

**ORTOPEDİK İMPLANTLARIN NANOTEKNOLOJİK
YAKLAŞIMLARLA FONKSİYONELLEŞTİRİLMESİ**

**NANOTECHNOLOGIC APPROACHES FOR
FUNCTIONALIZATION OF ORTHOPEDIC IMPLANTS**

CEM BAYRAM

Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak hazırlanmıştır.

2013

CEM BAYRAM'ın hazırladığı "**ORTOPEDİK İMPLANTLARIN NANOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLARLA FONKSİYONELLEŞTİRİLMESİ**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Mehmet Mutlu

Danışman

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Üye

Prof. Dr. Sinan Adıyaman

Üye

Doç. Dr. Halil Murat Aydın

Üye

Yrd. Doç. Dr. Memed Duman

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Anne ve Babam'a

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri tez yazım kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

_ / _ / 2013

Cem BAYRAM

ÖZET

ORTOPEDİK İMPLANTLARIN NANOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLARLA FONKSİYONELLEŞTİRİLMESİ

CEM BAYRAM

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ

Eylül 2013, 105 sayfa

Tez çalışmasında ortopedik implant ve fiksator malzemelerin yapımında kullanılan titanyum ve titanyum temelli alaşımlarının biyouyumluluklarını ve biyoaktifliklerini arttırmaya yönelik yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Anodik oksidasyon, apatitik kalsiyum fosfat tuzu çöktürülmesi ve elektroçirme teknikleri ayrı ayrı ve/veya birlikte kullanılarak yüzeyde nano boyutta yeni kompozisyonlar elde edilmiştir. Titanyum yüzeylerde içe doğru büyüyen nanotübüler boşluklar, nanokristaller şeklinde apatitik kalsiyum fosfat ve de kolajen benzeri ipek fibroin nanofiberler sırasıyla anodik oksidasyon, simule vücut sıvısında bekletme ve elektroçirme ile elde edilmiştir. Elde edilen yüzeylerin ayrıntılı olarak karşılaştırılması fizikokimyasal olarak taramalı elektron mikroskopisi, kızılötesi spektroskopisi, su temas açısı ıslanabilirlik ölçümleri ile biyolojik olarak da *in vitro* ortamda insan osteoblast benzeri Saos-2 hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. Biyolojik incelemelerde başlangıç hücre yapışması, proliferasyon, hücre morfolojisi, toplam protein sentezi, alkalen fosfataz aktivitesi ve kalsiyum birikimleri incelenmiştir. Yüzey modifikasyonlarının yanı sıra implant sonrası ortaya çıkabilecek bakteriyel enfeksiyonlara karşı lokal ilaç salın yüzey geliştirilmesi hedeflenmiştir. İmplantasyon sonrası vücuda alınan oral ya da intravenöz antibiyotiklerin sistemik toksisite ve ilgili bölgedeki düşük etkinlik gibi dezavantajlarını ortadan kaldırmak için lokal ilaç salın yüzeyler boy-en oranı kontrol edilebilen nanotübüler boşlukların ilaç rezervuarı olarak kullanılması ile geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Titanyum, Ortopedik İmplant, Anodik Oksidasyon, Elektroçirme, Lokal İlaç Salımı, Osseoentegrasyon, İpek Fibroin, Hidroksiapatit.

ABSTRACT

NANOTECHNOLOGIC APPROACHES FOR FUNCTIONALIZATION OF ORTHOPEDIC IMPLANTS

CEM BAYRAM

Doctorate, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ

September 2013, 105 pages

In thesis study, surface modifications were carried out on titanium and titanium based alloys, which are used in orthopaedic implant and fixators, for the purpose of enhancing of the biocompatibility and bioactivity. New compositions in nano dimensions were obtained by performing anodic oxidation, apatitic calcium phosphate salt precipitation and electrospinning techniques one by one and/or consecutively. Ingrowing nanotubular spaces, nanocrystalline hydroxyapatite and collagen like silk fibroin nanofibers were successfully deposited on the titanium surfaces with anodic oxidation, simulated body fluid immersion and electrospinning, respectively. Physicochemical characterization of the obtained surfaces were carried out with scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, water contact angle wettability and the surfaces were also tested with human osteoblast like Saos-2 cell type for biological aspects in terms of initial cell adhesion, cell proliferation, cell morphology, total protein synthesis, alkaline phosphatase activity and calcium deposition. Apart from modifications, the development of local drug releasing surfaces were planned for the prevention of post implantation bacterial infections. To eliminate the disadvantages of systemic toxicity or low effectivity on relevant sites of the oral and intravenous administration, drug releasing surfaces were developed with the use of nanotubular spaces with controllable aspect ratios, as drug reservoirs.

Keywords: Titanium, Orthopaedic Implant, Anodic Oxidation, Electrospinning, Local Drug Release, Osseointegration, Silk Fibroin, Hydroxyapatite.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her zaman yakın ilgisini, alakasını hissettiğim ve yıllardır uyum içinde beraber çalıştığımız değerli danışman hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a,

Tez çalışmaları süresinde yaptıkları yol gösterici katkılar ve değerlendirmeler için Prof. Dr. Mehmet Mutlu ve Prof. Dr. Sinan Adıyaman'a

Tez ve tez harici çalışmalarına her zaman katkılarını koyan değerli büyüklerim Doç. Dr. Halil Murat Aydın ve Yrd. Doç. Dr. Memed Duman'a,

Tez çalışmalarında kullanılan malzemelerin hazırlama ve karakterizasyonunda yardımcı olan ve destek sağlayan Prof. Dr. Mohan J. Edirisinghe ve Dr. Zeynep Ekemen'e,

Laboratuvarlarının kapılarını her zaman sonuna kadar açan ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa Türk ve araştırma grubuna,

Tez çalışmalarındaki biyolojik değerlendirme testlerini tasarlayan ve gerçekleşmesinde yardımcı olan daimi ortak çalışma arkadaşım ve ağabeyim Dr. Murat Demirbilek ve eşi Dr. Melike Erol Demirbilek'e,

Keyifli dostluklarını tez çalışmalarım boyunca da hissettiren yardımsever dostlarım Dr. Ebru Akdoğan ve Dr. Tolga Şirin'e

Yüzey karakterizasyonu işlemlerinde yardımlarını sunan değerli arkadaşım Dr. Erku Yılmaz'a,

Her zaman birbirinin arkasını kollayan, destek olan, laboratuvarın "ihtiyar heyeti" Dr. Doğa Kavaz, Tamer Çırak ve Tayfun Vural'a,

Tez çalışmalarında çok emeği geçen "Anodizasyon" grubu üyeleri Nazlı Çalışkan, Gökçe Bozokalfa ve Kübra Kıcır'a

Tezin yazım düzeltmelerini büyük bir titizlikle gerçekleştiren Sema Tuncer'e,

Arkadaşlıkları ve yardımları için Ebru Erdal, Zeynep Karahaliloğlu, Eda Yalçın, Betül Pala, Göknur Kara, Ekin Çelik, Pezhman Hosseinian, Soheil Malekghasemi, Ali Örs, Demet Kayım ve yazmayı unuttuğum tüm araştırma grubu arkadaşlarıma,

Her an yanımda ve kalbimde olan Merve'ye,

Doğduğum günden beri her konuda maddi manevi desteklerini veren, bana her zaman inanan değerli aileme,

Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik Dokusu	4
2.1.1. Mikro ve Makro Yapılanma.....	6
2.1.2. Kemik Mekanik Özellikleri	7
2.1.3. Kemik Biçimlenmesi ve Kemik Hücreleri	8
2.1.3.1. Osteoblastlar.....	8
2.1.3.1. Osteositler.....	9
2.1.3.1. Osteoklastlar	9
2.2. Kemik İmplantları ve Kullanımlarında Karşılaşılan Sorunlar	9
2.2.1. Ototreftler	9
2.2.2. Allogreftler ve Ksenogreftler	10
2.2.3. Metaller ve Metal Alaşımları	10
2.3. Daha İyi İmplantlar İçin Nano Malzemeler	11
2.3.1. Ortopedik Uygulamalarda İmplant İyileştirilmesinin Önemi	12
2.4. İmplant Yüzeylerinin Hücreler ile Etkileşimleri	14
2.4.1. İmplant Kimyası.....	14
2.4.2. Topografi.....	15
2.5. Yeni Bir Yaklaşım: Nanofaz Yüzeyler	16
2.5.1. Nanofaz Yüzeyler ve Protein Etkileşimleri.....	19
2.5.2. Nanofaz Yüzeyler ve Islanabilirlik.....	20
2.6. Titanyum.....	21

2.6.1. Titanyumun Anodik Oksidasyonu.....	22
2.6.1.1. Anodizasyon Parametrelerinin Etkisi.....	23
2.6.1.2. Mikro Pürüzlü Yüzey Oluşumu.....	24
2.6.1.3. Nano Pürüzlü Yüzey Oluşumu	25
2.6.2. Anodize Titanyum Oksit Yüzeylerin Yapıları ve Özellikleri	28
2.6.3. Anotlanmış titanyumun Biyolojik Özellikleri	29
2.7. Ekstrasellüler Matriks	31
2.7.1. ECM Benzeri Yüzey Modifikasyonları	32
2.8. İpek Fibroin ve Sert Doku Uygulamalarında Kullanımı	34
2.9. İmplant Enfeksiyonları	35
2.9.1. Antibakteriyel Madde Yüklü Titanyum İmplantlar	36
2.9.2. Boy-En Oranı Yüksek Nanotüpler	37
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	38
3.1. Genel Deneysel Çalışmalar ve Karakterizasyonlar	38
3.1.1. Titanyum Örneklerin Hazırlanması.....	38
3.1.2. Anodizasyon Düzenegi ve Anodizasyon Prosesi	38
3.1.3. Morfolojik Karakterizasyonlar	39
3.1.4. Kimyasal Karakterizasyonlar	40
3.1.5. Islanabilirlik Testleri.....	40
3.1.6. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücreler.....	40
3.2. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Yüzeylerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve <i>in vitro</i> Biyolojik Testleri	41
3.2.1. Kaplama Öncesi Anodizasyon İşlemi	41
3.2.2. Apatitik Kalsiyum Fosfatın Anodize Titanyum Yüzeyle Çöktürülmesi.....	41
3.2.3. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Anodize Titanyum Yüzeylerin Hücreler ile Etkileşmesi	41
3.2.4. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Anodize Titanyum Yüzeylerde Kültür Edilen Hücre Proliferasyon Testleri ve Morfolojik İncelemeleri	42
3.2.5. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Anodize Titanyum Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Alkalin Fosfataz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	43
3.2.6. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Toplam Hücre İçi Protein Miktarının Ölçülmesi	43

3.3. İpek Fibroin Ve Nano Hidroksiapatit Katkılı İpek Nanofiber Kaplı Yüzeylerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve <i>in vitro</i> Biyolojik Testleri	44
3.3.1. Elektroeğirme Öncesi Anodizasyon İşlemi	44
3.3.2. İpek Fibroinin İpek Böceği Kozalarından Eldesi	44
3.3.3. İpek Fibroin Nanofiberlerin Titanyum Metal Yüzeyle Elektroeğrilmesi	45
3.3.3.1. Elektroeğirme Düzenegi	45
3.3.3.2. Elektroeğirme Parametreleri ve Optimizasyon	45
3.3.3.3. Titanyum ve Anodize Titanyum Yüzeylerin Elektroeğrilmiş Fibroin Nanofiberler ile Modifikasyonu	46
3.3.4. Nano Hidroksiapatit Parçacıklarının İpek Fibroin Nanofiberlere Katkılanması	46
3.3.4.1. Nano Hidroksiapatit – İpek Fibroin Elektroeğirme Çözeltilerinin Optimizasyonu	46
3.3.4.2. Titanyum ve Anodize Titanyum Yüzeylerin Elektroeğrilmiş Nano Hidroksiapatit Katkılı Fibroin Nanofiberler ile Modifikasyonu	47
3.3.5. Yüzeyleri ipek fibroin ve nHA katkılanmış ipek fibroin nanofiberler ile modifiye edilmiş titanyum ve anodize titanyum örneklerin <i>in vitro</i> hücre kültür testleri	47
3.3.5.1. İpek Fibroin Elektroeğrilmiş ve nHA katkılı İpek Fibroin Elektroeğrilmiş Yüzeylerin Hücre Hattı ile Etkileştirilmesi	47
3.3.5.2. İpek Fibroin Elektroeğrilmiş ve nHA Katkılı İpek Fibroin Elektroeğrilmiş Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Proliferasyon Testleri ve Morfolojik İncelemeleri	48
3.3.5.3. İpek Fibroin Elektroeğrilmiş ve nHA Katkılı İpek Fibroin Elektroeğrilmiş Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Alkalin Fosfataz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	48
3.3.5.4. İpek Fibroin Elektroeğrilmiş ve nHA Katkılı İpek Fibroin Elektroeğrilmiş Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Toplam Hücre İçi Protein Miktarının Ölçülmesi	49
3.4. Boy-En Oranı Yüksek Titanya Nanotüplerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Antibiyotik Yükleme-Salım Çalışmaları	49
3.4.1. Boy-En Oranı Yüksek Titanya Nanotüp Yüzeylerin Hazırlanması	49
3.4.2. İlaç Yükleme-Salım İşlemleri	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Anodizasyon ve Kalsiyum Fosfat Çöktürülmesi ile Hazırlanan Yüzeyler	51

4.1.1. Elektrolit 1 ile Anodizasyon İşlemi Yapılan Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu	51
4.1.2. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu	54
4.1.3. Titanyum Yüzeylerin EDX Spektrum Analizi	56
4.1.4. Titanyum Yüzeylerin Kızıl Ötesi Spektrum Analizi	57
4.1.5. Titanyum Yüzeylerin İslanabilirlik Ölçümleri	58
4.1.6. Titanyum yüzeylerin <i>in vitro</i> hücre kültür çalışmaları	60
4.2. Elektroğrılmış ipek fibroin nanofiberler ile hazırlanan yüzeyler	64
4.2.1. İpek Fibroinin Elektroğrılması	64
4.2.1.1. Elektroğirme Sistem Parametrelerinin Değerlendirilmesi ve Optimizasyonu	64
4.2.1.2. Elektroğirme Proses Parametrelerinin Değerlendirilmesi ve Optimizasyonu.....	66
4.2.2. Nano Hidroksiapatit Katkılı İpek Nanofiberler Kullanılarak Elde Edilen Yüzeylerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu.....	70
4.2.2.1. nanoHA:SF Oranının Fiber Çapına Etkisi	70
4.2.3. İpek Fibroin ve Nanohidroksiapatit Katkılı İpek Fibroin Nanofiber Elektroğrılmış Titanyum Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonları.....	71
4.2.4. İpek Fibroin ve Nanohidroksiapatit Katkılı İpek Fibroin Nanofiber Elektroğrılmış Titanyum Yüzeylerin <i>in vitro</i> Hücre Kültür Testleri	74
4.2.5. Nanohidroksiapatit Katkılı İpek Fibroin Nanofiber Elektroğrılmış Titanyum Yüzeylerdeki Hücrelerin Morfolojik İncelemesi	81
4.3. Boy-En Oranı Yüksek Nanotüpler ile Lokal İlaç Salımı	82
4.3.1. Boy-En Oranı Yüksek Nanotüplerin Morfolojik Karakterizasyonu	82
4.3.2. Anodizasyon Geriliminin (Nanotüp Çapının) İlaç Salım Profiline ve Yükleme Miktarına Etkisi	84
4.3.3. Anodizasyon Süresinin (Nanotüp Uzunluğunun) İlaç Salım Profiline ve Yükleme Miktarına Etkisi	85
4.3.4. Vakum Ortamında Yüklemenin İlaç Salım Profiline ve Yükleme Miktarına Etkisi	87
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.	Kemiğin makro mikro ve nano yapılanması4
Şekil 2.2.	Kemiğin nano yapılanmasındaki kolajen – hidroksiapatit dizilişi6
Şekil 2.3.	Spiral sarmal nanotüpler18
Şekil 2.4.	Konvansiyonel ve nanofaz titanyum yüzeylerin karşılaştırılması19
Şekil 2.5.	Anot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonlar23
Şekil 2.6.	Çöküm potansiyelinin üzerinde poröz titanyum oksit oluşumunun şematik diyagramı25
Şekil 2.7.	Nanotübüler titanya yapılarına literatürden örnekler27
Şekil 2.8.	DMSO/etanol/HF elektrolitinde 20 V ve 70 saat boyunca anodizasyon sonucu elde edilen yüzeyler27
Şekil 2.9.	Nanoporöz yüzeyin florür içeren elektrolitler içinde ve sabit voltajda oluşma mekanizması28
Şekil 2.10.	Mikro ark oksidasyon yönteminde uygulanan voltajın artmasıyla elde edilen yüzeylerin değişimi28
Şekil 2.11.	Nanotübüler titanya tabakanın flor içeren elektrolit ile anodizasyonunda uygulanan voltajın artmasıyla elde edilen yüzeylerin değişimi29
Şekil 2.12.	Etkileştirildikten 2 saat sonra nanotüp yapıları ve osteoblast filopedilerinin titanya yüzeydeki kenetlenme yapısı30
Şekil 2.13.	ECM benzeri nanofiber ağ yapılarında mezenkimal kök hücre morfolojileri34
Şekil 2.14.	Yüksek boy-en oranına sahip nanotüp yapılar37
Şekil 3.1.	Deneylerde kullanılan anodizasyon düzeneği39
Şekil 3.2.	Rejenere ipek fibroinin ipek kozalarından eldesi44
Şekil 3.3.	Elektroeğirme düzeneği45
Şekil 3.4.	Titanyum örneklerine vakum ortamında ilaç yükleme düzeneği50
Şekil 4.1.	Anotlanmamış (A) ve 0.2 M HF elektroliti kullanılarak 20 V potansiyel gerilimde anotlanmış titanyum (B) yüzeylerin morfolojileri.51
Şekil 4.2.	Elektrolit 1 ile gerçekleştirilen anodizasyon işleminde farklı potansiyel gerilimleri uygulanmış titanyum yüzeylerin morfolojileri.53

Şekil 4.3.	Kalsiyum fosfat çöktürülen yüzeylerin SEM görüntüleri.	55
Şekil 4.4.	AnTi ve AnTiSBF yüzeylerin EDX spektrumları	56
Şekil 4.5.	Ti, AnTi, AnTiSBF(3h) ve AnTiSBF(5h) yüzeylerin FTIR spektrumları	57
Şekil 4.6.	İşlem görmemiş titanyum yüzeyin su temas açısı	58
Şekil 4.7.	Anotlanmış (a) ve anotlanıp farklı saatlerde SBF içinde apatitik kalsiyum fosfat çöktürülmüş yüzeylerin su temas açıları ve küçük resimlerde SEM görüntüleri.	59
Şekil 4.8.	Ti, AnTi, AnTiSBF(1h), AnTiSBF(2h), AnTiSBF(3h), AnTiSBF(5h), AnTiSBF(8h) örnek gruplarında kültüre edilen hücrelerin 3. 5. ve 7. günlerdeki bağıl hücre canlılık değerleri	60
Şekil 4.9.	Ti, AnTi, AnTiSBF(1h), AnTiSBF(2h), AnTiSBF(3h), AnTiSBF(5h), AnTiSBF(8h) örnek gruplarında kültüre edilen hücrelerin 3. 5. ve 7. günlerdeki ALP aktivite değerleri	61
Şekil 4.10.	Modifikasyona uğramamış (A) ve anotlanıp SBF'de 3 saat apatitik kalsiyum fosfat çöktürülmüş (B) yüzeylerde kültür edilen hücrelerin görüntüleri	63
Şekil 4.11.	AnTi SBF(3h) grubundaki bir alana ait yüksek büyütme SEM görüntüsü	64
Şekil 4.12.	%10 (A), %18 (B) ve %25 (C) konsantrasyonlardaki SF çözeltilerinin elektroğirilmesi ile elde edilen nanofiber morfolojileri.	67
Şekil 4.13.	Elektrik alan şiddetinin ortalama SF fiber çapına etkisi	68
Şekil 4.14.	2, 5 ve 10 dakikalık elektroğirme işlemleri sonucunda elde edilen yüzey görüntüleri	69
Şekil 4.15.	nanoHA:SF oranının nanofiber çapına etkisi	70
Şekil 4.16.	Ti(A), AnTi(B), TiSF(C), AnTiSF(D), TiSFnHA(E) ve AnTiSFnHA(F) örnek gruplarının düşük büyütmede elde edilen SEM görüntüleri. ..	72
Şekil 4.17.	Ti(A), AnTi(B), TiSF(C), AnTiSF(D), TiSFnHA(E) ve AnTiSFnHA(F) örnek gruplarının yüksek büyütmede elde edilen SEM görüntüleri. 73	73
Şekil 4.18.	Ti, AnTi, ESTi, ESAnTi, ESTinHA ve ESANTinHA örnek gruplarındaki hücrelerin bağıl canlılık oranları.	75
Şekil 4.19.	Ti, AnTi, ESTi, ESAnTi, ESTinHA ve ESANTinHA örnek gruplarındaki hücrelerin total hücre içi protein konsantrasyonları	76
Şekil 4.20.	Ti, AnTi, ESTi, ESAnTi, ESTinHA ve ESANTinHA örnek gruplarındaki hücrelerin Alkalen Fosfataz aktiviteleri	77
Şekil 4.21.	ESAnTi ve ESANTinHA örnek gruplarında hücrelerin düşük ve yüksek büyütmedeki görüntüleri	81

- Şekil 4.22.** Elektrolit 2 kullanılarak 15 V (A), 25 V (B) ve 35 V (C) potansiyel gerilimlerde 20 dakika boyunca anodik oksidasyona maruz bırakılan titanyum yüzeyler ve ortalama tüp çap değerleri82
- Şekil 4.23.** Elektrolit 2 kullanılarak 20 dk (A), 40 dk (B) ve 80 dk (C) sürelerde 25 V potansiyel gerilim uygulanarak anodik oksidasyona maruz bırakılan titanyum yüzeyler ve yaklaşık tüp uzunluk değerleri83
- Şekil 4.24.** Elektrolit 2 kullanılarak 80 dk süre ve 25 V potansiyel gerilim uygulanarak anodik oksidasyona maruz bırakılan titanyum yüzeylerde elde edilen yüzeylerin yukarıdan (A) ve yandan (B) görüntüleri.83
- Şekil 4.25.** Elektrolit 2 kullanılarak 20 dk sabit sürede 15, 25 ve 35 V potansiyel gerilim uygulanan yüzeylerden ortama salınan ilaç profili84
- Şekil 4.26.** Elektrolit 2 kullanılarak 20 dk sabit sürede 15, 25 ve 35 V potansiyel gerilim uygulanan yüzeylerden ortama salınan toplam ilaç miktarı .85
- Şekil 4.27.** Elektrolit 2 kullanılarak 25 V sabit potansiyel gerilimde 20, 40 ve 80 dk süre ile anotlanan yüzeylerden ortama salınan ilaç profili86
- Şekil 4.28.** Elektrolit 2 kullanılarak 25 V sabit potansiyel gerilimde 20, 40 ve 80 dk süre ile anotlanan yüzeylerden ortama salınan toplam ilaç miktarı .87
- Şekil 4.29.** Elektrolit 2 kullanılarak 25 V sabit potansiyel gerilimde 20, 40 ve 80 dk süre ile anotlanan yüzeylere vakum ortamındaki yüklemmeden sonra ortama salınan ilaç profili88
- Şekil 4.30.** Elektrolit 2 kullanılarak 25 V sabit potansiyel gerilimde 20, 40 ve 80 dk süre ile anotlanan yüzeylere vakum ortamındaki yüklemmeden sonra ortama salınan toplam ilaç miktarı89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Sağlıklı insan kemiğinin bağıl yoğunluk ve mekanik özellikleri	7
Çizelge 2.2. Bazı metalik alaşımların fiziksel ve mekanik özellikleri	10
Çizelge 2.3. Konvansiyonel ve nanofaz seramik malzemelerin tanecik aralıklarının kalınlık ve hacim yüzdeleri	20
Çizelge 2.4. Farklı kalınlık ve boyutlara sahip nanotübüler titanya tabakalarına örnek çalışmalar	25
Çizelge 2.5. ECM'deki temel bileşenler, buldukları yerler ve görevleri	32
Çizelge 4.1. Elektroeğirme işleminde kullanılan ipek fibroin çözelti sistem parametreleri	65

1. GİRİŞ

Dünya genelinde yaşlı nüfusun, trafik kazalarının, spor yaralanmalarının artması ile beraber ortopedik implant ve fiksasyon gereçlerine olan ihtiyaç da büyümektedir. İmplant ve fiksatörler, kemik kütlesi ve fonksiyonunda ciddi azalma ve sorunlar meydana geldiğinde kullanılan cihazlar olarak tanımlanabilir ve bu materyallerin hastanın sağlıklı yaşamsal hareket ve faaliyetlerine dönebilmesi için çabuk ve efektif olarak işlevlerini yerine getirmesi beklenir. Bu sınıftaki malzemelerde çoklukla titanyum, CoCrMo (kobalt, krom, molibden) ve 316L paslanmaz çelik kullanılmaktadır. Mekanik özellikleri doğal kemik dokusuna oldukça yakın olan bu malzemelerin ortalama implant ömrü de 10-15 sene olarak öngörülmektedir. Bu öngörülen süre yaşlı nüfus için uygun olarak nispeten kabul edilebilir olsa da implant ve fiksasyona ihtiyacı olabilecek genç bireyler için tatmin edici değildir.

