



Makale / Research Paper

Sol-Jel Yöntemi ile Sentezlenen Antibakteriyel Kalsiyum Fosfat/Kitosan/Çinko Kaplamanın İncelenmesi

Eren YILMAZ^{1,2a}

¹Kaynak Teknolojisi Programı, Arifiye Meslek Yüksekokulu, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, 54187, Sakarya, Türkiye

²Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Malzeme ve Üretim Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi (SUMAR), 54187, Sakarya, Türkiye
erenyilmaz@subu.edu.tr

Received/Geliş: 19.03.2021

Accepted/Kabul: 28.04.2021

Öz: Ortopedik veya dental implant uygulamalarında yaygın olarak kullanılan kalsiyum fosfat kaplamalar mükemmel biyoaktivite ve osteokondüktiviteye sahip olsalar da enfeksiyon riski taşımaktadırlar. Bu çalışmada, Titanyumun yüzeyinde hem biyoaktif hem de antibakteriyel özellik sağlayan kalsiyum fosfat/kitosan/çinko içerikli biyokompozit kaplama sol-jel yöntemi ile elde edilmiştir. Kaplamanın karakterizasyon çalışmaları X-ışını kırınımı (XRD), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum fosfat içerikli kaplamaya, biyouyumlu kitosan ve çinko ilavesi antibakteriyel özellik kazandırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre postoperatif cerrahi enfeksiyonlarının önlenmesi için antibiyotik kullanmadan geliştirilen bu kaplama umut vericidir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel kaplama; sol-jel; implant.

Investigation of Antibacterial Calcium Phosphate / Chitosan / Zinc Coating Synthesized by Sol-Gel Method

Abstract: Although calcium phosphate coatings, which are widely used in orthopedic or dental implant applications, have excellent bioactivity and osteoconductivity, they carry a risk of infection. In this study, calcium phosphate / chitosan / zinc containing biocomposite coating, which provides both bioactive and antibacterial properties on the surface of Titanium, was obtained by sol-gel method. The characterization studies of the coating were carried out by X-ray diffraction (XRD), Scanning Electron Microscope (SEM), Energy Dispersion Spectroscopy (EDS) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analyzes. The addition of biocompatible chitosan and zinc to the calcium phosphate-containing coating has provided antibacterial properties. According to the results, this coating, which was developed without using antibiotics to prevent postoperative surgical infections, is promising.

Keywords: Antibacterial coating; sol-gel; implant.

1. Giriş

Metalik malzemeler özellikle yük taşıyan implant uygulamalarında tercih edilmektedir. Titanyum (Ti) ve alaşımları düşük yoğunlukları, mükemmel korozyon dirençleri, uygun biyouyumlulukları ve nispeten düşük elastik modülleri nedeniyle diğer metalik malzemelere kıyasla ön plana çıkmaktadır[1]. Özellikle beta faz içerikli Ti alaşımları ve gözenekli Ti alaşımları çalışmaları ile mekanik özellikler kemiğin özelliklerine yaklaştırılmıştır[2,3]. Ancak Ti'nin yüzeyinin biyoinert

Bu makaleye atıf yapmak için

Yılmaz,E., "Sol-Jel Yöntemi ile Sentezlenen Antibakteriyel Kalsiyum Fosfat/Kitosan/Çinko Kaplamanın İncelenmesi" El-Cezeri Fen ve Mühendislik Dergisi 2021, 8 (2); 942-950.

How to cite this article

Yılmaz, E., "Investigation of Antibacterial Calcium Phosphate/Chitosan/Zinc Coating Synthesized by So-Gel Method" El-Cezeri Journal of Science and Engineering, 2021, 8 (2); 942-950.
ORCID ID: 0000-0001-7264-2588

olması nedeniyle etrafındaki kemik doku ile kimyasal bir bağ oluşturamaz, osseointegrasyon özelliği zayıftır ve implant gevşeme sorunu ortaya çıkar[4]. Biyoaktif yüzey oluşturacak en yaygın kullanılan çözüm, kemiğin inorganik bileşeni olan ve sert dokuların ağırlıkça %70'ini oluşturan hidroksiapatitin (HA) kaplama malzemesi olarak kullanılmasıdır. HA kaplanan yüzeyde yeni kemik dokusu oluşumu uyarılarak implant ile etrafındaki kemik doku arasında sabitleme sağlanır[5-7]. Ancak HA kırılmandır ve genel olarak antimikrobiyal özelliğe sahip değildir[8,9]. Bu olumsuz yanlarının kuvvetlendirilmesi için HA'ya çeşitli takviyeler yapılarak kompozit kaplama çalışmaları gerçekleştirilmiştir[10,11].

