



## CELL CULTURE TEST AND BACTERIAL GROWTH EVALUATION OF NiTiNbX (X=Ta and V) BIOCOMPATIBLE SHAPE MEMORY ALLOYS IN SIMULATED BODY FLUID

Esra Balci<sup>\*1</sup>, Cennet Canan Karaderi<sup>2</sup>, Hüseyin Kahraman<sup>2</sup>, Fethi Dagdelen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, - Elazığ/Türkiye

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya, /Türkiye

### Abstract

Original scientific paper

In this study, a quaternary biocompatible shape memory alloy (BSMA) was produced by adding different ratios of Ta and V elements to the equiatomic NiTi and Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>23</sub> ternary alloy. Prepared alloys; They were coded as Ni<sub>50</sub>Ti<sub>50</sub> (EB1), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>23</sub> (EB2), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>22</sub>Ta<sub>1</sub> (E1), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>20</sub>Ta<sub>3</sub> (E3), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>18</sub>Ta<sub>5</sub> (E5), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>22</sub>V<sub>1</sub> (B1), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>21</sub>V<sub>2</sub> (B2) ve Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>18</sub>V<sub>5</sub> (B5). The BSMA samples prepared to be used for this experiment were cut in regular and equal sizes and subjected to sterilization processes. Simulated body fluid (SBF), in which the prepared alloys were in contact, was prepared in the laboratory and used in in-vitro studies. In this study, a closed incubator system was preferred and a pathogenic bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), was used. For the production of bacteria, Nutrient agar solid was prepared. Bacterial cell density grown in the artificial body fluid with the control (simulated body fluid); determined for each alloy using a spectrophotometer (OD<sub>600</sub>). In the other stage; bacteria were cultivated from liquid culture (SBF containing *Pseudomonas aeruginosa*) to petri dishes containing solid media by smear method for each alloy. At the end of this period, bacterial colonies were observed with an ultraviolet (UV) lamp. The degree of biocompatibility was evaluated according to the results of the cell culture test performed for examination. It was observed that the cell density values of NiTiNbTa BSMA's added with Ta element were lower than the control (SBF). In addition, much lower values were determined in the alloys prepared with the increase of vanadium element contribution in NiTiNbV BSMA. According to the bacterial growth tests obtained, it can be said that the Ta element increases the biocompatibility in NiTi alloys, since fewer bacterial colonies are seen in the Ta element added environments than the others.

**Keywords:** Biocompatible shape memory alloy, *pseudomonas aeruginosa*, In-Vitro, NiTiNbTa, NiTiNbV.

## NiTiNbX (X=Ta ve V) BİYUYUMLU ŞEKİL HATIRLAMALI ALAŞIMLARIN YAPAY VÜCUT SIVISI İÇERİSİNDE HÜCRE KÜLTÜR TESTİ VE BAKTERİ ÜREME DEĞERLENDİRİLMESİ

### Özet

Orijinal bilimsel makale

Bu çalışmada eş atomlu NiTi ve Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>23</sub> üçlü alaşıma farklı oranlarda Ta ve V elementi katkılanarak dörtlü biyoyumlu şekil hatırlamalı alaşım (BŞHA) üretildi. Hazırlanan alaşımlar; Ni<sub>50</sub>Ti<sub>50</sub> (EB1), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>23</sub> (EB2), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>22</sub>Ta<sub>1</sub> (E1), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>20</sub>Ta<sub>3</sub> (E3), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>18</sub>Ta<sub>5</sub> (E5), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>22</sub>V<sub>1</sub> (B1), Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>21</sub>V<sub>2</sub> (B2) ve Ni<sub>27</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>18</sub>V<sub>5</sub> (B5) şeklinde kodlandı. Daha sonra BŞHA'lar düzenli ve eş boyutta olmak üzere kesildi ve sterilizasyon işlemlerinden geçirildi. Hazırlanan alaşımların temas halinde bulunmuş olduğu yapay vücut sıvısı (SBF) laboratuvar ortamında hazırlandı ve in-vitro çalışmalarda kullanıldı. Bu çalışmada kapalı inkübatör sistemi tercih edilmiştir ve patojen bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) suşu kullanılmıştır. Bakteri üretimi için, Nutrient agar besiyeri hazırlandı. Kontrol (yapay vücut sıvısı) ile numunelerin temas ettiği yapay vücut sıvısı içerisinde üreyen bakteri hücre yoğunluğu; her bir alaşım için spektrofotometre (OD<sub>600</sub>) kullanılarak belirlendi. Diğer aşamada ise; katı besi yeri içeren petri kaplarına, sıvı kültüründen (*Pseudomonas aeruginosa* içeren SBF) her bir alaşım için yayma yöntemi ile bakteri ekimi gerçekleştirildi. Bu süre sonunda, ultraviyole (UV) lambası ile üreyen bakteri kolonileri gözlemlendi. Biyoyumluluk derecesi incelenmesi için yapılan hücre kültür testi sonuçlarına göre değerlendirildi. Ta elementi ile katkılanmış NiTiNbTa BŞHA'ların hücre yoğunluk değerleri kontrol (SBF)' ye göre daha düşük değerlerde olduğu gözlemlendi. Ayrıca, NiTiNbV BŞHA'da vanadyum elementi katkısının artması ile hazırlanan alaşımlarda çok daha düşük değerler tespit edilmiştir. Elde edilen bakteriler üreme testlerine göre, Ta elementi katkılı ortamlarda diğerlerine göre daha az bakteri kolonisi görüldüğü için NiTi alaşımlarda, Ta elementinin biyoyumluluğu arttırdığı söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoyumlu şekil hatırlamalı alaşım, *pseudomonas aeruginosa*, In-Vitro, NiTiNbTa, NiTiNbV.