Bir kemik implantı kaybedilen kemik dokusunun yerini almanın yanısıra lokal dokudaki kemik ve vasküler dokunun rejenerasyonu ve iyileşmesi için bir platform teşkil etmelidir. İmplantın doku ile temas ettiği noktanın, hücre yapışmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını; diğer bir deyişle yeni kemik oluşumunu teşvik etmesi gereklidir. Yeni kemik oluşumu ve damarlaşmanın hızlanması ile kırık-çatlak ya da kayıp olarak adlandırılan kemik ile implant arasında sağlam bağlantıların kurulması sağlanabilmektedir.

Bir implantasyonun başarısını ve kemikleşmeyi pek çok faktör etkilese de, yaygın olarak cerrahi teknik, implant tasarımı, yüzey topografisi, yüzey kimyası ve ıslanabilirlik ön plandadır ve bu sayılan özelliklerden özellikle son üçü gelişmiş ortopedik cihaz tasarımında anahtar özelliklerdir. Bir kemik implantında her ne kadar yığın ve mekanik özellikler öncelikli olsa da doku ile etkileşimde malzemenin yüzey özellikleri birincil rolü oynamaktadır; çünkü kendi tanımında da olduğu gibi direkt sitouyumluluk hücre-yüzey arasında gerçekleşen bir olaydır. Hücreler implant malzemesi üzerindeki topografi ve kimyaya karşı hassas ve de duyarlıdır. Topografi hem hücre proliferasyonu hem de farklılaşması konularında etkili bir nitelik olarak ön plana çıkar. Topografinin bir alt başlığı olarak pürüzlülük, implant veriminin etkili bir şekilde iyileştirilmesi konusunda oldukça yoğun bir şekilde çalışılmış olup, kumlama ve aşındırma ile elde edilen mikropürüzlülüğe (1 – 100 µm) sahip yüzeylerin düz yüzeylere nazaran osteoblast fonksiyonlarını arttırdığı bilinmektedir. Artan fonksiyonlara örnek verecek olursak, başlangıç hücre yapışması,

proliferasyon, alkalen fosfataz aktivitesi ve kalsiyum mineral birikimini sayabiliriz. Bu sayılan teknikler ile elde edilmiş yüzeylere sahip ortopedik ürünler günümüzde ortopedi marketinde yerlerini almışlardır.

Mikropürüzlülüğe sahip yüzeylerin vücuttaki doğal kemik dokusundaki yapılanma ile birebir örtüşemediği bilinmekte olup bu sebepten dolayı yukarıda sayılan gelişmelere rağmen implant verimliliği ve osteoindüksiyon konusunda istenilen seviyelere gelinememiştir. Kemiğin temel doğal bileşenleri olan kolajen fibril ve hidroksiapatit minerali nano boyutta bir yapılanma göstermektedir. Ekstrasellüler matriksteki protein içeriğinin %90'ını oluşturan fibriler kolajen demetlerinin çapı yaklaşık 300 nanometre ve inorganik kısmın büyük çoğunluğunu teşkil eden hidroksiapatit kristalinin boyutları da 4 x 25 x 50 nm olarak ölçülmüştür. İmplant materyali yüzeyinde de boyut anlamında bu seviyede kurulacak bir yapılanmaya gidilirse kemik ve materyal arası örtüşmenin daha başarılı olacağı açıktır.

Titanyum ve alaşımlarından oluşan implant yüzeylerinin modifikasyonlarına bakıldığında ilk önce sadece morfolojik değişikliklerin yapılmış olduğunu görürüz. Tezde gerçekleştirilen işlem basamaklarından ilki olan anodik oksidasyon ile de yapılan sadece morfolojik bir değişiklik olup yapılan yüzey işlemlerinin "biyomimetik" olarak adlandırılabilmesi için doğal ortamda bulunan bileşen ve/veya biçimsel ortamın simüle edilmesi gerekmektedir. Titanyum yüzeylere inorganik kalsiyum fosfat tuzlarının çöktürülmesi, plazma destekli kaplanması, sol-jel tekniği ile yapılan kaplamalar daha sonraki biyomimetik modifikasyonlar olarak göze çarpar. Anodik oksidasyonun 2000'li yılların ikinci yarısından sonra implant malzeme modifikasyonlarında kullanılmaya başlanması ile birlikte, nano seviyede implant yüzey modifikasyonları hız kazanmıştır.

Biyomimetik yüzey modifikasyonlarında elektroçirme tekniği ile nanofiber yapıların yüzeyde biriktirilmesi yeni bir yaklaşımdır. Yüzeyin hem nano ölçekte değiştirilmesi hem de biyokimyasal olarak aktifleştirilmesi amacıyla yapılan bu yeni nesil yaklaşımda ilk çalışmalar 2011 senesinde ortaya konulmuştur. Böylelikle kemik yapısında doğal olarak bulunan nanofibriler kolajen yapıların taklit edilmesi de mümkün olabilmektedir. Sunulan tez çalışmasında da yine sert doku uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir biyopolimer olan ipek fibroin proteini kolajene alternatif olarak titanyum yüzeylerin modifikasyonunda denenmiştir. İpek fibroin nanofiberlere ek olarak hidroksiapatit katkılı ipek nanofiberler de elektroçirme

tekniki kullanılarak yüzeyde biriktirilmiş ve yüzeyin biyomimetik özelliğinin taklit etme yeteneği arttırılmaya çalışılmıştır.

Yukarıda sözü edilen elektroçirime ile nanofiber biriktirilmesi ve anodizasyon teknikleri tez kapsamında hem ayrı ayrı hem de birlikte gerçekleştirilerek osteoblast fonksiyonlarına olan etkileri karşılaştırmalı olarak *in vitro* ortamda ayrıntılı olarak test edilmiştir.

Tez çalışmalarının son bölümünde ise implantasyon sonrası ortaya çıkabilecek bakteriyel enfeksiyonlara karşı lokal ilaç salınan yüzey geliştirilmesi hedeflenmiştir. İmplantasyon sonrası vücuda alınan oral ya da intravenöz antibiyotiklerin sistemik toksisite ve ilgili bölgedeki düşük etkinlik gibi dezavantajlarını ortadan kaldırmak için lokal ilaç salım sistemlerinin gereksinimi bilinmektedir. Bölgede kullanılacak implantın ilaç ihtiva eden bir dış materyal ile kaplanması yaklaşımı uygulama esası ile mümkün olamayacağından, polimer ya da seramik gibi malzemeler olmaksızın direkt yüzeye ilaç yüklenmesi üzerinde yoğunlaşılacak bir konudur. Bunun için anodik oksidasyon ile yüzeyde boy-en oranı yüksek, malzeme içine doğru büyüyen nanotübüler boşlukların ilaç rezervuarı olarak kullanılması test edilmiştir. Değişik boy-en oranlarına sahip nanotüp boşluklarının farklı konsantrasyonlarda ilaç yüklenmesi ile zamana bağlı olarak verdikleri cevaplar *in vitro* salım ortamında test edilmiştir.

Anodik oksidasyon ve nanofiberlerin elektroçirilmesi teknikleriyle elde edilen yeni nesil titanyum yüzeyler tez kapsamında hazırlanmış, karakterize edilmiş, biyolojik uyum ve osteoblast hücrelerinin fonksiyonları açısından test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

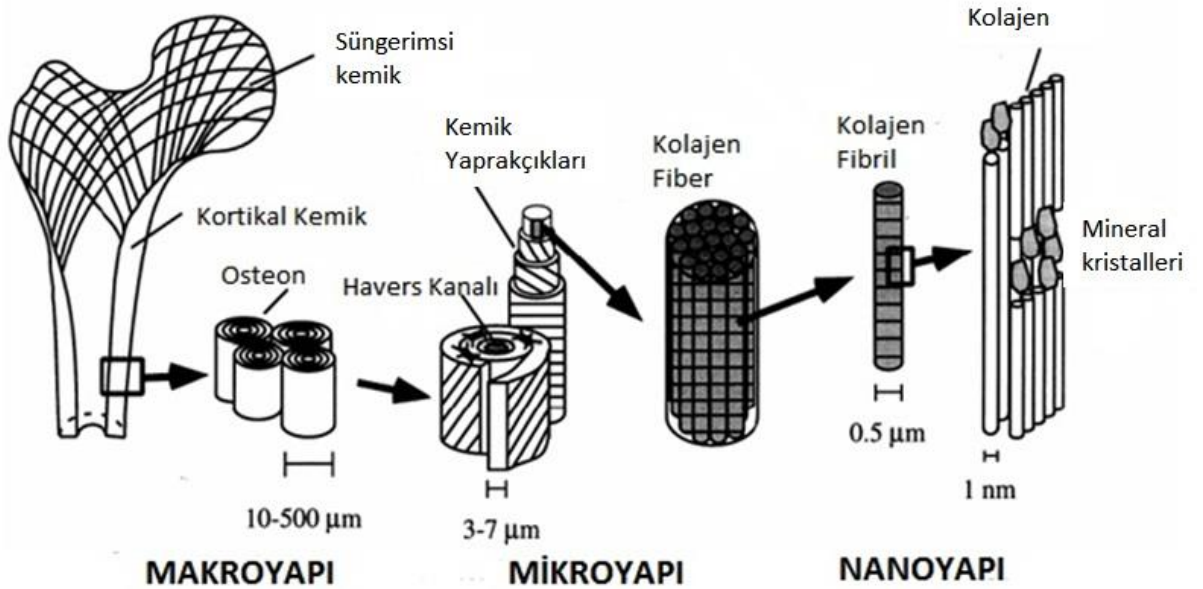
2.1. Kemik Dokusu

Kemik, boyut olarak geniş bir ölçekteki elemanların birbiriyle organize ve uyumlu bir şekilde yapılandığı, mekanik bir bütünlükte kimyasal ve biyolojik fonksiyonların yerine getirildiği özel bir dokudur.

Kemiğin hiyerarşik mimarisini tanımlama ve farklı tabakalarda bulunan yapılar arasındaki ilişkiyi anlamada ölçeği tanımlamak çok önem taşımaktadır. Kemikte 3 seviyeli bir yapılanmadan söz edilebilir:

- 1- Nano yapı: Birkaç nanometreden birkaç yüz nanometreye kadar olan yapılar (kolajen içermeyen organik protein yapıları, kolajen fibrilleri ve bu fibrillere gömülü mineral kristalleri)
- 2- Mikro yapı: Bir mikrondan birkaç yüz mikrona kadar olan yapılar (kemik yaprakçıkları, osteonlar ve havers kanal sistemleri)
- 3- Makro yapı: süngerimsi ve kortikal kemik yapıları

Bu 3 farklı ölçekte yönlendirilmiş yapılar bir araya gelerek heterojen ve anizotropik kemik dokusunu oluştururlar (Şekil 2.1.).

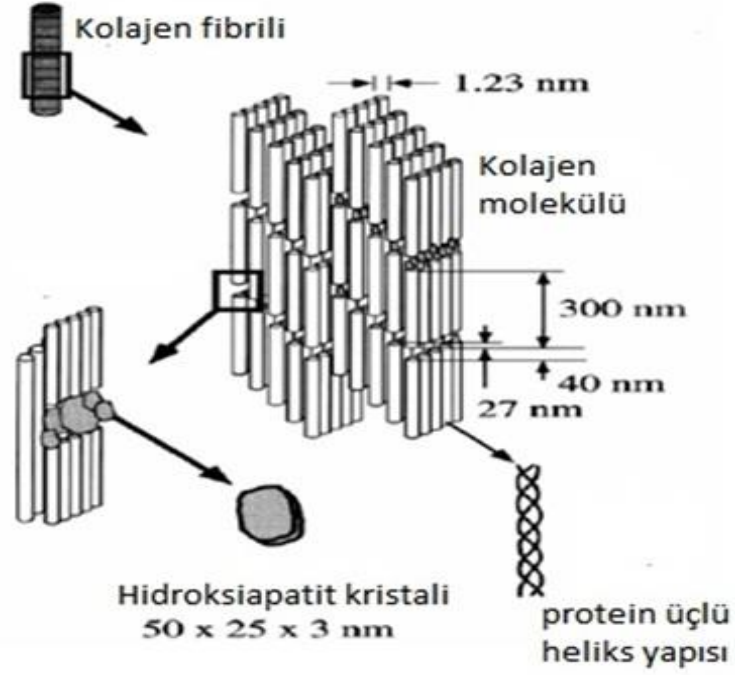


Şekil 2.1. Kemiğin makro mikro ve nano yapılanması

Doğal kemik dokusu organik (çoğunlukla kolajen) ve inorganik bileşenlerden (mineraller) oluşan bir kompozit olarak düşünülebilir. Nano boyutlu olarak en çok öne çıkan malzeme olan kolajen fiberlere mineral yapıları da girmiştir. Kemiğin hiyerarşik mimarisini bu nano boyutlu yapıtaşları oluşturur. Kemiğin detaylı bileşimi türlere, yaşa, beslenme alışkanlıklarına ve anatomik lokasyona göre değişse de inorganik faz kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %70'ini oluşturur ve kalan kısmı da organik matrikstir [1].

Organik fazın yaklaşık %90'lık kısmı Tip 1 kolajen olup, kalan %10'luk kısım ise kolajen dışı protein ve matriks destek elemanlarından oluşmaktadır. Kemikte bulunan tip 1 kolajen kemik oluşumunu gerçekleştiren osteoblast hücreleri tarafından sentezlenir ve ekstrasellüler matrikse (ECM) üçlü heliks – prokolajen – olarak salgılanır ve burada kolajen zincirlerindeki reaktif aldehit grupların çapraz bağlanması sonucu stabilize olur. Vücutta bulunan 12 çeşit kolajen de yaklaşık 1000 amino asit tarafından oluşan üçlü bir polipeptid zincirinden ibarettir. Tip 1 kolajen 2 adet aynı zincir ($\alpha 1$) ve bir diğer özgün üçüncü zincir ($\alpha 2$) den oluşur ve 139 kDa ağırlığında ve yaklaşık 300 nm uzunluğunda rijit lineer bir yapı teşkil eder [2]. Kolajen lineer fiberleri aralarında 40 nm'lik boşluk bulundurlar ve paralel diziye göre 67 nm'lik bir periyot ile sıralanırlar (Şekil 2.2.). Hidroksiapatit kristallerin de fiberler arasındaki bu boşlukları doldurduğu organizasyonda kolajen fiberler de kemiğin mimari ve yapısal çerçevesini oluştururlar.

Kemiğin yapısına oldukça az katkıda bulunan; ancak minerallerin boyut ve yönelimlerini düzenlemek, kalsiyum ve fosfat iyonlarını sağlamak gibi önemli biyolojik fonksiyonları sağlayan yapılara ise büyüme faktörleri, sitokinler, osteopontin ve osteokalsin gibi kemik indüktif proteinleri, proteoglikan ve proteolipidler gibi ekstrasellüler matriks elemanları örnek verilebilir. Yeni kemik oluşumunda kolajen dışı proteinler osteoblastlar tarafından sentezlenir ve kalsiyum, fosfat gibi mineral oluşumunda görevli iyonlar da fiber boşluklarına yerleşerek hidroksiapatit büyümesini desteklerler. Zemin maddesi olarak polisakkarit ve mukopolisakkaritler ise fiberler ve hidroksiapatit kristalleri arasındaki boşlukları doldururlar.



Şekil 2.2. Kemiğin nano yapılanmasındaki kolajen – hidroksiapatit dizilişi

Kemiğin inorganik yapısını oluşturan en önemli bileşen hidroksiapatit kristalidir ve kimyasal formülasyonu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ şeklindedir. İnce disk şeklindeki hidroksiapatit kristalleri kolajen fibrilleri arasındaki boşluklarda aralıklı bir şekilde yer alarak kristalin olası aşırı büyümesi limitlenir ve kemiğin hiyerarşik düzenli yapısı korunur. Tek bir kristal tabakasının en ve genişliği 50x25 nm olup kalınlıkları 2-3 nm dolayındadır [3].

Hidroksiapatit bileşiminde magnezyum, stronsiyum, sodyum ve potasyum gibi katyonların kalsiyum ile karbonatın fosfat grupları ile ve de klorür, florür iyonlarının da hidroksil grupları ile yer değiştirmeleri gibi küçük safsızlıklar kemik fonksiyonlarını etkileyebilirler. Örnek olarak magnezyumun mineralize matriks içerisinde yer alması sonucu hücresel aktivite artarak hidroksiapatit kristal büyümesini ve yeni kemik oluşumunu indükleyebilir [4].

2.1.1. Mikro ve Makro Yapılanma

Mikrometre ölçeğinde kemik, dokuma ve yaprakçık olmak üzere iki yapıda bulunmaktadır. Dokuma tipi kemik yapısı, olgunlaşmamış ve primitif türde olup yeni doğanlarda, kırık sonrası oluşan dokularda ve Paget hastalığına sahip kişilerde görülmektedir [5]. Bu kemik tipi yönlenmemiş ve kalın kolajen fiberlerince zengin, izotropik yapıdadır. Bunun tam tersi olarak yaprakçık mikro yapısı olgun

kemiğe daha çok benzer ve dokuma tipli kemiğin yeniden yapılanması sonucu oluşur. 3-7 µm kalınlığında ve yüksek derecede yönlendirilmiş kolajen fiberlerinin paralel yapılanması sonucu mekanik gücü çok yüksektir. Bu kolajen tabakaların yönelimlerini değiştirerek yarattıkları spiral biçimindeki yapılar bir araya gelerek eş merkezli bir halka çevresinde osteonları oluştururlar ve gerekli kan akışı da havers kanal sistemi ile sağlanır [5].

Kemiğin makro yapısında ise kortikal (kompakt) ve kanselöz (süngerimsi) yapılarından söz edebiliriz. Femur gibi uzun kemiklerin uçlarında kortikal bir dış kabuk ve içinde kanselöz kemik bulunur [6]. Kafatası kemikleri gibi düz kemiklerde ise sandviç benzeri bir yapılanmada kalın kortikal bir dış bölüm ve iç kesimlerde ise ince süngerimsi kemik yer alır. Kanselöz kemikte üç boyutlu sünger yapısı %50-%90 poröziteye sahip olup geniş gözenekler birkaç milimetre çapına ulaşabilir. Kortikal kemikte ise porözite oranı %30'u geçmez. Kanselöz kemik metabolik olarak daha aktif olup, kortikal kemiğe göre daha çok yenilenir ve bu nedenle daha "genç" olarak nitelendirilir.

2.1.2. Kemiğin Mekanik Özellikleri

Kortikal kemik dokusu kanselöz kemiğe nazaran daha yoğundur ve bu nedenle de mekanik olarak daha kuvvetlidir. Bu iki dokunun bağıl yoğunluk ve bazı mekanik özellikleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Sağlıklı insan kemiğinin bağıl yoğunluk ve mekanik özellikleri [7].

	Kanselöz kemik	Kortikal kemik	
		(Boylamasına)	(Enlemesine)
Bağıl yoğunluk	0.05 – 0.7	0.7 – 1.8	
Uzama (%)	5.7	1 – 3	
Elastik modül (Gpa)	0.1 – 0.5	17 – 30	7 – 13
Maks. çekme dayanımı (MPa)	2 – 20	130 – 150	50 – 60

Bu özellikler cins, yaş, beslenme alışkanlıkları ve anatomik lokasyona göre değişebilir. Hastalıklı kemik ise genellikle daha düşük yoğunluğa ve daha zayıf mekaniksel dayanıma sahip olur.

2.1.3. Kemik Biçimlenmesi ve Kemik Hücreleri

Kemik hasar gördüğü zaman rejenere olma özelliğine, yük binme durumları değiştiği zaman ise yeniden biçimlenme özelliğine sahiptir. Örnek verecek olursak artan egzersiz ve sportif aktivite sonrası yük binen bölgelerdeki kemik mineralizasyonu artar ve kemik kırılma ve çatlamalara karşı daha dayanıklı hale gelir. Bu yüzden kemiğin yapılanmasında görevli hücrelerin koordinasyonun anlaşılması önemlidir.

