birleştirilebilir, hızla biyoaktif kaplamalara dönüştürülebilir ve implantasyon bölgesine büyüme faktörleri ve ilaçların etkili bir şekilde iletilmesini sağlar.¹⁵⁹

Literatüre bakıldığında kitosanın kemik dokudaki farklı etkilerini inceleyen araştırmalar mevcuttur.^{15-17, 105, 107} Lahiji ve ark. yapmış olduğu in vitro çalışmada osteoblast ve kondroblast hücrelerini normal lameller ve kitosan kaplı lameller üzerine ekerek 2 hücre kültür grubu arasındaki farklılıkları araştırmışlardır. Kitosan kaplı lameller üzerine ekilen gruplarda hücrelerin morfolojik özelliklerini koruyarak, fenotipik özelliklerini gerçekleştirdiği ve 7 günlük kültür periyodu sonunda insan osteoblastlarının %90'ından fazlasının canlı kaldığı gözlenmiştir. Araştırmacılar, bu bulgular ışığında kitosanı, kemik ve kıkırdak doku mühendisliği için umut verici bir biyomateryal olarak değerlendirmişlerdir.¹⁷

Muzzarelli ve ark. 10 hasta üzerinde yaptığı çalışmada, hastalara gömülü yirmi yaş dişi çekimi sonrası, sokete jel formda kitosan uygulanmıştır. 7. gün, 1. ay ve 6. aylarda hastalardan periapikal radyograflar alınmıştır. 1. ve 6. aylarda ise kitosan uygulanan soketlerden alınan biyopsiler histolojik olarak incelenmiştir. Postoperatif 6. ayda alınan radyografiler, trabeküler yapının tüm çekim boşluğunda mevcut olduğunu ve çevreleyen

kemik dokusuna benzediğini ve kitosanın çekim soketinden tamamen emildiğini göstermiştir. Histolojik analiz ise radyografilerle uyumlu olarak, trabeküler yapıya sahip yeni kemik oluşumunu, lakuna içinde bulunan kollajen demetlerini ve osteosit benzeri hücreler ile ilişkili mezenkimal osteoblastik elementleri göstermiştir.¹⁶

Kitosan matrikslerin osteoindüktif ve osteokondüktif etkilerinin incelenmesi amacıyla Lee ve ark. yapmış olduğu çalışmada, hazırlanan kitosan matriks içerisine platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB) ve poli-L-laktik asit (PLLA) yerleştirilerek in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda doku mühendisliği ve kemik doku ikamesi için geliştirilen kitosan matrikslerin, kemik iyileşmesini ve remodelasyonunu önemli ölçüde desteklediği ve kontrollü PDGF-BB salımını gerçekleştirdiğini gösterilmiştir. Bu nedenle kitosan matrikslerin, dental implantoloji, ortopedi, plastik cerrahi alanlarında yapılan rekonstrüktif cerrahilerde kontrollü ilaç salım stratejilerini ve doku mühendisliğini geliştirmede kullanılabileceği belirtilmiştir.¹⁶⁰

Çalışmamızda kitosan ile beraber kullanılan kurkumin; düşük emilim oranı ve zayıf suda çözünürlüğü nedeniyle, genellikle biyoyararlanımını artırmak ve terapötik uygulamalarda kullanmak için uygun hale getirilmek üzere özel olarak tasarlanmış taşıyıcılar ile birlikte formüle edilir. Bu nedenle kurkuminin kitosan nanokapsüller veya hidrojel ile taşındığı çok sayıda farmakolojik çalışma bulunmaktadır.¹⁶¹⁻¹⁶⁴

Asefi ve ark. yaptıkları çalışmada kurkumin içeren kitosan hidrojel geliştirerek ortodontik diş hareketleri sırasında uygulanmak üzere ratlarda kullanmışlardır. Hidrojel, %50 kurkumin içeren 0.03cc kitosan veya jelatinin ultrasonik cihaz kullanılarak santrifüj edilmesiyle oluşturulmuştur. Hidrojellerden kurkumin salımı hem in vitro hem in vivo olarak ölçülmüştür. Standartizasyon sağlandıktan sonra çalışma modeli oluşturulmuştur. Çalışma modeli 40 ratın 4 gruba (negatif kontrol/NC, pozitif kontrol/PC, kurkumin emdirilmiş jelatin hidrojel/G, kurkumin emdirilmiş kitosan

hidrojel/Ch) ayrılması ile oluşturulan bir split-mouth, tek kör çalışmadır. Ortodontik diş hareketlerini sağlamak için rat maksillalarına Ni-Ti aparey yerleştirilmiştir. Hidrojeller ise birinci molar dişin mezial kökü hizasında bukkal mukozaya enjekte edilmiştir. Aparey 21 gün süreyle uygulanmıştır. Ratların sakrifiye edilmesinden sonra alınan maksillalar uygun kalınlıkta kesilerek histolojik olarak incelenmiştir. Histolojik analizler sırasında parametreler olarak; hawship lakunaların sayısı, osteoklast sayısı, kan damarı sayısı ve kök rezorpsiyonu miktarı incelenmiştir. G ve Ch gruplarında tüm incelenen parametrelerin sayısında PC grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlenmiştir. Bu yönüyle çalışma sonuçları, bizim çalışmamıza paralel olarak, kurkumin uygulamasının osteoklast sayısında anlamlı ölçüde azalma ile sonuçlandığını ve ortodontik diş hareketleri sonucu oluşan kök ve kemik rezorpsiyonunu azalttığını göstermiştir. Bu nedenle kurkuminin lokal kullanımı araştırmacılar tarafından kemik rezorpsiyonunun önüne geçmek için önerilmiştir.¹⁶⁵

Kurkuminin kemik rezorpsiyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi Ozaki ve ark. yaptığı çalışmada doz bağımlı olarak gösterilmiştir.¹⁶⁶ Ayrıca Bharti ve ark. kurkuminin RANKL sinyal yolu üzerinden osteoklastogenezde baskılayıcı etkisi olduğunu doğrulamıştır.²¹ Çalışmamızda kurkuminin bu etkisinden yararlanılarak, osseointegrasyon sırasındaki kemik rezorpsiyonu evresinde oluşabilecek aşırı kemik kaybının önlenmesi ve vida etrafında yeni kemik oluşumunun sağlanması için biyoaktif kaplama materyali olarak kullanılmıştır.

Kemik fraktür iyileşmesinde kurkuminin etkileri üzerine de çalışmalar yapılmıştır.^{149, 150} Li ve ark. 36 rat üzerinde femur fraktür modeli oluşturarak yaptığı çalışmada, kurkumin sistemik yolla kullanılarak kırık iyileşmesine etkisi araştırılmıştır. Femurun corpus bölgesinde oluşturulan horizontal fraktür hattına kirschner teli yerleştirilmiştir. 2 ve 6 haftalık takiplerle radyolojik ve histolojik incelemeler yapılmıştır.