\* Corresponding author

E-mail address: eesra0122@gmail.com (E. Balci)

Received 14 January 2022; Received in revised form 10 February 2022; Accepted 22 April 2022

2587-1943 | © 2022 IJIEA. All rights reserved.

Doi: <https://doi.org/10.46460/ijiea.1057497>

## 1 Giriş

Akıllı malzemeler dışarıdan uygulanan fiziksel parametreler örneğin; sıcaklık, nem, basınç, elektriksel ve manyetik alan gibi çevresel etkiler karşısında istenilen tepkilerin alınabildiği malzemelerdir. Bu malzemeler, dışarıdan uygulanan etkiler karşısında istenilen tepkileri anlık ve aralıksız bir şekilde yerine getirebilen özelliktedir. En yaygın olarak kullanılan akıllı malzeme türleri şekil hatırlamalı alaşımlardır (SHA)[1]. SHA sistemlerinde diğer alaşım grupları içerisinde NiTi bazlı şekil hatırlamalı alaşımların; dönüşüm fonksiyonları, korozyona olan dayanımları, sertlikleri, yüksek biyouyumluluk ve süper elastiklik gibi üstün özelliklerinden dolayı günümüzde en yaygın kullanım alanlarına sahiptir [2-9].

NiTi alaşımları ikili veya çoklu alaşım sistemi olarak kullanılabilir. Alaşıma katılan elementler sayesinde alaşımın fiziksel özelliklerinde (termodinamik parametreleri, faz dönüşüm sıcaklıkları, yapısal ve mekanik özellikleri) ve biyouyumluluklarında iyileştirmeler hedeflenir. Fe, Cu, Nb elementlerine ek olarak Ta ve V elementleri ilave edilmiş olan alaşımların dönüşüm histeresizlikleri, mekanik ve biyouyumlulukları değiştirilebilir [10-13]. Bu elementler arasında Nb, Ta ve V elementlerinin biyolojik olarak yan etkileri olmadığı bilinmektedir [14]. Biyomalzeme olarak kullanılabilen alaşımlarda, ana metallere katılan üçüncü veya dördüncü minör elementler ise çeşitlilik açısından daha zengin olabilir. Buradaki parametreler sağlığa risk oluşturan elementler göz önüne alınarak hazırlanmalıdır. Yıllardır biyoygulama alanlarında kullanımı mevcut olan V elementi ise; NiTi bazlı şekil hatırlamalı alaşımların mekanik özelliklerini iyileştirmek için kullanılan elementler içerisinde var olmaktadır [15-19].

Biyouyumluluğun değerlendirilmesinde, materyallerin kullanılan canlı doku üzerine zarar vermesi ya da toksik etkilerinin dereceleri son derece önemli bir unsurdur. Kullanılan biyomalzemeler ve uygulandığı alan birbirleri ile uyum içerisinde olmalıdır. Biyomalzeme ile vücut sıvısı, ağız içi salya, kan sıvısı, yiyecek ve içeceklerden canlıya geçen protein ve diğer saldırganlar ile etkileşimin kimyasal ve fizyolojik sonuçları hala tartışma konusudur. Biyouyumluluk, yüzey ve yapısal uyumluluk olarak iki sınıfa ayrılabilir [20]. Yüzey uyumluluk durumunda; kullanılan materyallerin vücut dokularında fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak uyumlu olması durumu söz konusu iken, yapısal uyumlulukta kullanılan materyallerin vücut dokularının mekanik davranışlara karşı sağlamış olduğu en mükemmel uyumdur. Yeni üretilen biyomalzemeler uygulama alanlarına çıkmadan önce, canlıda istenmeyen etkilere sebep olmamaları amacıyla çeşitli biyolojik testlere tabi tutulurlar. Öncelikli olarak vücut dışında (in-vitro) sonra ise vücut içerisinde (in-vivo) testleri uygulanır. Bir materyalin biyouyumlu olup olmadığını kontrol etmek için korozyon testinden mutlaka geçirelmedir [21]. Biyouyumlulukta durağan bir akış gözlenmez; konakçı, materyal ve materyallerin oluşum fonksiyonları sürekli olarak birbirleri ile etkileşim halindedir. Bu faktörlerden herhangi birinde değişiklik meydana gelirse biyouyum bozulur [22, 23]. Kullanılan materyallerin, biyouyumluluk testleri bu süreci belirlemede önemli olarak yer alır. Bu testlerden in-vitro çalışmalar içerisinde yer alan hücre kültür testleri etkin yöntemler

arasında yer alır. Test edilecek olan malzemelerin karakteristikleri ve temas ettiği canlı dokulara temas yöntemi önemlidir.