Mekanik özelliği kemik ile uyumlu Ti alaşımı yüzeyine biyoaktif özellikli kaplamalar oluşturulmuş olsa da bakteri yapışması ve çoğalması engellenemez, mikrobiyal kolonizasyon ve biyofilm oluşumu klinik bir problemdir, ortopedik replasman başarısızlığına yol açar. Bakteri kolonizasyonunu tedavi etmek ve önlemek için kullanılan en yaygın yöntem lokal ve sistemik antibiyotik uygulamasıdır[12]. Bununla birlikte farklı farklı bakteri suşlarında antibiyotiklere karşı artan direnç, bu tür tedaviler ile ilgili temel endişedir. Ayrıca özellikle antibiyotik doz miktarındaki artış bakterilerin yanında kemik hücre canlılık oranını da düşürür. Bu nedenle son yıllarda güvenli, toksik etki yaratmayan ve antibakteriyel etki gösteren malzemeler üzerine odaklanılmıştır. Bu amaçla özellikle hidrofilik özelliğe sahip, biyouyumlu, biyoaktif ve doku mühendisliğinde faydalı olan kitosan biyopolimeri ile ilgili geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır. Kitosan, hidroksil grupları ve amino grupları içeren doğal olarak oluşan katyonik bir polisakkarittir[13]. Kitosan doğada bol bulunur, kabuklular, yumuşakçalar, böcek, mantarlar ve deniz omurgasızları gibi birçok canlıdan üretilir. Literatürde özelliklerin geliştirilmesi için çeşitli HA-kitosan iskeleti ve kaplamaları çalışmaları yapılmıştır[14,15].

Ayrıca mineral ikameli HA kaplamalar da mikroyapı, çözünürlük, kristallik ve osteokonduktivite gibi özelliklerin kontrolünde önemlidir. Kemiğin inorganik bileşiminde Ca ve P içeriğinin yanısıra sodyum, çinko, demir ve karbonat gibi katyonlar ve anyonlar bulunur. Bunların arasından çinkonun, kemik oluşumunu desteklediği, enzim reaksiyonlarında önemli rol oynadığı ve antibakteriyel etkiye katkısının olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle çeşitli HA-Zn içerikli kaplama çalışmaları gerçekleştirilmiştir[16].

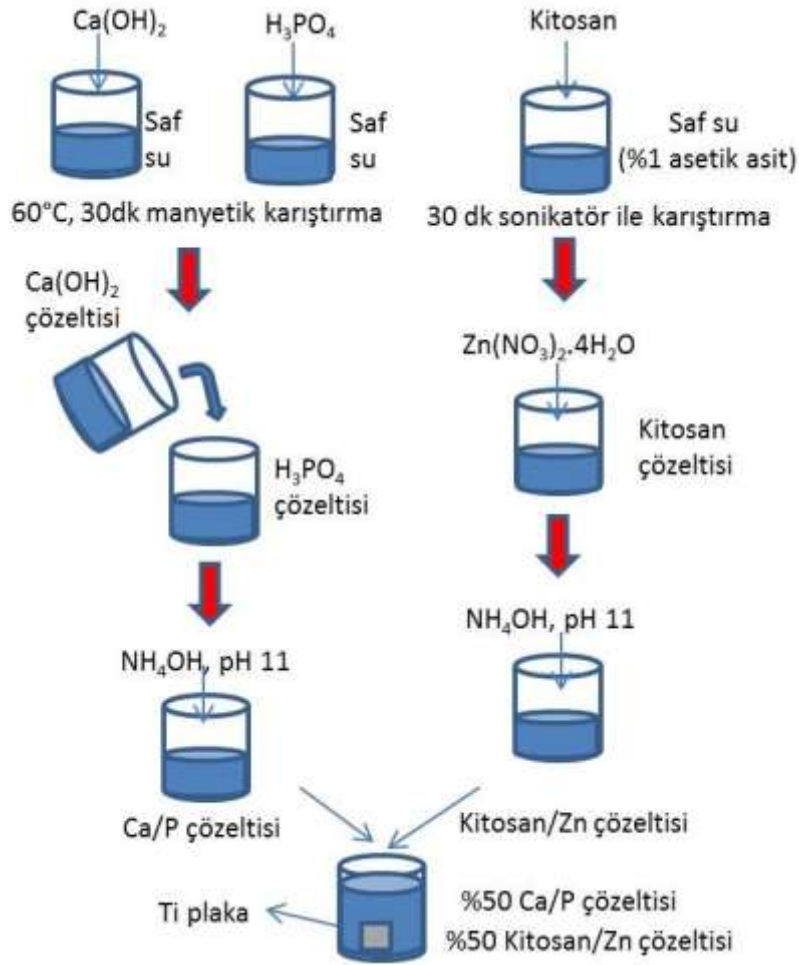
Bu çalışmada Ti plaka yüzeyine sol-jel yöntemi ile kalsiyum fosfat / kitosan / Zn içerikli kompozit kaplaması gerçekleştirilmiştir. Sol-jel yöntemi düşük maliyeti, homojen moleküler karıştırma, nano boyutlu parçacıklar ve ince filmler oluşturma yeteneği ve düşük sıcaklıktaki uygulaması ile avantaj sağlamaktadır[17]. Özellikle düşük sıcaklıktaki kaplama, kitosan ve HA'daki hidroksil grubu uzaklaşması ve bozunma gibi sorunları ortadan kaldırır. Kaplanan yüzeylerde mikroyapı ve faz analizleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra antibakteriyel kabiliyetleri incelenmiştir. Literatürde kaplama için kalsiyum fosfat, kitosan ve çinko içeriğinin beraber kullanıldığı çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışma sol-jel yöntemi ile üç bileşenin beraber kaplanması açısından bir yenilik getirmektedir. Oluşturulan bu kaplama hem dental hem de ortopedik implant yüzeyleri için kullanımı hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada kaplamalar için altlık malzeme olarak 0.25 mm kalınlığında %99.99 saflıktaki Ti plaka (Alfa Aesar) kullanılmıştır. Kaplama öncesi her bir Ti plaka 1x1cm boyutlarında kesilip, sonikatör içinde aseton ile yüzey temizlikleri gerçekleştirilmiştir. Yüzeylerde kalsiyum fosfat / kitosan / çinko kompoziti kaplamasının sol-jel yöntemi ile oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla kalsiyum ve fosfor kaynağı olarak sırasıyla kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂) (Merck) ve fosforik asit (H₃PO₄) (Merck) kullanılmıştır. Öncüllerin karışımı HA'ya benzer Ca/P atomik oranına (1,67) yakın olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla, ayrı beherlerde 25 ml saf su içine 1.85g Ca(OH)₂ ve