Radyolojik bulgular kurkumin ile tedavi edilen grupta ikinci haftada oluşan kallusun daha kalın olduğunu ve diğer gruplara göre fraktür hattındaki iyileşmenin daha belirgin olduğunu göstermiştir. Histolojik olarak kurkumin ile tedavi edilen gruptaki kemik trabekülleri eski kemik ile benzer olarak görülmüştür ve sayılan ortalama osteoblast sayısı 591.08 ± 14.53 olarak bulunmuştur. Kontrol grubundaki kemik trabeküllerinin ise eski kemikle daha az oranda birleşmiş olduğu, trabeküler boşlukların daha geniş, trabeküler kalınlığının ise daha az olduğu görülmüştür. Osteoblast sayısı ise 536.36 ± 17.42 olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları, otofaji inhibitörü olarak kullanılan 3-metiladenin ile kombine kullanılan kurkuminin, kemik remodelasyonunu desteklediği yönündedir.¹⁵⁰

Rat femur fraktür modelinde yapılan bir başka çalışmada Safalı ve ark. fraktür oluşumu ardından kırık hattına kirschner teli yerleştirmişlerdir. Sistemik olarak uyguladıkları kurkuminin kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini radyolojik, histolojik ve biyomekanik testlerle postoperatif 14. ve 28. günlerde değerlendirmişlerdir. 2 haftalık radyolojik ve histolojik incelemelerde toplam kallus çapı/femoral çap kıyaslanarak kontrol grubuna oranla kurkumin uygulanan grupta daha az kallus oluşumu izlenmiştir. 4 haftalık iyileşmenin kontrolü için düşük yoğunluklu kemiğin yüksek yoğunluklu kemiğe oranına bakılmıştır. 2 haftalık bulguların aksine 4 haftalık iyileşme oranlarının kurkumin grubunda daha iyi seviyede olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmadığı görülmüştür. Biyomekanik inceleme sonuçlarında da anlamlı farklılıklar bulunamamıştır. Bu nedenle araştırmacılar kurkuminin kemik remodelasyonu üzerindeki etkilerinin doğru anlaşılabilmesi için uzun vadeli takip çalışmalarının yapılması gerekliliğini savunmuşlardır. Çalışmamızın takip süresi belirlenirken, kurkuminin kemik maturasyonu ve osseointegrasyonu üzerine etkisinin doğru değerlendirilmesi amaçlanarak, bu faktör dikkate alınmıştır.¹⁴⁹

Çalışmada uygulanan titanyum vida üzerine kitosan ve kurkumin biyoaktif kaplamanın, kaplama yöntemi ve kaplama karakterizasyon teknikleri de literatür temel alınarak belirlenmiştir.

Titanyum yüzeylerin silanizasyon yöntemi kullanılarak kitosan ile kaplandığı bir çalışmada, kitosan kaplanan titanyum plakların mekanik, çözünme ve hücre kültür testleri yapılarak, kaplamanın uygunluğunun çok yönlü kontrolü yapılmıştır. Silanizasyon ile kaplama yönteminin üstünlüğünün araştırıldığı bu çalışma, silan bağlı kaplamaların dayanıklılığının, çözelti dökümü yöntemi ile titanyuma bağlanan kitosan kaplamaların dayanıklılığından önemli ölçüde fazla olduğunu göstermiştir. Silan ile bağlanan kitosan kaplamalar, hücre kültürü ortamında 8 hafta içinde minimum degradasyona uğramıştır ve kitosan ile kaplanmamış titanyum kontrollere kıyasla, kaplanan yüzeylerde artmış osteoblastik hücre adezyonu ve proliferasyonu gözlenmiştir. Çözelti dökümü yöntemi ile yapılan kaplamaların dayanıklılığının yeterli olmamasına ek olarak karmaşık geometrik şekilli yüzeyleri kaplamak için uygun bir yöntem olarak görülmemektedir.¹⁰¹ Silanizasyon yöntemi ile yivli yüzeylerde çözelti döküm yöntemine göre dayanıklı kaplamalar sağlanabilir fakat kaplama zamanla fizyolojik kararlılığını yitirerek biyobozunuma uğrar. Bu degradasyon sırasında doku içerisine glutraldehit salımı olur ve bu dokuya zarar verir.¹²³

Yan ve ark. in vitro osteoblast ve bakteri kültür çalışmasında; titanyum yüzeyler, hidroksiapatit-gümüş- kitosan (HA/Ag/CS) ile farklı voltaj dereceleri uygulanarak, EPD yöntemi ile kaplanmıştır. Kaplamanın fiziksel özelliklerinin belirlenmesi için kaplanmış yüzeyler XRD ve SEM ile analiz edilmiştir. Yüzeyden salınan kalsiyum (Ca) ve gümüş (Ag) miktarı FTIR analizi ile ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarına göre; antimikrobiyal etkiye sahip, kemik rejenerasyonunu ve revaskülarizasyonu teşvik eden HA/Ag/CS nanokaplamalar, bu araştırmada EPD yöntemi ile Ti yüzeyde başarıyla üretilmiştir.

Elektrokimyasal biriktirme modeli, darbe potansiyeli 0-1,3V olarak ayarlanan kaplamaların agregasyonunda daha faydalı olmuştur ve eşit şekilde dağıtılmış küresel nanopartiküllerle kaplama oluşturmuştur. İyonik salım incelemeleri, CS'nın iyonların salım oranını düşürdüğünü ve kaplamaların fizyolojik kararlılıklarını iyileştirdiğini göstermiştir.⁵ Bu nedenle çalışmamızda, tekniğin avantajları da göz önünde bulundurularak, diğer kaplama yöntemlerine göre daha dayanıklı bir kaplama elde edebilmek için EPD yöntemi seçilmiştir. Voltaj değerleri de biyoaktif kaplamanın agregasyonunu sağlamak için -0.5V ile 1.5V aralığında belirlenmiştir. EPD yöntemi ile toz veya solüsyon halindeki malzemelerin, karmaşık yapıli elektrotlar üzerine homojen birikmesi sağlanabilir.¹²⁸ Diğer kaplama yöntemleri ile kolayca elde edilemeyecek derecede stokiometrik, yüksek saflıkta malzeme birikmesine olanak sağlaması ve metal-fiber ağ yapıları gibi karmaşık yapılar üzerine kaplama yapılabilmesi sebebiyle biyomedikal uygulamalar için EPD önemli bir avantaj oluşturmaktadır.¹³¹ Yan ve ark. çalışmanın antibakteriyel testleri, kitosan kaplamaların *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterileri inhibe etmede iyi performans gösterdiğini ve antibakteriyel oranının %100'e ulaştığını kanıtlamıştır. Osteoblast benzeri hücreler, osseointegrasyonun artırmanın temeli olan kaplama yüzeyine adezyon, proliferasyon ve farklılaşmada üstün performans sergilemiştir. Dahası, kitosan kaplamaların dışındaki vasküler endotelial hücrelerde (VEC) de benzer sonuçlar bulunmuştur, bu da malzemelerin vaskülarizasyonu indüklemeye potansiyeline sahip olduğu anlamına gelir. Bu in vitro osteoblast kültür çalışması, kitosan gibi biyoaktif malzemelerin biyouyumluluk ve osteogenezde olumlu sonuçları olduğunu da göstermiştir.⁵

Cometa ve ark. yapmış olduğu çalışmada titanyum levhalar üzerine elektrodpozisyon yoluyla kitosan ve gümüş kaplama uygulanmıştır. Kaplamanın

morfolojik özellikleri XPS ve AFM (Atomik Force Microscopy) ile analiz edilmiştir. Kitosan üzerinden gümüş salımı ise ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer) ile ölçülmüştür. Gümüş modifiye kitosan kaplamanın antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amacıyla *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* kültürlerinde bekletilen titanyum levhalar daha sonra osteoblast kültüründe 7 gün süre ile bekletilmiştir. Çalışmanın sonucu olarak, EPD yöntemi ile kaplanan titanyum yüzeyin topografyasının, EPD parametrelerinin uygun şekilde düzenlenmesi ile istenen sonuçların elde edilebileceği belirtilmiştir. Kitosan üzerine eklenen gümüşün, 21. güne kadar ortama salındığı ve antibakteriyal etki gösterdiği gözlenmiştir.³