Hücre kültür testlerinde temel olan, canlı dokulara ait olarak alınan parçaların in-vitro çalışma koşullarında yaşamaları ve üremelerini sağlamaktır. Bu kültürler; çeşitli laboratuvar cihazlarında (otoklav, inkübatör, etüv) uygun besi ortamları (Nutrient Broth, Nutrient agar, SBF) içerisinde yaşamı devam ettirilerek kullanılan canlı doku ya da doku gruplarını kapsamaktadır. Hazırlanmış olan besi ortamlarında hücrelerin yaşaması, beslenmesi ve çoğalması için bazı şartların sağlanması gerekmektedir. Bu deney aşamasında hazırlanmış olan besi ortamları ve bakteri örnekleri günlük ya da haftalık kontrol edilmesi gereklidir. Hazır olan besi ortamlarında mikroorganizmaların gelişip çoğalabilmesi için ideal bir ortam (uygun sıcaklık, sterilizasyon, pH, ışık faktörü vb.) oluşturulmalıdır. Bu nedenlerden dolayı kültür ortamında kontaminasyona (yani; canlıya ait doku kültürlerinin mikro plazmalar, bakteriler, mantarlar ya da virüs türleri gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından enfekte edilmesi olayı) sebep olabilecek sterilizasyonlar yapılmalıdır. Kontaminasyon olayı makroskopik veya mikroskopik olarak kültür ortamında gözlemlenebilir. Hazırlanan besi yerlerinde kullanılan tüm gereçler mutlaka her kullanımdan önce sterilizasyon amaçlı alevden geçirilmelidir. Öncelikle, testi yapılacak materyalin fiziksel özellikleri ve bakterilerle temas yöntemi önemlidir. Kültürde bulunan bakteriler, temas edilen yüzeye bağımlı olarak farklılık gösterir. Son çalışmalarda ağırlıklı olarak patojen bir bakteri türü olan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) suşu kullanılmaya başlanmıştır [24]. *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alan bu bakteri türü farklı özelliklere sahiptir. Ortamda çoğalabilmeleri için gerekli olan gelişme faktörlerini kendileri sentezleyebilmektedir [25]. Fırsatçı bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa*, hücre dışı polimerik maddelerle biyofilm oluşturma kabiliyeti nedeniyle bazen içme suyu boru hattı sistemlerinde tespit edilir [26]. Bu bakteri türü bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda ciddi enfeksiyonlara sebep olan Gram(-) yani patojen bir bakteri türüdür. Uzunlukları çok değişik (1.5-3µm) olmasının yanı sıra ikili bazen de kısa zincirler halinde görülmektedir [27]. Bu bakterilerin kültürel özellikleri uygun besi ortamlarında optimum 30-37°C’ de ve düşük alkali ortamlardır. Bu özelliklerinden dolayı daha yaygın çalışma alanlarında tercih edilirler. Ayrıca bu bakteri türünün kolay tespit edilebilmeleri UV lambaları altındaki analizleri ile kolay hale gelmektedir [26]. *Pseudomonas aeruginosa* türünün kendine has ayırt edici özelliklerinden birisi Piyosyanin üretmesidir [28]. *P. aeruginosa* suşları ise temelde iki çeşit pigment üretirler: Piyosyanin (mavi) ve piyoverdin (veya fluorescein-sarı-yeşil). Bu pigment alkali pH’ da mavi veya yeşilimsi renk oluşturduğu için “*aeruginosa*” adı verilmiştir [29]. Ayrıca epitelin fonksiyonlarını bozar ve toksik serbest radikallerin salgılanmasına neden olarak, daha önceden meydana gelmiş olan doku hasarını artırır [30].

Bu çalışmada; akıllı malzemeler arasında günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan eş atomlu NiTi şekil hatırlamalı alaşımlara Nb elementi katılarak hazırlanan üçlü Ni27Ti50Nb23 şekil hatırlamalı alaşımı ve farklı oranlarda Ta ile V elementlerinin ilave edilerek yeni formu

oluşturulmuş dördü NiTiNbTa ile NiTiNbV BŞHA'ların biyoyoumluluk değerlendirilmesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2 Materyal ve Metot

### 2.1 Alaşımların Hazırlanması

Bu çalışmada araştırılan her bir alaşım % 99,9 saflıkta Merk marka - 325 mesh metal tozlarından karıştırılarak ark-ergitme yöntemiyle üretildi. Toz halde istenilen oranlarda hazırlanan alaşımların metal tozları hidrolik baskı yardımıyla beş ton basınç uygulanarak her biri 13 mm çapında peletler haline getirildi. Pelet haline getirilen metal tozları, ark ergitme fırınında da birkaç kez eritilerek şekil hatırlamalı alaşımlar oluşturuldu[8, 31, 32]. Böylece 10 gramlık ŞMA'lar elde edildi. Elde edilmiş alaşımlar Tablo 1'de ki adlandırma ve atomik yüzdelere sahip olmak üzere oluşturulan kodlar ile verildi.

**Tablo 1:** Hazırlanan alaşımların kodları ve kompozisyonları.

Alaşımlar	Alaşımların kompozisyonu (% at.)				
	Ti	Ni	Nb	Ta	V
EB1	50	50	-	-	-
EB2	50	27	23	-	-
E1	50	27	22	1	-
E3	50	27	20	3	-
E5	50	27	18	5	-
B1	50	27	22	-	1
B2	50	27	21	-	2
B5	50	27	18	-	5

Bu deney için kullanılmak üzere hazırlanmış olan BŞHA numuneleri her biri düzenli ve eş boyutta olmak üzere 2x1x1 mm<sup>3</sup> oranlarında kesilerek sterilizasyon işlemlerinden geçirildi ve deneyde kullanılabilir hale getirildi. Uygun boyutlarda kesilerek hazırlanmış alaşım numuneleri ve hazırlanan SBF (20 ml) erlen içerisine koyuldu.