0.87 ml H_3PO_4 dahil edilerek manyetik karıştırıcıda $60^\circ C$, 30 dk karıştırma işlemi yapıldı. Ardından hazırlanan $Ca(OH)_2$ çözeltisi, H_3PO_4 çözeltisi içine damla damla ilave edildi ve hazırlanan kalsiyum fosfat (Ca/P) çözeltisi karıştırmaya bırakıldı. Bu çözeltinin pH'ını 11'e getirmek için amonyum hidroksit (NH_4OH) ilavesi yapıldı. Bunun yanı sıra, kitosan/çinko (Zn) çözeltisi hazırlamak için öncelikle 6 mg kitosan (Merck), 100ml %1 asetik asit çözeltisi içinde sonikatörde 30 dk sürede çözündürülmüştür, ardından 24 saat kapalı kap içinde manyetik karıştırıcıda çözündürme işlemi tamamlanmıştır. Kitosan miktarı literatürden alınmıştır[15]. Ardından 1 g çinko nitrat tetrahidrat ($Zn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$), kitosan çözeltisi içine dahil edilmiştir, kitosan/Zn çözeltisinin pH'ı 4.5 ölçülmüştür, pH değerini 11'e çıkarmak için NH_4OH ilavesi yapılmıştır. Son adımda Ca / P – kitosan / Zn çözeltisi elde etmek için hazırlanan iki farklı çözeltiden eşit hacimlerde (25 ml) alınarak bir beher içinde karıştırılmıştır. Ön temizliği yapılan Ti plakalar hazırlanan çözelti içine 3 dk için daldırılmıştır ve sabit hızda geri çekilmiştir. Bu işlem iki defa tekrar edilmiştir ve kaplaması yapılan Ti plakalar $40^\circ C$ 'de etüvde kurutulmuştur. Kaplama akış şeması Şekil 1'de özetlenmiştir. Ayrıca incelemelerde kıyaslama amacıyla kitosan/Zn içermeyen kalsiyum fosfat (Ca-P) kaplı numuneler üretilmiştir.

Kaplaması yapılan numunelerin mikroyapıları SEM (Jeol JSM 6060LV) ve EDS (IXRF 5000EDX) analizi ile incelenmiştir. Kaplamaların fazları XRD (RIGAKU D/MAX 2200) analizi ile tespit edilmiştir. Özellikle kitosan içeriğinin tespiti için daha ayrıntılı inceleme için moleküler yapıdaki bağların tanımlanması adına kaplamalı yüzeylerin FTIR (Perkin Elmer) analizleri gerçekleştirildi.