Kemik boyut, şekil, pozisyon ve mekanik özellikleri yaşam süresi boyunca değişen, farklı fiziksel aktivite ve yük binimlerine cevap veren bir organdır. Aşırı mekanik kuvvet altında kemiğin yeniden yapılanma süreci aktif hale geçer. Bu süreçte osteoblast (kemik oluşumunu başlatan) , osteosit (kemik yapısını oluşturan) ve osteoklast (kemik resorpsiyonunu sağlayan) olmak üzere 3 hücre tipi görev alır.

Osteoklastlar kemik matriksinde bulunan büyüme hormonları, sitokinler ve proteinler tarafından aktive edilerek eski kemiğin resorpsiyonuna başlar. Daha sonrasında ise osteoklast ve/veya osteositlerden salgılanan insülin benzeri büyüme hormonu I ve II ile aktif hale gelen osteoblastlar süreçte rol almaya başlar ve kalsiyum içeren mineralleri depolar. Osteositler de bu süreçte insülin benzeri büyüme hormonu I, II ve doku büyüme faktörü β gibi biyomolekülleri sağlayarak osteoblastların kalsiyum depolamayan hücrelerden kalsiyum depolayan hücrelere farklılaşma oranını düzenler [8].

2.1.3.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar kemiğin periosteal ve endosteal yüzeyinde bulunurlar ve boyutları da 10 – 50 mikrometre arasında değişir. Bir implantasyon sonrasında implant cihazına yapışan osteoblastlar çoğalır ve Tip 1 kolajen, vitronektin ve fibronektin için gerekli olan gen ekspresyonları gerçekleşir. Proliferasyon sonrası ekstrasellüler matriks gelişimi ve olgunlaşması başlar ve osteoblastlar kalsiyum depolayan hücrelere doğru farklılaşırlar. Alkalen fosfataz aktivitesi osteopontin, kolajenaz gibi proteinler için gerekli olan mRNA ekspresyonları da birkaç kat artar. Alkalen fosfataz (ALP) vücutta çoğunlukla karaciğer ve kemikte bulunur ve defosforilasyon mekanizmasında rol alarak hızlı kemik büyümesi sırasında aktiviteleri artış gösterir. Mineralizasyon başladığında ise osteoblastlar kemik sialoprotein ve kalsiyum bağlayıcı protein olan osteokalsin proteinlerini sentezler.

2.1.3.2. Osteositler

Osteositler mineralize kemik matriksine gömülmüş ve yeni kemik oluşumuna osteoblastlar kadar olmasa da bir miktar katkıda bulunan olgunlaşmış osteoblastlardır. Osteoblastlara göre en önemli farklılıkları kemikte buldukları lokasyonun farklı oluşudur. Kemik yaprakçıkları ve osteon lumenlerinin merkezleri arasında yoğun olarak bulunurlar. Kanalikül adı verilen ve bitişik osteositler ile etkileşimde bulunmak üzere yapılan dallanmış boşluklara sahiptirler. Bu üç boyutlu yapılanmaya sahip oldukları için fizyolojik kuvvet ve gerilmelere karşı cevap olarak kemiğin osteoblastik ve osteoklastik sürecini başlatarak yeni kemik oluşumu veya eski kemiğin resorpsiyonunu sağlarlar.

2.1.3.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar kemik iliğindeki pluripotent hücrelerden farklılaşarak Howship aralıkları adı verilen boşluklarda bulunurlar. Kemik resorpsiyonunda görev alan osteoklastlar 100 µm civarındaki boyutları ve 100 e varan çoklu çekirdek sayıları sayesinde diğer kemik hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilir. Bozunacak kemik bölgesine sızan osteoklastlar öncelikle kıvrımlı bir membran yapısı oluşturarak yüzey alanlarını artırırlar ve sonrasında tartarat dirençli asit fosfatazları üreterek karbonik anhidraz sistemi üzerinden hidrojen iyonlarını serbest bırakır ve lokal bölgede pH düşüşünü sağlarlar. Düşen pH ile beraber HA kristalleri ile kemik matriksinin organik bileşenlerinin çözünürlüğü artar ve sonrasında da asidik proteolitik sindirim ile ortadan kaldırılır.

2.2. Kemik İmplantları ve Kullanımlarında Karşılaşılan Sorunlar

Çatlak, kırık ve diğer kemik defektlerinde otogreft, allogreft, ksenogreft ve metalik implantlar kullanılmıştır; ancak bu malzemeleri mükemmel olmaktan uzak kılan ve her biri için değişen çeşitli spesifik problem ve kısıtlamalar bulunmaktadır.

2.2.1. Otogreftler

Otogreft uygulamaları, aynı bireyin iskelet sistemindeki bir parçanın çıkarılarak hasarlı bölgeye transfer edildiği uygulamalardır. Genellikle kalça krestindeki kanselöz dokudan alınan uygulamalar yoğun olmakla beraber bazı uygulamalarda kompakt kemik de tercih edilebilir. Kemik iyileşmesi ve rejenerasyonu için gerekli olan osteojenik hücrelerin ve temel osteoindüktif faktörlerin eldesini sağladığı için

otogreft uygulamaları tarihsel olarak altın standart kabul edilmiştir; ancak donör bölgesindeki oluşan morbidite uygulamayı ciddi biçimde limitler.

2.2.2. Allogreft ve Ksenogreftler

Aynı türden doku transplantasyonu sonucu gerçekleşen allogreft ve farklı türlerden gerçekleşen doku transplantasyonu uygulaması olan ksenogreftler sonucunda farklı problem ve limitasyonlar görülmektedir. Bunların başlıcaları hastalık yayılma riski ve sıklıkla görülen immün sistem cevabıdır [9,10].

2.2.3. Metaller ve Metal Alaşımları

Otogreft, allogreft ve ksenogreftlerin yukarıda sayılan dezavantajları yüzünden metal ve metal alaşımları gibi sentetik malzemelerin sayısız ortopedi uygulamasında kullanımı uzun zamandır tercih edilen bir seçenek olmuştur. Metal ve metal alaşımları da gerçek kemik dokusu gibi fizyolojik, dinamik ve mekanik özelliklere sahip olmadıkları için sağlıklı bir kemik gibi davranamazlar.

Günümüzde ortopedik implantlarda kullanılan metalik malzemelerin bazı fiziksel ve mekanik özellikleri Çizelge 2.2.'de özetlenmiştir. Açıkça görülmektedir ki metalik malzemeler kemikten çok daha yüksek yoğunluğa ve mekanik dayanıma sahiptirler.

Çizelge 2.2. Bazı metalik alaşımların fiziksel ve mekanik özellikleri [7].

	Paslanmaz Çelik (316L)	CoCrMo(F75)	Ti6Al4V
Yoğunluk (g/cm ³)	8	8.3	4.42
Uzama (%)	40	8	10
Elastik modül (Gpa)	193	220	100
Maks. çekme dayanımı (MPa)	485	655	860
Sünme dayanımı (MPa)	172	450	795

Metalik implant ve kemik dokusu arasındaki mekanik özelliklerin uyuşmamasından dolayı “kuvvet perdelemesi” olarak adlandırılan problemler ortaya çıkmaktadır [11]. İmplant materyalinin iyileşme sürecinde kemiği mekanik yük biniminden uzak tutması sonucunda implantı çevreleyen kemikte oluşan resorpsiyon ve bunu izleyen süreçte “implant gevşemesi” adı verilen durum gerçekleşebilir. Bu durum sonucunda ek cerrahi müdahale ile implantın yerinden çıkarılması gerekebilir ve

nekrotik kemik dokusu oluşumu gözlenebilir. Kuvvet perdelemesi sonucu ek olarak yetersiz osseoentegrasyon, yani malzemeye güçlü olarak yapışmayan kemik dokusu da implant gevşemesine yol açabilir. Yukarıda sayılan dezavantajlar sonucu revizyon cerrahisi olarak isimlendirilen ek operasyonlar gerçekleşir.

2.3. Daha İyi İmplantlar İçin Nano Malzemeler

İmplant biyomalzemesinin dizayn ve sentezindeki en önemli nokta doğal kemiğin özelliklerini simule edilebilmesi olup geçmişte kullanılan sentetik konvansiyonel malzemelerden tamamen memnuniyet veren bir sonuç alınamamıştır. Örnek verecek olursak; günümüzde kullanılan ortopedik implantların (kalça, diz, dirsek vb.) ortalama ömrü 10-15 senedir [12,13]. Bu tip konvansiyonel malzemeler (ya da bu malzemelerin boyutları mikron ölçüsünde olan bileşenleri) uzun bir süre kullanımda esas olan kemik rejenerasyonu için gerekli olan hücrel cevabı başlatacak özelliğe sahip değildir. Buna karşın kemik yapısındaki bileşenleri (proteinler, hidroksiapatit vb.) boyutsal olarak taklit edebilen nanofaz malzemelerin kullanımı daha iyi ortopedik implantlar için alternatif bir yaklaşım olabilir.

Birleşik Devletlerdeki Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI) nanoteknolojiyi “malzemeyi atomik, moleküler ve supramoleküler seviyede hedefli ve kontrollü bir şekilde manipüle ederek yapılan görüntüleme, ölçme, araştırma ve üretme” olarak tanımlar. Bu ölçekte çalışılan örneklerin en az bir boyutunun kabaca 1 – 100 nm arasında olması kabul edilmektedir [14]. Bu boyutta malzemeler yığın özelliklerinden farklı fiziksel, kimyasal ya da biyolojik cevaplar verebilmektedir. Büyüklükleri sayesinde nano ölçekteki malzemelerin yığın yapılarında gösterdikleri fiziksel/kimyasal özellikleri değişerek, gelişmiş elektriksel ya da optiksel aktiflik, artmış yapısal bütünlük gibi farklı cevaplar verebilir, bununla beraber artan yüzey alanıyla da daha reaktif bir karakter kazanabilirler [15].

Nanofaz malzemelerin ortopedik implant gelişimi için neden alternatif bir yol olduğunun önemini vurgulamak için aşağıda öncelikle neden daha iyi implantlara gereksinim duyulduğu açıklanmaya çalışılmıştır. İlerleyen başlıklarda nano yapılanmanın hücre fonksiyonlarını manipüle etmesindeki önemli rolü ve daha sonrasında ise nanofaz malzemelerin ortopedide karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında efektif olarak nasıl kullanılabileceği açıklanmaya çalışılmıştır.

2.3.1. Ortopedik Uygulamalarda İmplant İyileştirilmesinin Önemi

Ortopedide implant malzemelerine gereken ihtiyaç yaşlanan nüfus ile birlikte yıldan yıla artmaktadır. Dünyadaki 65 yaş üstü nüfusun 2000 ile 2100 yılları arasındaki dönemde iki kat artacağı ön görülmektedir. Şüphesiz ki bu artış yaşa bağlı olarak gelişen ve bireyin iskelet yapısını güçsüzleştiren osteoporoz rahatsızlığının da artışıyla da beraberinde getirecektir. Öngörülen istatistiklerle göre, Birleşik Devletler'de 2002'de 10,1 milyon osteoporoz hastası varken, 2020'de bu rakamın 14 milyon olması beklenmektedir [12]. Osteoporoz rahatsızlığı ırksal ve etnik kökenlere bağlı olmadığı için diğer dünya ülkelerinde de benzer senaryoların yaşanacağı kesindir.

Osteoporoz, kemik yoğunluğunun ve gücünün azaldığı, kemikte makrogeometri/mikroskopik yapılanma ile mineralizasyon özelliklerinin değiştiği bir hastalık olup, dokuda kırık ya da çatlak olmaksızın kendisini belli etmeyen bir rahatsızlıktır. Çatlaklar ve beraberinde gelişen ağrı, hareketlerde kısıtlama, şekil bozuklukları ve bazen erken ölüme yol açabilir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin sağlık politikalarında yaşlanmakta olan nüfusun yaşam kalitesini arttırmak öncelikli alanlardandır.

Ortopedik implantlara olan ihtiyaç sadece yaşlılığa bağlı olarak artmamaktadır. İnsan hayatındaki modernleşmenin sonucu olarak artan trafik kazaları, spor yaralanmaları, duruş-oturuş bozukluklarının tetiklediği rahatsızlıklar ile de ortaya pek çok iskelet sistemi rahatsızlığı ortaya çıkmaktadır. Rahatsızlıklar sonucunda kemik yoğunluğunda ve kütlelerinde yaşanan azalma ile beraber fiksasyon aletleri dediğimiz metalik (titanyum, tantalum, CoCrMo) ortopedik implantlar ile bölgedeki iskelet yapısı desteklenir. Daha önce de değinildiği gibi bu tipteki metalik implantların ortalama 10-15 yıl olan ömürleri yaşlı hastalar için kısmen uygun olsa da daha genç hastalar için bu süre yeterince uzun değildir.

Bir kemik implantı sadece uygulama bölgesindeki dokunun yerine geçmekle kalmamalı, canlı doku ile bir sistem oluşturarak vasküler doku rejenerasyonuna ve iyileşmeye katkıda bulunmalıdır. Yüzey yeni kemik oluşumunu, damarlanma ve yumuşak doku gelişimini desteklemeli ve var olan kemik ile implant materyali arasında bir köprü vazifesi görerek aradaki etkileşimi ve fiksasyonu güçlendirmelidir. Daha ideali, pasif bir evrede bulunmak yerine doku ile etkileşerek

osteojenik hücrelerin toplanması ve bunların farklılaşarak proliferasyonunu sağlamalıdır.

Aşağıda ortopedik implant başarısızlıklarında sıklıkla karşılaşılan durumlardan en yaygın görülenleri yer almaktadır:

- Temas halinde bulunan kemik ile bağ kurup bütünleşecek implantın yüzeyinde yetersiz kemik hücresi çoğalımı,
- İmplantın çıkıntılı kısımlarında aşınma ile meydana gelen kalıntıların birikmesiyle çevre dokularda meydana gelen kemik hücresi ölümleri,
- İmplant ve çevre doku arasındaki yük ve gerilim dengesizliğinden ötürü meydana gelen implant gevşemesi ve çatlak oluşumları

Bu olumsuzlukların ortadan kaldırılması için kemik implantlarının hızlı bir biçimde kemik rejenerasyonunu indüklemesi ve eksik dokunun oluşması ya da komşu kemiğe hızlıca entegre olması gerekmektedir. Bu yüzden implant yüzeyi özellikle kemik oluşumunu sağlayan osteoblast hücrelerinin kolonizasyonu ve yeni kemik sentezi için elverişli olmalıdır. Başarılı implantlarda, implant-kemik arasındaki boşlukları rejenera kemik hızlı bir biçimde doldurur ve entegrasyon sağlanır.

Kemik ile bütünleşme (osseointegrasyon) süreci her zaman bu doğrultuda gerçekleşmeyebilir. İmplant malzemesi bazen osteoblastlar yerine fibroblastlar tarafından tercih edilerek yüzeyde istenmeyen yumuşak bağ dokusunun oluşmasına neden olurlar. Fibröz yumuşak doku da sert kemiksi dokunun tam tersi olarak ortopedik implant yüzeyinde düzgün olmayan bir fiksasyona yol açar ve gevşeyen implant sonrası operasyon başarısızlıkla sonuçlanır [16]. Ayrıca fibröz dokunun aşırı derecede oluşması osteoblast/osteoklast aktivitelerini de etkileyerek dolaylı yoldan yeni kemik oluşumunu engeller. Erken ve hızlı bir osseointegrasyon sağlayacak malzemenin önemi burada bir kez daha öne çıkmaktadır. Çabuk bir kemik dokusunun oluşumu ile implant-kemik arasındaki birleşim sağlanabilir ve istenmeyen yumuşak doku oluşumunun önüne geçilebilir.

Yukarıda söz edildiği gibi, osteoblast hücrelerinden ilk hücre yapışması, çoğalması, kalsiyum depolamayan hücrelerden kalsiyum depolayan hücrelere farklılaşması gibi pozitif cevapları alabilme yeteneğine sahip, hücresel proseslere duyarlı implant malzemesi elde etmek temel hedeftir. Bunlara ek olarak, implantı

çevreleyen kemiğin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarına devam etmesi için hem osteoblast hem de osteoklast tipi hücre aktivitelerinin koordine bir şekilde devam etmesi gereklidir. Bu önemli spesifik hücresel olaylar yüzünden ortopedi alanında implant dizayn ve sentezi “deneme-yanılma” yaklaşımından, hücreleri tanıyan ve istenilen cevabı alma kapasiteleri maksimum seviyelere sahip biyomalzeme yüzeylerinin elde edilmesine doğru kaymıştır.

2.4. İmplant Yüzeylerinin Hücreler ile Etkileşimleri

Osteoblast veya farklı hücrelerin implant yüzeyine yapışmasından önce kemik iliği, kan gibi vücut sıvılarındaki proteinler ile etkileşir. Bu sebeptendir ki, proteinler implant yüzeyine ilk olarak adsorbe olur ve sonrasındaki hücre yapışmalarını da böylelikle kontrol ederler [17]. Kan plazması gibi vücut sıvılarındaki fibronektin ve vitronektin gibi spesifik proteinler istenen hücrelerin implant yüzeyine yapışma, farklılaşma ve gelişimine aracılık ederler [18,19]. Bazı çalışmalarda yüzeyin serbest enerjisi, kimyasal kompozisyonu ve muhtelif başka özelliklerinin adsorbe edilecek protein tipini etkileyeceğine yönelik bulgular elde edilmiştir. Örnek verilecek olursa fibronektinin tercihen kalsiyum fosfat kaplı biyoaktif cama, kaplanmamış biyoaktif cam yüzeyinden daha fazla tutunduğu görülmüştür [20]. Ek olarak osteoblastların da tercihen adsorbe olmuş proteinlerin arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) spesifik amino asit sekanslarına ve heparin sülfat bağlanma bölgelerine yapıştıkları da bilinmektedir [21]. Buna göre yüzeye tutunan proteinlerdeki spesifik bölgelerin hücre membranlarındaki integrin reseptörleri ile etkileşmelerinin hücre yapışmasına kritik bir etkisi olduğu bilinmektedir. Bu yüzden kemik oluşumunun etkinliği implantın fiziksel özellikleri ve kimyasal kompozisyonu gibi yüzey karakteristiklerine doğrudan bağlıdır. Bu karakteristikler istenen (osteoblast) ve istenmeyen (fibroblast) hücrelerinin yapışmasına da aracılık ederler. Protein etkileşimini ve sonrasında gerçekleşecek hücre yapışmasını kontrol etmek akıllı implant dizaynına yön verirken implantın yüzey kimyası ve topografisini değiştirmek ilk basamak olarak görülebilir.

2.4.1. İmplant Kimyası

Yeni nesil implant malzemelerinin geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde kullanılan malzemeler arasında metaller (CoCrMo alaşımı, titanyum ve alaşımları), seramikler (alumina, titanya, zirkonya, hidroksiapatit), polimerler (poliüretan,

polietilen, polilaktik-ko-glikolik asit [PLGA]) ve simule vücut sıvısında kalsiyum ve fosfat ile mineralize edilmiş kolajen gibi biyolojik kökenli malzemeler bulunmaktadır. Bu sayılan malzemelerden optimal özelliklerde bir implant dizaynı henüz gerçekleştirilmemiştir. Örnek verecek olursak; ortopedide kullanılan metallere yüzeyleri işlem görmemiş olanları, özellikle titanyum, yüzeyinde yumuşak fibröz doku gelişimine sebebiyet vererek daha az kemik dokusu üretilmesine ve zayıf osseoentegrasyona yol açmaktadır [22].

Diğer taraftan küçük boyuttaki kemik hasarlarında kullanılmak üzere direkt ya da büyük kapsamlı sorunlarda kullanılacak olan metalik malzemeler üzerine kaplama şeklinde tatbik edilen seramiklerin kemik protez uygulamalarında daha başarılı performans sergiledikleri gözlemlenmiştir. Başta kalsiyum fosfat tuzları olmak üzere kullanılan pek çok seramiğin osseoentegrasyon sürecinde görev alan proteinleri (ör. fibronektin ve vitronektin) seçici olarak adsorplayarak başlangıç hücre tutunmasını seçici olarak arttırdığına dair bulgular literatürde mevcuttur [22].

Polimerler ile yapılan çalışmalarda da umut verici sonuçlar alınmıştır. Örnek olarak Ca^{2+} ile muamele edilmiş ve vitronektin tutturulmuş polistirenin osteoblast fonksiyonlarını arttırarak kontrol gruplarına göre daha biyoaktif bir karakterde olduğu görülmüştür [23].

Örneklerden de anlaşılacağı gibi biyomalzemedeki farklı kimyasal kompozisyonlar ile osteoblast fonksiyonları manipüle edilebilmektedir. Günümüze kadar da yüzey kimyasının değiştirilmesi, ortopedik implantların performanslarının geliştirilmesi çalışmalarında birincil inceleme konusu olarak çalışılmıştır. Ancak yine de yapılan bu çalışmalar sonucunda genel geçer bir sonuç alınamamış ve yapılan yüzey değişimleri kemik rejenerasyonu konusunda bir altın standart olarak kabul edilmemiştir.

2.4.2. Topografi

Araştırmacıların implant performansını artırma amacıyla denedikleri yöntemlerden biri de yüzey pürüzlülüğüyle oynamaktır. Titanyum implantların aşındırma, kumlama ya da mikrometre boyutundaki parçalarla kaplanması ile yüzeylerinde meydana getirilen mikron ölçekli (<10 μ m) pürüzlülüğün yapışma, proliferasyon, alkaline fosfataz üretimi ve kalsiyum içeren mineral depolanması gibi osteoblast fonksiyonlarını arttırdığı rapor edilmiştir [24,25]. Yukarıda sayılan yüzey

modifikasyon işlemlerinden pek çoğu günümüzde ortopedik implant marketine girmiştir. Mikropürüzlülüğe ek olarak mikroporöz yüzeye sahip titanyum osteoindüktif bir etki gösterirken mikroporöz bir yapılanma göstermeyen titanyumun kemik oluşumunu indüklediği görülmüştür [26]. Titanyumun tanecik ve parçacık büyüklüğü ile ilgili yapılan başka çalışmalarda da bağıl olarak daha düz yüzeylere göre pürüzlü yüzeylerde osteoblast fonksiyonların arttığı gözlemlenmiştir. Bir önceki konu başlığında değinildiği üzere yüzey kimyasının ya da implant malzemesinin olarak değiştirilmesi genel geçer olarak değerlendirilmezken, yüzey topografisinde yapılan pürüzlülüğü artırıcı yöndeki modifikasyonların implant verimini arttırdığı herkes tarafından kabul görmektedir.