### 2.2 SBF Hazırlanması

Bu deneyde hazırlanan alaşımların temas halinde bulunmuş olduğu yapay vücut sıvısı hazırlamak için; 1000 ml'lik bir behere 700 ml distile (mineral katkı içermeyen saf su) su döküldü. Daha sonra bu su manyetik bir karıştırıcı ile karıştırıldı ve 309,5±1,5 K'ye (36,5±1,5 °C) kadar ısıtıldı. 1000 ml SBF hazırlamak için kullanılan reaktiflerin sırası, miktarı ve formülleri Tablo 2'de verildi.

**Tablo 2:** 1000 mL SBF hazırlamak için kullanılan reaktiflerin sırası, miktarı ve formül ağırlığı.

Sıralama	Reaktif	Miktar	Formül ağırlığı
1	NaCl	8.035 gr	58.44
2	NaHCO <sub>3</sub>	0.355 gr	84.01
3	KCl	0.225 gr	74.55
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.176 gr	174.18
5	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.311 gr	203.30
6	HCl	39 mL	-
7	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.382 gr	147.01
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.072 gr	142.04
9	Tris	6.118 gr	121.14
10	1,0 M HCl	0.5 mL	-

1'den 8'e kadar olan reaktifler belirlenen sıcaklıkta (36,5±1,5 °C) damıtılmış suya eklendi. Kullanılan her malzemenin birbiri içinde çözünmesi gerçekleştirildi.

Çözeltinin pH değeri 2,0±1,0 olarak tespit edildi. Sonuç olarak, sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 309,5±0,5 K ve 7.30±0.05'te sabit kaldığında hazırlanan çözeltiliye Tris ilave edildi. Çözeltiliye hidroklorik asit (HCl) damlaları eklenerek pH değeri vücut dengelerine uyumlu olarak 7.30±0.05'te sabitlendi. Yapay olarak laboratuvar ortamında hazırlanmış olan bu solüsyon saklama koşulları gereği buzdolabında tutularak, *in-vitro* çalışmalarda kullanıldı.

### 2.3 Katı Besi Ortamının Hazırlanması

Toplam hacim 200 ml olacak şekilde Nutrient agar besiyeri hazırlandı ve otoklava (121°C ve 1.5 saat bekleme süresi) koyuldu. Petrilere steril olmaları amacıyla pastör fırınına (180 °C ve 60 dk bekleme süresi) koyuldu. Sterilizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, hazırlanan her bir besi yeri alevin yanında sıcak bir şekilde petrilere aktarıldı. Tekrar üzerleri alevden (sterilizasyona amacı) geçirilerek katılaşımları tamamlandıktan sonra 4 °C buzdolabında saklandı.

*In-vitro* kültür testlerinde, bu mikroorganizmaların yaşatılması için açık ya da kapalı sistem inkübatörleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada kapalı inkübatör sistemi tercih edilmiştir ve patojen bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) suşu kullanılmıştır. Öncelikle; katıdan sıvı yöntemi kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)'nın ekimi yapıldı. Üreyen bakteri ekimlerinden 100µl alınarak yapay vücut sıvısı içerisine koyularak 24 saat, 37 °C'de gece boyu (O/N) üretilmiştir. Kontrol (sadece yapay vücut sıvısı) ile yapay vücut sıvısı içerisinde üreyen bakteri hücre yoğunluğu; her bir alaşım için SHIMADZU markalı spektrofotometre (OD<sub>600</sub>) kullanılarak belirlendi. Diğer aşamada ise; katı besi yeri içeren (Nutrient Broth agar) petri kaplarına, sıvı kültüründen (*Pseudomonas aeruginosa* içeren SBF) her bir alaşım için yayma yöntemi ile bakteri ekimi gerçekleştirildi ve etüvde (37 °C ve statik ortam) 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda, CAMAG marka ultraviyole (UV) lambası ile üreyen bakteri kolonileri gözlemlendi.

## 3 Bulgular ve Tartışma

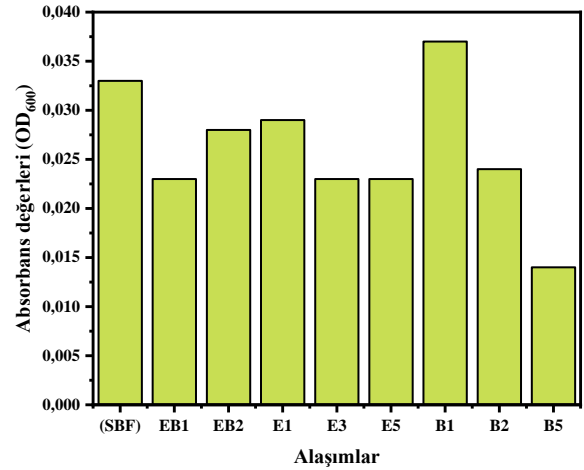
Biyometalik malzemeler temel olarak tıbbi alanda kullanılmalarına karşın biyoteknoloji alanında da kullanılmaktadırlar. Bu implantlar, medikal uygulamalarda önemli alana sahiptir. Bu yüzden bir takım testlerden geçirilmiş; dayanıklılıkları ve biyoyoumluluk özelliklerinin insan vücuduna ne kadar oranda yakın olduğu araştırma konusu olmuştur. Hücre kültür testi içerisinde yer alan yöntemlerden hücre yoğunluk ve bakteri üreme testleri değerlendirilecektir.

