



Hastane Enfeksiyonlarına Karşı İmplant Yüzeylerinden Kontrollü İlaç Salımı

Sakip ÖNDER ¹, [♣]

¹ *Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Işık Üniversitesi, İstanbul 34980, Türkiye.*

Başvuru: 29/04/2016 Düzeltme: 16/06/2016 Kabul: 17/06/2016

ÖZ

Hastane enfeksiyonları vücuda yerleştirilen implant malzemelerinin başarısını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Enfeksiyonlar sonucu hastalar ciddi ağrılara maruz kalabilir, doku ve implant malzemesi arasındaki bağlanma zayıflayabilir, revizyon cerrahisi gerekebilir, hastadan implantın geri alınması söz konusu olabilir. Bu çalışmada enfeksiyonlarının önlenmesinde kullanılacak bir polimer/metal (kitosan/titanyum) sistemi üzerinde kontrollü antibiyotik (gentamisin) salım çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak antibiyotik yüklü polimerler titanyum yüzeylere tutuklanmış, sonrasında farklı kuruma koşullarına (hava ile kurutma- dondurarak kurutma) maruz bırakılmıştır. Dondurarak kurutma işlemi uygulanan yüzeylerde porlu yapılar elde edilmiştir. Porlu yapının hem yüzeylerden salımı yapılan antibiyotik miktarı üzerine hem de kemik hücrelerinin yüzeylere tutunması ve çoğalması üzerine olan etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak dondurarak kurutma işlemi sonrasında oluşan porlu yapıların yüzeylerden antibiyotik salımını arttırdığı görülmüştür. Hücre çoğalması testi (MTS) ise özellikle 5. günde porlu kitosan ile kaplı titanyum yüzeylerinde kemik hücrelerinin düz kitosan kaplı yüzeylere kıyasla çok daha fazla çoğaldığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Titanyum, kitosan, antibiyotik, kontrollü salım, kemik hücresi*

ABSTRACT

Hospital infections are one of the most important factors that affect the success of implant materials. Patients may have strong pain, integration between newly formed tissue and implant material may weaken, revision surgery may be needed, and even implant may be taken back from the patient as a result of infections. In this study, a polymer/metal (chitosan/titanium) system that can be used to prevent infections was tested in controlled antibiotic (gentamicin) release studies. Firstly, antibiotic loaded polymers were immobilized onto titanium substrates and then these samples were exposed to different drying conditions (air drying-freeze drying). Porous structures were formed on the titanium samples after freeze-drying. The effects of porous structure on the amount of released antibiotic from surfaces and osteoblast attachment & proliferation were investigated. As a result, it was shown that porous structures led to an increase in released antibiotic amount. Furthermore, cell proliferation test (MTS) showed that cell proliferation was higher on porous chitosan coated surfaces than smooth chitosan coated surfaces, especially at day 5.

Key words: *Titanium, chitosan, antibiotic, controlled release, osteoblast*

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

İmplant malzemelerinin başarısını etkileyen en önemli faktörlerin başında yüzey özellikleri gelmektedir. İmplant malzemesi vücuda yerleştirildikten sonra yüzeyinde gerçekleşen ilk olay olan proteinlerin birikmesi [1], hücrelerin bu yüzeylere tutunması ve çoğalması [2], hücrelerin farklılaşması [3] vb. bir çok olayı direkt olarak malzemelerin yüzey özellikleri etkilemektedir.

İmplant malzemelerinin yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve geliştirilmesi için literatürde çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Yüzeyle hücrelerin kolay bir şekilde tutunmasını sağlamak amacıyla sentetik peptitler [4], hücrelerin hücre dışı sıvılarının içerisinde doğal bir şekilde bulunan ve hücrelerin yüzeylere tutunmak için tanıdığı peptitlere (arginin-glisin-asparagin) sahip fibronektin, hiyalüronik asit gibi proteinler tutuklanmaktadır [5]. Fonksiyonel kaplamalar implant malzemelerinin hem biyouyumluluklarını hem de mekanik özelliklerini arttırmak üzere yine literatürde yüzey çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, titanyum altlık malzemelerinin üzerine kaplanan TiN ince film malzemelerin korozyon direncinin kaplanmamış titanyuma göre daha iyi olduğu bilinmektedir [6]. Daha önceki çalışmalarda TiN kaplamaların içerisine Mg katılması ile yüzeylerin biyouyumluluklarının da arttırıldığı, magnezyumun kemik hücrelerinin çoğalması üzerinde pozitif bir etkisinin olduğu gösterilmiştir [7]. Titanyum esaslı malzemelerin yüzeylerinin geliştirilmesinde sadece metalik kaplamalar değil, seramik kaplamalar da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kemik yapısında bulunan doğal mineral hidroksiapatiti (HA) içeren yüzeylerde hücre çoğalmasının HA içermeyen yüzeylere göre çok daha fazla olduğu görülmüştür [8].