Yüzeydeki pürüzlülük yine de osteoblastların vücut içerisindeki alışık oldukları pürüzlülük derecesiyle uyuşmamaktadır. Kemik dokusunun kendisi nano boyutta yapılanmış bileşenlerden oluştuğu için yüzeylerin mikron pürüzlülüğünden ziyade nanometre pürüzlülüğe sahip olması için gerekli formülasyonlar üzerinde çalışılması yani başka bir deyişle yüzey bileşenlerinin en az bir boyutunun 100 ve altı nanometreye sahip elemanlardan oluşması herhangi bir malzemedan oluşan implantların etkinliğini arttıracaktır.

2.5. Yeni Bir Yaklaşım: Nanofaz Yüzeyler

Kemik dokusunun nano boyuttaki organizasyonuna daha önceki başlıklarda da değinildiği üzere inorganik (kemik mineralleri) ve organik (kolajen fibriller) bileşenleri doğal nanomalzemelerdir ve osteoblast hücrelerinin etkileşmeye alışık oldukları boyutlar nano ölçekte. Daha efektif ortopedik malzemeler için kullanılan yaklaşımlardan birisi de doğal kemik dokusunun kompozisyon ve mikroyapısını taklit eden sistemler geliştirmektir.

Biyolojik ölçeğin bu boyutta olmasından ilham alınarak nanofaz malzemelerin implant dizaynında kullanılması son yıllarda artan bir ivmeyle yaygınlaşmıştır. Nanopürüzlülüğe sahip herhangi bir yüzey materyalinin kemik protezlerinde gösterdiği etkinin iyileşmesi de aynen mikropürüzlülükte olduğu gibi genel geçer bir olaydır ve alınan cevap mikro skalaya göre daha iyidir. Osseoentegrasyonun konvansiyonel ve mikro pürüzlülüğe nazaran nanopürüzlülüğe sahip yüzeylerde daha hızlı gerçekleştiği konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Örnek verecek olursak boyutları 4 – 50 nm arasında olan alumina nanofiberlerin bir araya

getirilmesi ile elde edilen plakalarda kültüre edilen osteoblastların konvansiyonel tanecik boyutuna sahip alumina plakalarda kültüre edilen osteoblastlara göre ilk yapışma, alkalın fosfataz aktivitesi ve kalsiyum depolama fonksiyonlarının daha gelişmiş olduğu bildirilmiştir [27]. Bu çalışmada bir diğer ilginç bulgu olarak da kullanılan malzemenin geometrik formunun da osteoblast fonksiyonlarına yaptığı etkidir. Nanofibrillerden oluşan plakadaki osteoblastların, 23 nm çapa sahip alumina nanoküreler kullanılarak yapılan plakalardan oluşan başka bir çalışma grubundaki osteoblastlara göre fonksiyonlarının daha da arttığı gözlemlenmiştir. Alumina nanofiberlerin yapısal olarak nanohidroksiapatit – kolajen nanofiberlere daha çok benzediğinden ötürü kemik protezlerinde taklit edilmesine daha başarılı olabileceği hipotezine varılmıştır.

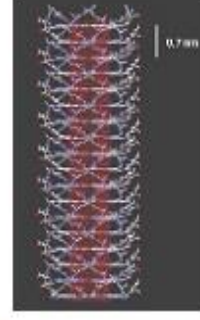
Nanofiber yapıların kemik rejenerasyonundaki önemine başka çalışmalarda da değinilmiştir. Titanyum üzerine spiral sarmal yapısında bulunan organik nanotüp yapıları kaplanan örneklerin kaplanmayan titanyum örneklere oranla osteoblast adezyonunu arttırdığı rapor edilmiştir [28]. Spiral sarmal yapıdaki nanotüpler kemik komponentlerinin boyutlarını taklit eden organik yapıdaki yeni nesil malzemelerdir. Bu bağlamda, geleneksel olarak kullanılan titanyum metalinin yüzeyine söz konusu spiral malzeme ve benzerlerinin kaplanması ile biyoaktif bir karakter kazandırılabilir.

Kalsiyum içeren mineral depolamasını arttıran nanoyapılar ile yapılan çalışmalara nanofaz metaller, karbon nanofiberler/nanotüpler, seramik ve polimerlerin nanokompozitler örnek olarak verilebilir [29-31]. Osteoblast fonksiyonlarını arttırıcı yöndeki bu çalışmaların hepsinde de görülen iyileşme kullanılan malzemeye bağımlı olmaksızın yüzeyde yaratılan pürüzlülüğün sonucudur.

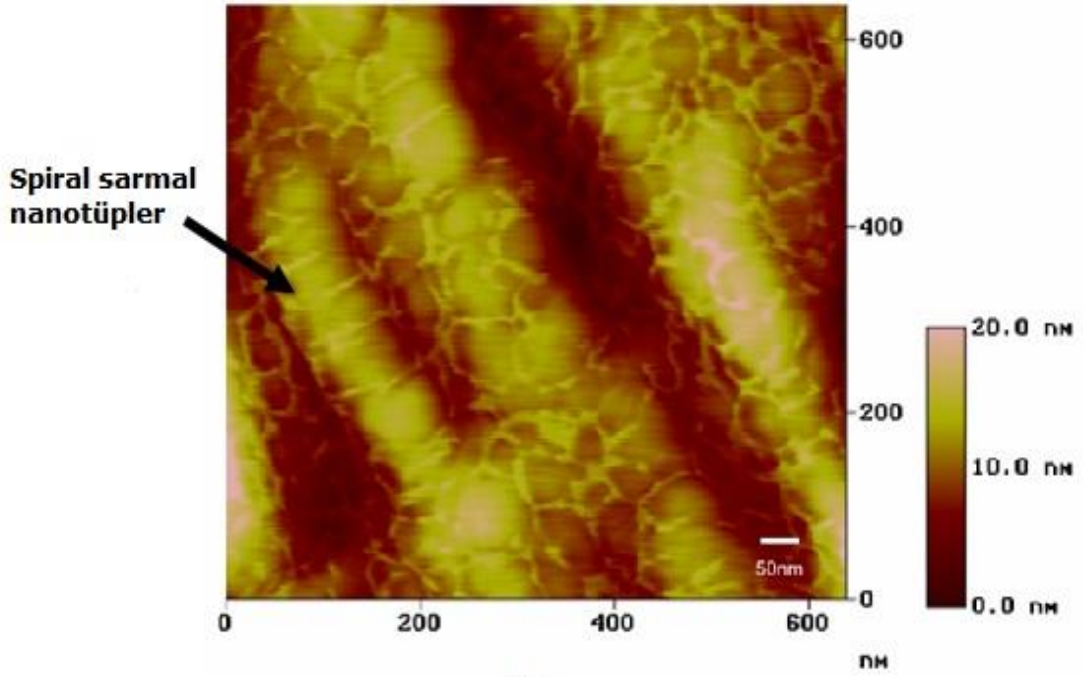


Kesit görünümü

(a)

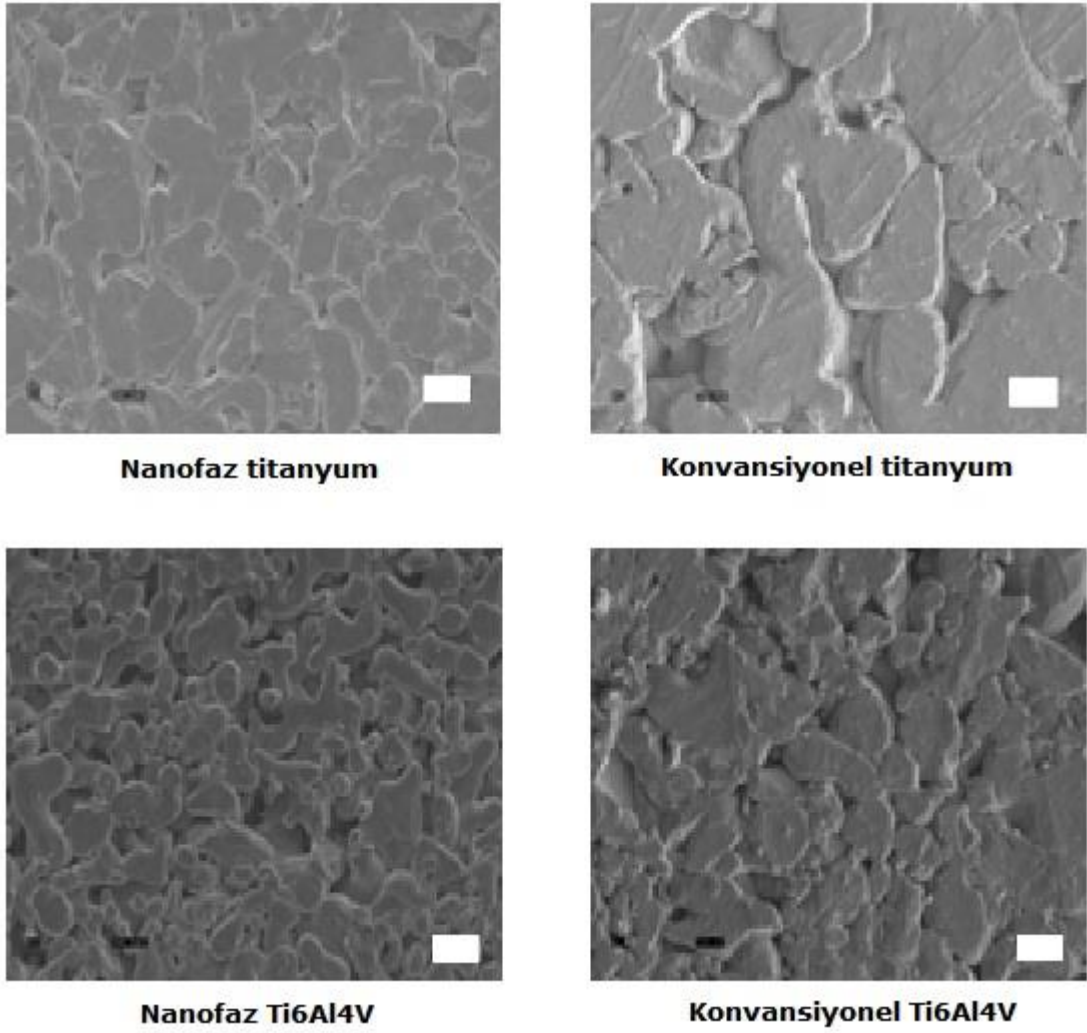


Boydan görünümü



(b)

Şekil 2.3. Spiral sarmal nanotüpler. Yapının kesit (sol) ve boydan (sağ) görünümleri (a) ; yapının titanyum yüzeye kaplama sonrasında alınan atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri (b) [28].



Şekil 2.4. Konvansiyonel ve nanofaz titanyum yüzeylerin karşılaştırılması. Beyaz çubuklar konvansiyonel malzemelerde 10, nanofaz malzemelerde ise 1 mikrometre boyutundadır. Kemik hücresi fonksiyonlarının nanofaz malzemelerde söz konusu kimyaya sahip malzemelerin konvansiyonel örneklerine oranla arttığı bildirilmiştir [29].

2.5.1. Nanofaz Yüzeyler ve Protein Etkileşimleri

Daha önce de sözü edildiği gibi yeni kemik oluşumunda optimal seviyede yüzey özelliklerinin dizaynı gerekmektedir. Nanofaz malzemelerin de ortopedik implantlarda kullanımının ne şekilde olacağı ve ne konuda yararlar getireceği önemlidir. Öncelikle yüzeyin başlangıçtaki proteinler ile etkileşmesinin öneminden ötürü, değişen yüzey özellikleri ile beraber hücresel aktivitenin de etkileneceği açıktır. Bu bağlamda nanofaz malzemelerin konvansiyonel malzemelere göre

proteinlerle seçici olarak daha efektif bir şekilde etkileşeceği ve bunun da osteoblast fonksiyonlara yansıtacağı düşünülmüştür.

Son çalışmalar da nanofaz malzemeler ile etkileşen fibronektin ve vitronektin gibi osteoblast aktivitelerini yönlendiren spesifik proteinlerin yüzey tutunmaları ve konformasyonlarının (biyoaktifliklerinin) daha iyi olduğunu göstermektedir [32]. Aynı polimerik malzemeden (poli-L-laktik asit) elde edilen yapılardan nanofibröz doku iskelelerinin, yekpare bir membrana karşın fibronektin ve vitronektinin de aralarında bulunduğu proteinleri daha fazla adsorpladığı bildirilmiştir [33]. Burada artan yüzey alanı ve madde taşınımı ile protein adsorpsiyonunda bir artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda nanofaz malzemelerdeki değişen yüzey enerjisi de proteinler ile etkileşimi arttırmaktadır.

Bunlara ek olarak protein biyoaktifliğinin nanofaz malzemeler üzerinde konvansiyonel malzemelere göre daha fazla olduğuna yönelik bulgular da mevcuttur [19,34]. Özellikle hücre yapışmalarını yönlendiren ve yapışma peptitleri olarak bilinen RGD sekansının vitronektin proteininin nanofaz seramikler ile etkileştiği durumlarda daha fazla açıkta kaldığı rapor edilmiştir. Bunun sebebinin nanofazdaki malzemenin protein ile boyutsal olarak daha kolay etkileşebildiği ve de yine boyutun bir etkisi olarak yüzeyin daha fazla ıslanabilmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

2.5.2. Nanofaz Yüzeyler ve Islanabilirlik

Malzemelerin tanecik boyutları nanometre boyutlarına düştüğü zaman pek çok yüzey özelliği de beraberinde değişim göstermektedir. Wen ve Yan'ın yaptıkları bir çalışmada tanecik boyutları 2 mikrometre – 2 nanometre aralığında değişen seramik malzemelerin tanecikler arası hat kalınlıkları ile bu araların hacme oranları ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 2.3'te özetlenmiştir [35].

Çizelge 2.3. Konvansiyonel ve nanofaz seramik malzemelerin tanecik aralıklarının kalınlık ve hacim yüzdeleri [35].

	Konvansiyonel	Nanofaz			
Tanecik boyutu (nm)	2000	20	10	4	2
Aralık kalınlığı (nm)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Aralık/Hacim oranı (%)	0.09	9.0	18.0	42.6	80.5

Tablodan da anlaşılacağı gibi malzemenin tanecik yapısı nanoboyuta indiğinde ve boyutlar küçüldüğünde taneciklerin aralık/hacim oranı giderek artmaktadır. Ek olarak, nanofaz malzemelerin yüzey alanları artmakta ve elektron dağılımları da değişmektedir [36]. Proteinlerin de yüklü nanoparçacıklar olduğunu düşünürsek, yüzeyde meydana gelen boyutsal değişimlerin yüzey enerjisini değiştireceği ve hücre yapışmasını yönlendiren proteinlerin yüzey ile etkileşimini etkileyeceği sonucuna varabiliriz.

Alüminanın tanecik boyutu azaldıkça ıslanabilirliğin de arttığı bilinmektedir. Bununla paralel olarak osteoblast yapışmasını teşvik eden bir protein olan vitronektinin de nanofaz seramiklere tutunmasının artan ıslanabilirlikle çoğaldığı not edilmiştir [37].

Benzer olarak nanofaz seramikler kullanılarak elde edilen polimer seramik kompozit yapılarında, nanofaz seramik kullanılmayanlara göre kemik hücresi fonksiyonlarının arttığı bildirilmiştir. Nanoboyutlu titanya parçacıklarının PLGA polimeri ile karıştırılması ile elde edilen kompozit yapılarının konvansiyonel titanya kullanılarak elde edilen aynı kompozit yapılara göre daha hidrofilik olduğu ve hücre yapışmasını daha çok tetiklediği rapor edilmiştir [38]. Malzemelerdeki daha ıslanabilir bir yüzey oluşturma çabaları metal yüzeyler üzerinde de etkili sonuçlar vermiştir. Titanyum, Ti6Al4V alaşımı ve CoCrMo metalik yüzeyler üzerinde yapılan bir çalışmada da osteoblast farklılaşmasının bir parametresi olan kalsiyum depolamanın her malzemenin nanofaz yapıda olanı ile arttığı bulunmuş ve aynı zamanda kalsiyum depolamanın da artan ıslanabilirlik ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği, dolayısıyla osteoblastların farklılaşmasına etki ettiği sonucuna varılmıştır [29].

2.6. Titanyum

Titanyum metali hava ya da oksijen içeren bir ortamda bulunduğunda üstünde kendiliğinden oluşan ince bir oksit tabakası tarafından korunmaktadır. Bu oksit tabakası yaklaşık 2 – 5 nm kalınlığında olup titanyum ve titanyum alaşımlarının çok bilinen korozyon direnci özelliğinden sorumludur [39]. Daha önce de sözü edildiği üzere ortopedik ve dental implant uygulamalarında biyouyumluluğu ve mekanik özelliklerinden dolayı sıklıkla tercih edilen bir malzeme olmakla beraber

yüzeydeki doğal oksit tabakası kemik dokusu ile direkt bir bağlanma oluşturacak kadar aktif değildir ve implantasyon başarısızlıkla sonuçlanabilir.

Titanyum yüzeyin implant uygulamaları için iyileştirilmesi (topografik, kimyasal, yüzey enerjisi) konusunda mekanik yöntemler (ör.: kumlama), kimyasal muameleler (ör.: asit aşındırma) ve kaplamalar (ör.: plazma sprey) gibi farklı yaklaşımlar denenmiştir [40-43]. Bu konvansiyonel yaklaşımlar sonucunda optimum mikroölçekli yüzey pürüzlülüğünün yaratılması, daha uygun yüzey kimyasının oluşturulması ve kemik hücreleri tarafından daha çok tercih edilen morfolojinin eldesi gibi çıktılar ile hücrelerle daha iyi bağ kurabilen implantlara ulaşılabilmektedir. Ancak sayılan yöntemlerden hiçbirinde yüzey topografisinin tam anlamıyla kontrol edilebildiği söylenemez. Daha da fazlası yöntemler sonucunda potansiyel olarak yüzeyde kalıntıların olabileceği ihtimali de vardır. Bu yüzden alternatif yüzey modifikasyon tekniklerine ihtiyaç vardır.

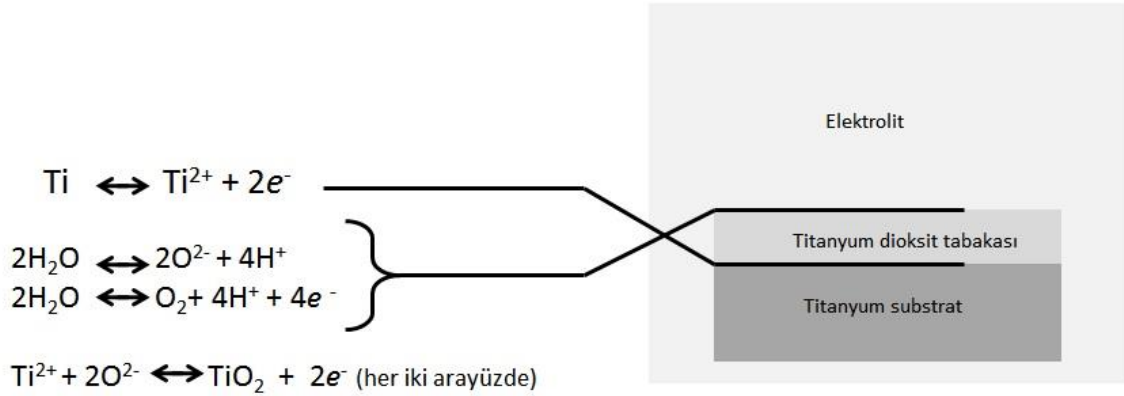
Modifikasyonlara ek olarak simule vücut sıvısı ya da plazma spreyi yöntemi ile kemik ile bağlanmayı güçlendirecek hidroksiapatit ya da diğer kalsiyum fosfat tuzlarının yüzeye kaplanması metotları da sıklıkla tecrübe edilen yaklaşımlardandır [44-47]. Ancak kaplanan inorganik malzemelerin de yüzeye zayıf bir adezyon gösterebilmesi nedeniyle de kaplama etkinliği uzun dönemde başarısızlık gösterebilir.

Anodizasyon ya da anodik oksidasyon olarak bilinen ve bir elektrokimyasal yöntem olan teknikle metalin korunması amaçlı yüzeyde koruyucu oksit tabakalar oluşturulabilmektedir. Bu yöntem ile özellikle son on yılda ortopedik implantlar üzerinde gelişimlere açık yeni yüzeyler elde edilmektedir.

2.6.1. Titanyumun Anodik Oksidasyonu

Tipik bir anodik oksidasyon prosedüründe alkalın temizleme, asit aktivasyonu ve elektrolit ile anodizasyon bulunmaktadır. Temizleme sonrasında yüzeyde bulunabilecek organik safsızlıklar giderildikten sonra asit aşındırma ile aktivasyon basamağına geçilir. Bu basamakta nitrik asit ve hidroflorik asit karışımı kullanılarak yüzeyde bulunan doğal oksit tabakasının giderilmesi sağlanır. Anodizasyon işlemi ise titanyum metalinin anot, karşıt platin elektrotunun katot olarak kullanıldığı bir elektrokimyasal hücrede gerçekleşir. Anot ve katot arasında sabit bir potansiyel gerilim uygulandığı zaman oksidasyon ve indirgeme reaksiyonları sonucu anot

yüzeyinde bir oksit tabakasının oluşması gözlenir. Anot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonlar Şekil 2.5.'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Anot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonlar

2.6.1.1. Anodizasyon Parametrelerinin Etkisi

Anodizasyon sonucu elde edilen oksit tabakasının nanometre pürüzlülük, morfoloji ve kimyasal bileşim gibi özellikleri işlem esnasında uygulanan potansiyel, akım yoğunluğu, elektrolit kompozisyonu, pH ve sıcaklık gibi parametreler ile geniş bir skalada değişkenlik gösterebilir. Hidroflorik asit, fosforik asit, sülfürik asit, nötral tuz çözeltileri ve alkalın solüsyonlar titanyum anodizasyonunda sıklıkla kullanılan elektrolitlerdir. Elektrokimyasal oksit tabakasının gelişimi konusundaki detaylı bir çalışma Sul ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır [48]. Genel olarak kullanılan tüm elektrolitler arasında sülfürik asit çözeltisi ile yapılan proseslerde anodik oksidasyon kalınlığının en fazla olduğu gözlemlenmiştir ve asidik elektrolitlerin alkalın elektrolitler ile karşılaştırıldığında oksit tabakası oluşturma kapasitelerinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Fosforik asit ve sülfürik asit temelli elektrolitler yüksek voltajlarda kullanıldığında onlarca mikron kalınlığında ve mikrometre pürüzlülük seviyesinde tabakalar elde edilmektedir. Buna karşın geçtiğimiz son on senede florür iyonu içeren çözeltiler ile yapılan çalışmalarda ise biyolojik olarak uyumlu nanotübüler yapıların elde edildiği rapor edilen çalışmalar oldukça çoktur [49-52].