Wang ve arkadaşlarının keçi iliak krestinden elde ettikleri kemik iliği stromal hücre kültürü ile yaptıkları çalışmada, grade 5 titanyum plaklar 2 gruba ayrılarak elektrodepozisyon yöntemi ile kalsiyum fosfat (CaP) ve kalsiyum fosfat-kitosan (CaP-Ch) malzeme ile kaplanmıştır. Kaplamanın karakterizasyonu XRD analizleri ile yapıldıktan sonra, hücre kültürüne uygulanan titanyum plaklardaki hücre adezyonu SEM ile ölçülmüştür. 1 ve 3 günlük kültürler SEM altında incelendiğinde CaP kaplanan plaklar üzerinde yalnızca birkaç hücre gözlenirken CaP-Ch ile kaplanan plaklar üzerinde büyük miktarda kemik iliği stromal hücresi gözlemlenmiştir. Daha yüksek büyütmelelerde, bu hücrelerin kitosan ile uygun şekilde birleştiği bulunmuştur. Bu birleşmenin; kitosanın, ekstraselüler matriksteki glikozaminoglikanlara yapısal olarak benzerliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Buna ek olarak kaplama materyaline kitosanın eklenmesi ile kitosan agreganların, kalsiyum fosfat globüllerini sararak kaplamanın dayanıklılığını artırdığı da gözlenmiştir.¹⁶⁷

Literatüre bakıldığında kaplamanın kalitesinin ölçülmesi için kullanılan yaygın yöntemlerin XRD ve SEM olduğu görülmektedir. XPS yönteminde 10 nm derinliğe kadar ölçüm yapılabilir. Bu yöntemle daha derin yüzeylere ulaşılması için kaplama yüzeyinde

erozyon yapılması gerekmektedir.¹⁴¹ TEM yönteminde de benzer şekilde incelenecek materyalin kalınlığının, elektronların geçirilebilmesi için çok ince olması gerekmektedir. İncelenecek materyali, bu yöntemin uygulanabileceği hale getirmek zordur.¹⁴¹ Ayrıca TEM yöntemi ile yüksek çözünürlükte görüntüler elde edildiğinden, incelenen materyalin çok küçük bir bölümü izlenebilmektedir. Bu sebeple, daha geniş alanı gösterebilen ancak daha düşük çözünürlükte görüntü verebilen sistemlerin kullanılmasından sonra, bu mikroskopik tekniğin kullanılması önerilmektedir.¹⁶⁸ Bu inceleme yönteminin kitosan kaplamalarının karakterizasyonunda, SEM ve FTIR spektroskopisiyle birlikte kullanıldığı rapor edilmektedir.¹⁶⁹ SEM yöntemi, kaplama kalınlığının ve yüzey morfolojisinin kolayca incelenmesine olanak sağlar. Bunun yanı sıra in vitro ve in vivo çalışmalarda kaplama yüzeyindeki hücresel aktiviteyi de gösterdiği için sıklıkla başvurulan bir analiz yöntemidir.^{4, 5, 102, 142, 170, 171} XRD yöntemi; kristalize yapıların ve film tabakası şeklindeki kaplama yüzeylerinin kristallografik yapısı, kimyasal kompozisyonu ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesi için kitosan-kurkumin biyoaktif kaplamaların karakterizasyonunda kullanılan önemli bir yöntemdir.^{139, 140, 171} Bu yüzden çalışmamızda kaplamanın karakterizasyonu için bu iki yöntem tercih edilmiştir. Özellikle SEM ile kitosan-kurkumin film tabakasının morfolojik özellikleri farklı büyütmeyle gösterilmiştir. Elde ettiğimiz SEM görüntüleri daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.^{4, 170, 172}

Kitosan ve kurkumin biyoaktif kaplamanın lokal etkinliğinin moleküler düzeyde değerlendirilmesi için literatürdeki önceki çalışmalara paralel olarak OPG, RANKL, RUNX2 ve OC genleri RT-PCR yöntemi kullanılarak çalışmamızda incelenmiştir.

Xiao ve ark. çalışmalarında ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis tedavisi için oral yolla sistemik kurkumin uygulamışlardır. Buna ek olarak gingival fibroblast hücre kültüründe NF- κ B, OPG/sRANKL, IL-1 β ve TNF- α seviyelerine ELİSA yöntemi

kullanılarak bakılmıştır. ELİSA bulguları kurkumin ile tedavi edilen grupta NF- κ B ve sRANKL(çözünebilir RANKL) seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük, OPG seviyesinin ise daha yüksek olduğu yönündedir. Deneysel periodontitis modeli micro-CT ve histolojik yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analizler sonucu mandibular birinci ve ikinci molar arasındaki alveolar kemik kaybının ve inflamasyonun, kurkumin ile tedavi edilen gruplarda daha az olduğu görülmüştür.¹⁷³ OPG ve RANKL'ın ekspresyonu/aktivasyonu, alveolar kemik rezorpsiyonu ve metabolizması için çok önemlidir.^{174, 175} Osteoklastlar; RANKL/RANK sinyallemesinin düzenlenmesi ile monosit/makrofaj öncülerinden farklılaşırlar. OPG, RANKL'a bağlanarak ve RANK'a bağlanmasını önleyerek kemiği aşırı rezorpsiyondan koruyan bir proteindir.^{176, 177} Xiao ve ark. çalışmalarında ise gingival fibroblastlardan elde edilen sRANKL ve OPG'nin parakrin sekresyonu ile alveolar kemik metabolizmasını kesintiye uğratabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla, OPG/sRANKL oranı önemli bir belirleyici olmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, gingival fibroblastların kültür süpernatantlarında OPG/sRANKL oranı kurkumin ilavesi ile artmıştır. Bu nedenle kurkuminin osteoklast aktivasyonunu azaltarak alveolar kemik rezorpsiyonunu hafifletebileceği kabul edilmiştir.¹⁷³

Cirona ve ark. diyabetik ratlarda (diabetes mellitus/DM), kurkuminin kemik defekti iyileşmesi ve implant osseointegrasyonu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, deney hayvanları 5 gruba ayrılmıştır: plasebo (DM + PLAC), insülin (DM + INS), kurkumin (DM + CURC), insülin ve kurkumin (DM + CURC + INS) ve kontrol grubu (non-DM). Rat tibalarına 2.2x4 mm çapında titanyum implantlar yerleştirilmiş ve kalvaryaya trepan frezle kritik boyutta kemik defekti açılmıştır. Postoperatif 30. günde doku örnekleri alınarak histolojik-histomorfometrik analizler, tork testi ve gen analizleri yapılmıştır. OPN(osteopontin), OPG, RANKL, RUNX2, BMP-2(bone morfojenik

protein 2), β -katenin, Osx(osterix) gen ekspresyonları için qPCR (quantitative PCR) yapılmıştır. Defektten alınan doku, histolojik olarak incelendiğinde, DM+CURC+INS grubunda yeni kemik oluşumu miktarının, non-DM grubuna benzer olarak, en fazla olduğu görülmüştür. Periimplant bölgeden alınan doku örnekleri ile yapılan qPCR sonucunda ise DM+CURC ve DM+CURC+INS gruplarında, DM+PLAC grubuna göre daha fazla RUNX2 gen ekspresyonu görülmüştür. RANKL/OPG oranı, DM+CURC ve DM+CURC+INS gruplarında non-DM grubuna benzer olarak, DM+PLAC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur.⁸² Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarına kısmen paraleldir. Bizim çalışmamızda da kurkumin uygulanan gruplarda RANKL ekspresyonu düşükken OPG ekspresyonu yüksektir. Bu da kurkuminin, RANKL-OPG yolu üzerinde etki göstererek osteoklastogenezi baskıladığını destekleyen bir bulgudur. CH-CU-Ti-2h ve CU-Ti-2h grupları histolojik olarak incelendiğinde osteoklast sayılarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olması da bu bulguyu doğrulamaktadır. Çalışmamızda CH-Ti uygulanan grupta OPG seviyelerinde azalma ve RANKL seviyelerinde artma görülmektedir. Bu durum histolojik bulgular da dikkate alındığında CH-Ti uygulanan gruplarda, CH-CU-Ti uygulanan ve CU-Ti uygulanan gruplara oranla zayıf osseointegrasyonu göstermiştir. CH-CU-Ti uygulanan grupta ise 6. haftada RANKL seviyesindeki azalma ile birlikte artmış OPG düzeyi osseointegrasyon için gereken kemik formasyonunun devam etmekte olduğunu göstermektedir. RUNX2 ekspresyonu ise en yüksek CH-Ti uygulanan gruplarda olmakla beraber CH-CU-Ti uygulanan gruplarda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kemik formasyonu aşamasında RUNX2 gen ekspresyon seviyesinin yüksek olması osteoblastik aktivitenin bir göstergesidir. Kemik maturasyonu aşamasında ise RUNX2 ekspresyonun azalması beklenmektedir.⁶¹ CH-Ti-6h grubunda RUNX2 ekspresyonunun kontrol grubuna oranla