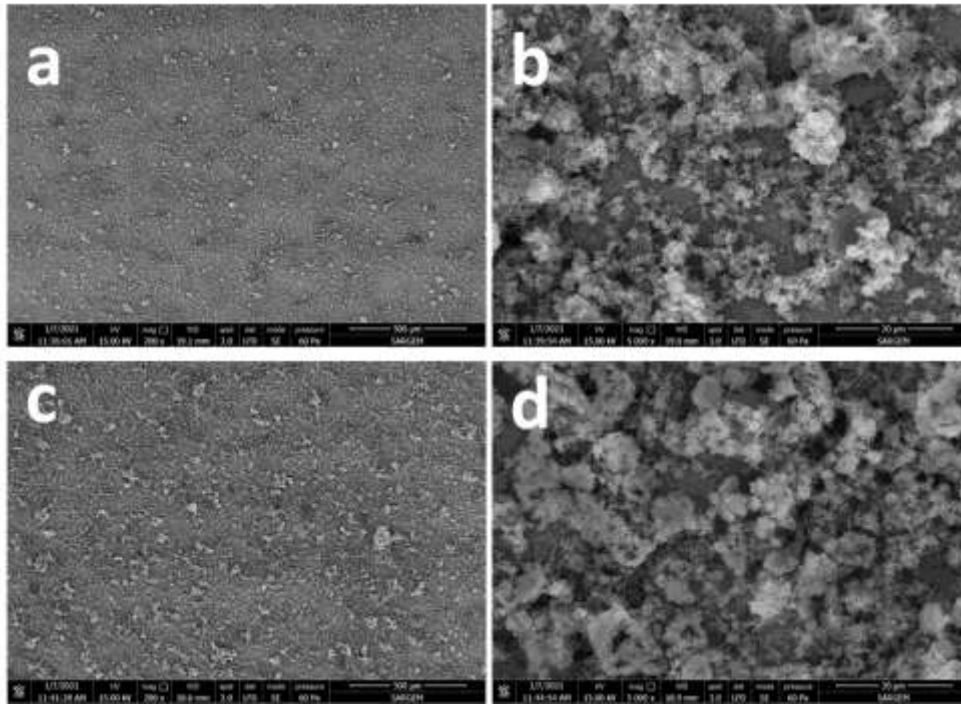


Şekil 1. Sol-jel yöntemi ile Ti yüzeyine Ca/P-kitosan/Zn kaplanması şeması

Antibakteriyel test için *Escherichia coli* (E.coli) bakterisi seçilmiştir. E.coli, gram negatif ortopedik implant enfeksiyonlarının en yaygın nedenlerindedir, implant enfeksiyonlarının yaklaşık %15'ini gram-negatif basil enfeksiyonları oluşturur. İlave olarak E.coli, organizmaların konak dokuları kolonize etmesine ve/veya istila etmesine, temel besinleri toplamasına, konakçı savunma mekanizmalarını bozmasına ve enflamatuvar yanıtı teşvik etmesine yardımcı olur[18]. Antimikrobiyal deneyler için, E. coli suşları (25µl) sterilize edilmiş petri kabı Baird-Parker agar içinde büyütülmüştür. Daha sonra test numuneleri petri kabının ortasına yerleştirilip, 37°C'de 24 saat süreyle kültür yapılmıştır. Ardından inhibisyon bölgesi oluşup oluşmadığına dair gözlem yapıp, fotoğrafları alınmıştır.

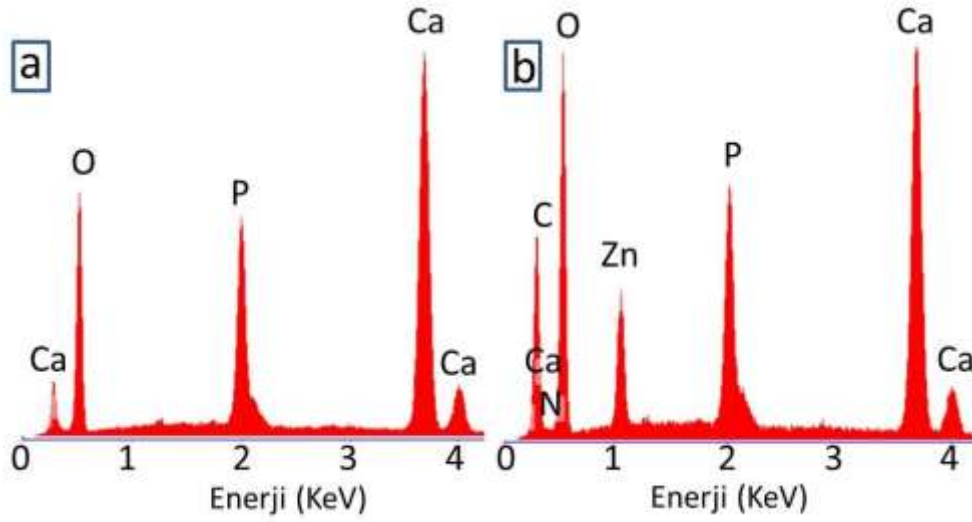
3. Araştırma Bulguları

Şekil 2'de Ti plaka yüzeyine kaplanan Ca/P ve Ca/P-kitosan/Zn mikroyapı resimleri verilmiştir. Her iki kaplamada da açık renkli küresel benzeri çökelti gözlenmiştir ve rastgele yüzeyde dağılmıştır. Çökeltilerin nano boyutlu şekilde çekirdeklendiği gözlenmiştir. Nano boyutlu çökelti, doğal apatitin morfolojisini taklit eder, bu nedenle nano boyutlu yüzeyler diğer tip topografyalara göre daha yüksek biyoaktiviteye sahiptirler ve implant materyali için en uygun yüzey olduğu daha önce raporlanmıştır[19]. Ca/P kaplaması ile Ca/P-kitosan/Zn kaplamasının yüzey morfolojileri genel olarak benzer görünmüştür. Düşük konsantrasyonda kitosanın Ca/P içerikli kaplamaya ilavesinin mikroyapıyı değiştirmedeği literatürde de tespit edilmiştir[15]. Ancak Ca/P-kitosan/Zn kaplaması (Şekil 2c) için küresel birikimlerin, Ca/P kaplamasına (Şekil 2a) kıyasla daha yoğun olduğu görülmektedir. Bunun nedeni olarak, kitosan moleküllerinin HA'nın çekirdek bölgesi olan büyük miktarda hidroksil (OH) grubu içermesidir. Ayrıca kitosandaki CH₂ fonksiyonel grupları, kaplama çözeltisindeki H₂O molekülleri ile hidrojen bağı oluşturabilir. Sol-jel prosesinde Ti plakayı daldırma süresine ve daldırma tekrarına göre kaplama miktarı değişebilir[20]. Biriken çökelti (Şekil 2b, Şekil 2d), literatürdeki hidroksiapatit kaplamalarına benzer karakteristik göstermiştir[13].