Anodizasyon prosesi sabit voltaj (potansiyostatik) ya da sabit akım (galvanostatik) olarak gerçekleştirilebilmektedir. Proses esnasında eğer uygulanan voltaj değeri oksitin dielektrik çöküm değerini aşarsa, oksit tabakası daha fazla büyüme ve

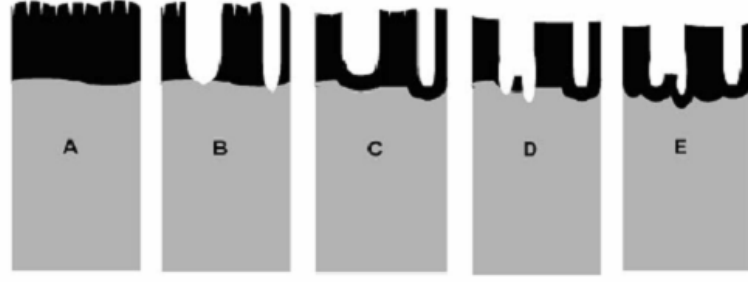
akımın akışına karşı koyamaz ve tabakadan ark şeklinde boşalimler baş gösterir. Bu yöntemde Mikro Ark Oksidasyonu adı verilir. Fosforik asit ve Sülfürik asit için bu çöküm değerleri sırasıyla 80 ve 100 V olarak hesaplanmıştır [53]. Çöküm limitinden aşağı değerlerde anodik oksit tabakası ince ve genellikle poröz olmayan yapıdadır.

Proses parametrelerinde oksit oluşumuna etki eden bir diğer parametre de sıcaklıktır. İşlemde sabit sıcaklık homojen bir yüzey eldesi için sabit olarak tercih edilir. Artan sıcaklık kimyasal olarak oksit tabakasının çözünmesini hızlandırdığı için poröziteyi arttırsa da tabakanın tamamen yüzeyden ayrılmaması için düşük tutulması gerekmektedir.

2.6.1.2. Mikro Pürüzlü Yüzey Oluşumu

Titanyum metalinin anodizasyon ile modifikasyonu 1930'lu yılların başında keşfedilmiş ve ortopedik implantların osseoentegrasyonunu arttırmak için de 1960'larda çalışılmaya başlamıştır. Mikro Ark Oksidasyonu tekniği kullanılarak yapılan bu çalışmalar mikro poröz bir yüzey eldesi ile sonuçlanmıştır. Bu teknikte anot yüzeyinde oluşan yeni oksit tabakası akıma karşı bir dielektrik bariyer olarak yer alır ve dielektrik çöküm noktasına kadar büyümeye yani kalınlaşmaya devam eder. Genel olarak anodizasyon tabakası çatlaklar, defektler yüzünden tek boyulu birikmeyen oksit tabakası homojen değildir. Uygulanan potansiyel arttırıldıkça zayıf noktalarda meydana gelen dielektrik çökümleri neticesinde ark boşalimleri meydana gelir. Bu lokal zayıf noktalarda sıcaklık birkaç bin Kelvin dereceye ulaşabilir ve yüzeyde aynı zamanda lokal erimeler de baş gösterebilir. Bu termal etkiden dolayı yüzeydeki zayıf noktaların artmasıyla daha küçük lokal bölgelerde yukarıdaki mekanizma yinelenir. Mikro poröz yüzeyin oluşma mekanizması Şekil 2.6'da açıklanmıştır.

Temel olarak anodik filmin büyümesi içinde bulunduğu elektrolitin etkisine göre değişen bir oksit filminin oluşumu ve oksit çözünmesi arasındaki bir denge sonucu gerçekleşmektedir. Elektrolitin etkisi, konsantrasyon, uygulanan voltaj, akım yoğunluğu ve pH gibi diğer sistem parametreleri ile farklılık gösterir.



Şekil 2.6. Çöküm potansiyelinin üzerinde poröz titanyum oksit oluşumunun şematik diyagramı: (A) Maksimum kalınlığa kadar oksit büyümesi, (B) Oksit boşalımı ile por oluşumu, (C) Por uçlarının oksit büyümesi ile pasivizasyonu, (D) Pasivize olmuş uçlardan oksit boşalımı, (E) Por uçlarının tekrar pasivizasyonu [53].

2.6.1.3. Nano Pürüzlü Yüzey Oluşumu

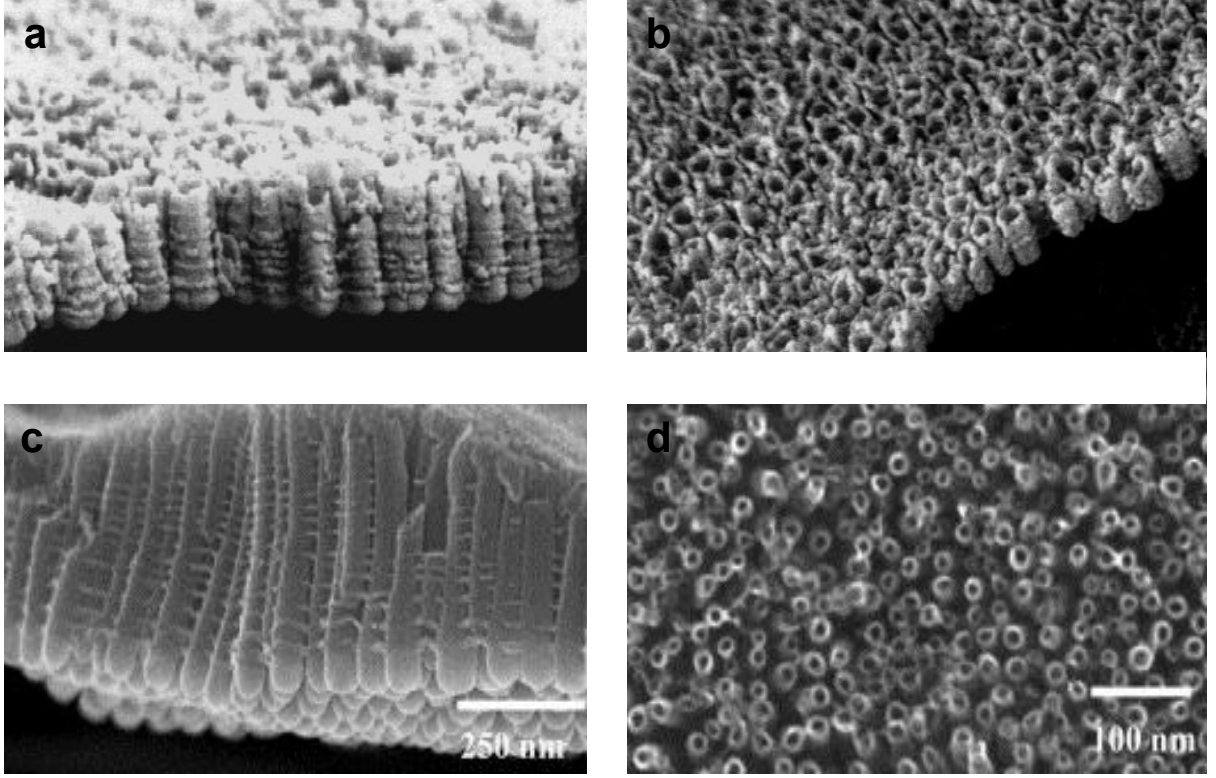
Mikro poröz titanyum yüzeylerin fabrikasyonu ve üretimi iyi bilinen prosesler olmakla birlikte anodizasyon ile yapılan çalışmalar özellikle biyomalzeme olarak kullanılan titanyumun biyoyumunun artırılması ve hücrealtı boyutta mimetik bir yüzey elde edilmesi için nanometre seviyelerinde çalışmalara ağırlık verilmiştir. Nanoporöz yüzeylerin 10 – 40 V aralığında anodizasyon sonrasında titanyum üzerinde elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmalarda elektrolit olarak florür içeren çözeltilerin kullanıldığı ve çalışılan voltajın da dielektrik çöküm değerinin altında olduğu rapor edilmiştir. Bu sınırlayıcı parametreler ile yapılan örnek araştırmalarda 60 – 4400 nm arasında kalınlığa sahip ve çapları da 20 – 500 nm arasında değişen tüp formunda oksit tabakaları elde edilmiştir (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Farklı kalınlık ve boyutlara sahip nanotübüler titanya tabakalarına örnek çalışmalar

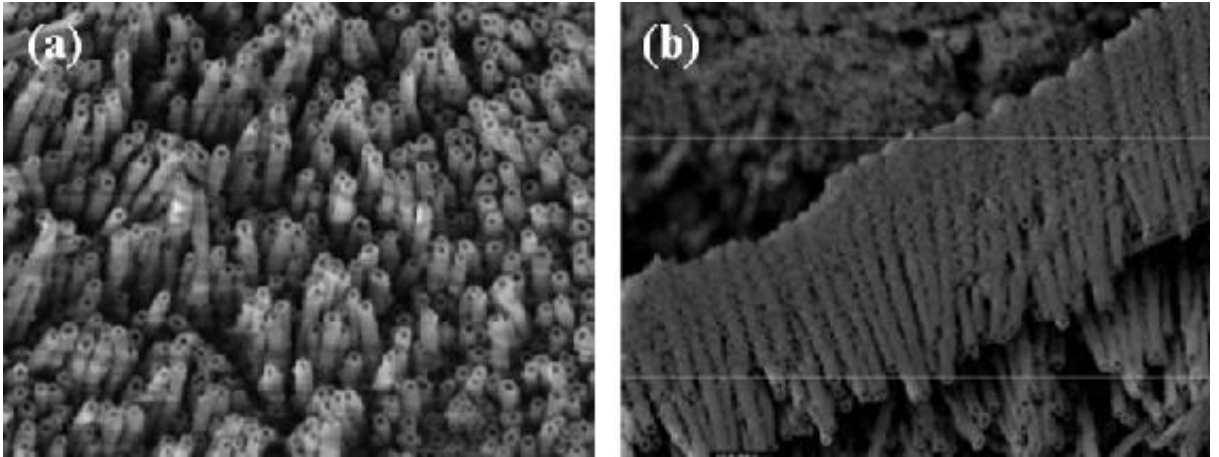
Elektrolit Bileşeni	Voltaj (V)	Zaman (saat)	Kalınlık(nm)	Por çapı (nm)	Referans
CH ₃ COOH ve 0.5M HF	10	4	60	500	[53]
0.5 – 1.5% HF	10 – 40	<1	250	25 – 65	[49]
0.5 % HF	10 – 23	<1	300	22 – 76	[50]
KF ve NaF	25	20	4400	115	[54]
1M H ₂ SO ₄ ve 0.15% HF	30	24	540	140	[51]
CH ₃ COOH ve 0.5% NH ₄ F	20	1	200	30	[52]
1M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1MH ₃ PO ₄ ve 0.5%HF	20	40	4070	50	[55]

Nanoporöz titanya yapıların düşük voltajlarda eldesindeki florür iyonunun gereksinimi ilk defa 1999 senesinde Zwilling ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir [56]. Ancak titanyumun seyreltik hidroflorik asit çözeltisinde (ağırlıkça 0.5 – 1.5%) 10 – 40 V aralığında anodizasyonu sonucu oluşan nanotübüler yapılar ilk kez 2001 senesinde Gong ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [49] (Şekil 2.7. a ve b). Çalışmada aynı zamanda oluşan nanotüp yapılarının çaplarının uygulanan voltaj ile; tabaka kalınlıklarının yani nanotüp uzunluğunun ise anodizasyon süresi ile arttığı görülmüştür. Beranek ve arkadaşları da HF/H₂SO₄ elektrolit sistemi kullanarak 24 saatlik anodizasyon sonrasında 140 nm çapına sahip ve 540 nm kalınlıkta nanotüp tabakaları elde etmişlerdir [51]. Bununla beraber benzer yüzeylerin eldeleri aynı zamanda organik elektrolitler ile de mümkündür. Tsuchiya'nın çalışmasında asetik asit ve amonyum florürün susuz karışımlarından oluşan elektrolit ile elde edilen nanotübüler yapılar sentezlenmiştir [52] (Şekil 2.7. c ve d). Bu örnek verilen çalışmalarda oksit tabakasının kalınlığı birkaç yüz nanometreyi geçmemektedir. Literatürde bulunan ve çeşitli elektrolitler ile gerçekleştirilen farklı çalışmalarda ise kalınlıkları birkaç mikrometreye kadar ulaşabilen titanya oksit tabakaları rapor edilmiştir. Cai ve arkadaşlarının pH değeri 4.5 olan KF ve NaF sulu çözeltilerini kullanarak yaptıkları anodizasyon uygulamalarında titanyum oksit tabakasının 4 mikrometre kalınlığı aştığı gözlemlenmiştir [54](Şekil 2.8). Yine aynı grubun yaptığı bir başka çalışmada ise titanya yüzey kalınlığının DMSO/etanol/HF elektroliti kullanıldığında 2.3 mikrometreye ulaştığı rapor edilmiştir [57].

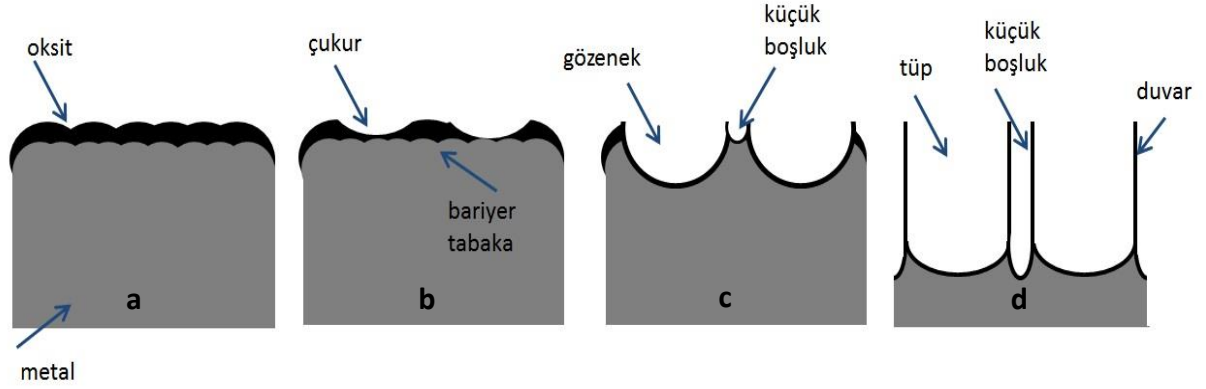
Kimyasal çözünme, alan-destekli çözünme ve oksidasyon florür elektrotlu anodizasyondaki 3 temel reaksiyondur. Bunların arasında alan-destekli çözünme titanya nanotüp yapılarının oluşumunda en ağır basan mekanizma olarak kabul görmektedir. Mor ve arkadaşlarının çalışmasında titanya nanotüplerin oluşum mekanizmasını nokta defekti modeli ile açıklamışlardır. Başlangıç porlarının oluşumu zayıf noktalarda meydana gelen lokalize çözünmeler ile olduğu ve anodize olmayan metalik kısımların da porlar arasında yer aldıklarını belirtmişlerdir [50]. Sonrasında ise bu gözenekler arasındaki bölgelerde alan-destekli oksidasyon/çözünme ile küçük boşluklar oluşmaktadır (Şekil 2.9.). Bu boşlukların gelişimi gözenekler ile dengeye geldiğinde nanotüp yüzey formları son şekillerini almaktadır.



Şekil 2.7. Nanotübüler tiyanya yapılarına literatürden örnekler. Seyreltik HF elektrolit kullanılarak 20 V voltajda elde edilen titanya yüzeylerin yandan ve üstten görünüşleri (a ve b) ; Amonyum florür/asetik asit kullanılarak 20 V voltajda elde edilen titanya yüzeylerin yandan ve üstten görünüşleri (c ve d) [49;52].



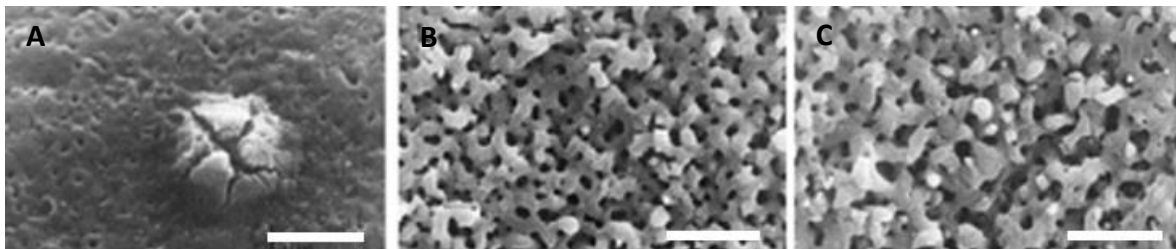
Şekil 2.8. DMSO/etanol/HF elektrolitinde 20 V ve 70 saat boyunca anodizasyon sonucu elde edilen yüzeyler. (a) yukarıdan ve (b) yandan görüntüleri (Ruan et al., 2005).



Şekil 2.9. Nanoporöz yüzeyin florür içeren elektrolitler içinde ve sabit voltajda oluşma mekanizması. (a) oksit oluşumu, (b) konkav bölgelerde çukur benzeri oluşumlar, (c) alan- destekli çözünme ile gözenek oluşum büyümesi ve gözenekler arası kalan küçük boşluklar, (d) gözenek ve küçük boşluk büyümesinin dengeye ulaşmasıyla ortaya çıkan nanotüp yüzeyler

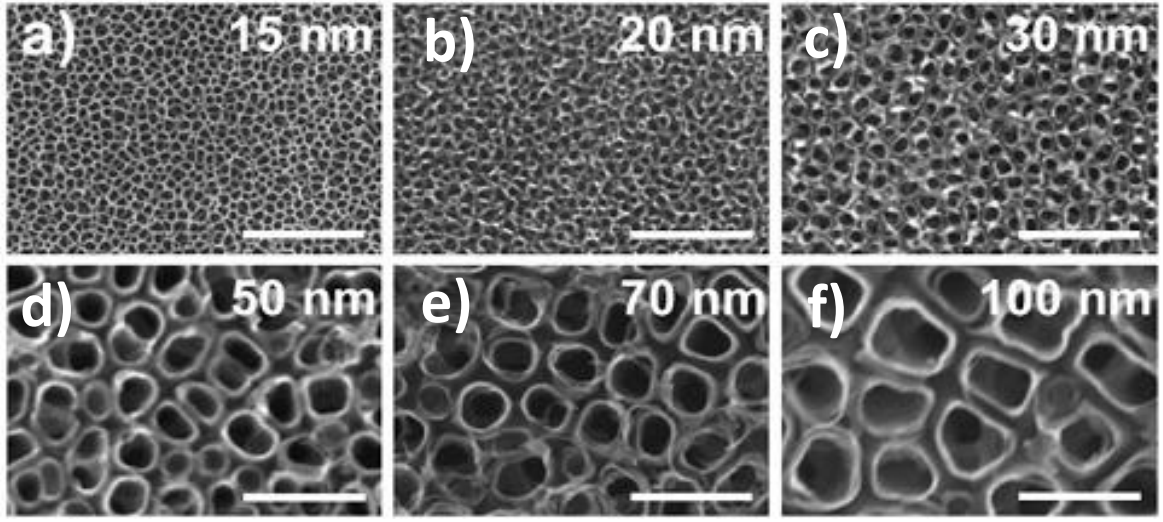
2.6.2. Anodize Titanyum Oksit Yüzeylerin Yapıları ve Özellikleri

Mikro ark oksidasyonu ile elde edilen titanya tabakalar oldukça pürüzlü, gözenekli bir dokuya sahip ve yer yer mikrometre seviyesinde çatlaklara sahip formdadır [58] (Şekil 2.10.). Gözenek boyutları proses parametrelerince değişkenlik gösterebilir. Birkaç yüz nanometreden birkaç mikron çapına değişen gözenekler ile birlikte tekdüze bir yapılanma gözükmez. Bununla beraber tüm gözenek ve boşluklar birbiri ile bağlantı halinde bulunmaktadır. Gözenek şekilleri çoğunlukla yuvarlak olmakla beraber düzgün değildir. Gözenek çapı ve film pürüzlülüğünün akım yoğunluğu, uygulanan potansiyel ve elektrolit konsantrasyonu arttıkça daha da artma eğiliminde olduğu rapor edilmiştir [59,60] ve oksit filminin kalınlığı da onlarca mikrometreyi bulabilir.



Şekil 2.10. Mikro ark oksidasyon yönteminde uygulanan voltajın artmasıyla elde edilen yüzeylerin değişimi. 1M H₂SO₄ elektrolit içinde ticari titanyum filminin (A) 90 V, (B) 155 V ve (C) 180 V potansiyel uygulandığı zaman artan pürüzlülük ve büyüyen porlar. Beyaz çubuk 2 mikrometreyi göstermektedir [60].

Nanotübüler titanyum oksit yüzeylerde ise uygulanan voltaj artsa da oldukça düzenli bir yapılanma söz konusudur (Şekil 2.11.). Gözenek çapının değişimi birkaç on nanometreden 100 – 200 nanometre arasında sınırlanmıştır ve uygulanan voltaj ile doğru orantılı olarak artış gösterir [61]. Yüzeydeki nanotübüler yapıların kalınlığı birkaç yüz nanometre olsa da pH ve elektrolit bileşimi kontrol edilerek bu uzunluk birkaç mikrometreye kadar çıkarılabilir. Tüm yapılanma tekdüze olarak kabul edilse de substrat yüzeyinde herhangi bir yüzeysel defekt ile nanotüp yapılarında bağlı değişimler görülebilir.

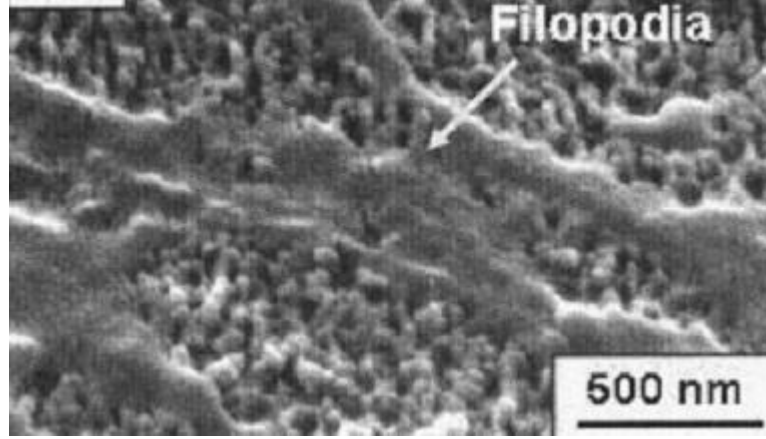


Şekil 2.11. Nanotübüler titanya tabakanın flor içeren elektrolit ile anodizasyonunda uygulanan voltajın artmasıyla elde edilen yüzeylerin değişimi. 1M H₃PO₄ elektrolite ağırlıkça %0.3 HF eklenmesiyle elde edilen elektrolit içinde ticari titanyum filminin (a) 1 V, (b) 3 V, (c) 5 V, (d) 10 V, (e) 15 V ve (f) 20 V potansiyel uygulandığı zaman artan nanotüp çapları. Beyaz çubuk 200 nanometreyi göstermektedir [61].