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olması, bazı numunelerde histolojik olarak gördüğümüz vida etrafında kartilaj doku oluşumu ile ilişkili olabilir. RUNX2 geninin kondroblastik farklılaşmayı da düzenlediği bilinmektedir.⁶¹ CH-CU-Ti-6h grubunda RUNX2 ekspresyonunun kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olması ise RUNX2 geninin, OPG gen aktivasyonunda rol alması ile ilgili olabilir.⁶² Bu grupta OPG ekspresyonunun kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Fakat Cirona ve ark. çalışmalarının aksine bizim çalışmamızda, CU-Ti uygulanan gruplarda, RUNX2 gen ekspresyonu kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmamızın histolojik analiz bulguları Cirona ve ark. çalışmasına benzer olarak yeni kemik oluşumu açısından CH-CU-Ti uygulanan gruplarda ileri düzeydedir. Bu araştırmacılar; bu bulgular ışığında bizim görüşümüzle benzer olarak kurkumin uygulamasının, titanyum implant etrafındaki kemik remodelasyonunu iyileştirdiğini ve kemik defektlerinin onarımında alternatif bir yaklaşım olduğunu savunmuştur.⁸²

Bumgardner ve ark. in vitro tavşan modelinde yaptığı çalışmada 2x4 mm'lik titanyum pinler kullanılarak kitosan kaplama ve CaP kaplamaların osseointegrasyon üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Kaplamalar çözelti dökümü ve silanizasyon yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Kaplamanın fiziksel özellikleri bizim çalışmamızda olduğu gibi SEM ile değerlendirilmiştir. Tibiaya yerleştirilen pinler postoperatif 2, 4, 8 ve 12. haftalarda histolojik olarak analiz edilmiştir. 4 haftalık kitosan pin içeren gruplarda fibrotik doku gözlenmiştir. 2 haftalık örneklerde yeni oluşan bağ dokusu ve yeni kemiğin kaplanmış vidalarla ve eski kemikle direkt temasta olduğu gözlenmiştir. İmplantasyon sonrası 12. haftada alınan örneklerde her üç grupta da benzer şekilde yeni kemik oluşumunun mevcut olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, kitosanın implant osseointegrasyonunu sağlayabildiği, kemik-implant arayüzünde geleneksel CaP

kaplamalarla benzer sonuçlar verdiği ve ilaçlar veya büyüme faktörleri gibi terapötik ajanların verilmesi için avantajlar sunabileceği yönündedir.⁴ Bizim çalışmamızda ise CH-Ti-2h grubunda fibrotik doku yoğunluğunun diğer gruplardan fazla olduğu bulunmuştur fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (0,240). CH-Ti-6h gruplarında ise histolojik incelemelerde bazı örneklerde vida etrafında kartilaj doku ve yabancı cisim reaksiyonu gözlenmiştir. CH-CU-Ti gruplarında herhangi bir yabancı cisim reaksiyonu oluşmamasının nedeni, kitosana eklenen kurkuminin antiinflamatuvar özelliğinden kaynaklanıyor olabilir.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰

Suo ve ark. Ti yüzeylerin HA, CH ve grafin oksit (GO) ile EPD yönteminde kaplanarak rat tibialarında 3 aylık süre ile takip edildiği çalışmada biyomekanik testler, moleküler ve histolojik analizler, mikro CT değerlendirmeleri yapılmıştır. Çalışmada 40 rata HA-Ti, GO/HA-Ti, CH/HA-Ti ve GO/CH/HA-Ti uygulanarak her grupta 10 hayvan içeren 4 grup elde edilmiştir. Ti yüzeylerin karakterizasyonu FTIR ve XRD ile yapılmıştır. Çalışmada in vitro hücre kültürünün kaplanmış yüzeylere bağlanma potansiyeli de ölçülmüştür. Bunun için alınan SEM görüntülerinde izlenen CH kaplamanın mikroskobik yapısı çalışmamızdaki SEM görüntüleri ile benzerlik göstermektedir. Yüzeye bağlanan hücrelerde OPG ve OC genlerinin ekspresyon miktarını belirlemek için qPCR yapılmıştır. CH/HA-Ti ve GO/CH/HA-Ti gruplarında OPG ve OC'nin mRNA ekspresyon seviyeleri, 3. ve 7. günlerde HA-Ti ve GO/HA-Ti ile karşılaştırıldığında önemli bir artış göstermiştir ($p < 0.05$).¹⁸¹ Bizim çalışmamızın sonuçlarında, CH-Ti-2h grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında OPG ve OC düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış ($p < 0.05$), CU-Ti-2h ve CH-CU-Ti-2h gruplarına göre daha az miktarda OPG ve OC düzeyi izlenmiştir ($p < 0.05$). CH-Ti-6h grubunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir. OC, sadece osteoblastlar tarafından salgılanan ve vücudun metabolik regülasyonunda rol oynadığı düşünülen bir protein

hormondur.^{66, 68} En yüksek OC miktarının CH-CU-Ti uygulanan gruplarda olması ve OC ekspresyonunun kemik maturasyonu aşamasında diğer gruplarda düşmüş olmasına rağmen CH-CU-Ti-6h grubunda, formasyon aşamasındaki seviyesine yakın miktarda olması, bu grupta osteoblastik aktivitenin hala devam etmekte olduğunu gösteren önemli bir bulgudur ve osseointegrasyonu sağlamada, kitosan-kurkumin biyoaktif kaplamanın faydalı olduğunu düşündürmektedir. Bunlara ek olarak çalışmamızda RUNX2 ve RANKL gen ekspresyonuna da bakılmıştır. CH-Ti uygulanan gruplarda diğer gruplara oranla daha fazla RUNX2 ekspresyonu gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu bulgular ışığında kemik formasyonu aşamasında kitosanın osteoblastik aktivite üzerinde olumlu etkisi olabileceği düşünülmüştür. Suo ve ark. kaplama karakterizasyonun ardından Ti yüzeyleri rat tibialarının medüller kanalına uygulamıştır. 3 ay sonra deneklerin sakrifiye edilmesi ile doku örnekleri alınarak histolojik ve mikro-CT analizleri yapılmıştır. CH/HA-Ti ve GO/CH/ HA-Ti için yeni kemik alanı (BV) ve kemik-implant temas alanı (BVI), HA-Ti ve GO/HA-Ti oranlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). En yüksek BV ve BVI oranı GO/CH/HA-Ti grubunda bulunmuştur.¹⁸¹ Bizim çalışmamızın histolojik analizlerinde ise; yeni kemik oluşumu, fibrotik doku yoğunluğu ve osteoklast sayısı incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre CH-CU-Ti uygulanan gruplarda yeni kemik oluşumunun en fazla olduğu görülmüştür. Çalışmamızda tek başına kitosan uygulamasının yeni kemik oluşumunun formasyon aşamasında kontrol grubuna oranla daha etkili olduğu görülmüştür. Fakat oluşan yeni kemiğin maturasyon aşamasında CH-Ti-6h grubu, kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kitosan ve kurkumin kaplamanın osseointegrasyon üzerine etkisini araştırmak için yaptığımız deneysel çalışmamızın sonucunda;