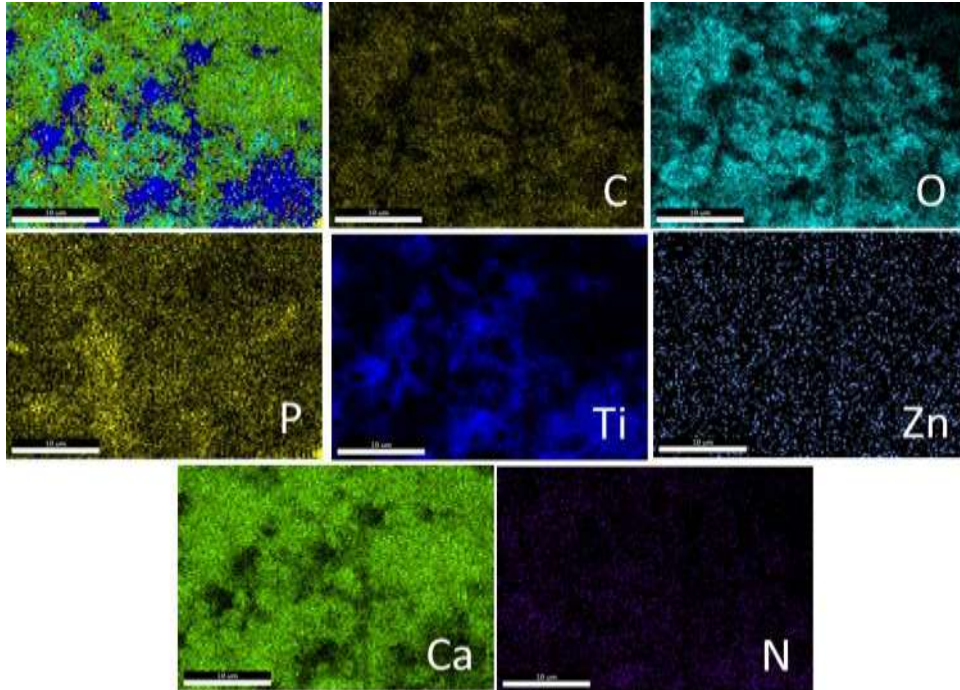


Şekil 2. Ca/P (a, b) ve Ca/P-kitosan/Zn kaplanan (c,d) yüzeylerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri

Her iki kaplama çeşidi için de Ti plaka yüzeyindeki birikimler sıyrılarak EDS analizleri alınmıştır (Şekil 3). Her iki kaplamada da ortak olarak Ca, P, O elementleri tespit edilmiştir. Ca/P-kitosan/Zn kaplaması için ayrıca kitosan varlığını kanıtlayan C, N elementleri ve çinko varlığını gösteren Zn elementi belirlenmiştir. Ayrıca, Ca/P-kitosan/Zn kaplamasından alınan EDS analizinde oksijen içeriği, kitosanın hidroksil grubu nedeniyle artmıştır. Sol-jel yöntemi gibi ıslak çökeltme ile nanomikron boyutlarında kalsiyum fosfatlar (Ca/P: 0.5-2.5) sentezlenebilir[21]. Her iki kaplama için de Ca/P oranı yaklaşık 1.90 tespit edilmiştir, nispeten HA'nın stokiyometrik oranına (1.67) yaklaşmıştır[22]. Başlangıç kimyasallarının konsantrasyonlarının değişimi, kaplama sonrası ek kimyasal ve ısıl işlemler ile Ca/P oranları düzenlenebilir.



Şekil 3. Ca/P (a) ve Ca/P-kitosan/Zn kaplanan (b) yüzeylerin EDS sonuçları



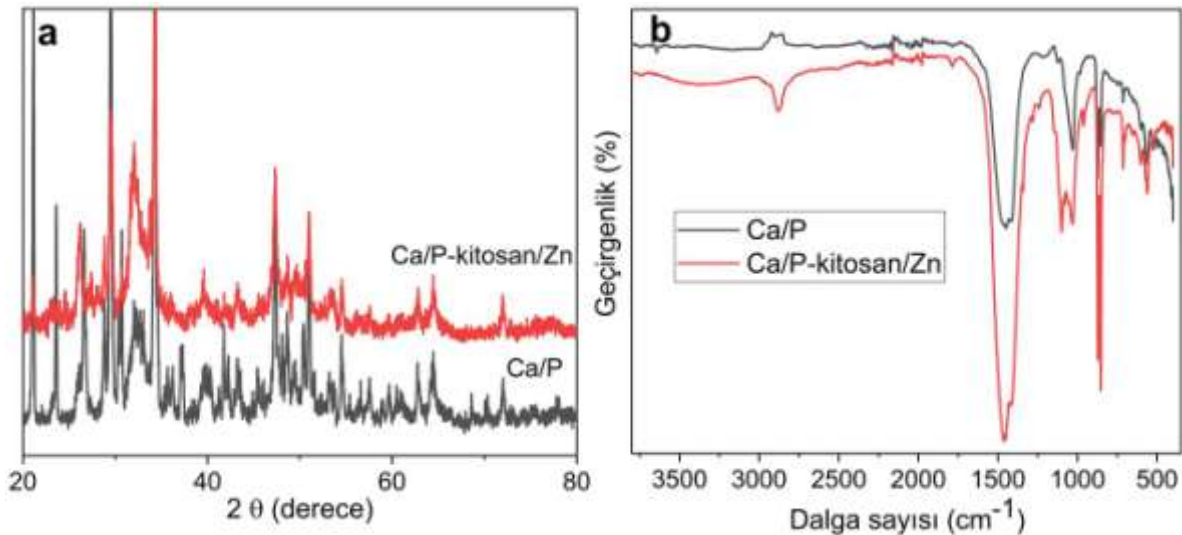
Şekil 4. Ca/P-kitosan/Zn kaplanan yüzeyin harita EDS sonuçları