Yapılan hücre kültür testinin ilk aşamasında Şekil 1'de verilen SBF'de üreyen *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)'nın OD<sub>600</sub>'de hücre yoğunlukları incelenirse, en yüksek değer B1 alaşımına ait olduğu tespit edildi. Vanadyum elementi ile katılan alaşımın teması olduğu SBF'de daha fazla bakteri ürediği sonucuna varılabilir. E.Balci ve diğerlerinin yapmış oldukları bir çalışmada, NiTiNbX(X=V,Ta) ŞHA'ların biyoyoumluluk derecesi incelenmesi için korozyon testi sonuçlarında Ta elementi ile katılan alaşımların biyoyoumluluklarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir [8]. Öte yandan içerisinde Ta

elementi ile katkılanmış diğer numunelerin hücre yoğunluk değerleri kontrol (SBF) 'ye göre daha düşük değerlerde olduğu gözlemlenirken, vanadyum elementinin artması ile hazırlanan alaşımlarda çok daha düşük değerler tespit edilmiştir. OD<sub>600</sub>'de okunan hücre yoğunlukları Tablo 3'de verildi.

Bakteri hücre sayımı analizi; üzerinde çok sayıda bakteri üremiş olduğu için bakteri sayımı yapılamadı. Her bir kapalı inkübatör sisteminde UV lambası altında üreyen bakteriler gözlemlendi. Gözlemi yapılan besi ortamlarının UV lambası altındaki meydana gelen bakteri kolonileri Şekil 2'de verildi. Eş atomlu NiTi ve Nb elementi katkılı Ni<sub>23</sub>Ti<sub>50</sub>Nb<sub>27</sub> alaşımının diğer alaşımlara göre daha yoğun bakteri kolonisine sahip olduğu gözlemlenirken, NiTiNbTa alaşımlarda hazırlanan kapalı inkübatörlerde gözlemlenen bakteri kolonilerinin daha az olduğu fark edildi. S. M. Vater ve ark. *P. aeruginosa*'nın yüzme hareketi ile ilgili yapmış olduğu yarı katı agarlı besiyerleri içerisinde hazırlanmış olan bir çalışmada *P. aeruginosa* türlerinin yüzme hareketi yapabildiğini ve bu bakterinin çoğaldığını göstermişlerdir [33]. Gözlemlenen bakteri kolonileri, OD<sub>600</sub>'de okunan hücre yoğunluk değerleri grafiği ile uyum içerisindedir. Sonuç olarak Ta elementi katkılı alaşımlarda diğerlerine göre daha az bakteri kolonisi görüldüğünden dolayı biyoyumlu implant uygulamalarında NiTiNbTa BŞHA'ların kullanılabilirliğini artırmıştır. Çalışmada kullanılan bakteri ortamında savunma mekanizması olarak bir metabolit olan *Pyocyanin* üretimini gerçekleştirmiştir. Bu pigment mavimsiyişil renkte kendini göstermektedir. Bakteriler stres ortamına girdiği için *Pyocyanin* pigmenti üretmiştir. Bu renkler Şekil 2'de açıkça görülmektedir. Alaşımli ortamlarda bu pigmentin varlığı dikkat çekmektedir. H. Kahraman ve C.C. Karaderi'nin farklı organik atıkların (peynir altı suyu, atık kızartma yağı, melas, türk kahvesi telvesi ve çay suyu atığı) besi ortamı olarak kullanıldığı çalışmada *P. aeruginosa*'nın maliyeti düşük, toksik olmayan ortamlarda *Pyocyanin* pigment üretimini gerçekleştirdiği gösterilmiştir [34]. V elementi toksik bir element iken, Ta elementinin toksik olmadığı bilinmektedir. H. Kahraman ve C.C. Karaderi'nin yaptığı çalışmaya kıyasla; NiTiNbTa alaşımlarla temas halinde kapalı inkübatör sisteminde tutulmuş olan *P. aeruginosa*'nın savunma mekanizması için üretmiş olduğu