1. Kurkumin uygulamasının kemik remodelasyonunu hızlandırarak osseointegrasyon üzerine olumlu etkisinin olduğu,
2. Kitosan ve kurkuminin beraber kullanımının ortamda uzun süreli kurkumin varlığını sağlaması ile kurkuminin antirezorptif ve antiinflamatuvar etkilerinden daha çok yararlandığı,
3. Tek başına kitosan uygulamasının erken dönem kemik oluşumu sırasında osteoblastik aktiviteyi artırıcı etkisi bulunduğu,
4. Kitosanın osseointegrasyonu güçlendirmek adına pürüzlü yüzey oluşturma ve yeni kemik oluşumunu artıracak diğer maddelerin taşıyıcısı olarak kullanımının doğru olabileceği düşünülmüştür.
5. Daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için kitosan ve kurkuminin farklı dozlarda ve farklı voltaj seviyelerinde uygulanarak kaplama kalitesinin artırılması ile kemik remodelasyonunu osseointegrasyon lehine artırdığını gösteren biyokimyasal, mekanik ve radyolojik çalışmaların yapılması gerekliliği görülmüştür. Bu anlamda deneysel çalışmamız, tüm bu ileri deneysel çalışmaların yapılabilmesi için bir basamak olmuştur.

KAYNAKLAR

1. Branemark P-I. Osseointegration and its experimental background. *J prosthet Dent*, 1983, 50: 399-410.
2. Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clinical oral implants research*, 2009, 20: 372-378.
3. Cometa S, Bonifacio MA, Baruzzi F, de Candia S, Giangregorio MM, Giannossa LC, Dicarlo M, Mattioli-Belmonte M, Sabbatini L, De Giglio E. Silver-loaded chitosan coating as an integrated approach to face titanium implant-associated infections: analytical characterization and biological activity. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2017, 409: 7211-7221.
4. Bumgardner JD, Chesnutt BM, Yuan Y, Yang Y, Appleford M, Oh S, McLaughlin R, Elder SH, Ong JL. The integration of chitosan-coated titanium in bone: an in vivo study in rabbits. *Implant dentistry*, 2007, 16: 66-79.
5. Wang X, Yan L, Ye T, Cheng R, Tian J, Ma C, Wang Y, Cui W. Osteogenic and antiseptic nanocoating by in situ chitosan regulated electrochemical deposition for promoting osseointegration. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 102: 415-426.
6. Kung S, Devlin H, Fu E, Ho KY, Liang SY, Hsieh YD. The osteoinductive effect of chitosan–collagen composites around pure titanium implant surfaces in rats. *Journal of periodontal research*, 2011, 46: 126-133.
7. Fernández-Urrusuno R, Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 1999, 16: 1576-1581.

8. De Campos AM, Sánchez A, Alonso MaJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *International journal of pharmaceutics*, 2001, 224: 159-168.
9. Ge Z, Baguenard S, Lim LY, Wee A, Khor E. Hydroxyapatite–chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials*, 2004, 25: 1049-1058.
10. Thein-Han W, Misra R. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 2009, 5: 1182-1197.
11. Tan W, Krishnaraj R, Desai TA. Evaluation of nanostructured composite collagen–chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue engineering*, 2001, 7: 203-210.
12. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced drug delivery reviews*, 2010, 62: 28-41.
13. Arca HÇ, Günbeyaz M, Şenel S. Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. *Expert review of vaccines*, 2009, 8: 937-953.
14. Zhang J, Xia W, Liu P, Cheng Q, Tahi T, Gu W, Li B. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Marine drugs*, 2010, 8: 1962-1987.
15. Khor E. Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise. Department of Chemistry, National University of Singapore, Republic of Singapore. 2001.
16. Muzzarelli R, Biagini G, Bellardini M, Simonelli L, Castaldini C, Fratto G. Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery. *Biomaterials*, 1993, 14: 39-43.
17. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *Journal of biomedical materials research*, 2000, 51: 586-595.

18. Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, Nestor BJ, Sculco TP. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 2007, 454: 251-261.
19. Chen D, Zhang X, Guo Y, Shi S, Mao X, Pan X, Cheng T. MMP-9 inhibition suppresses wear debris-induced inflammatory osteolysis through downregulation of RANK/RANKL in a murine osteolysis model. *International journal of molecular medicine*, 2012, 30: 1417-1423.
20. Li J, Jiang Y, Wen J, Fan G, Wu Y, Zhang C. A rapid and simple HPLC method for the determination of curcumin in rat plasma: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study of curcumin liposome. *Biomedical chromatography*, 2009, 23: 1201-1207.
21. Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF- κ B ligand-induced NF- κ B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *The journal of Immunology*, 2004, 172: 5940-5947.
22. Gu Q, Cai Y, Huang C, Shi Q, Yang H. Curcumin increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. *Pharmacognosy magazine*, 2012, 8: 202.
23. Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015, 2015.
24. Ilvesaro J. Attachment, polarity and communication characteristics of bone cells. 2003.

25. Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures*, 1996, 45: 371.
26. Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R. Bone biology. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, 77: 1256-1275.
27. Marks Jr SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy*, 1988, 183: 1-44.
28. Clark B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008, 3: S131-S139.
29. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annual Review of Cell and Developmental*, 2009, 25: 629-648.
30. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *The American journal of pathology*, 2007, 170: 427-435.
31. Everts V, Delaisse J, Korper W, Jansen D, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17: 77-90.
32. Özer A, Girgin A, Liman N, Özfiliz N, Özcan Z, Erdost H. *Temel Histoloji*. Baskı. Nobel Akademik Yayıncılık, 2014: 237-262.
33. AN YH, Draughn RA, Barfield WR, Bonucci E, Zioupos P, Smith CW. *Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface*. Baskı. CRC Press LLC, 2000: 3-23.
34. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurgical focus*, 2001, 10: 1-4.

35. Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 2016, 20: 846.
36. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki S-I, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998, 139: 1329-1337.
37. Simonet W, Lacey D, Dunstan C, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen H, Wooden S, Bennett L, Boone T. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
38. Akatsu T, Murakami T, Ono K, Nishikawa M, Tsuda E, Mochizuki S-I, Fujise N, Higashio K, Motoyoshi K, Yamamoto M. Osteoclastogenesis inhibitory factor exhibits hypocalcemic effects in normal mice and in hypercalcemic nude mice carrying tumors associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Bone*, 1998, 23: 495-498.
39. Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W, Rattan A, Scully S, Fletcher F, Juan T. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *The American journal of pathology*, 2000, 157: 435-448.
40. O'Brien E, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane. *Bone*, 2001, 28: 208-214.
41. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF- κ B ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 41155-41164.