2.6.3. Anotlanmış Titanyumun Biyolojik Özellikleri

İmplant uygulamalarında sitouyumluluk, anotlanmış yüzeylerin mekanik özellikleri kadar önemli bir parametredir. Anodizasyon sonrası titanyum nanotübüler yüzeyler ile hücrelerin etkileştirildiği pek çok çalışma literatürde mevcuttur. Kemiğin doğal çevresini taklit eden nano yapılanmanın morfolojik ve boyut olarak kemik hücresi fonksiyonlarının gelişmesinde bir avantaj sağlayıp sağlamadığı bu çalışmalarda incelenmiştir. Oh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MC3T3-E1 osteoblast öncül hücreleri ile yaptıkları çalışmada değişen topografi ve yüzey karakteri ile başlangıç hücre yapışmasında ilk 48 saatte %300 değerinde artış gözlemişlerdir [62].

Kurulan hipotez ve destekleyici elektron mikroskop görüntülerine göre, hücre filopedilerinin nanotüp yapılarının içine doğru penetrasyonu sonucu daha kenetlenmiş bir yapı ortaya çıkmış ve yine nano yapılanma ile artan yüzey alanı da bu olayı desteklemiştir (Şekil 2.12.). Benzer şekilde Gong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da osteoblast adezyonunun 4 saat sonrasında anotlanmış titanyum yüzeylerde daha fazla olduğu ve artışın yüzeylerde yaratılan nanopürüzlülük ile paralellik gösterdiği rapor edilmiştir [49]. Osteoblast hücrelerinin 20 V potansiyel gerilimde 20 dakika boyunca anotlanarak elde edilen nanotübüler yüzeylerde daha çok yayıldıkları gözlemlenirken, düz yüzeylerde daha yuvarlak şekilde kalmıştır. 4 haftalık kültür sonrasında da kalsiyum birikmesi yine nanotübüler yüzeyde daha fazla olmuştur.



Şekil 2.12. Etkileştirildikten 2 saat sonra nanotüp yapıları ve osteoblast filopedilerinin titanya yüzeydeki kenetlenme yapısı [62].

Fibronektin ve vitronektin proteinleri osteoblast yapışmasında görev alan en önemli iki proteindir ve nanotübüler yüzeylere adezyonları osteoblast yapışmalarını da artırır [63]. Anotlanmış titanyum yüzeylerde hem fibronektinin hem de vitronektinin adsorpsiyonu anotlanmamış titanyum yüzeylere sırasıyla %15 ve %18 oranında daha fazla gerçekleştiği rapor edilmiştir. Proteinin artan nanopürüzlülük ve yüzey alanıyla artış göstermesi, başlangıç hücre yapışmasının artmasının başlıca nedenlerindedir [58].

Boyutları doğal kemik bileşenleri ile örtüşen bir yüzeye sahip anotlanmış titanyum yüzeyinde (40 – 60 nm boyutlarındaki hidroksiapatit kristalleri) kültüre edilen osteoblastların ilk yapışma, alkalen fosfataz aktivitesi, kollajen sentezi ve kalsiyum depolama gibi hücrel fonksiyonlarının anotlanmamış titanyuma nazaran daha fazla olduğu bilinmektedir [64,65]

2.7. Ekstrasellüler Matriks

İnsan vücudundaki dokular temel olarak iki bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenlerden ilki tüm metabolik olayları düzenleyerek hayatı idame ettiren hücreler olup diğer bileşen ise hücrelerin içinde bulunduğu biyomakromoleküllerdir. Hücre dışında bulunan bu biyomakromolekül ağ örgüsüne ekstrasellüler matriks (ECM) ismi verilmiştir ve ECM yapıları her doku tipine özgü olup kompozisyonları farklılık göstermektedir. Farklı dokulardaki ECM bileşenleri ve esas görevleri Çizelge 2.5.'te özetlenmiştir.

ECM bileşenleri doku hacminin büyük bir kısmını oluşturmakla beraber başlıca 50 ila 500 nm çapa sahip fiberlerden oluşarak dokunun geometrik şeklini de oluştururlar [66]. Dinamik, üç boyutlu polisakkarit ve doğal biyopolimerlerden oluşan ECM bileşenleri, destekledikleri hücreler tarafından devamlı sentezlenir, düzenlenir ve modifiye olurlar. Hücre-ECM etkileşimi, dokulardaki organizasyonun oluşumu, hücrelerin dokuya özgü morfoloji ve fenotip kazanmasını ve bunun korunmasını sağlar. Hücre yapışması, göçü, gelişmesi, farklılaşması ve apoptoz olaylarının hepsi hücre ve ECM arasındaki sinyal aktarımları tarafından kontrol edilir. Tüm bunlara ek olarak büyüme faktörleri ve biyosinyal molekülleri de ECM içinde saklanabilir ve prematüre bozulmalardan korunabilir ya da ECM üzerinde hücre reseptörleri için birer “bağlayıcı bölge” olarak bulunabilir [67,68].

Çizelge 2.5. ECM'deki temel bileşenler, buldukları yerler ve görevleri

Bileşen	Bulunduğu yer	Fonksiyon
Kolajen	Çeşitli dokular	Doku mimarisinin anahtar bileşenlerinden, çekme-gerilme dayanımı sağlar, hücre-matriks ve matriks-matriks etkileşimlerini sağlar.
Elastin	Yüksek elastik dokular (akciğer, kan damarı, deri)	Doku mimarisinin anahtar bileşenlerinden, elastisite sağlar
Proteoglikanlar	Çeşitli dokular	Hücre-matriks ve matriks-matriks etkileşimlerini sağlar, hücre çoğalması ve göçünde rol alır.
Hyaluronan	Çeşitli dokular	Hücre-matriks ve matriks-matriks etkileşimlerini sağlar, hücre çoğalması ve göçünde rol alır.
Laminin	Bazal membranlar	Membran temel bileşeni, hücre göçünde rol alır.
Fibronektin	Çeşitli dokular	Hücre-matriks ve matriks-matriks etkileşimlerini sağlar, hücre çoğalması ve göçünde rol alır.
Fibrinojen	Kan, yara iyileşme bölgeleri	Hücre çoğalma ve göçünde rol alır, hemostazda görev yapar.
Çeşitli adezyon molekülleri	Çeşitli dokular	Matirkste hücre yapışmasını ve membranlar arası haberleşmeyi yönetirler.

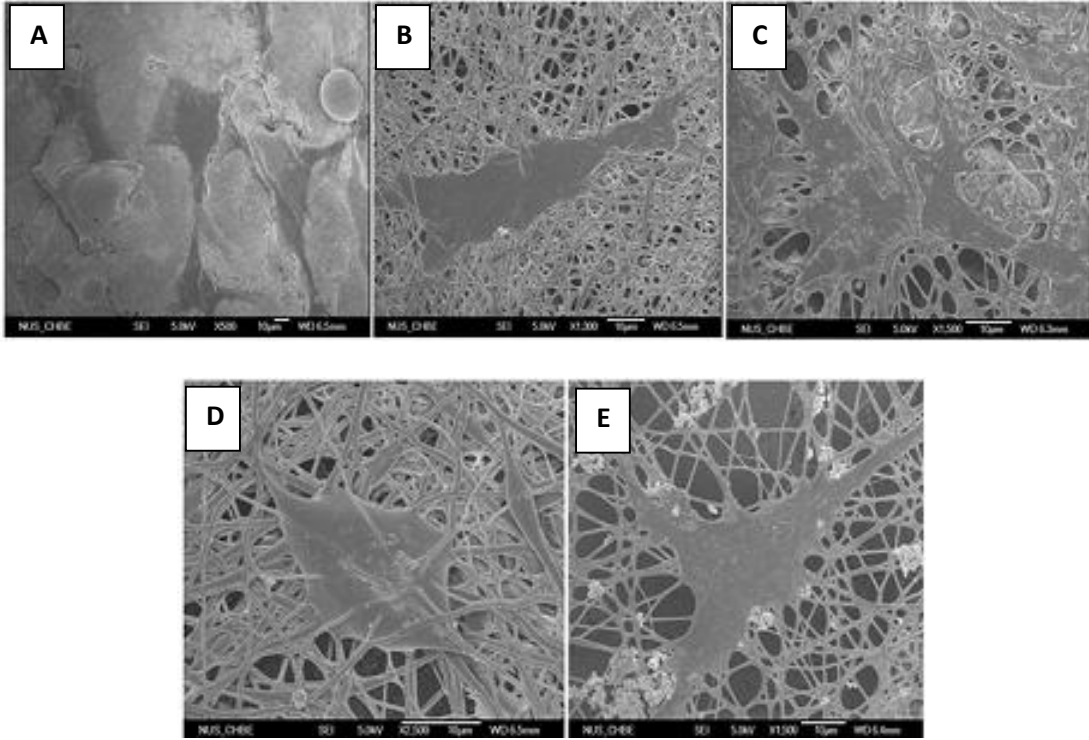
2.7.1. ECM Benzeri Yüzey Modifikasyonları

Ekstrasellüler matriks benzeri yüzey modifikasyonları, malzeme biyouyumunu artırıcı yönde umut vaat eden modifikasyon yöntemlerindedir. Temelinde biyopasif bir malzeme olan titanyum üzerinde osseoentegrasyonu hızlandırıcı yönde yapılan iyileştirmelerin bir türü de farklı malzemeler ile ekstrasellüler matriks benzeri bir organizasyonu yapısal ya da boyutsal bir şekilde taklit etmektir. Yakın zamanda ortopedik ve dental uygulamalarda kullanılmaya başlanan biyoaktif

moleküllerin titanyum yüzeylere immobilizasyon çalışmaları büyük ilgi uyandırmıştır ve immobilizasyon yaklaşımları olarak da pasif adsorpsiyon, silikat ile bağlama, kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ve ardışık tabaka kaplamalar denenmiştir [69-71]. Titanyum yüzey üzerinde metalin kendi yığın yapılarını değiştirmeden yapılan biyobozunur polimerik ince film kaplamaların biyouyumluluğu arttırdığı ve efektif bir modifikasyon olduğu pek çok çalışmada rapor edilmiştir [72,73].

İdeal bir kemik implantı çevre dokular ile aktif olarak etkileşimde olup olabildiğince fazla kemik hücresi ile etkileşmeli ve osteojenik kök hücrelerin farklılaşmasını tetiklemelidir. Bu fenomen yeni nesil biyomedikal malzeme araştırmalarının temelidir [72]. Bu bağlamda metal yüzeyinin ECM'yi taklit edebilecek kaplamaların geliştirilmesi öncelikli bir yüzey modifikasyon araştırma konusudur. İmplantasyon sonrası implant yüzeyinde hücreler arası iletişim, biyosinyal transferi ve nutrient iletimi için hazır olan bir ağ yapısının mümkün olması ile implant yüzeyi mekanik yığın özelliklerini kaybetmeyerek ekstra fonksiyonlar kazanabilir [74].

Bu fonksiyonu metal yüzeyine kazandırabilmek için ECM analogları olarak biyopolimerler kullanılabilir. Elektroforetik biriktirme, elektroçirme, matriks destekli lazer buharlaştırma gibi metalin yığın yapısına zarar vermeyen teknikler kullanılarak, kitosan, PLGA, heparin, ipek fibroin gibi biyomakromoleküller yüzey fonksiyonizasyonlarında kullanılmıştır [74-76]. Ravichandran ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada elektroçirilmiş PLGA ve PLGA/kollajen nanofiberlerle kaplanmış yüzeylerde, kontrol titanyum yüzeylere göre başlangıç hücre tutunma sayılarında ve proliferasyon oranlarında artış gözlenmiştir. Her iki nanofiber tipine de hidroksiapatit çöktürülmesi sonrasında ise insan mezenkimal kök hücrelerin ALP aktivitelerinde kontrol ve hidroksiapatit katkılanmamış fiber yüzeylere göre anlamlı artışlar rapor edilmiştir ve hücrelerin ECM benzeri nanofiber ağ yapısına entegre oldukları gözlenmiştir [74](Şekil 2.13.).



Şekil 2.13. ECM benzeri nanofiber ağ yapılarında mezenkimal kök hücre morfolojileri (A) İşlem görmemiş titanyum, (B) Titanyum - PLGA nanofiber, (C) Titanyum - PLGA-kolajen nanofiber, (D) Titanyum - PLGA-HA nanofiber, (E) Titanyum - PLGA-kolajen-HA nanofiber yapıları[74].

2.8. İpek Fibroin ve Sert Doku Uygulamalarında Kullanımı

İpek yüksek kristaliniteye sahip, elastik, güçlü, dayanıklı ve çekme-sıkıştırmada dirençli bir biyopolimerdir. İpeği oluşturan bileşenlerden fibroin yüzyıllardır tekstil endüstrisinde gerilim dayanımı nedeniyle kullanılmakta olup son yıllarda ise yüksek biyouyumluluğu sayesinde biyomalzeme ve doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilen bir malzeme olmuştur. Doğal ipekte iki bileşen olup bir fiber yapısında fibroin zinciri ve bunu kaplayan serisin tabakası bulunmaktadır. Serisin, fibroinin aksine immun cevabı uyaran, yapışkan sakız benzeri bir proteindir ve seyreltik tuz çözeltisinde ısıtma ile kolaylıkla fibroinden ayrıştırılarak su fazına alınabilir.

İpek fibroin sırasıyla 350 kDa ve 25 kDa ağırlıklarında, birbirine disülfid bağı ile bağlanmış ağır ve hafif zincirlerden oluşan bir protein yapısındadır. Fibroinin dayanıklılığı, yavaş degradasyon oranı, iyi su buharı ve gaz geçirgenliği, minimum enflamasyon uyarması ve pek çok şekil ve geometride malzemeler oluşturulabilmesi biyomalzeme çalışmalarında onu tercih edilen bir malzeme yapmaktadır. Termal olarak da vücut içinde oldukça stabildir ve bu stabilitesini

250°C'ye kadar korur. Elektroğirme, membran dökme ya da film şeklinde hazırlanan formları vasküler, kemik ve ligament doku mühendisliğinde sayısız uygulamalara sahiptir. İpek fibroin ve hidroksiapatit kompozit yapısının üç boyutlu yapılar ve kaplamalar şeklinde sert doku mühendisliği alanında pek çok çalışmada uyumu ve kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

Cai ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yüzeylerinde ipek fibroin/kitosan ardışık tabakalı ince film kaplamalar olan titanyum yüzeylerdeki osteoblast tutunması, çoğalması ve alkalen fosfataz aktivitelerinin kaplama olmayan titanyuma göre daha fazla olduğu bildirilmiştir [72]. Elektroğirme yöntemi kullanılarak kemik morfojenetik protein – 2 (BMP-2) ya da nano hidroksiapatit katkılanmış ipek fibroin nanofiberlerin in vitro kemik oluşumu ve kök hücre farklılaşmasını hızlandırdığı da bilinen bir etkidir [77].

2.9. İmplant Enfeksiyonları

Titanyum temelli implantların kullanılmasında kimi zaman karşılaşılan bakteriyel enfeksiyon (osteomyelit), lokal enflamasyon, kemik harabiyeti gibi çeşitli komplikasyonlar ortaya çıkabilir [78,79]. İmplantasyon başarısızlığına yol açan bu tip komplikasyonlar arasında periimplantit enfeksiyonları en sık karşılaşılan durumlardan bir tanesidir [80,81]. İmplant operasyonu sonrasında genel enfeksiyon görülme oranı %0,5 - %5 arasında değişirken, revizyon cerrahisi sonrasında da %14 oranında yeniden enfeksiyon riski ortaya çıkmaktadır [82,83]. Enfeksiyonlar sonrasında tahmini hastabaşı maliyetin 50,000 Amerikan Dolar olduğu öngörülürken, enfeksiyona bağlı ölüm oranı da yaklaşık % 2.5 olarak rapor edilmiştir [84-86].

Protez enfeksiyonları titpik olarak biyofilm oluşturmuş mikroorganizmalar tarafından ortaya çıkmaktadır [87,88]. Enfeksiyon yaratan en yaygın patojenler Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermis* olarak bilinmektedir ve bu sorunların üstesinden gelirken uygulanacak yöntemlerin başında yüksek doz antibiyotik tedavisi gelmektedir [84,89]. Katı sterilizasyon ve aseptik koşullara rağmen cerrahi müdahale esnasında veya daha sonrasında (hematojen yol) implant yüzeyinde bakteriler kolonize olabilirler [90,91] ve biyofilm oluşturan bakterilerin bağışıklık sistemi hücreleri ve antibiyotiklerin penetrasyonuna 10 ila 1000 kat daha dirençli olduğu bilinmektedir [92,93].

2.9.1. Antibakteriyel Madde Yüklü Titanyum İmplantlar

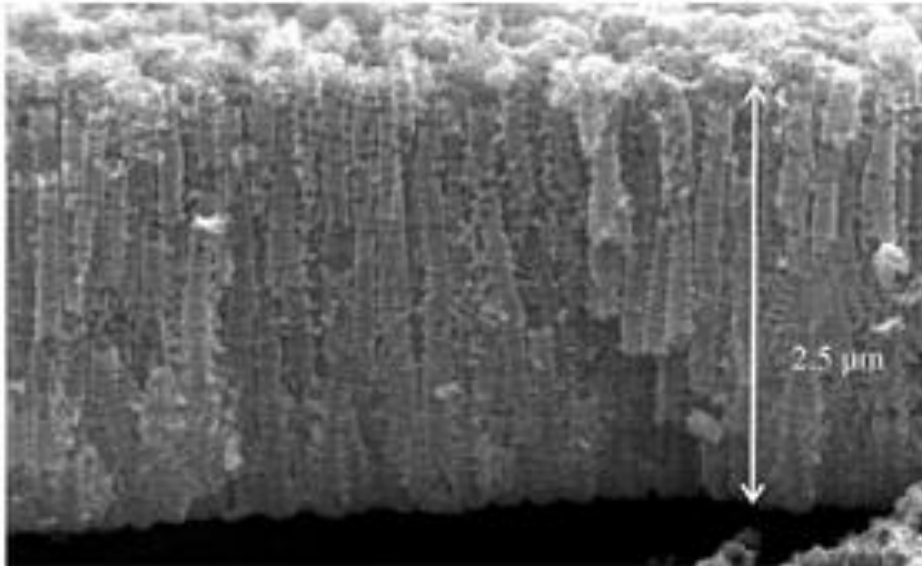
Geleneksel yöntemler ile ilaç tedavisi uygulandığı zaman yaşanacak sistemik zararlardan kaçınmak için ve de oral ya da intravenöz yollar ile alınan ilaç miktarının lokal enfeksiyon bölgesinde istenilen dozda etkinlik gösteremediğinden dolayı implant merkezli bir ilaç salım stratejilerine yoğunlaşmıştır. Konu ile ilgili olarak en sık kullanılan yöntemlerden biri malzeme üzerine ilaç salan bir polimer kullanarak kaplamaktır. Bu yaklaşıma örnek olarak restenoza karşı ilaç salan kardiyovasküler stentler gösterilebilir. Enflamasyon bölgesinde görülen yavaş ve kontrollü salım yukarıda yaşanabilecek dezavantajları ortadan kaldırılabılır ve haftalar sürece salım profillerine ulaşılabilir; ancak polimer degradasyonu ve hatta yüzeyden yırtılması ile bu kez enflamatuvar cevap, fagosit aktivasyonu gibi durumlar ortaya çıkarabilir. Öte yandan ortopedik implantlarda yüzeyin polimer bir tabaka ile kaplanması uygulama açısından sıkıntılara yol açabilir.

Polimer kullanılmadan elde edilebilen ilaç yüklü titanyum yüzeylere olan ilgi özellikle son 5 senedeki çalışmalarda artmıştır. İlaçların anodizasyon sonrasında elde edilen nanotübüler boşluklara yüklenmesi ile birkaç saat ile birkaç hafta arasında değişen sürelerde elde edilen salım profilleri elde edilmiştir [94-97]. Salım süreleri olarak yaşanan bu çeşitliliğe etki eden parametreler arasında yüklenen biyomolekülün hidrodinamik çapı, nanotüp uzunluğu, nanotüp çapı ve yükleme prosedürlerinin farklılıkları bulunmaktadır. Popat ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada basit bir pipetleme ile gentamisin antibiyotiği ile doldurulmuş nanotübüler tabaka üzerinde *S. epidermis* bakteri türünün kolonileşmesinde kontrol grubuna nazaran %40 oranında bir azalma elde edilmiştir [94]. Yükleme prosedürlerinde nanotübüler yüzeylerin polimerik veya seramik tabakalar ile kaplanması sonucu ilaç salım süreleri birkaç hafta mertebesine ulaşabilmektedir [95-98]. Yüzeye ek bir kaplama yapılmadan gerçekleştirilen yükleme işlemleri sonucunda ise metal yüzeyinden salımın tamamlanmasının birkaç gün içinde son bulduğu rapor edilmiştir [97,98]. Salım süresinin uzatılması için yapılacak polimerik veya seramik kaplamaların biyoyumlulukları ve *in vitro* stabiliteleri yapılan çalışmalarda tatmin edici sonuçlar verse de mikrometre kalınlıklarına sahip bu tabakaların implantasyon esnasında ya da dinamik ortamda malzeme yüzeyinden delaminasyonu ve/veya parçalanması olasılığı da bulunmaktadır.

2.9.2. Boy-En Oranı Yüksek Nanotüpler

Herhangi bir bariyer tabaka kullanılmadan gerçekleştirilen ilaç yükleme çalışmalarında salım süresine etki eden en önemli parametrenin nanotübüler yapının uzunluğu, yüklenebilecek ilaç miktarına etki eden en önemli parametrenin ise nanotüp çapı (uzunluk sabit tutulduğunda) olduğu Peng ve arkadaşları tarafından yapılan öncül çalışmada ortaya konmuştur [94].