Teknolojinin gelişmesi ile birlikte biyomalzeme olarak kullanılan malzemelerde özelliklerinde ciddi gelişmeler yaşanmaktadır. Mevcut malzemelerin doku onarımını ve yapımını tetikleyecek sinyaller oluşturabilmesi, doku ve implant yüzeyleri ara kesitinde kuvvetli bağların kurulabilmesi, hücrelerin çoğalmasını hızlandıran pürüzlü ve farklı yüzey şekillerinin tasarlanması, biyomalzeme yüzeylerinden yine hücrelerin büyümesine ve çoğalmasına pozitif etki yapacak büyüme faktörlerinin salımı vb. konular mevcut üçüncü nesil implant malzemelerinin taşıması gereken özelliklerden olup çalışmalar bu alanlarda yoğunlaşmıştır [9]. Bu amaç doğrultusunda implant

yüzeylerinden büyüme faktörlerinin salınımında genellikle polimer esaslı malzemeler tercih edilmektedir. Salımı yapılacak olan biyomoleküller polimerik yapılara çeşitli yöntemlerle tutuklanmaktadır [10]. Kitosan, jelatin, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) veya polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) vb. hem biyomalzeme hem de doku mühendisliği çalışmalarında biyomoleküllerin *in vivo* koşullarda kontrollü bir şekilde salınımında yaygın olarak kullanılan polimerlerdir [11-13].

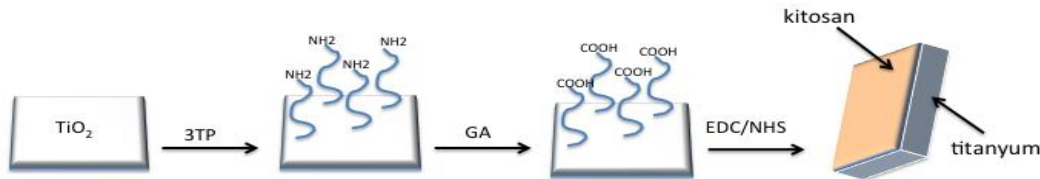
Yeni nesil implant malzemelerinin yıpranmış dokuların onarımı ve yapımını tetikleyebilme özelliklerinin yanında anti bakteriyel özelliklere de sahip olmaları gerekir. Özellikle implantların vücuda yerleştirildiği operasyon odalarında yaşanacak bir sterilizasyon problemi ortopedik implantların başarısını ciddi anlamda etkileyecektir [14, 15]. Olası bir bakteri enfeksiyonu implant yüzeylerinde biyofilm oluşmasına, doku ile implant arasında zayıf bir bağlanmaya ve hatta implantın cerrahi müdahale ile geri alınmasına neden olabilmektedir [16, 17] Bu tür enfeksiyonlar implant yüzeylerinden yapılacak kontrollü ilaç salımı ile önenebilir [18, 19].

Bu çalışmada titanyum esaslı sert doku implant malzemelerinin vücuda yerleştirilmesi esnasında oluşabilecek bakteri enfeksiyonlarını önlemede kullanılmak üzere kontrollü ilaç (gentamicin) salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun amaçları; 1) titanyum malzemelerin yüzeylerine antibiyotik yüklü kitosan polimerlerin tutuklanması ve karakterizasyonu, 2) titanyum/polimer sistemlerinin farklı kurutma koşullarına (hava- dondurarak) maruz bırakma ve yüzeylerden antibiyotik salım çalışmaları, 3) düz ve porlu polimer kaplı yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM (MATERIAL and METHOD)

2.1 Titanyum Yüzeylerinde TiO₂ Oluşturma (TiO₂ formation on titanium surfaces)

Titanyum (Ti) plakalar öncelikle 15x15x1 mm boyutlarında giyotin ile kesildi ve sırasıyla 1000, 2500 ve 4000 lik SiC kağıtlar ile yüzeyleri parlatıldı. Parlatılan yüzeyler daha sonra aseton ve alkol ile ultrasonik banyo içerisinde 10 dk. süre ile temizlendi. Temizlik işleminde sonra yüzeylere antibiyotik yüklü ve -NH₂ gruplarına sahip kitosanların tutuklanabilmesi için -COOH gruplarının oluşturulması aşamasına geçildi (Şekil 1).