Ca/P-kitosan/Zn kaplama yüzeyi harita EDS yöntemi ile daha ayrıntılı incelenmiştir (Şekil 4). Kalsiyum fosfat içeriği için Ca,P, O, kitosan içeriği için C,N, O ve çinko içeriği Zn varlığı farklı renklerde görülmektedir. Ayrıca altlık fazı olan Ti de yer almaktadır. Buna göre kaplamanın olduğu

bölgelerde Ca elementi yoğun olmak ile birlikte diğer elementlerin de homojen dağıldığı görülmüştür. Ek olarak Ca/P numunesi için kaplama yüzeyin yaklaşık %50'sini örtmüşken, Ca/P-kitosan/Zn numunesinde kaplama yüzeyin %73'ünü örtmüştür. Bu sonuç, Şekil 2'deki mikroyapı görüntülerini doğrulamaktadır.

Kaplama yüzeylerinin sıyrılması ile elde edilen kaplama tozlarının XRD ve FTIR analizleri alınarak oluşan fazlar hakkında bilgi edinilmiştir. XRD analizinde, iki kaplama çeşidi için de HA fazının (JCPDS numarası 09-0432) yanında CaO gibi çeşitli Ca ve O dan oluşan fazlar belirlenmiştir (Şekil 5a). HA varlığını gösteren pikler 2 θ : 31-32°'lerde karakteristik maksimum pikinin yanı sıra yaklaşık 2 θ : 23°, 26°, 34°, 42°, 44°, 53° ve 56°'lerde belirmiştir. Ca/P içeriği nispeten yüksek olduğu için CaO fazları (2 θ : 37°) oluşmuştur[13]. CaO fazının ek yaşlandırma işlemi veya kimyasal modifikasyonlar ile ortadan kaldırılabileceği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Ayrıca düşük konsantrasyon içeriklerinden ve/veya HA piklerinin çakışmasından dolayı kitosan ve çinkoya ait pikler gözlemlenememiştir. Ca/P-kitosan/Zn numunesi için elde edilen pik şiddetleri kitosan içeriği nedeniyle genel olarak azalmıştır. Literatürde de benzer sonuçlar elde edilmiştir[15].

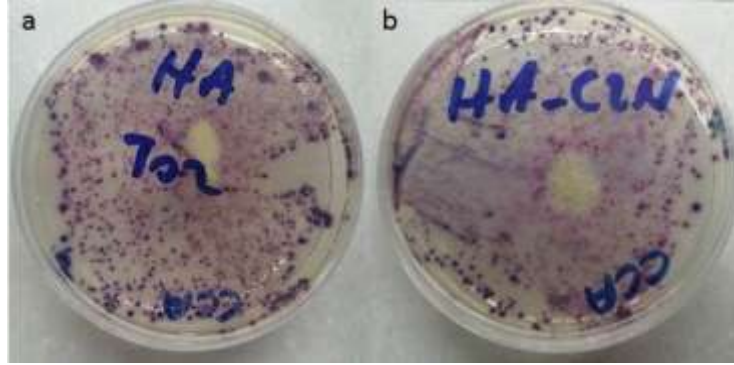
Özellikle kitosan varlığını kanıtlamak için kaplamaların fonksiyonel grup incelemeleri FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 5b). Kitosana ait piklerin dışında, her iki kaplama için de HA varlığını gösteren pikler vardır. Bunlar dalga sayısı sırasıyla yaklaşık 960-1098 cm^{-1} ve 561-605 cm^{-1} elde edilen adsorpsiyon bantları O-P-O iyonlarının asimetric germe modlarına ve simetric eğilme modlarına karşılık gelir. 1415 cm^{-1} 'deki pik ise karbonat varlığını gösterir. OH grubuna ait geniş pikler ise 3300-3600 cm^{-1} değerine karşılık gelmektedir. Kitosan varlığı nedeniyle Ca/P-kitosan/Zn kaplamasına ait OH piki daha belirgindir. Ayrıca Ca/P numunesine kıyasla, Ca/P-kitosan/Zn numunesinde kitosan varlığını doğrulayan pikler için; 1342-1344 cm^{-1} 'deki pikler CH_3 grubunu ve 2881 cm^{-1} C-H grubunu temsil eder[23,24]. Kitosanın amino grubu ve HA'nın fosfat grubu arasındaki olası etkileşimlerinden dolayı amin gruplarının neredeyse görülemediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca Ca/P-kitosan/Zn numunesinde HA'ya ait pik şiddetlerinin artması, kitosan içeriğinin Şekil 2'de görüldüğü gibi HA çekirdeklenmesini desteklediğini göstermektedir. Zn içeriğinin HA veya kitosan pikleri üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Ca/P ve Ca/P-kitosan/Zn kaplanan yüzeylerin XRD (a) ve FTIR (b) analizleri