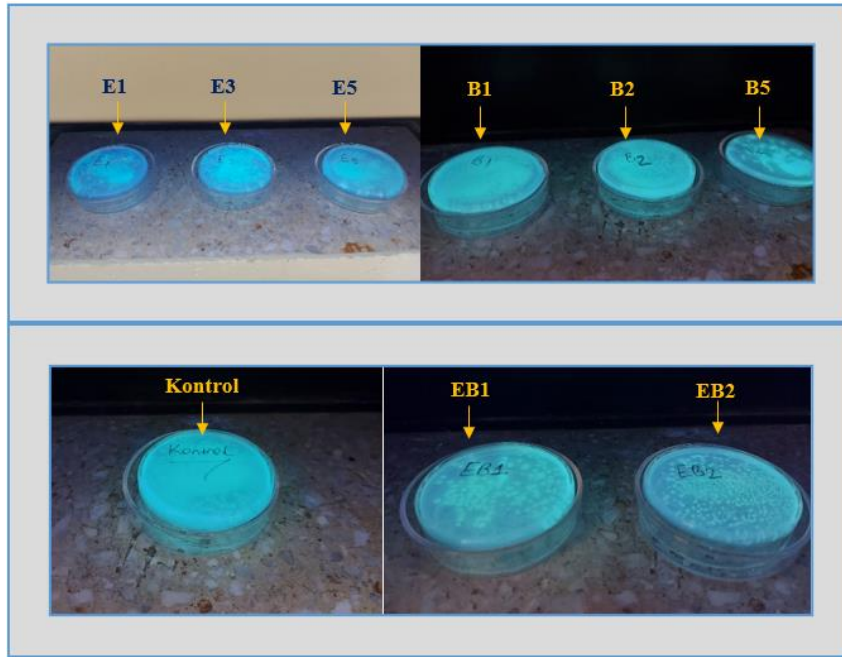
*Pyocyanin* pigmenti daha fazla olduğu ve biyoyumluluk derecesinin daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir. Kültür ortamında oluşan bu pigment oksijensiz ortamda üretilmez. Bunlara ek olarak; literatürde mevcut olan birkaç çalışma Ta, Sn gibi elementlerin oluşturduğu TiO<sub>2</sub> tabakasının [35] antibakteriyel etkisini bildirmiştir, çünkü bu oksitler güçlü antibakteriyel özelliklerinden bahseder [36-44]. Marrez ve ark, *P. aeruginosa*'nın ürettiği *pyocyanin* pigmentinin biyolojik aktivitesi ve uygulamaları ile ilgili yaptığı derlemede *pyocyanin* antibakteriyel, antifungal ve kanser hücrelerine karşı antikanser aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir [45]. Başka bir çalışmada ise El Feghali ve ark, *P. aeruginosa*'nın ürettiği *pyocyanin* bir inhibitör olarak kullanıldığında biyofilm (hücrelerin birbirine ve/ya da buldukları yüzeye yapıştıkları bir mikroorganizma topluluğudur) oluşumunun engellenebileceğini ve bu sayede patojen bakterilerin (örneğin; *P. aeruginosa*) üremelerinin engellenebileceğini göstermişlerdir [46]. Bu çalışmalara bakıldığında *pyocyanin* hem stres metaboliti hem de inhibitör olarak kullanılabilirliği görülmektedir. NiTi, NiTiNb ve NiTiNbTa alaşımlarının implant uygulamalarında antibakteriyel, antikanser davranış sergileyen *pyocyanin* pigmentinin ürettiği söylenebilir.



Şekil 1. SBF'de üreyen *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)'nin OD<sub>600</sub>'de hücre yoğunlukları.

Tablo 3. Alaşımlarda OD<sub>600</sub>'de okunan hücre yoğunlukları.

Alaşım	OD <sub>600</sub> 'de okunan hücre yoğunluk değeri
Kontrol (SBF)	0.033
Ni <sub>50</sub> Ti <sub>50</sub>	0.023
Ni <sub>27</sub> Ti <sub>50</sub> Nb <sub>23</sub>	0.028
Ni <sub>27</sub> Ti <sub>50</sub> Nb <sub>22</sub> Ta <sub>1</sub>	0.029
Ni <sub>27</sub> Ti <sub>50</sub> Nb <sub>20</sub> Ta <sub>3</sub>	0.023
Ni <sub>27</sub> Ti <sub>50</sub> Nb <sub>18</sub> Ta <sub>5</sub>	0.023
Ni <sub>27</sub> Ti <sub>50</sub> Nb <sub>22</sub> V <sub>1</sub>	0.037
Ni <sub>27</sub> Ti <sub>50</sub> Nb <sub>21</sub> V <sub>2</sub>	0.024
Ni <sub>27</sub> Ti <sub>50</sub> Nb <sub>18</sub> V <sub>5</sub>	0.014



Şekil 2. Besi ortamlarının UV lambası altında görüntülenen bakteri kolonileri.

#### 4 Sonuç

Biyouyumluluk derecesi incelenmesi için yapılan hücre kültür testi sonuçlarına göre; Ta elementi ile katkılanmış diğer numunelerin hücre yoğunluk değerleri kontrol (SBF) 'ye göre daha düşük değerlerde olduğu gözlemlenirken, vanadyum elementi katkısının artması ile hazırlanan alaşımlarda çok daha düşük değerler tespit edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* türünün kendine has ayırt edici özelliklerinden birisi *Pyocyanin* üretimi gözlenmiştir. Alaşımli ortamlarda bu pigmentin varlığı dikkat çekmektedir. NiTiNbTa alaşımlarla temas halinde kapalı inkübatör sisteminde tutulmuş olan *P. aeruginosa*'nın savunma mekanizması için üretmiş olduğu *Pyocyanin* pigmenti daha fazla olduğu ve biyouyumluluk derecesinin daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir. Sonuç olarak Ta elementi katkılı ortamlarda diğerlerine göre daha az bakteri kolonisi görüldüğü için bu da biyouyumluluk çalışmalarında ŞHA' ların kullanılabilirliğini artırmıştır. Bu derlemeden de anlaşılacağı üzere patojen bir bakteri olan *P. aeruginosa*'nın bu karakteristik özelliği sayesinde mikrobiyoloji, biyoteknoloji ve kanser gibi pek çok bilim dalında gelişme gösterdiğini söylemek mümkündür. Alaşımli ortamlarda *P. aeruginosa*'nın bu pigmenti oluşturduğu görülmesi ile ileride yapılacak bu gibi pek çok çalışmalara önemli katkılar sağlanabileceği düşünülmektedir.