Şekil 1.Kitosan polimerlerin Ti yüzeylere tutuklanma yöntemi

Figure 1. Procedure used to immobilize chitosan polymers onto Ti surfaces

Şekil 1 de gösterildiği üzere öncelikle titanyum altlık malzemelerinin yüzeylerinde TiO₂ oluşumu sağlanmıştır. Bunun için titanyum numuneler öncelikle 5M NaOH çözeltisi ile 24 saat muamele edilmiştir. Daha sonra yüzeyler 2M HCl çözeltisi ile 1 dk. süre nötrale edilmiş ve distile su ile yıkanmıştır. Son olarak numuneler 200 °C etüv içerisinde 24 saat bekletilmiştir.

2.2 Oksitlenmiş Titanyum Yüzeylerinde –COOH Gruplarının Oluşturulması

2.2 –COOH Group Formation on Oxidized Titanium Surfaces

İlk olarak 10% (w/v) luk 3-(triethoxysilyl)-propylamine (3TP) çözeltisi hazırlanmıştır (pH:3). 3TP çözeltisi 100 °C kadar ısıtılmış ve oksitlenmiş titanyum numuneler 3dk. boyunca bu çözeltinin içerisinde bekletilmiştir. Numuneler daha sonra yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Bu işlemten sonra titanyum yüzeylerinde –NH₂ grupları oluşmuştur (Şekil 1). Son olarak 8% glüteraldehide (GA) çözeltisi hazırlanmış ve –NH₂ gruplarına sahip numuneler 24 saat boyunca GA çözeltisi ile muamele edilmiş, sonrasında yıkanarak kurumaya bırakılmıştır.

2.3 Titanyum Yüzeylerine Antibiyotik Yüklü Kitosanların Tutuklanması

2.3 Immobilization of Antibiotic Loaded Chitosan onto Titanium Surfaces

EDC/NHS literatürde biyomoleküllerin yüzeylere tutuklanmasında yaygın bir şekilde kullanılan, karboksil grup (-COOH) ve amin grup (-NH₂) reaksiyonuna dayanan bir yöntemdir [20]. Bu çalışmada da ilaçların yükleneceği kitosan polimerinin –NH₂ grupları ile kimyasal işlemler sonucu yüzeylerde oluşturduğumuz –COOH gruplarının birbirlerine kovalent bağlanması hedeflenmiştir.

Çalışmada daha önceki çalışmamda kullandığım ve homojen por yapısına sahip 2% kitosan (düşük viskoz, sigma 50494) çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan kitosan çözeltinin içerisine EDC/NHS (2:1/ mol:mol) ve antibiyotik eklenip karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımdan numune yüzeylerine konulmuş (200 µl/ örnek) ve örnekler tutuklanma işlemi için +4 °C ye kaldırılmıştır (6 saat). Son olarak numunelerin bir kısmı hava ile kurutma bir kısmı da dondurarak kurutma ile kurutma işlemine maruz bırakılmıştır. Dondurarak kurutma işlemi için numuneler ilk olarak -20 °C da bekletilmiş (20 dk.) daha sonra liyofilizasyon cihazına konulmuştur.

2.4 Yüzeylerin SEM ile Karakterizasyonu

2.4 Characterization of Surfaces by Using SEM

Hava ile kurutma ve dondurarak kurutma işlemlerinden sonra titanyum/polimer ara kesitindeki bağlanmayı ve yüzeylerde oluşan porlu yapıları incelemek üzere numuneler taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmiştir.

2.5 Antibiyotik Salım Çalışmaları

2.5 Antibiotic Release Studies

Salım işlemleri 37 °C ve PBS (0.01 M) içerisinde gerçekleştirilmiştir (4 ml). Salım işleminin yapıldığı solüsyondan belirli aralıklarla (2-48 saat) numuneler alınmış (1 ml) ve alınan numune kadar taze PBS ortama eklenmiştir.

Ortama salınan antibiyotik miktarını UV-vis spektrofotometrede okuyabilmek için öncelikle o-phthaldialdehide çözeltisi hazırlanmıştır [21]. Daha sonra o-phthaldialdehide çözeltisi ve bilinen miktarlarda antibiyotik kullanılarak 332 nm de ölçümler yapılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Son olarak kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirli aralıklarla toplanmış olan numunelerin içerisinde bulunan antibiyotik miktarları hesaplanmıştır.