Şekil 6'da antibakteriyel testlere ait fotoğraflar yer almaktadır. Petri kaplarının ortasında daire şeklindeki beyaz renkteki kısımlar kaplama yüzeylerinden sıyrılan tozlardır. Petri kabı yüzeyinde yayılan mor renkli belirtiler ise E.coli bakterisini göstermektedir. Ca/P kaplaması için kaplama tozunun etrafında herhangi bir inhibisyon zonu görünmemiştir, bakteriler yoğun bir şekilde tozun

etrafını sarmıştır (Şekil 6a). Ca/P-kitosan/Zn kaplaması için ise yaklaşık 2-3 mm ölçüsünde tozun etrafında inhibisyon zonu ölçülmüştür, antimikrobiyal özellik taşıdığı gözlenmiştir (Şekil 6b). Buradaki etken pozitif yüklü kitosan moleküllerinin, negatif yüklü mikrobiyal hücre zarlarıyla etkileşime girerek hücre duvarı geçirgenliğinde değişikliklere ve hücre içi bileşiklerin sızmasına neden olmaktadır. Bu bakterilerin yok edilmesinin ana nedenidir[13]. Ayrıca kitosan ve Zn metal iyonunun oluşturduğu şelat reaksiyonu, protein, fosfolipid ve yağ asidi gibi bakteri hücrelerinin dış yüzeyiyle etkileşime girerek sitoplazma zarının bozulmasına neden olur[14]. Bu olay metabolizma aktivitesini ve hücre büyümesini inhibe eder. Ek olarak görülen antibakteriyel etkide bakteri hücre duvarı yapısı da önemlidir.



Şekil 6. Ca/P (a) ve Ca/P-kitosan/Zn (b) tozları ile Baird-Parker üzerinde E. Coli'nin fotoğrafları

5. Sonuç ve Öneriler

Sol-jel yöntemi ile Ti yüzeyine Ca/P ve Ca/P-kitosan/Zn kaplamaları başarıyla uygulanmıştır. Kaplamalara ait yüzeylerin SEM, XRD ve FTIR analizlerine göre biriken küresel partiküllerin esas olarak HA'dan oluştuğu tespit edilmiştir. HA oluşumu, Ti'nin biyoaktif özellik kazanması ve implantasyon sonrası etrafındaki kemik doku ile sıkı bir şekilde bağlanması için önemlidir. Ayrıca yüzeyde biriken partiküller nano yapıya olduğu için implant uygulamalarında tercih edilen bir topografya sağlanmıştır. Kompozit kaplamada kitosan içeriği EDS ve FTIR analizi ile doğrulanmıştır. Kaplamada Ca/P içeriğine kitosan ve Zn ilavesi ile yüzeyin kaplanma oranı artmıştır, HA birikimi hızlanmıştır. Ayrıca Ca/P kaplamasının aksine, Ca/P-kitosan/Zn kaplaması, E.coli bakterisine karşı antibakteriyel özellik sağlamıştır. Bu nedenle oluşturulan bu kompozit kaplama hem ortopedik hem de dental implantlar için biyoaktif ve antimikrobiyal özellik taşıması nedeniyle önerilebilir. İleriki yapılacak çalışmalarda geliştirilen bu Ca/P-kitosan/Zn kaplaması için yüzeyi tamamen örtecek şekilde kaplama parametrelerinin optimize edilmesinin ardından hücre testlerinin yapılması tavsiye edilmektedir.

Teşekkür

Antibakteriyel testler için imkân oluşturan ve destek sağlayan Biyolog Mustafa Çelik'e teşekkür ederim.

Yazar(lar)ın Katkıları

EY çalışmaları yapmış ve makalenin yazımını gerçekleştirmişlerdir. Yazar makalenin son halini okudu ve onayladı.