Bariyer kaplamasız çalışmalarda nanotüp boy-en oranının etkisinin öneminin ortaya konması ile bu özelliğin kontrol edilebilir bir hale gelmesi ilaç salım çalışmaları için öncelikli bir hale gelmiştir. Anodizasyon işleminde yüksek en-boy oranına ulaşmak ya da başka bir deyişle nanotüp boyutunun uzatılması gözenek dip kısmında lokalize bir asidifikasyon yaratıp, gözenek duvar ve çevresinde ise pH değerini daha yüksek tutarak F⁻ iyonları yardımıyla TiO₂ çözünmesinin kontrollü bir şekilde sürdürülmesi ile mümkündür [99]. HF kullanılan elektrolitlerde gözenek oluşumunun sağlanabildiği; ancak bu tabakanın çözünme hızının kontrol edilememesiyle beraber kalınlığının sadece 100-200 nm civarında kaldığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir [49,51]. Polar organik elektrolitlerin ve tampon çözelti sistemlerinin kullanımı ile gözenek diplerinde düşük, gözenek ağzlarında ise daha yüksek pH değerlerine ulaşılması ile uzunlukları mikrometre boyutlarında nanotüplerin eldesi sağlanabilir [99,100] (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14. Yüksek boy-en oranına sahip nanotüp yapılar [99].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışmalarında kullanılan 0,127 mm kalınlığa sahip titanyum metal folyolar (% 99,7 saflıkta) Alfa Aesar ve Strem Chemicals, ABD firmalarından temin edilmiştir. Elektrolit çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan hidrojen florür (HF), nitrik asit (HNO_3), Etilen Glikol ve amonyum florür (NH_4F), Merck, Almanya'dan satın alınmış ve ileri bir saflaştırmaya tabi tutulmamıştır. Model antibiyotik olarak yapılarla yüklenen vankomisin.HCl AppliChem Lifescience, Almanya'dan, ipek fibroin eldesinde kullanılan ipek kozaları Stef Francis, Devonshire, Birleşik Krallık'tan, diyaliz kasetleri Thermo Scientific, Birleşik Krallık'tan, lityum bromür, PBS tabletler Sigma-Aldrich, ABD'den satın alınmıştır.

3.1. Genel Deneysel Çalışmalar ve Karakterizasyonlar

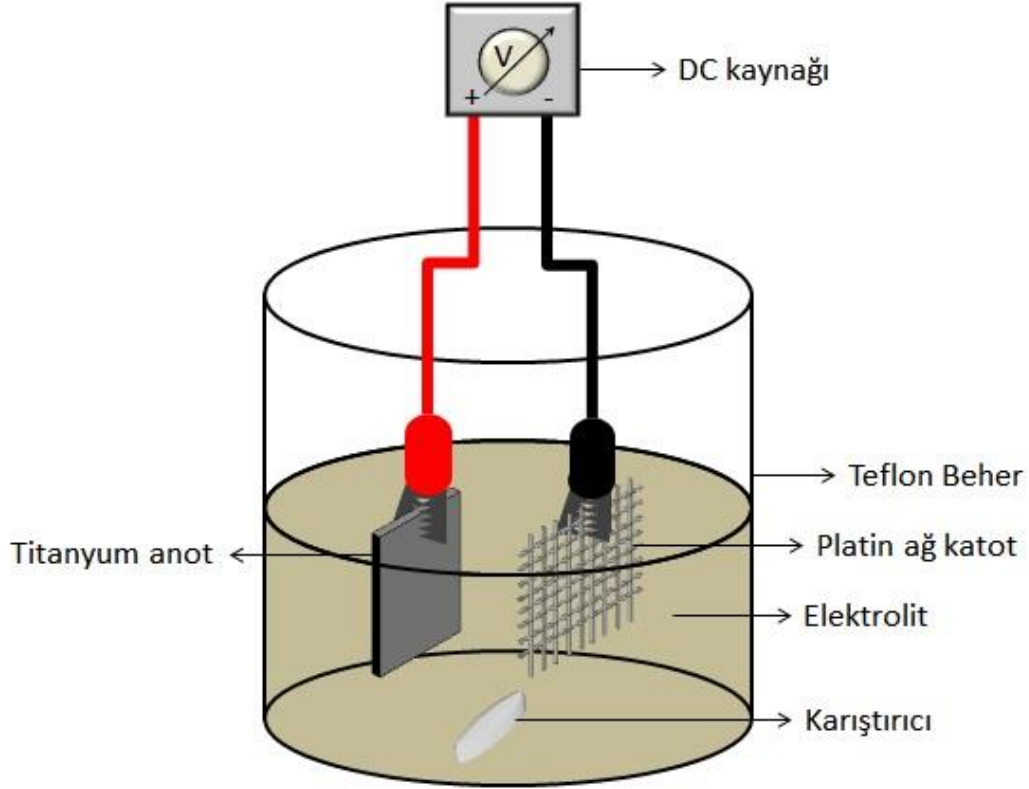
3.1.1. Titanyum Örneklerin Hazırlanması

Titanyum plakalar 1x2 cm boyutlarında kesilerek öncelikle organik safsızlıklardan temizlemek için sıvı deterjan içeren suda 5 dakika, daha sonrasında da %70 lik etil alkol çözeltisi içinde sonikasyon ile 10 dakika boyunca temizlenmiştir. Titanyum folyoların üstünde bulunan koruyucu ve inaktif amorf oksit tabakasının ortadan kaldırılması için metaller çeker ocak altında aşındırma solüsyonu (2% (v/v) HF ; 3% (v/v) HNO_3) içinde 5 dakika bekletilmiştir. Elde edilen metaller deiyonize su ile yıkanarak etüvde 70°C'de kurumaya bırakılmışlardır.

3.1.2. Anodizasyon Düzenegi ve Anodizasyon Prosesi

Anotlama düzenegi; 0-100 V potansiyel fark aralığında çalışabilen bir doğru akım güç kaynağı, kaynağın pozitif ucuna bağlı titanyum (anot), negatif ucuna bağlı platin (katot), elektrolit çözeltisi, manyetik karıştırıcı ve bağlantı elemanlarından oluşmaktadır. Düzenekte anot ve katot plakalar arası 4 cm olarak sabit tutulmuştur. Tez çalışmalarında 0,2 M hidrojen florür çözeltisi (elektrolit 1) ve 0,1M NH_4F içeren etilen glikol (elektrolit 2) olmak üzere 2 farklı elektrolit kullanılmıştır. Elektrolit 1 ve elektrolit 2 ile yapılan denemelerde voltaj ve süre değişimleri dışında bütün parametreler sabit tutulmuştur ve kullanılan parametreler her alt başlıkta belirtilmiştir. Anodizasyon işlemleri 10 – 35 V aralığında önceden belirlenmiş sabit potansiyel farklarında gerçekleşmiş olup anodizasyon süresi de 20 – 80 dakika aralığında değişimler göstermiştir. Proses sonrasında titanyum metalleri deiyonize

su ile yıkanarak daha sonraki aşamalarda kullanılmadan önce etüvde 70°C'de 30 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Deneylerde kullanılan anodizasyon düzeneği

3.1.3. Morfolojik Karakterizasyonlar

Tez çalışmalarında titanyum metallerin tüm morfolojik karakterizasyonları taramalı elektron mikroskopisi (SEM) tekniği ile gerçekleştirilmiştir (Quanta 200 FEG, FEI Instruments, ABD). Analiz edilecek örneklerden sadece titanyum ve anotlanmış titanyum örnekleri söz konusu olduğunda yapıların iletken olmasından dolayı görüntüleme öncesi herhangi bir kaplamaya ihtiyaç duyulmaz iken, üzeri kalsiyum fosfat kaplı, ipek fibroin nanofiber kaplı ve hücre kültürü yapılmış örneklerin görüntüleme öncesinde 5 nm kalınlığında altın ya da krom ince film kaplaması yapılmıştır.

3.1.4. Kimyasal Karakterizasyonlar

Yüzeylerin kimyasal karakterizasyonları Azaltılmış Toplam Reflektans – Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spektroskopisi (NicoletiS5, Thermo Scientific, ABD) ve Enerji Ayırıştırıcı X-Işınları (EDX) Spektroskopisi (Quanta 200 FEG, FEI Instruments, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.5. Islanabilirlik Testleri

Su ile ıslanabilirliği test edilecek titanyum metallерinin analizleri bir gönyemetre cihazı (DSA100 Contact Angle Analyzer, Krüss, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Her örnek grubu için 8 adet rastgele nokta seçilmiş ve 10 µl suyun yüzey ile etkileştikten hemen sonrasında temas açıları “durağan damla ölçüm” metodu ile hesaplanmıştır.

3.1.6. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücreler

Tez çalışmalarında elde edilen tüm örnek ve yüzey tiplerinin in vitro biyolojik uyumları ve osteoblast hücrelerinin fonksiyonlarına etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda Saos-2 osteoblast benzeri osteosarkoma hücre hattı hücre hattı kullanılmıştır. Saos-2 Türkiye Cumhuriyeti, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. Saos-2 hücreleri malzemeler ile etkileştirilmeden önce %10 Fetal Sığır Serumı (FBS) ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium besiyerinde çoğaltılmış ve ortama %1 oranında L-Glutamin ile birkaç damla penisilin/streptomisin çözeltileri eklenmiştir. Proliferasyon, %5 CO₂ atmosfere sahip ve 37°C'de sabit sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde gerçekleşmiş olup, hücre kültür ortamları günlük bakteriyel ve mantar kontaminasyonu ile pH incelemesine tabi tutulmuştur ve besi yerleri iki günde bir yenilenmiştir. Hücreler kültür kaplarını tam olarak doldurdukları zaman tripsin enzimi ile kültür kabı tabanından kaldırılmış, besi ortamı ile seyreltilen hücreler 1'e 4 oranında pasajlanarak çoğaltılmıştır.

3.2. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Yüzeylerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve *in vitro* Biyolojik Testleri

3.2.1. Kaplama Öncesi Anodizasyon İşlemi

Üretici firmadan temin edilen titanyum folyolar Kısım 3.1.1.'de anlatıldığı şekilde temizlenmiş ve yüzeyi apatitik kalsiyum fosfat ile kaplanacak örneklerin anodizasyon çözeltisi elektrolit 1 (0,2 M HF) olarak belirlenmiştir. Anodizasyon işlemi de 20 V potansiyel gerilimde ve 20 dakikalık bir sürede uygulanmıştır. Anodizasyon işlemi sonrasında titanyum örnekler (**AnTi**) deiyonize su ile yıkanarak etüvde 70°C'de 30 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır.

3.2.2. Apatitik Kalsiyum Fosfatın Anodize Titanyum Yüzeyle Çöktürülmesi

Etüvde kurutulan örnekler 500°C fırında 2 saat boyunca tüm oksit yapısının rutil fazdan anataz fazına geçmesi için sinterlenmiştir. Bu ısıl işlem yardımı ile apatit kristalleri ile anataz faz arasında daha iyi bir örgü uyumu olduğu bilinmektedir [101]. Oda sıcaklığında soğuma işlemi sonrasında metaller 1x1 cm boyutlarında kesilmiş ve 10 X simüle vücut sıvısında (SBF) farklı zaman aralıklarında (1,2,3,5 ve 8 saat) bekletilmiş ve sırasıyla **AnTiSBF1h**, **AnTiSBF2h**, **AnTiSBF3h**, **AnTiSBF5h** ve **AnTiSBF8h** örnek grupları elde edilmiştir. 10x SBF stok çözeltisi; 1000mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂ ve 10 mM Na₂HPO₄'ten oluşmaktadır [102]. Stok çözeltiliye 10 mM NaHCO₃ eklenmesiyle pH seviyesi 6.5 seviyesine yükselir ve apatitik kalsiyum fosfat çökme işlemi başlatılır. Çökme prosedürü oda sıcaklığında gerçekleşmiş olup ek bir ısıtma ya da karıştırma uygulanmamıştır. Belirlenen zaman aralıklarında ortamdan alınan örnekler deiyonize su ile yıkanarak vakum etüvünde kurutulmuş ve ileri karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları için saklanmıştır.

3.2.3. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Anodize Titanyum Yüzeylerin Hücreler ile Etkileştirilmesi

1x1 cm boyutlarındaki titanyum örnek grupları (**AnTi**, **AnTiSBF1h**, **AnTiSBF2h**, **AnTiSBF3h**, **AnTiSBF5h** ve **AnTiSBF8h**) ile işlem görmemiş **Ti kontrol** grubu hücrelerle etkileştirilmeden önce sterilizasyonu sağlamak amacıyla 24 kuyucuklu doku kültür kaplarında %70'lik etil alkol içinde 30 dakika boyunca bekletilmiş ve sonrasında laminar akış kabini içinde ultraviyole radyasyona maruz bırakılmıştır.

Steril edilen örnekler, 0.45 µm'lik polikarbonat membrandan süzölmüş PBS ve sonrasında da hücre besi yeri ile yıkanarak hücre ekimine hazır hale getirilmiştir.

Titanyumlara ekilecek hücreler tripsin ile hücre kültür kabı yüzeylerinden kaldırılmış ve Kısım 3.1.6.'da belirtilen besiyeri ile süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon edilen hücreler sayım lamında sayılmış ve 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonu sağlamak için besiyeri ile seyreltilmiştir. 24 kuyucuklu doku kültür kaplarına yerleştirilen titanyum örnekler 50 µl hücre süspansiyonu pipetlenmiş ve daha sonra kuyucuklara 1'er ml besiyeri eklenmiştir. Hücre kültür ortamları günlük bakteriyel ve mantar kontaminasyonu ile pH incelemesine tabi tutulmuştur ve besi yerleri iki günde bir yenilenmiştir.

3.2.4. Kalsiyum Fosfat Çöktürölmüş Anodize Titanyum Yüzeylerde Kültür Edilen Hücre Proliferasyon Testleri ve Morfolojik İncelemeleri

Hücre proliferasyon testleri 3., 5., ve 7. günlerde MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi ile gerçekleştirilmiştir. Planlanan günlerde test edilecek örneklerdeki hücre besiyeri atılıp yerine 300 µl taze besiyeri ve 30 µl de MTT reaktifi (1mg MTT/ml PBS) eklenmiş ve tekrar 37°C'de 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre esnasında MTT boyası canlı hücreler tarafından metabolize olur ve mitokondrilerinde mor renkli formazan kristallerini oluşturur. 4 saat sonunda besiyerleri atılır ve formazan kristallerini çözmek için 100 µl 0.04M izopropanol – HCl çözeltisi (0.04 M HCl içeren mutlak izopropanol) eklenmiştir. 30 dakika boyunca karanlık ortamda tutulan formazan çözeltileri 96 kuyucuklu kaplara aktararak ELISA okuyucuda (Biochrom ASYS, Birleşik Krallık) 570 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Hücre proliferasyonları 570 nm'de okunan absorbans değerleri ile doğru orantılıdır.

Örnek grupları üstünde kültür edilen hücrelerin morfolojilerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi için 3. gün sonunda örnekler PBS ile yıkanmış ve sonrasında %4 paraformaldehit çözeltisi ile +4°C'de 30 dakika etkileştirilmiş ve hücrelerin fiksasyonu sağlanmıştır. Hücrelerin taramalı elektron mikroskopu ile görüntülenmesi Kısım 3.1.3.'te anlatıldığı biçimde gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Anodize Titanyum Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Alkalen fosfataz (ALP) aktiviteleri hücre proliferasyonlarının da ölçüldüğü günler olan 3., 5., ve 7. günlerde analiz edilmiştir. Çalışmada ALP aktivitesinin değerlendirilmesi pH 10.2'de p-nitrofenil fosfatın p-nitrofenole dönüşmesi prensibine dayanır. Analiz edilecek örnekler kültür ortamından alındıktan sonra PBS ile yıkanmış ve sonrasında da 250 µl hücre liziz ortamı (0.5% v/v Triton X-100, 50 mM Tris (pH 7.6) ve 1 mM MgCl₂) eklenen örnekler dondurulup, ısıtılarak parçalanmıştır. Isıtma işleminden sonra hücre lizatları 5000 rpm hızda 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatandan alınan 50 µl örnek 37°C'de 50 µl ALP reaktifi (Sigma, ABD) ile etkileştirilmiştir. ALP aktivitesi 10 dakika boyunca her dakikada bir ölçüm alınarak 410 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Örnekler üstünde kültüre edilen osteoblastlar tarafından sentezlenen ALP, precinorm'un (Roche Diagnostics, Almanya) bilinen konsantrasyonlara sahip absorbanları ile karşılaştırılıp hesaplanmıştır. Elde edilen değerler toplam hücre içi protein miktarına normalize edildiğinden ALP aktivitesi mU/mg protein/dk olarak verilmiştir.

3.2.6. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Toplam Hücre İçi Protein Miktarının Ölçülmesi

Kısım 3.2.5.'te anlatıldığı biçimde elde edilen hücre lizatlarının toplam protein miktarları Lowry metoduna göre ölçülmüştür ve elde edilen absorbanlar standart BSA proteini değerlerine karşılık hesaplanmıştır. Ölçümlerde hücre lizatının santrifüjlenmesi ile elde edilen süpernatandan alınan 1.2 ml hacmindeki örnek 6 ml Alkalın bakır reaktifine (0.1 M NaOH içinde ağırlıkça %1 CuSO₄, %2 Sodyum tartarat ve %2 Na₂CO₃'ün çözülmesiyle hazırlanır) eklenir ve 10 dakikalık bir bekleme sonunda 0.3 ml Folin-Ciocalteu reaktifi bu karışıma eklenir. 30 dakikalık karanlıkta bekleme sonunda örnekler 750 nm dalga boyunda uV spektrofotometrede analiz edilmiştir.

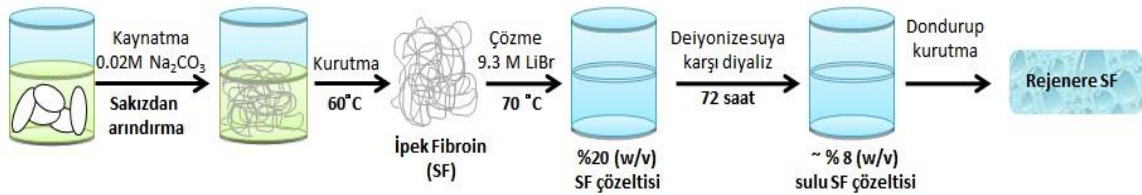
3.3. İpek Fibroin Ve Nano Hidroksiapatit Katkılı İpek Nanofiber Kaplı Yüzeylerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve *in vitro* Biyolojik Testleri

3.3.1. Elektroçizme Öncesi Anodizasyon İşlemi

Üretici firmadan temin edilen titanyum folyolar Kısım 3.1.1.'de anlatıldığı şekilde temizlenmiş ve yüzeyi elektroçizme işlemi ile nanofiber fibriller kaplanacak örneklerin anodizasyon çözeltisi elektrolit 1 (0.2 M HF) olarak belirlenmiştir. Anodizasyon işlemi de 20 V potansiyel gerilimde ve 20 dakikalık bir sürede uygulanmıştır. Anodizasyon işlemi sonrasında titanyum örnekler deiyonize su ile yıkanarak etüvde 70°C'de 30 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır.

3.3.2. İpek Fibroinin İpek Böceği Kozalarından Eldesi

İpek böceği kozaları (Stef Francis Ltd, Devon, Devonshire, Birleşik Krallık) 0.02M Na₂CO₃ sulu çözeltisinde 30 dakika boyunca kaynatılarak sakızımsı serisin yapısından arındırılmıştır. Kurutulan ipek fibroin (SF) 9.3 M LiBr tuz çözeltisinde 4 saat boyunca 60°C'de çözülmüş ve ağırlıkça % 20lik bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen konsantre çözelti, tuzdan arındırılmak üzere diyaliz kasetlerinde (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 3.5K MWCO, Pierce, Thermo Scientific, ABD) deiyonize suya karşılık 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir ve deiyonize su her gün yenilenmiştir. 3. gün sonunda elde edilen SF çözeltisinin ağırlıkça konsantrasyonu % 8 dolayındadır. SF çözeltisi sonrasında dondurup kurutma işlemine tabi tutularak rejenere ipek fibroin fibrilleri elde edilmiştir (Şekil 3.2.)

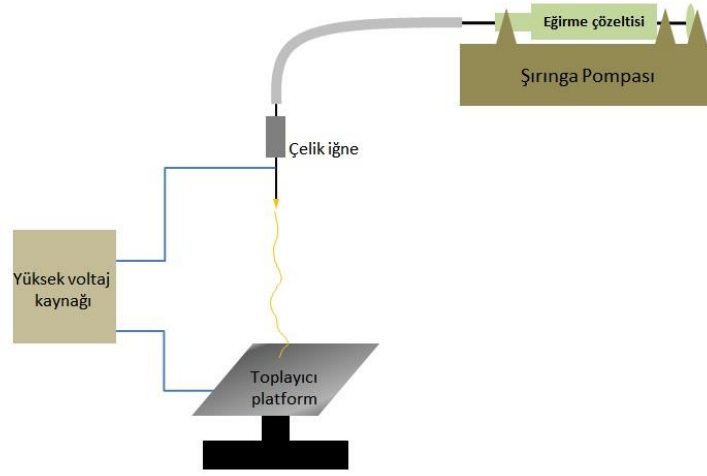


Şekil 3.2. Rejenere ipek fibroinin ipek kozalarından eldesi

3.3.3. İpek Fibroin Nanofiberlerin Titanyum Metal Yüzeyle Elektroeğrilmesi

3.3.3.1. Elektroeğirme Düzenegi

Elektroeğirme düzenegi, bir yüksek gerilim güç kaynağı (Glassman Europe, Tadley, Birleşik Krallık) , eğirme çözeltisini paslanmaz çelik iğneye ileten şırınga pompası (Harvard Apparatus, Edenbridge, Birleşik Krallık) ve çeşitli bağlantı hortumları ile titanyum plakaların bulunduğu bir platformdan oluşmaktadır. Düzenegin şematik gösterimi Şekil 3.3.'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Elektroeğirme düzenegi

3.3.3.2. Elektroeğirme Parametreleri ve Optimizasyon

İpek fibroinden elektroeğirme yöntemiyle elde edilen yüzeyde oluşturulan nanofiberlerin optimizasyon çalışmalarında sistem parametresi olarak çözelti konsantrasyonları (rejenere ipek fibroin fibrillerinin formik asit içinde ağırlıkça %5 - %25 aralığında çözülmesiyle) denenmiş ve bu çözeltilerin viskozitesi, elektriksel iletkenliği ve yüzey gerilimi ölçülerek konsantrasyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Viskozite ölçümlerinde DV-III Ultra Rheometer (Brookfield, ABD), yüzey gerilimi ölçümlerinde Krüss Tensiometer K9 (Krüss GmbH, Hamburg, Almanya) ve elektriksel iletkenlik hesaplamalarında ise HACH SensION 156 dip – Probe (Camlab Ltd., Cambridge, Birleşik Krallık) cihazları kullanılmıştır. Sistem parametrelerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen optimizasyondan sonra yüzey modifikasyonlarında ağırlıkça % 25'lik ipek fibroin çözeltisi kullanılmıştır.