2.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.6 Cell Culture Studies

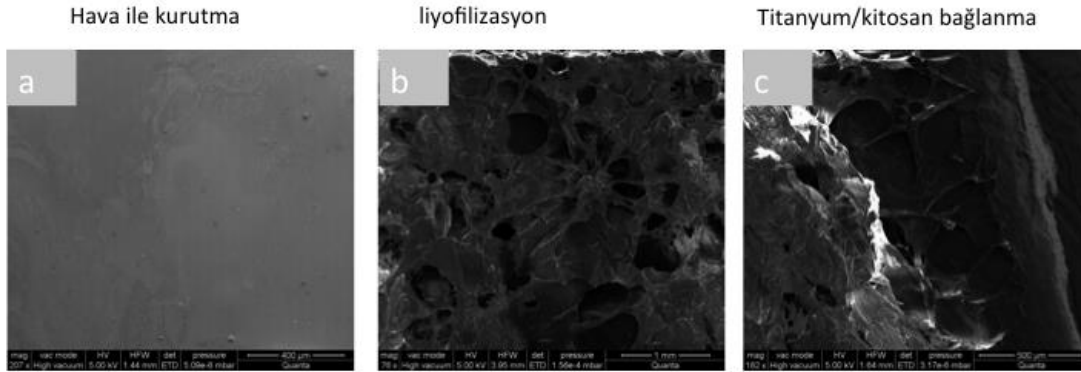
Kemik hücrelerinin farklı yüzey özelliğine sahip numuneler üzerinde sergileyeceği davranışı incelemek üzere hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak numuneler 3 saat boyunca sterilizasyon için UV ye maruz bırakılmış, daha sonra içerisinde 50 mL fetal bovine serum (FBS), 1 mL promicin (Invivogen) ve 500 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Nutrient Mixture F-12 HAM) dan hazırlanmış hücre kültürü besiyeri içeren 12 lik kuyulu tabak içerisine yerleştirilmiştir. Numunelerin üzerine kemik hücreleri (hFOB; ATCC CRL-11372) ekilmiş (1000 hücre/numune) ve numuneler 5 % CO₂ inkübatörü içerisinde saklanmıştır (37 °C). Hücre kültürü besiyeri 3 günde 1 yenisi ile değiştirilmiş, yüzeylerdeki hücre sayıları hücre çoğalma testi (MTS) ile kontrol edilmiştir (1-8 gün).

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA (RESULTS and DISCUSSION)

3.1 SEM Analizleri

3.1 SEM Analysis

Yüzeylerin SEM görüntüleri hava ile kurutma ve dondurarak kurutma işlemlerinden sonra titanyum yüzeylerinin farklı yüzey özelliklerine sahip olduklarını göstermiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Yüze işlemleri sonrası titanyum yüzeylere ait SEM görüntüleri. (a) hava ile kurutmadan sonra, (b) dondurarak kurutmadan sonra, (c) EDS/NHS işlemi sonrası titanyum altlık ve kitosan arasındaki bağlanma.

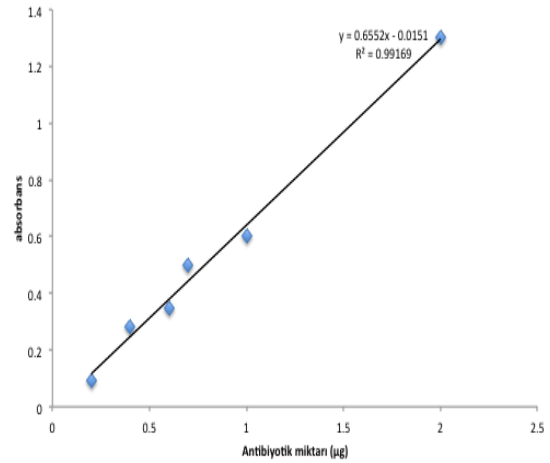
Figure 2. SEM micrographs of titanium surfaces after surface treatment. (a) after air-drying, (b) after freeze-drying, (c) Attachment between titanium and chitosan after EDS/NHS coupling

Hava ile kurutma işlemi sonrasında titanyum yüzeyler düz bir polimer tabakası ile kaplanırken (Şekil 2a), dondurarak kurutma işlemi sonrasında yüzeylerde porlu bir yapı oluşmuştur (Şekil 2b). Yüzeylerde oluşan porlu yapıların hücrelerin tutunması ve göçü için önemli olduğu bilinmektedir [22]. Hücreler porlu yapılardan içeriye implant yüzeylerine doğru hareket edebilir ve yeni oluşacak doku ile implant arasında kuvvetli bağlanmayı sağlayabilir [9]. Buradaki önemli noktalardan birisi de polimer ile titanyum arasındaki bağlanmanın ne kadar sağlam olduğunun kontrol edilmesidir (Şekil 2c). Bunu için yüzeyleri polimer ile kaplanmış titanyum numuneler 1 ay PBS içerisinde bekletilmiş, titanyum ile polimer arasında herhangi bir ayrılma gözlemlenmemiştir.