42. Reid PE, Brown NJ, Holen I. Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell contact. *Molecular Cancer*, 2009, 8: 49.
43. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Lamoureux F, Ruiz-Velasco C, Maillason M, Redini F, Heymann M-F, Heymann D. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine & growth factor reviews*, 2013, 24: 401-409.
44. Hanada R, Hanada T, Sigl V, Schramek D, Penninger JM. RANKL/RANK—beyond bones. *Journal of Molecular Medicine*, 2011, 89: 647-656.
45. Bord S, Ireland D, Beavan S, Compston J. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*, 2003, 32: 136-141.
46. Stolina M, Adamu S, Ominsky M, Dwyer D, Asuncion F, Geng Z, Middleton S, Brown H, Pretorius J, Schett G. RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2005, 20: 1756-1765.
47. Kong Y-Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 1999, 402: 43-47.
48. Nakamichi Y, Udagawa N, Kobayashi Y, Nakamura M, Yamamoto Y, Yamashita T, Mizoguchi T, Sato M, Mogi M, Penninger JM. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF- κ B ligand derived from osteoblasts. *The journal of Immunology*, 2007, 178: 192-200.
49. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is

- an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 2000, 141: 3478-3484.
50. Lacey D, Timms E, Tan H-L, Kelley M, Dunstan C, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93: 165-176.
 51. O'Brien E, Williams J, Marshall M. Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria. *Biochemical and biophysical research communications*, 2000, 274: 281-290.
 52. Itoh K, Udagawa N, Matsuzaki K, Takami M, Amano H, Shinki T, Ueno Y, Takahashi N, Suda T. Importance of membrane-or matrix-associated forms of M-CSF and RANKL/ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 cells expressing recombinant PTH/PTHrP receptors. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000, 15: 1766-1775.
 53. Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology*, 1998, 139: 4424-4427.
 54. Mueller CG, Hess E. Emerging functions of RANKL in lymphoid tissues. *Frontiers in immunology*, 2012, 3: 261.
 55. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in molecular medicine*, 2006, 12: 17-25.
 56. Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL, Fremont DH. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *The Journal of clinical investigation*, 2001, 108: 971-979.

57. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine reviews*, 2008, 29: 155-192.
58. Wysokinski D, Pawlowska E, Blasiak J. RUNX2: A master bone growth regulator that may be involved in the DNA damage response. *DNA and cell biology*, 2015, 34: 305-315.
59. Choi K-Y, Lee S-W, Park M-H, Bae Y-C, Shin H-I, Nam S-H, Kim Y-J, Kim H-J, Ryoo H-M. Spatio-temporal expression patterns of Runx2 isoforms in early skeletogenesis. *Experimental & molecular medicine*, 2002, 34: 426-433.
60. Xiao Z-S, Hjelmeland AB, Quarles L. Selective deficiency of the “bone-related” Runx2-II unexpectedly preserves osteoblast-mediated skeletogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 20307-20313.
61. Bruderer M, Richards R, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*, 2014, 28: 269-286.
62. Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 25163-25172.
63. Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1999, 1445: 134-141.
64. Hauschka PV, Reid ML. Timed appearance of a calcium-binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in developing chick bone. *Developmental biology*, 1978, 65: 426-434.

65. Puchacz E, Lian JB, Stein GS, Wozney J, Huebner K, Croce C. Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. *Endocrinology*, 1989, 124: 2648-2650.
66. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 2007, 130: 456-469.
67. Karsenty G, Olson EN. Bone and muscle endocrine functions: unexpected paradigms of inter-organ communication. *Cell*, 2016, 164: 1248-1256.
68. Sun T, Li J, Xing H-L, Tao Z-S, Yang M. Melatonin improves the osseointegration of hydroxyapatite-coated titanium implants in senile female rats. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 2020, 53: 770-777.
69. M. D. Pratik Dişhekimliği İmplantolojisi. Baskı. 2010.
70. Subaşı M, Karataş Ç. Titanyum ve titanyum alaşımlarından yapılan implantlar üzerine inceleme. *Politeknik Dergisi*, 2012, 15: 87-103.
71. Brånemark P-I, Breine U, Adell R, Hansson B, Lindström J, Ohlsson Å. Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*, 1969, 3: 81-100.
72. Hrabec NW. *Characterization of cellular titanium for biomedical applications*. Baskı. University of Washington, 2010.
73. Brånemark P-I. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.*, 1977, 16.
74. Misch CE. Contemporary Implant dentistry 2nd edition. *Saint Louis: Mosby*, 1999.
75. Taşan E. Normal kemik yapım-yıkım döngüsü ve osteoporozun patogenezi. *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Osteoporoz Sempozyumu, İstanbul*, 1999: 17-32.

76. Parfitt AM. The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*, 1983: 143-223.
77. Lian JB, Stein GS, Javed A, Van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2006, 7: 1-16.
78. Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of cellular biochemistry*, 2013, 114: 975-984.
79. Sartori EM, das Neves AM, Magro-Filho O, Silveira Mendonça DB, Krebsbach PH, Cooper LF, Mendonça G. The Role of MicroRNAs in the Osseointegration Process. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2019, 34.
80. Moradian-Oldak J, Wen HB, Schneider GB, Stanford CM. Tissue engineering strategies for the future generation of dental implants. *Periodontology 2000*, 2006, 41: 157-176.
81. Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso G, Passeri G. The importance of WNT pathways for bone metabolism and their regulation by implant topography. *Eur Cell Mater*, 2012, 24: 46-59.
82. Cirano F, Pimentel S, Casati M, Corrêa M, Pino D, Messoria M, Silva P, Ribeiro F. Effect of curcumin on bone tissue in the diabetic rat: repair of peri-implant and critical-sized defects. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2018, 47: 1495-1503.
83. Nishimura I. Genetic networks in osseointegration. *Journal of dental research*, 2013, 92: 109S-118S.

84. Weiss C. Tissue integration of dental endosseous implants: description and comparative analysis of the fibro-osseous integration and osseous integration systems. *J Oral Implantol*, 1986, 12: 169-214.
85. Weiss C. A comparative analysis of fibro-osteal and osteal integration and other variables that affect long term bone maintenance around dental implants. *J Oral Implantol*, 1987, 13: 467-487.
86. Brunski JB, Moccia JR AF, Pollack SR, Korostoff E, Trachtenberg DI. The influence of functional use of endosseous dental implants on the tissue-implant interface. I. Histological aspects. *Journal of dental research*, 1979, 58: 1953-1969.
87. Hobo S, Ichida E, Garcia LT. *Osseointegration and occlusal rehabilitation*. Baskı. Quintessence Pub Co, 1989.
88. Spiekermann H, Jansen VK, Richter E-J. A 10-year follow-up study of IMZ and TPS implants in the edentulous mandible using bar-retained overdentures. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 1995, 10.
89. de Putter C, de Lange G, de Groot K. Perimucosal oral implants of dense hydroxylapatite: Fixation in alveolar bone. *Tissue Integration in Oral and Maxillofacial Reconstruction*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1986: 389-394.
90. Cook SD, Kay JF, Thomas KA, Jarcho M. Interface mechanics and histology of titanium and hydroxylapatite-coated titanium for dental implant applications. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 1987, 2.
91. Tan F, Naciri M, Dowling D, Al-Rubeai M. In vitro and in vivo bioactivity of CoBlast hydroxyapatite coating and the effect of impaction on its osteoconductivity. *Biotechnology advances*, 2012, 30: 352-362.
92. Block MS, Kent JN, Kay JF. Evaluation of hydroxylapatite-coated titanium dental implants in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1987, 45: 601-607.

93. Sahoo D, Nayak P. Chitosan: The most valuable derivative of chitin. 2011: 129-166.
94. Aguilar A, Zein N, Harmouch E, Hafdi B, Bornert F, Offner D, Clauss F, Fioretti F, Huck O, Benkirane-Jessel N. Application of chitosan in bone and dental engineering. *Molecules*, 2019, 24: 3009.
95. Demirtaş TT, Irmak G, Gümüşderelioğlu M. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *Biofabrication*, 2017, 9: 035003.
96. Mohebbi S, Nezhad MN, Zarrintaj P, Jafari SH, Gholizadeh SS, Saeb MR, Mozafari M. Chitosan in biomedical engineering: a critical review. *Current stem cell research & therapy*, 2019, 14: 93-116.
97. Sugano M, Watanabe S, Kishi A, Izume M, Ohtakara A. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. *Lipids*, 1988, 23: 187-191.
98. Koide S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition research*, 1998, 18: 1091-1101.
99. Liu Y, Ji P, Lv H, Qin Y, Deng L. Gentamicin modified chitosan film with improved antibacterial property and cell biocompatibility. *International journal of biological macromolecules*, 2017, 98: 550-556.
100. Hillyard IW, Doczi J, Kiernan PB. Antacid and antiulcer properties of the polysaccharide chitosan in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1964, 115: 1108-1112.
101. Bumgardner JD, Wiser R, Gerard PD, Bergin P, Chestnutt B, Marini M, Ramsey V, Elder SH, Gilbert JA. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2003, 14: 423-438.