#### Bilgilendirme

Gerçekleştirilen bu çalışmada Etik Kurul Onay belgesine gerek yoktur.

#### Kaynaklar

[1] Mohammed, S., Mediha, K. Ö. K., Qader, I. N., & Coşkun, M. A Review Study on Biocompatible Improvements of NiTi-based Shape Memory Alloys. *International Journal of Innovative Engineering Applications*, 5(2), 125-130.

- [2] Karaca, H. E., Acar, E. M. R. E., Basaran, B., Noebe, R. D., Bigelow, G., Garg, A., ... & Chumlyakov, Y. I. (2012). Effects of aging on [1 1 1] oriented NiTiHfPd single crystals under compression. *Scripta Materialia*, 67(7-8), 728-731.
- [3] Acar, E., Karaca, H. E., Basaran, B., Yang, F., Mills, M. J., Noebe, R. D., & Chumlyakov, Y. I. (2013). Role of aging time on the microstructure and shape memory properties of NiTiHfPd single crystals. *Materials Science and Engineering: A*, 573, 161-165.
- [4] Acar, E. (2015). Dynamic mechanical response of a Ni45. 7Ti29. 3Hf20Pd5 alloy. *Materials Science and Engineering: A*, 633, 169-175.
- [5] Acar, E., et al., Compressive response of NiTiHfPd and NiTiHfPd shape-memory alloys. *Journal of Materials Science*, 2015. 50(4).
- [6] Karaca, H. E., Acar, E., Tobe, H., & Saghaian, S. M. (2014). NiTiHf-based shape memory alloys. *Materials Science and Technology*, 30(13), 1530-1544.
- [7] Balci, E. and F. Dağdelen, Investigate of Microhardness and Microstructure of Ti-Ni-Nb-X (Ta and V) Shape Memory Alloys. *International Journal of Innovative Engineering Applications*. 5(2): p. 131-135.
- [8] Balci, E., Dağdelen, F., Qader, I. N., & Kok, M. (2021). Effects of substituting Nb with V on thermal analysis and biocompatibility assessment of quaternary NiTiNbV SMA. *The European Physical Journal Plus*, 136(2), 145.
- [9] Balci, E., & Akpınar, S. (2021). Quaternary Element Incorporation Effects on Thermal Properties and Crystal-Micro Structure of Cu-Al-Fe High Temperature Shape Memory Alloys. *International Journal of Thermodynamics*, 24(2), 119-126.
- [10] Zhang, Y. Q., Jiang, S. Y., Zhao, Y. N., & Ming, T. (2012). Influence of cooling rate on phase transformation and microstructure of Ti-50.9% Ni shape memory alloy. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 22(11), 2685-2690.
- [11] Mousavi, T., Karimzadeh, F., & Abbasi, M. H. (2008). Synthesis and characterization of nanocrystalline NiTi intermetallic by mechanical alloying. *Materials Science and Engineering: A*, 487(1-2), 46-51.
- [12] Ying, C., Hai-Chang, J., Li-Jian, R., Li, X., & Xin-Qing, Z. (2011). Mechanical behavior in NiTiNb shape memory alloys with low Nb content. *Intermetallics*, 19(2), 217-220.