3.2 Antibiyotik Salımları

3.2 Antibiotic Release

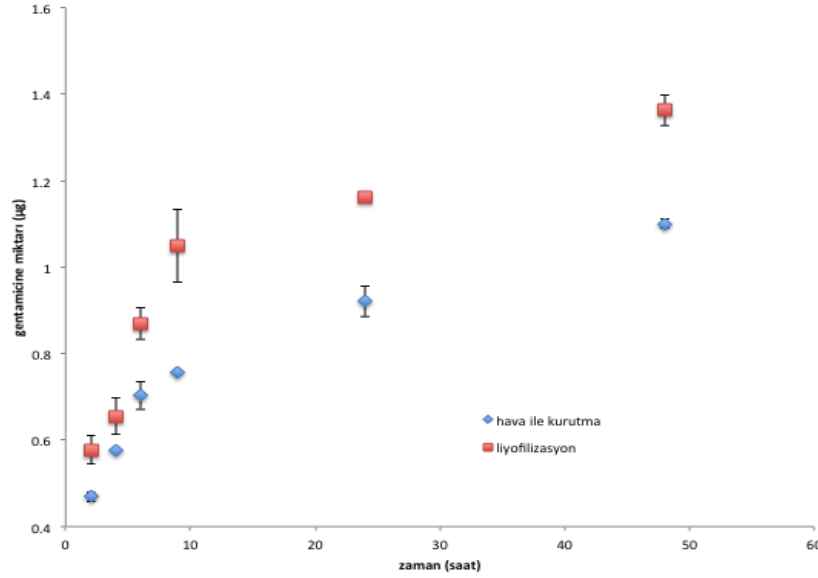
Yüzeylerden salımı yapılan antibiyotik miktarını belirlemek üzere kullanılacak olan kalibrasyon eğrisi şekil 3 teki gibi elde edilmiştir.



Şekil 3. Antibiyotik kalibrasyon eğrisi

Figure 3. Antibiotic Calibration Curve

Kalibrasyon eğrisine ait R^2 değerine bakıldığında o-phthaldialdehyde solüsyonun çalıştığı ve 332 nm de UV-vis spektro ile antibiyotik miktarının doğru bir şekilde tayininin yapılabileceği gösterilmiştir. Elde edilen bu kalibrasyon eğrisine ait denklem daha sonrasında salım numunelerinin içerisindeki antibiyotik miktarının belirlenmesinde kullanılmış ve şekil 4 teki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4. Hava ile kurutma ve dondurarak kurutma işlemlerinden sonra yüzeylere ait antibiyotik salım eğrileri

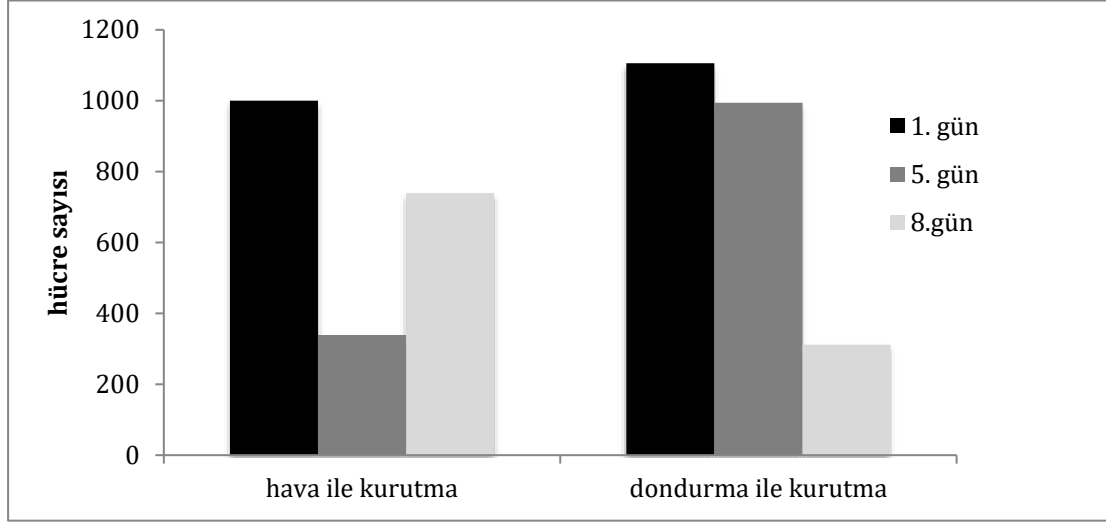
Figure 4. Antibiotic release curves from surfaces after air and freeze drying