Çıkar Çatışması

Yazar(lar), çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

- [1]. Ayday A., "Oxidation kinetics of Ti6Al4V alloy and pure titanium (Cp-Ti)", *El-Cezeri Journal of Science Engineering*, 2020, (7): 402–409.
- [2]. Yılmaz E., Gökçe A., Findik F., Gulsoy H.O., İyibilgin O., "Mechanical properties and electrochemical behavior of porous Ti-Nb biomaterials", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2018, (87): 59–67.
- [3]. Yılmaz E., Gökçe A., Findik F., Gülsoy H.Ö., "Characterization of biomedical Ti-16Nb-(0–4)Sn alloys produced by Powder Injection Molding", *Vacuum*, 2017, (142): 164–174.
- [4]. Yılmaz E., Çakıroğlu B., Gökçe A., Findik F., Gulsoy H.O., Gulsoy N., Mutlu Ö., Özacar M., "Novel hydroxyapatite/graphene oxide/collagen bioactive composite coating on Ti16Nb alloys by electrodeposition", *Materials Science and Engineering: C*, 2019, (101): 292–305.
- [5]. Arcos D., Vallet-Regí M., "Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants", *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, (8): 1781–1800.
- [6]. Gomes D.S., Santos A.M.C., Neves G.A., Menezes R.R., Grande C., Grande C., "A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine (Uma breve revisão sobre a obtenção de hidroxiapatita e aplicação na biomedicina)", *Cerâmica*, 2019, (65): 282–302.
- [7]. Yılmaz E., Kabataş F., Gökçe A., Findik F., "Production and Characterization of a Bone-Like Porous Ti/Ti-Hydroxyapatite Functionally Graded Material", *Journal of Materials Engineering and Performance*, 2020, (29): 6455–6467.
- [8]. Kattimani V.S., Kondaka S., Lingamaneni K.P., "Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration", *Bone Tissue Regeneration Insights*, 2016, (7): 9-19.
- [9]. Lamkhao S., Phaya M., Jansakun C., Chandet N., Thongkorn K., Rujijanagul G., Bangrak P., Randorn C., "Synthesis of Hydroxyapatite with Antibacterial Properties Using a Microwave-Assisted Combustion Method", *Scientific Reports*, 2019, (9): 1–9.
- [10]. Tian B., Chen W., Dong Y., Marymont J. V., Lei Y., Ke Q., Guo Y., Zhu Z., "Silver nanoparticle-loaded hydroxyapatite coating: Structure, antibacterial properties, and capacity for osteogenic induction in vitro", *RSC Advances*, 2016, (6): 8549–8562.
- [11]. Townsend L., Williams R.L., Anuforum O., Berwick M.R., Halstead F., Hughes E., Stamboulis A., Oppenheim B., Gough J., Grover L., Scott R.A.H., Webber M., Peacock A.F.A., Belli A., Logan A., De Cogan F., "Antimicrobial peptide coatings for hydroxyapatite: Electrostatic and covalent attachment of antimicrobial peptides to surfaces", *Journal of the Royal Society Interface*, 2017, (14): 1-12.
- [12]. D'Almeida M., Attik N., Amalric J., Brunon C., Renaud F., Abouelleil H., Toury B., Grosogeat B., "Chitosan coating as an antibacterial surface for biomedical applications", *PLoS One*, 2017, (12): 1–11.
- [13]. Chozhanathmisra M., Pandian K., Govindaraj D., Karthikeyan P., Mitu L., Rajavel R., "Halloysite nanotube-reinforced ion-incorporated hydroxyapatite-chitosan composite coating on Ti-6Al-4 v alloy for implant application", *Journal of Chemistry*, 2019, (2019): 1-12.
- [14]. Yuwono A.H., Ramahdita G., Mu' Lanuddin M.A., Adyandra A., Gustiraharjo G., "The study of zinc oxide addition into hydroxyapatite/chitosan scaffold for bone tissue engineering application", *AIP Conference Proceedings*, 2019, (2193): 1-7.
- [15]. Li B., Xia X., Guo M., Jiang Y., Li Y., Zhang Z., Liu S., Li H., Liang C., Wang H., "Biological and antibacterial properties of the micro-nanostructured hydroxyapatite/chitosan coating on titanium", *Scientific Reports*, 2019, (9): 1–10.
- [16]. El-Wassefy N.A., Reicha F.M., Aref N.S., "Electro-chemical deposition of nano hydroxyapatite-zinc coating on titanium metal substrate", *International Journal of Implant Dentsity*, 2017, (3): 1–8.
- [17]. Türk S., Altınsoy İ., Çelebi Efe G., Ipek M., Özacar M., Bindal C., "Effect of Solution and Calcination Time on Sol-gel Synthesis of Hydroxyapatite", *Journal of Bionic Engineering*, 2019, (16): 311–318.

- [18]. Crémet L., Corvec S., Bémer P., Bret L., Lebrun C., Lesimple B., Miegerville A.F., Reynaud A., Lepelletier D., Caroff N., "Orthopaedic-implant infections by *Escherichia coli*: Molecular and phenotypic analysis of the causative strains", *Journal of Infection*, 2012, (64): 169–175.
- [19]. Zhukova Y., Hiepen C., Knaus P., Osterland M., Prohaska S., Dunlop J.W.C., Fratzl P., Skorb E. V., "The Role of Titanium Surface Nanostructuring on Preosteoblast Morphology, Adhesion, and Migration", *Advanced Healthcare Materials*, 2017, (6): 1–13.
- [20]. Tang X., Yan X., "Dip-coating for fibrous materials: mechanism, methods and applications", *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2017, (81): 378–404.
- [21]. Liu H., Yazici H., Ergun C., Webster T.J., Bermek H., "An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration", *Acta Biomaterialia*, 2008, (4): 1472–1479.
- [22]. Ramesh S., Tan C.Y., Hamdi M., Sopyan I., Teng W.D., "The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics", *International Conference on Smart Materials and Nanotechnology Engineering*, 2007, (6423) 64233A: 1-6.
- [23]. AbdElhady M.M., "Preparation and Characterization of Chitosan/Zinc Oxide Nanoparticles for Imparting Antimicrobial and UV Protection to Cotton Fabric", *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, (2012): 1–6.
- [24]. Sukhodub L.F., Sukhodub L.B., Chorna I. V., "Chitosan-apatite composites: Synthesis and properties", *Biopolymers Cell*, 2016, (32): 83–97.