102. Bumgardner J, Wiser R, Elder S, Jouett R, Yang Y, Ong J. Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2003, 14: 1401-1409.
103. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *Journal of periodontology*, 1996, 67: 1170-1175.
104. Ohara N, Hayashi Y, Yamada S, Kim S-K, Matsunaga T, Yanagiguchi K, Ikeda T. Early gene expression analyzed by cDNA microarray and RT-PCR in osteoblasts cultured with water-soluble and low molecular chitooligosaccharide. *Biomaterials*, 2004, 25: 1749-1754.
105. Muzzarelli R, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli M, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 1994, 15: 1075-1081.
106. Yeo YJ, Jeon DW, Kim CS, Choi SH, Cho KS, Lee YK, Kim CK. Effects of chitosan nonwoven membrane on periodontal healing of surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2005, 72: 86-93.
107. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 2005, 26: 5983-5990.
108. Usami Y, Okamoto Y, Takayama T, Shigemasa Y, Minami S. Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B₄ and prostaglandin E₂. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal*

- of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials, 1998, 42: 517-522.
109. Akarchariya N, Sirilun S, Julsrigival J, Chansakaowa S. Chemical profiling and antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma glans* K. Larsen & J. Mood and *Curcuma cf. xanthorrhiza* Roxb. collected in Thailand. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2017, 7: 881-885.
 110. Dosoky NS, Setzer WN. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Curcuma* species. *Nutrients*, 2018, 10: 1196.
 111. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*, 2007, 4: 807-818.
 112. Buckingham J. Dictionary of natural products on DVD. *Company: HDS, Version*, 2011, 43.
 113. Wahlström B. The Fate of Curcumin in the Rat. İçinde: *Toxicological Aspects of Food Safety*, Springer, 1978: 303-303.
 114. Rohanizadeh R, Deng Y, Verron E. Therapeutic actions of curcumin in bone disorders. *BoneKEy reports*, 2016, 5.
 115. Zambrano LM, Brandao DA, Rocha FR, Marsiglio RP, Longo IB, Primo FL, Tedesco AC, Guimaraes-Stabili MR, Junior CR. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. *Scientific reports*, 2018, 8: 1-11.
 116. von Metzler I, Krebbel H, Kuckelkorn U, Heider U, Jakob C, Kaiser M, Fleissner C, Terpos E, Sezer O. Curcumin diminishes human osteoclastogenesis by inhibition of the signalosome-associated I κ B kinase. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 2009, 135: 173.

117. Son H-E, Kim E-J, Jang W-G. Curcumin induces osteoblast differentiation through mild-endoplasmic reticulum stress-mediated such as BMP2 on osteoblast cells. *Life sciences*, 2018, 193: 34-39.
118. Kim S-K. *Chitin and chitosan derivatives: advances in drug discovery and developments*. Bask1. CRC press, 2013.
119. Zhang Z, Jiang T, Ma K, Cai X, Zhou Y, Wang Y. Low temperature electrophoretic deposition of porous chitosan/silk fibroin composite coating for titanium biofunctionalization. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21: 7705-7713.
120. Park JH, Olivares-Navarrete R, Wasilewski CE, Boyan BD, Tannenbaum R, Schwartz Z. Use of polyelectrolyte thin films to modulate osteoblast response to microstructured titanium surfaces. *Biomaterials*, 2012, 33: 5267-5277.
121. Lieder R, Sigurjonsson OE. Chitosan as Coating Material for Titanium Implants.
122. Yuan Y, Chesnutt BM, Wright L, Haggard WO, Bumgardner JD. Mechanical property, degradation rate, and bone cell growth of chitosan coated titanium influenced by degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2008, 86: 245-252.
123. Phaechamud T. Hydrophobically modified chitosans and their pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2008, 1: 2-9.
124. Cai K, Rechtenbach A, Hao J, Bossert J, Jandt KD. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials*, 2005, 26: 5960-5971.

125. Channasanon S, Graisuwan W, Kiatkamjornwong S, Hoven VP. Alternating bioactivity of multilayer thin films assembled from charged derivatives of chitosan. *Journal of colloid and interface science*, 2007, 316: 331-343.
126. Cai K, Hu Y, Jandt KD, Wang Y. Surface modification of titanium thin film with chitosan via electrostatic self-assembly technique and its influence on osteoblast growth behavior. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008, 19: 499.
127. Lvov Y, Onda M, Ariga K, Kunitake T. Ultrathin films of charged polysaccharides assembled alternately with linear polyions. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1998, 9: 345-355.
128. Dickerson JH, Boccaccini AR. *Electrophoretic deposition of nanomaterials*. Bask1. Springer, 2011.
129. Adamcová Z, Dempírová L. Film-forming electropolymerization. *Progress in organic coatings*, 1989, 16: 295-320.
130. Boccaccini A, Keim S, Ma R, Li Y, Zhitomirsky I. Electrophoretic deposition of biomaterials. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, 7: S581-S613.
131. Zhitomirsky I, Gal-Or L. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1997, 8: 213-219.
132. Zhang Y-y, Jie T, Pang Y-c, Wei W, Tao W. Electrochemical deposition of hydroxyapatite coatings on titanium. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2006, 16: 633-637.
133. Zhitomirsky I, Gal-Or L, Kohn A, Hennicke H. Electrodeposition of ceramic films from non-aqueous and mixed solutions. *Journal of Materials Science*, 1995, 30: 5307-5312.

134. Şahin T. Elektrodepozisyon tekniğiyle üretilen Co ve CoFe filmlerin, yapısal ve manyetodirenç özelliklerinin incelenmesi. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
135. Kar A, Raja K, Misra M. Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO₂ for implant applications. *Surface and Coatings Technology*, 2006, 201: 3723-3731.
136. Puleo D, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 1999, 20: 2311-2321.
137. Ordikhani F, Tamjid E, Simchi A. Characterization and antibacterial performance of electrodeposited chitosan-vancomycin composite coatings for prevention of implant-associated infections. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, 41: 240-248.
138. Ryland AL. X-ray diffraction. 1958.
139. Kamaraj S, Palanisamy UM, Mohamed MSBK, Gangasalam A, Maria GA, Kandasamy R. Curcumin drug delivery by vanillin-chitosan coated with calcium ferrite hybrid nanoparticles as carrier. *European journal of pharmaceutical sciences*, 2018, 116: 48-60.
140. Napooni S, Delavari M, Arbabi M, Barkheh H, Rasti S, Hooshyar H, Mashkani SMH. Scolicidal effects of chitosan-curcumin nanoparticles on the hydatid cyst protoscolices. *Acta Parasitologica*, 2019, 64: 367-375.
141. Feddes B, González P, Serra J, Pou J, Chiussi S, Wolke JG, Jäger C. Characterization of thin calcium phosphate coating. İçinde: *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, Springer, 2009: 25-66.