Hava ile kurutma ve dondurarak kurutma işlemleri yüzeylerin sadece por yapılarını değil aynı zamanda yüzeylerden salınan antibiyotik miktarlarını da etkilemiştir. Dondurarak kurutma işlemi ile hazırlanan yüzeylerden salınan antibiyotik miktarının, havayla kurutma işlemi ile hazırlanan yüzeylerden salınan antibiyotik miktarına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Özellikle 10. saate gelindiğinde yüzeylerden salınan antibiyotik miktarları arasında ciddi bir fark görülmektedir (Şekil 4). Dondurarak kurutma işlemi sonrasında yüzeylerde oluşan porlu yapılar antibiyotik salımını hızlandırmış ve arttırmıştır. Bu sonuçlara göre polimer kaplı titanyum yüzeylerden salımı yapılacak olan antibiyotik miktarının farklı kurutma işlemleri ile ayarlanabileceği gösterilmiştir. Antibiyotik salımı için düşünülen bu sistem aynı zamanda farklı biyomoleküllerin salımında da kullanılabilir. 3. nesil biyomalzemelerin taşınması gereken en temel özelliklerinden birisi implantların buldukları bölgelerde biyosinyaller oluşturmaları, hücrelerin implant bölgesine yönelmelerinin sağlanması ve hücre farklılaşmalarına yardımcı olmalarıdır [9]. Bu sebeple bu yüzeylerden hücre büyüme faktörlerinin, sinyal faktörlerinin salımının yapılması da mümkündür.

3.3 MTS Analizleri

3.3 MTS Analysis

Hücrelerin farklı yüzey özelliklerine sahip titanyum üzerinde çoğalmalarını incelemek üzere yapılan MTS analizlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 5 te verilmiştir. 1. gün sonunda hem hava ile kurutma yöntemiyle hem de dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış numunelerin yüzeylerinde hücrelerin bulunduğu görülmektedir. 5. gün sonunda dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış numunelerin üzerinde daha fazla miktarda hücre vardır fakat 8. gün sonunda hücre miktarında bir azalma görülmektedir. Hücre sayısında meydana gelen bu dalgalanmanın farklı sebepleri olabilir. Daha az yüzey alanına sahip düz polimer ile kaplı yüzeylerdeki hücreler daha erken yoğunluğa ulaşmış ve yüzeylerden atmaya başlamış olabilirler, çünkü 8. güne gelindiğinde hücre sayısında tekrar bir artış gözlemlenmiştir. Porlu polimer ile kaplı titanyum yüzeyleri incelendiğinde bu yüzeylerde 5. gün sonunda daha fazla hücre olduğu tespit edilmiştir. Porlu polimer yapılarına sahip titanyum yüzeylerinden hücreler daha geç atmaya başlamış olabilir. Porlardan implant yüzeyine doğru hareket eden hücreler 5. günde yüzeylerde daha fazla miktarda hücrenin tutunmasına ve çoğalmasına olanak sağlamıştır. 8. güne gelindiğinde bu yüzeylerde de ayrılma sonrası hücre miktarında azalma gözlemlenmiş olabilir. Fakat 5. güne ait MTS sonuçları dondurarak kurutma işlemi sonrasında titanyum yüzeylerinde oluşturulan porlu yapının hücre tutunması ve çoğalması üzerine pozitif bir katkı sağladığını göstermesi açısından önemlidir.