- [13] Hamilton, R. F., Lanba, A., Ozbulut, O. E., & Tittmann, B. R. (2015). Shape memory effect in cast versus deformation-processed NiTiNb alloys. *Shape Memory and Superelasticity*, 1(2), 117-123.
- [14] Dagdelen, F., Balci, E., Qader, I. N., Ozen, E., Kok, M., Kanca, M. S., ... & Mohammed, S. S. (2020). Influence of the Nb content on the microstructure and phase transformation properties of NiTiNb shape memory alloys. *JOM*, 72(4), 1664-1672.
- [15] Campbell, F. C. (Ed.). (2012). *Phase diagrams: understanding the basics*. ASM international.
- [16] Lin, H. C., Yang, C. H., Lin, M. C., Lin, C. S., Lin, K. M., & Chang, L. S. (2008). Aging effect on a Ti47. 25Ni48. 75V4 shape memory alloy. *Journal of alloys and compounds*, 449(1-2), 119-124.
- [17] Lin, H. C., Lin, K. M., Chang, S. K., & Lin, C. S. (1999). A study of TiNiV ternary shape memory alloys. *Journal of alloys and compounds*, 284(1-2), 213-217.
- [18] Mao, H., Yang, H., Shi, X., Li, Y., Zhang, J., & Jiang, J. (2018). Transformation and superelastic characteristics of large hysteresis TiNi matrix shape memory alloys reinforced by V nanowires. *Materials Letters*, 228, 391-394.
- [19] Oymak, M.A., E. Bahçe, and İ. Gezer, Investigation of Cryogenic Cooling Effect With Finite Element Method In Micro Milling Of Ti6Al4V Material. *International Journal of Innovative Engineering Applications*. 5(2): p. 93-100.
- [20] International Orienteering Federation Standards (1997). *Dentistry-Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry Test Methods for Dental Materials/IOS (ISO-7405)*.
- [21] Oshida, Y. (2010). *Bioscience and bioengineering of titanium materials*. Elsevier.
- [22] Schmalz, G. (1998). Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical oral investigations*, 1(4), 154-162.
- [23] Wataha, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of prosthetic dentistry*, 86(2), 203-209.
- [24] Tremblay, J., Richardson, A. P., Lépine, F., & Déziel, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental microbiology*, 9(10), 2622-2630.
- [25] Şen, A., & Halkman, A. K. (2006). Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(2), 2-13.
- [26] Rattanukul, S., & Oguma, K. (2018). Inactivation kinetics and efficiencies of UV-LEDs against *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, and surrogate microorganisms. *Water research*, 130, 31-37.
- [27] Karaderi, C.C. (2016). *Pseudomonas aeruginosa, escherichia coli ve enterococcus faecalis' de farklı ortam koşullarında protaz, prolin ve biofilm üretimi ile kayma hareketlerinin incelenmesi* (Master's dissertation, İnönü University).
- [28] Calfee, M. W., Coleman, J. P., & Pesci, E. C. (2001). Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(20), 11633-11637.
- [29] Sırıken, B., & Veli, Ö. Z. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*: Özellikleri ve Quorum Sensing Mekanizması. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (18), 42-52.
- [30] Britigan, B. E., Railsback, M. A., & Cox, C. D. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates a1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infection and immunity*, 67(3), 1207-1212.
- [31] Dağdelen, F., Balci, E., & Ercan, E. (2021). Ti-27Ni-20Nb-3V Alaşımın Faz Dönüşüm Sıcaklıkları, Korozyon Direnci ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10(3), 796-802.
- [32] Dagdelen, F., Balci, E., Qader, I. N., Aydogdu, Y., & Saydam, S. (2021). Effects of Substituting Nb with Ta on Microstructure and Thermal Properties of Novel Biocompatible TiNiNbTa Shape Memory Alloys. *Physics of Metals and Metallography*, 122(14), 1572-1580.
- [33] Vinoth, J., Murugan, S., & Stalin, C. (2014). Optimization of alkaline protease production and its fibrinolytic activity from the bacterium *Pseudomonas fluorescens* isolated from fish waste discharged soil. *African Journal of Biotechnology*, 13(30), 3052-3060.
- [34] Kahraman, H., & Karaderi, C. C. (2021). Pyocyanine Production, Twitching Motility and Hydrophobicity of Different Wastes on *Pseudomonas aeruginosa*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(2).
- [35] Kaygili, O., Bulut, N., Tatar, C., Tankut, A., & Turan, İ. N. C. E. (2017). Sol-gel synthesis and characterization of TiO2 powder. *International Journal of Innovative Engineering Applications*, 1(2), 38-40.
- [36] Kamaraj, P., Vennila, R., Arthanareeswari, M., & Devikala, S. (2014). Biological activities of tin oxide nanoparticles synthesized using plant extract. *World J Pharm Pharm Sci*, 3(9), 382-388.
- [37] Amininezhad, S. M., Rezvani, A., Amouheidari, M., & Mohamad, S. (2015). The Antibacterial Activity of SnO2 Nanoparticles against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 2015. 17(9).
- [38] Chang, Y. Y., Huang, H. L., Chen, H. J., Lai, C. H., & Wen, C. Y. (2014). Antibacterial properties and cytocompatibility of tantalum oxide coatings. *Surface and Coatings Technology*, 259, 193-198.
- [39] Ghoranneviss, M., & Shahidi, S. (2013). Effect of various metallic salts on antibacterial activity and physical properties of cotton fabrics. *Journal of Industrial Textiles*, 42(3), 193-203.
- [40] Kubacka, A., Diez, M. S., Rojo, D., Bargiela, R., Ciordia, S., Zapico, I., ... & Ferrer, M. (2014). Understanding the antimicrobial mechanism of TiO2-based nanocomposite films in a pathogenic bacterium. *Scientific reports*, 4(1), 1-9.
- [41] Lu, Y., Hao, L., Hirakawa, Y., & Sato, H. (2012). Antibacterial activity of TiO2/Ti composite photocatalyst films treated by ultrasonic cleaning. *Adv. Mater. Phys. Chem*, 2(04), 9-12.
- [42] Xing, Y., Li, X., Zhang, L., Xu, Q., Che, Z., Li, W., ... & Li, K. (2012). Effect of TiO2 nanoparticles on the antibacterial and physical properties of polyethylene-based film. *Progress in Organic Coatings*, 73(2-3), 219-224.
- [43] Kim, Y. S., Park, E. S., Chin, S., Bae, G. N., & Jung, J. (2012). Antibacterial performance of TiO2 ultrafine nanopowder synthesized by a chemical vapor condensation method: Effect of synthesis temperature and precursor vapor concentration. *Powder technology*, 215, 195-199.
- [44] Harun, A. M., Noor, N. F. M., Shaari, R., Ying, L. X., Yusoff, M. E., & Alam, M. K. (2021). The toxicology properties of modified hydrothermal nanotitania extraction. *Archives of Medical Science*, 1-4.
- [45] Marrez, D. A., & Mohamad, H. S. (2020). Biological activity and applications of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bio Sci*, 1(4): p. 140-144.
- [46] Raji El Feghali, P. A., & Nawas, T. (2018). Pyocyanin: a powerful inhibitor of bacterial growth and biofilm formation. *Madridge J Case Rep Stud*, 2(2), 101-107.