142. Khoshakhlagh P, Rabiee SM, Kiaee G, Heidari P, Miri AK, Moradi R, Moztarzadeh F, Ravarian R. Development and characterization of a bioglass/chitosan composite as an injectable bone substitute. *Carbohydrate polymers*, 2017, 157: 1261-1271.
143. Bumgardner JD, Boring JG, Cooper Jr RC, Gao C, Givaruangsawat S, Gilbert JA, Misch CM, Steflik DE. Preliminary evaluation of a new dental implant design in canine models. *Implant dentistry*, 2000, 9: 252-260.
144. Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P, Nishimura I. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2009, 24.
145. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, Watzek G. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2003, 18.
146. Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants: A histological and histometrical study in rats. *Clinical oral implants research*, 2004, 15: 346-350.
147. Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008, 19: 2949-2952.
148. Wikesjö UM, Xiropaidis AV, Qahash M, Lim WH, Sorensen RG, Rohrer MD, Wozney JM, Hall J. Bone formation at recombinant human bone morphogenetic protein-2-coated titanium implants in the posterior mandible (Type II bone) in dogs. *Journal of clinical periodontology*, 2008, 35: 985-991.

149. Safali S, Aydin BK, Nayman A, Ugurluoglu C. Effect of curcumin on bone healing: An experimental study in a rat model of femur fracture. *Injury*, 2019, 50: 1915-1920.
150. Li G, Chen L, Chen K. Curcumin promotes femoral fracture healing in a rat model by activation of autophagy. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 2018, 24: 4064.
151. Takanche JS, Kim J-E, Kim J-S, Lee M-H, Jeon J-G, Park I-S, Yi H-K. Chitosan-gold nanoparticles mediated gene delivery of c-myb facilitates osseointegration of dental implants in ovariectomized rat. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2018, 46: S807-S817.
152. Sendyk D, Deboni M, Pannuti C, Naclério-Homem M, Wennerberg A. The influence of statins on osseointegration: a systematic review of animal model studies. *Journal of oral rehabilitation*, 2016, 43: 873-882.
153. Histing T, Garcia P, Holstein J, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke M, Wehner T, Bindl R. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*, 2011, 49: 591-599.
154. Dereka X, Calciolari E, Donos N, Mardas N. Osseointegration in osteoporotic-like condition: A systematic review of preclinical studies. *Journal of periodontal research*, 2018, 53: 933-940.
155. AbuMoussa S, Ruppert DS, Lindsay C, Dahners L, Weinhold P. Local delivery of a zoledronate solution improves osseointegration of titanium implants in a rat distal femur model. *Journal of Orthopaedic Research®*, 2018, 36: 3294-3298.
156. Berley J, Yamano S, Sukotjo C. The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. *Journal of Oral Implantology*, 2010, 36: 185-193.

157. Siqueira CRBd, Semenoff TADV, Palma VC, Borges ÁH, Silva NFd, Segundo AS. Effect of chronic stress on implant osseointegration into rat's mandible. *Acta cirurgica brasileira*, 2015, 30: 598-603.
158. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 2003, 24: 2339-2349.
159. Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 2006, 8: 203-226.
160. Lee J-Y, Nam S-H, Im S-Y, Park Y-J, Lee Y-M, Seol Y-J, Chung C-P, Lee S-J. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Journal of Controlled Release*, 2002, 78: 187-197.
161. Li J, Hwang I-C, Chen X, Park HJ. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocolloids*, 2016, 60: 138-147.
162. Ternullo S, Schulte Werning LV, Holsæter AM, Škalko-Basnet N. Curcumin-in-deformable liposomes-in-chitosan-hydrogel as a novel wound dressing. *Pharmaceutics*, 2020, 12: 8.
163. Khan MA, Zafaryab M, Mehdi SH, Ahmad I, Rizvi MMA. Characterization and anti-proliferative activity of curcumin loaded chitosan nanoparticles in cervical cancer. *International journal of biological macromolecules*, 2016, 93: 242-253.
164. Marin E, Briceño MI, Torres A, Caballero-George C. New curcumin-loaded chitosan nanocapsules: In vivo evaluation. *Planta medica*, 2017, 83: 877-883.
165. Asefi S, Seifi M, Fard GH, Lotfi A. Innovative evaluation of local injective gel of curcumin on the orthodontic tooth movement in rats. *Dental research journal*, 2018, 15: 40.

166. Ozaki K, Kawata Y, Amano S, Hanazawa S. Stimulatory effect of curcumin on osteoclast apoptosis. *Biochemical pharmacology*, 2000, 59: 1577-1581.
167. Wang J, de Boer J, De Groot K. Preparation and characterization of electrodeposited calcium phosphate/chitosan coating on Ti6Al4V plates. *Journal of dental research*, 2004, 83: 296-301.
168. Williams DB, Carter CB. The transmission electron microscope. *İçinde: Transmission electron microscopy*, Springer, 1996: 3-17.
169. Hamedinasab H, Rezayan AH, Mellat M, Mashreghi M, Jaafari MR. Development of chitosan-coated liposome for pulmonary delivery of N-acetylcysteine. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 156: 1455-1463.
170. Sharma S, Soni VP, Bellare JR. Electrophoretic deposition of nanobiocomposites for orthopedic applications: influence of current density and coating duration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009, 20: 93.
171. Pang X, Zhitomirsky I. Electrodeposition of nanocomposite organic–inorganic coatings for biomedical applications. *International Journal of Nanoscience*, 2005, 4: 409-418.
172. Rilda Y, Alif A, Munaf E, Agustien A. Effects of molar ratio on the synthesis and characterization nanocluster TiO₂-SiO₂ with induced copolymer chitosan by sol-gel. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, 2014, 5: 1417-1427.
173. Xiao C-J, Yu X-J, Xie J-L, Liu S, Li S. Protective effect and related mechanisms of curcumin in rat experimental periodontitis. *Head & face medicine*, 2018, 14: 1-8.
174. Yuan H, Gupte R, Zelkha S, Amar S. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 2011, 38: 1029-1036.

175. Yu X, Lv L, Zhang J, Zhang T, Xiao C, Li S. Expression of neuropeptides and bone remodeling-related factors during periodontal tissue regeneration in denervated rats. *Journal of molecular histology*, 2015, 46: 195-203.
176. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2008, 473: 139-146.
177. Lv L, Wang Y, Zhang J, Zhang T, Li S. Healing of periodontal defects and calcitonin gene related peptide expression following inferior alveolar nerve transection in rats. *Journal of molecular histology*, 2014, 45: 311-320.
178. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*, 2007: 105-125.
179. Deguchi A. Curcumin targets in inflammation and cancer. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 2015, 15: 88-96.
180. Aggarwal BB, Yuan W, Li S, Gupta SC. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. *Molecular nutrition & food research*, 2013, 57: 1529-1542.
181. Suo L, Jiang N, Wang Y, Wang P, Chen J, Pei X, Wang J, Wan Q. The enhancement of osseointegration using a graphene oxide/chitosan/hydroxyapatite composite coating on titanium fabricated by electrophoretic deposition. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2019, 107: 635-645.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Elif Banu ÖZKAN
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Medeni Hali:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
Faks:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Erzurum Merkez Anadolu Lisesi
Lisans:	
Yüksek lisans:	Hacettepe Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi
Uzmanlık:	Atatürk Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	(orta)
Almanca:	-
Rusça:	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük

Sayı : E-75296309-050.01.04-2100106890
Konu : HADYЕК Kararı.

14.04.2021

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 03.03.2021 tarihli ve 25330273-100-E.2100065243 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 12.04.2021 tarihli ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 57 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYЕК Sonuç Raporu"nın Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ : 12.04.2021

TOPLANTI SAYISI : 3

KARAR N0 57: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı, Klinik Diş Hekimliği Bölümü, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Ertan YALÇIN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **"Kitosan ve Kurkumin İle Kaplanan Titanyum Mini Vidaların Osseointegrasyonunun Histolojik ve Moleküler Düzeyde İn Vivo Rat Modelinde Değerlendirilmesi"** isimli araştırma çalışması ile ilgili Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığının 03.03.2021 tarihli ve 25330273-100-E.2100065243 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Adı: <http://www.atauni.edu.tr/birim-veteriner-fakultesi>
Kep Adresi: atauni@ku1.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr