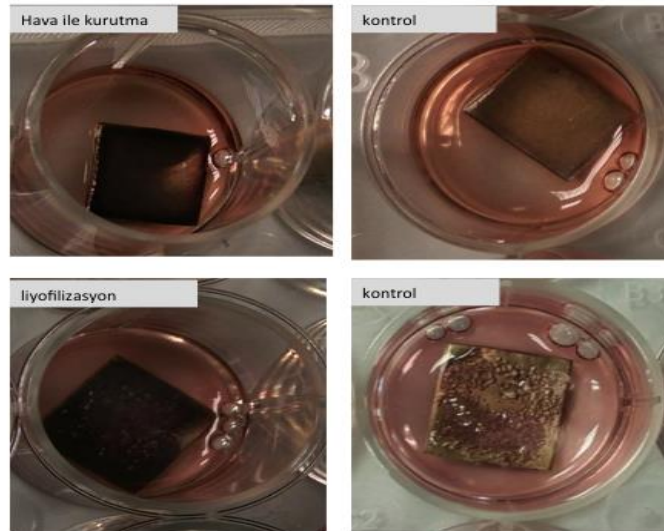


Şekil 5. MTS sonuçları

Figure 5. MTS results

MTS analizi bilindiği üzere kolorimetrik bir yöntemdir. Test içerisinde bulunan tetrazolium canlı hücrelerin içinde bulunduğu hücre kültürü besiyerinin renginin

değişmesine neden olmaktadır [7]. Besiyerinin renginde meydana gelen değişiklik ortamda bulunan hücre miktarına bağlıdır. MTS analizleri sonunda numune yüzeylerinin fotoğrafları da çekilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. MTS analizi sonrası titanyum yüzeylerin görüntüsü

Figure 6. Pictures of titanium surfaces after MTS analysis

Şekil 6 da görüldüğü üzere yüzeylerde bulunan polimerlerin de renklerinin değiştiği görülmüştür. Dolayısıyla boyar maddenin polimerler tarafından

absorbe edilmesi ortamda bulunan hücre kültürü besiyerinin renginde normalden daha az miktarda değişime neden olmuştur. Bu sonuçlar daha önceki

çalışmamda elde etmiş olduğum sonuçları da desteklemektedir [23]. MTS analizleri sonucunda hücre sayılarındaki dalgalanmanın diğer bir sebebi de bu durum olabilir. Şekil 6 da ki görüntüler 5 günlük yüzeylerden elde edilen görüntüler olup, porlu polimerle ile kaplı yüzeylerde renk oluşumunun düz polimerle kaplı yüzeylere göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

4. DEĞERLENDİRME (CONCLUSIONS)

Çalışmada titanyum esaslı sert doku implant malzemelerinin vücuda yerleştirilmesi esnasında oluşabilecek enfeksiyonların önlenmesi amacıyla yüzeylerden kontrollü ilaç salımı yapılabileceği gösterilmiştir. Titanyum yüzeylerine antibiyotik (gentamisin) yüklü kitosan polimerler EDS/NHS yöntemi ile tutuklanmış ve numuneler farklı kuruma (hava-dondurma) işlemlerine maruz bırakılmıştır. PBS içerisinde yapılan salım çalışmalarında farklı kurutma işlemlerinin yüzeylerden salınan antibiyotik miktarını etkilediği görülmüştür. Ayrıca dondurarak kurutma sonrası yüzeylerde oluşan porlu yapıların kemik hücrelerinin yüzeylere tutunması ve çoğalmasına pozitif bir etki yarattığı da kısmen gösterilebilmiştir. Kitosanın renkli hücre kültürü besiyerini absorbe etmesi ortamdaki renk yoğunluğunun normalden az olmasına neden olmuştur. Bu durum MTS sonuçlarının doğru bir şekilde yorumlanmasını zorlaştırmıştır. Fakat porlu yüzeylerde polimerlerin sahip olduğu renk yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada hastane enfeksiyonlarına yönelik kontrollü ilaç salımı yapılmış olmasına rağmen mevcut sistem proteinlerin, büyüme faktörlerinin, hücrelerin vb. salımında da kullanılabilir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Lorenzetti M., Bernardini G., Luxbacher T., Santucci A., Kobe S., Novak S., " Surface properties of nanocrystalline TiO₂ coatings in relation to the "in vitro plasma protein adsorption" , **Biomedical Materials**, 10, 2015.
- [2] Kloczko E., Nikkiah D., Yildirimer L., "Scaffolds for hand tissue engineering: the importance of surface topography " ,**Journal of Hand Surgery-European Volume**, 40, 973-985, 2015.
- [3] Ferlin K.M., Prendergast M.E., Miller M.L., Kaplan D.S., Fisher J.P., "Influence of 3D printed porous architecture on mesenchymal stem cell enrichment and differentiation" ,**Acta Biomaterialia**, 32, 161-169, 2016.
- [4] Lee J.Y., Choi Y.S., Lee S.J., Chung C.P., Park Y.J., "Bioactive Peptide-modified Biomaterials for Bone Regeneration", **Current Pharmaceutical Design**, 17, 2663-2676, 2011.
- [5] Omorphos N.P., Kahn L., Kalaskar D.M., "Design of extracellular protein based particles for intra and extra-cellular targeting" ,**Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, 136, 440-448, 2015.
- [6] Van Hove R.P., Siervelt I.N., Van Royen B.J., Nolte P.A., "Titanium-Nitride Coating of Orthopaedic Implants: A Review of the Literature" , **Biomed Research International**, 2015.
- [7] Onder S., Calikoglu-Koyuncu A.C., Kazmanli K., Urgan M., Kose G.T., Kok F.N., "Behavior of mammalian cells on magnesium substituted bare and hydroxyapatite deposited (Ti, Mg) N coatings" ,**New Biotechnology**, 32 747-755, 2015.
- [8] Lee H.J., Kwon T.Y., Kim K.H., Kang S.S., Choi S.H., Kwon S.T., Cho D.H., Son J.S., "In Vitro Evaluation of Hydroxyapatite-Coated Titanium Implant with Atmospheric Plasma Treatment",**Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 15, 5593-5596, 2015.
- [9] Buddy D.R., Frederick J. S., Jack E.L., **Biomaterials Science (Third Edition)** ,Elsevier Inc., 2013.
- [10] Liu Y.S., Yu J., "Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review", **Microchimica Acta**, 183, 1-19, 2016.
- [11] Chung T.W., Chou T.H., Wu K.Y., "Gelatin/PLGA hydrogel films and their delivery of hydrophobic drugs" ,**Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 60, 8-14, 2016.
- [12] Song K.D., Liu Y.C., Macedo H.M., Jiang L.L., Li C., Mei G.Y., Liu T.Q., " Fabrication and evaluation of a sustained-release chitosan-based scaffold embedded with PLGA microspheres", **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, 33,1506-1513, 2013.
- [13] Kutlu C., Cakmak A.S., Gumusderelioglu M., "Double-effective chitosan scaffold-PLGA nanoparticle system for brain tumour therapy: in vitro study", **Journal of Microencapsulation**, 31, 700-707, 2014.
- [14] Knobben B.A.S., van Horn J.R., van der Mei H.C., Busscher H.J., "Evaluation of measures to decrease intra-operative bacterial contamination in orthopaedic implant surgery", **Journal of Hospital Infection**, 62, 174-180, 2006.
- [15] Phuengkham H., Teeranachaideekul V., Chulasiri M., Nasonkka N., "Preparation and optimization of chlorophene-loaded nanospheres as controlled release antimicrobial delivery systems",**Pharmaceutical Development and Technology**, 21, 8-13, 2016.
- [16] Yazici H., O'Neill M.B., Kacar T., Wilson B.R., Oren E.E., Sarikaya M., Tamerier C., "Engineered Chimeric Peptides as Antimicrobial Surface Coating Agents toward Infection-Free Implants", **ACS Applied Materials & Interfaces**, 8, 5070-5081, 2016.
- [17] Pye A.D., Lockhart D.E.A., Dawson M.P., Murray C.A., Smith A.J., "A review of dental implants and infection " , **Journal of Hospital Infection**, 72, 104-110, 2009.

- [18] Feng W.C., Geng Z., Li Z.Y., Cui Z.D., Zhu S.L., Liang Y.Q., Liu Y.D., Wang R.F., Yang X.J., "Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes", **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, 62 , 105-112, 2016.
- [19] Gimeno M., Pinczowski P., Perez M., Giorello A., Martinez M.A., Santamaria J., Arruebo M., Lujan L., "A controlled antibiotic release system to prevent orthopedic-implant associated infections: An in vitro study ", **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 96, 264-271, 2015.
- [20] Onder S., Kazmanli K., Kok F.N., "Alteration of PTFE Surface to Increase Its Blood Compatibility", **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, 22, 1443-1457, 2011.
- [21] Posadowska U., Brzychczy-Wloch M., Pamula E., "Gentamicin loaded PLGA nanoparticles as local drug delivery system for the osteomyelitis treatment ", **Acta of Bioengineering and Biomechanics**, 17, 41-48, 2015.
- [22] Gao C.D., Zhuang J.Y., Li P.J., Shuai C.J., Peng S.P., " Preparation of micro/nanometer-sized porous surface structure of calcium phosphate scaffolds and the influence on biocompatibility " **Journal of Materials Research**, 29, 1144-1152, 2014.
- [23] Önder S., "Surface Modification of Titanium by Using BSA Loaded Chitosan and Chitosan/Gelatin Polymers" **Journal of Medical and Biological Engineering**, 2016-basında.