Yüzey modifikasyon işleminin optimizasyonunda ise proses parametresi olarak uygulanan elektrik alan kuvvetinin şiddeti (0.7 kV/cm – 1.0 kV/cm) ve elektroegirme sürelerinin (2 – 10 dk) elektroegirilmiş fibroin nanofiber kalınlığına ve yüzey birim alandaki fiber yoğunluğuna etkisi incelenmiştir. Testler oda sıcaklığında ve iğne – titanyum örnek arası 20 cm uzaklıkta, dakikada 3 µl çözelti beslemesiyle gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.3. Titanyum ve Anodize Titanyum Yüzeylerin Elektroegirilmiş Fibroin Nanofiberler ile Modifikasyonu

Optimizasyon sonrası ağırlıkça %25 ipek fibroin konsantrasyonu, 0.9 kV/cm elektrik alan kuvveti ve 5 dakikalık eğirme süresi işlem parametreleri olarak seçilmiş ve titanyum yüzeylerin yüzey modifikasyonları da bu parametreler ile gerçekleştirilmiştir. İpek fibroin nanofiberler ile yüzey modifikasyonu yapılan anotlanmamış titanyum yüzeyler “*TiSF*” ; anotlanmış titanyum yüzeyler ise “*AnTiSF*” olarak kısaltma şeklinde kullanılacaktır.

3.3.4. Nano hidroksiapatit parçacıklarının ipek fibroin nanofiberlere katkılanması

3.3.4.1. Nano hidroksiapatit – ipek fibroin elektroegirme çözeltilerinin optimizasyonu

Elektroegirme çözeltisi nano hidroksiapatit (nHA) parçacıklarının (<200 nm, Sigma-Aldrich, ABD) ağırlıkça % 25’lik ipek fibroin çözeltisi içinde ağırlıkça %10, %15 ve %20 oranlarında ve eğirme işleminin hemen öncesinde dağıtılmasıyla elde edilmiştir. Kullanılan nHA konsantrasyonun nanofiber çapına ve yüzeye hücre tutunmasına etkisini incelemek üzere bir önceki basamakta optimize edilen oranlar olan 0.9 kV/cm elektrik alan kuvveti ve 5 dakikalık eğirme süresi işlem parametreleri olarak seçilmiştir. Eğirme işlemi sonucunda elde edilen yüzeyler %10, %15 ve %20 nHA içeren ipek fibroin nanofiber kaplı titanyumlar için sırasıyla nHA10 , nHA15 ve nHA20 olarak kısaltılmıştır.

nHA katkılı fiberlerin çap ölçümleri elektron mikroskopu görüntüleme sırasında gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.2. Titanyum ve Anodize Titanyum Yüzeylerin Elektroeğrilmiş Nano Hidroksiapatit Katkılı Fibroin Nanofiberler ile Modifikasyonu

Nano hidroksiapatitin ipek fibroin çözeltisine katılanmasının optimizasyonu sonucunda eğirme çözeltisi olarak ağırlıkça %25 ipek fibroin ve bu çözelti içinde ağırlıkça % 20 oranında nHA kullanılmış, 0.9 kV/cm elektrik alan kuvveti ve 5 dakikalık eğirme süresi işlem parametreleri olarak seçilmiş ve titanyum yüzeylerin yüzey modifikasyonları da bu parametreler ile gerçekleştirilmiştir. nHA katkılı ipek fibroin nanofiberler ile yüzey modifikasyonu yapılan anotlanmamış titanyum yüzeyler "**TiSFnHA**"; anotlanmış titanyum yüzeyler ise "**AnTiSFnHA**" olarak kısaltma şeklinde kullanılacaktır.

3.3.5. Yüzeyleri ipek fibroin ve nHA katkılanmış ipek fibroin nanofiberler ile modifiye edilmiş titanyum ve anodize titanyum örneklerin *in vitro* hücre kültür testleri

3.3.5.1. İpek Fibroin Elektroeğrilmiş ve nHA katkılı İpek Fibroin Elektroeğrilmiş Yüzeylerin Hücre Hattı ile Etkileştirilmesi

1x1 cm boyutlarındaki örnekler (**Ti kontrol, AnTi, TiSF, AnTiSF, TiSFnHA ve AnTiSFnHA**) örnekler hücre ile etkileştirilmeden önce sterilizasyonu sağlamak amacıyla 24 kuyucuklu doku kültür kaplarında %70'lik etil alkol içinde 30 dakika boyunca bekletilmiş ve sonrasında laminar akış kabini içinde ultraviyole radyasyona maruz bırakılmıştır. Steril edilen örnekler, 0.45 µm'lik polikarbonat membrandan süzölmüş PBS ve sonrasında da hücre besiyeri ile yıkanarak hücre ekimine hazır hale getirilmiştir.

Titanyumlara ekilecek hücreler tripsin ile hücre kültür kabı yüzeylerinden kaldırılmış ve Kısım 3.1.6'da belirtilen besiyeri ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücreler sayım lamında sayılmış ve 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonu sağlamak için besiyeri ile seyreltilmiştir. 24 kuyucuklu doku kültür kaplarına yerleştirilen örnek gruplarına 50 µl hücre süspanasyonu pipetlenmiş ve daha sonra kuyucuklara 1'er ml besiyeri eklenmiştir. Hücre kültür ortamları günlük bakteriyel ve mantar kontaminasyonu ile pH incelemesine tabi tutulmuştur ve besiyeri yerleri iki günde bir yenilenmiştir.

3.3.5.2. İpek Fibroin Elektroeğrilmiş ve nHA Katkılı İpek Fibroin Elektroeğrilmiş Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Proliferasyon Testleri ve Morfolojik İncelemeleri

Örnek grupları (*Ti kontrol, AnTi, TiSF, AnTiSF, TiSFnHA ve AnTiSFnHA*) üstünde çoğalan hücrelerin proliferasyon testleri 3., 8., ve 13. günlerde MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoluim bromide; Thiazolyl blue) testi ile gerçekleştirilmiştir. Planlanan günlerde test edilecek örneklerdeki hücre besiyeri atılıp yerine 300 µl taze besiyeri ve 30 µl de MTT reaktifi (1mg MTT/ml PBS) eklenmiş ve tekrar 37°C'de 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. MTT formazan kristallerini çözmek için ortama 100 µl 0.04M izopropanol – HCl çözeltisi (0.04 M HCl içeren mutlak izopropanol) eklenmiş ve karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. 30 dakika sonunda tamamlanan çözünme sonrası formazan çözeltileri 96 kuyucuklu kaplara aktarılarak ELISA okuyucuda (Biochrom ASYS, Birleşik Krallık) 570 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

Örnek grupları üstünde kültür edilen hücrelerin morfolojilerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi için 8. gün sonunda örnekler PBS ile yıkanmış ve sonrasında %4 paraformaldehit çözeltisi ile +4°C'de 30 dakika etkileştirilmiş ve hücrelerin fiksasyonu sağlanmıştır. Hücrelerin taramalı elektron mikroskopu ile görüntülenmesi Kısım 3.1.3'te anlatıldığı biçimde gerçekleştirilmiştir.

3.3.5.3. İpek Fibroin Elektroeğrilmiş ve nHA Katkılı İpek Fibroin Elektroeğrilmiş Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

ALP aktiviteleri test edilecek örnekler hücre kültürünün 8. Gününde SensoLyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit (AnaSpec, ABD) metoduyla analiz edilmiştir. Prosedür gereği analiz edilecek örnekler Kısım 3.2.5.'te anlatıldığı şekilde lisiz çözeltisi ile etkileştirilmiş ve hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Santrifüj edilen hücre lizatından alınan 50 µl süpernatant örneği 37°C'de 50 µl pNPP reaktifi ile 96 kuyucuklu kaplarda etkileştirilmiştir. Etkileştirilen örnekler 10 dakika boyunca dakikada bir ELISA okutucu kullanılarak 405 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Standart alkaline fosfataz enzimi ile yapılan kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğru denklemi yardımıyla, örneklerdeki aktif ALP içeriği ng/ml olarak hesaplanmıştır.

3.3.5.4. İpek Fibroin Elektroeğrilmiş ve nHA Katkılı İpek Fibroin Elektroeğrilmiş Yüzeylerde Kültür Edilen Hücrelerin Toplam Hücre İçi Protein Miktarının Ölçülmesi

Kısım 3.2.5.'te anlatıldığı biçimde elde edilen hücre lizatlarının toplam protein miktarları Lowry metoduna göre ölçülmüştür ve elde edilen absorbanslar standart BSA proteini değerlerine karşılık hesaplanmıştır. Ölçümlerde hücre lizatının santrifüjlenmesi ile elde edilen süpernatandan alınan 1.2 ml hacmindeki örnek 6 ml Alkalın bakır reaktifine (0.1 M NaOH içinde ağırlıkça %1 CuSO₄, %2 Sodyum tartarat ve %2 Na₂CO₃'ün çözülmesiyle hazırlanır) eklenir ve 10 dakikalık bir bekleme sonunda 0.3 ml Folin-Ciocalteu reaktifi bu karışıma eklenir. 30 dakikalık bekleme sonunda örnekler 750 nm dalga boyunda uV spektrofotometrede analiz edilmiştir.

3.4 Boy-En Oranı Yüksek Titanya Nanotüplerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Antibiyotik Yükleme-Salım Çalışmaları

3.4.1. Boy-En Oranı Yüksek Titanya Nanotüp Yüzeylerin Hazırlanması

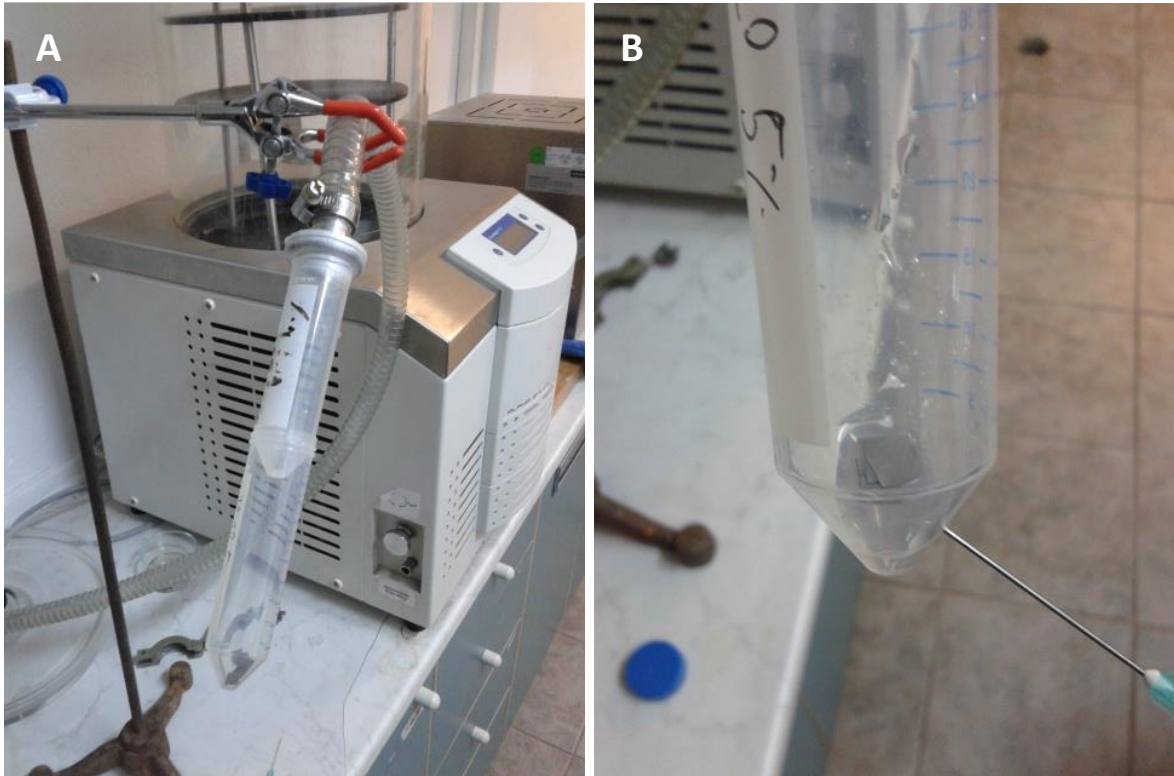
Üretici firmadan temin edilen titanyum folyolar Kısım 3.1.1.'de anlatıldığı şekilde temizlenmiş ve anodizasyon işlemine hazır hale getirilmiştir. Boy-en oranı yüksek titanya nanotüplerin hazırlanması için 0,1M NH₄F içeren etilen glikol (elektrolit 2) çözeltisi kullanılmıştır. Farklı çap ve uzunluklara sahip nanotübüler yapıların eldesi için 20 dakikalık anodizasyon süresi sabit tutularak 15 V, 25 V ve 35 V potansiyel gerilim ve 25 V potansiyel gerilim sabit tutularak 20 dk, 40 dk ve 80 dk sürelerde anodizasyon işlemi uygulanmıştır. Anodizasyon işlemi sonrasında titanyum örnekler deiyonize su ile yıkanarak etüvde 70°C'de 30 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır.

3.4.2. İlaç Yükleme-Salım İşlemleri

6mm x 6mm boyutlarında kesilen örnekler 50 mg/ml, konsantrasyondaki vankomisin çözeltisi içinde 30 dakika bekletilmiştir. Yüzeye adsorbe olmuş antibiyotikten kurtulmak için fosfat tamponuna daldırılıp emici kâğıt ile kurulan örnekler 37°C'de 1 gece kurutulmuştur. Kapalı tüplerde 500 µl PBS (pH= 7.2) içine yerleştirilmiş ve ilaç salımı Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile 280 nm dalga boyunda ölçümler alınarak izlenmiştir. İlaç yükleme miktarı ve salım profiline

etki eden parametreler olarak nanotüp çap genişliği (anodizasyon voltajı) ve nanotüp uzunluğu (anodizasyon süresi) seçilmiştir.

İlaç salımı işlemlerinde nanotüp çap ve boyutuna ek olarak vakumun da etkisi incelenmiştir. Vakum uygulanan metal örnek yüzeylerindeki nanotübüler boşluklarda bulunan havanın da ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Vakumda 20 dakika boyunca tutulan titanyum örnekler Şekil 3.4.'te tasarlanan deney düzeneğinde ilaç çözeltisi ile etkileştirilmiştir ve yine fosfat tamponu ile yıkama-kurutma işlemlerinin ardından yukarıda anlatıldığı şekilde salım profilleri incelenmiştir. Tasarlanan deney düzeneğinde plastik tüplerin içinde tutulan 6x6 mm titanyum plakalar bir pompaya bağlanarak 30 dakika boyunca vakuma tabi tutulmuştur. Vakum ortamında tutulan anodize tüplere ilaç solüsyonunun yüklenmesi bir şırınga yardımıyla plastik tüpün delinmesi ve vakum ortamına ilaç solüsyonunun enjeksiyonu sonucu gerçekleşmiştir.



Şekil 3.4. Titanyum örnekler vakum ortamında ilaç yükleme düzeneği. Plastik tüplerde 30 dakika vakumda bekletilen örnekler (A) daha sonrasında tüp duvarının delinmesi suretiyle ortama enjekte edilen ilaç çözeltisi ile etkileştirilmiştir (B).

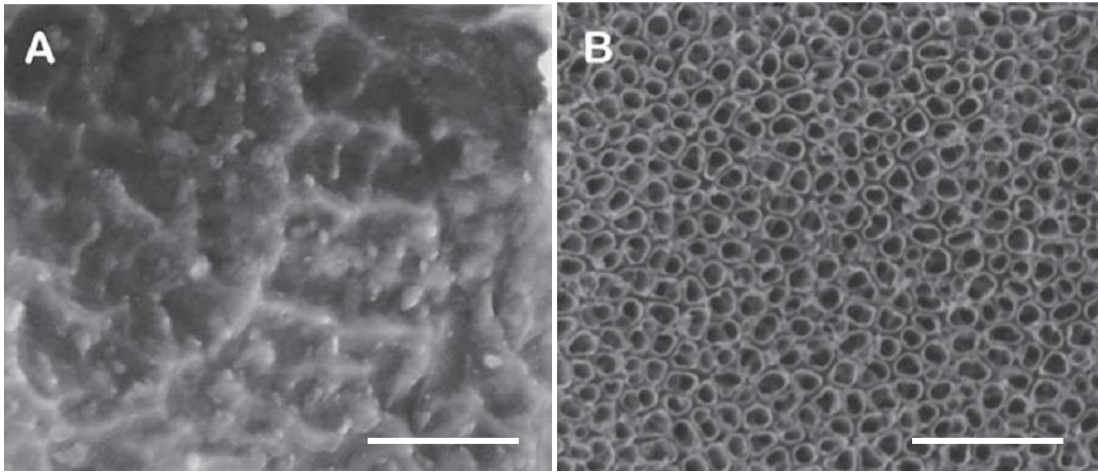
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmaları kapsamında titanyum metal yüzey üzerinde uygulanan anodizasyon, kalsiyum fosfat çöktürülmesi ve elektroçirime işlemleri ile farklı yüzeyler elde edilmiş, bu yüzeylerin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları yapılmış ve *in vitro* biyolojik performansları herhangi bir yüzey modifikasyonuna uğramamış titanyum yüzeyler ile karşılaştırılmıştır. Çalışmalar lineer bir planda gerçekleşmediğinden ve her modifikasyon tekniği her örnek grubuna uygulanmadığı için bulgular ve tartışma kısmı 3 farklı alt başlığa bölünmüştür.

4.1. Anodizasyon ve Kalsiyum Fosfat Çöktürülmesi ile Hazırlanan Yüzeyler

4.1.1. Elektrolit 1 ile Anodizasyon İşlemi Yapılan Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu

Anodizasyon işleminden sonra titanyum yüzeyler, anodizasyon öncesine göre ise tamamen değişmiştir. Ticari olarak elde edilen titanyumda rasgele geniş tepeler ve çukurlardan oluşan bir pürüzlülük görülürken anodize titanyumda 50 nm'lik çap ve 10 nm duvar kalınlığından oluşan nanotübüler yapıların meydana getirdiği bir yüzey gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.).

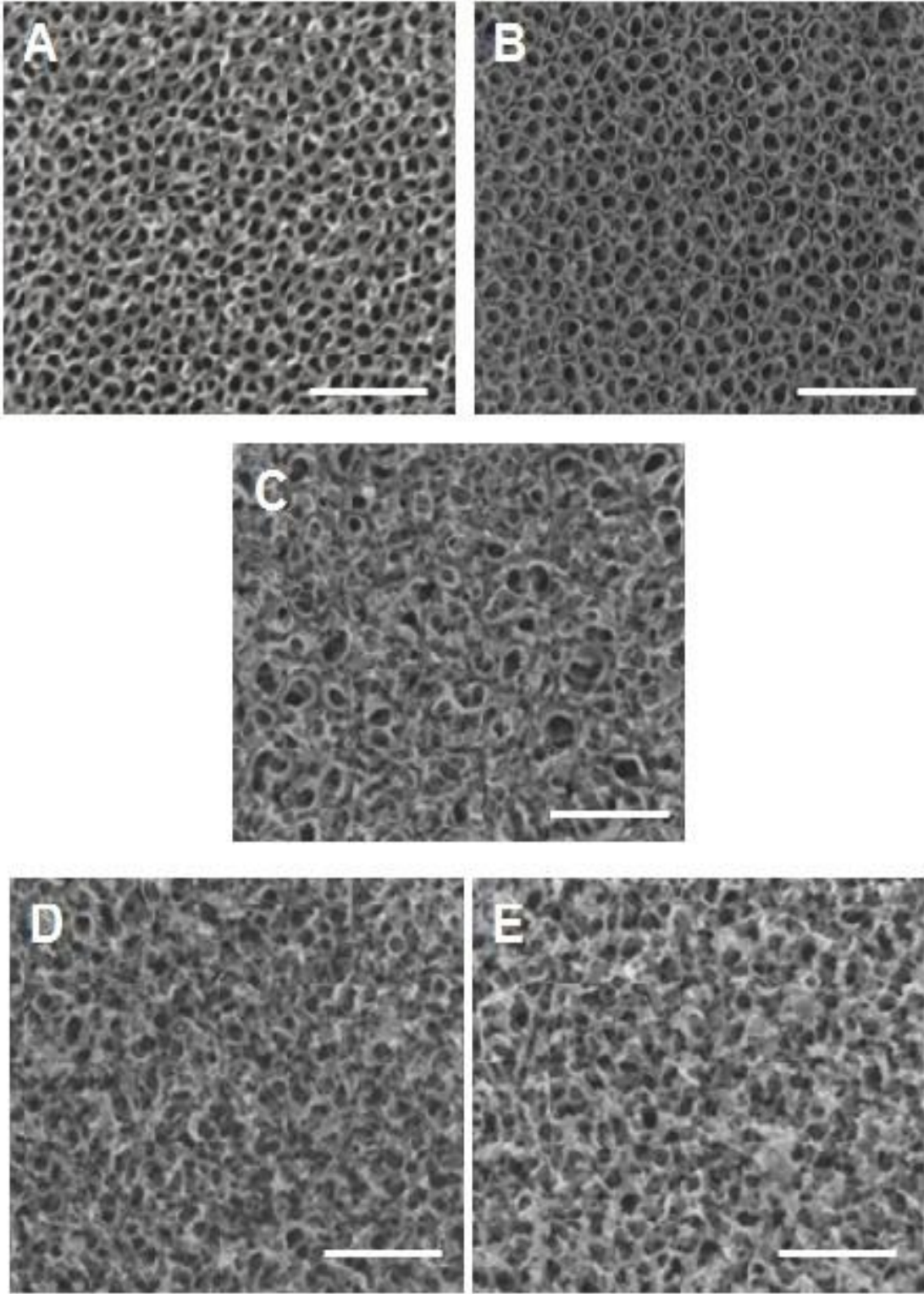


Şekil 4.1. Anotlanmamış (A) ve 0.2 M HF elektroliti kullanılarak 20 V potansiyel gerilimde anotlanmış titanyum (B) yüzeylerinin morfolojileri. Beyaz çubuk 500 nmyi göstermektedir.

Elektrolit 1 (0.2 M HF) ile anodizasyon işlemi yapılan titanyum örneklerin morfolojik karakterizasyonları taramalı elektron mikroskop cihazından elde edilen görüntüler ile yapılmıştır. Elde edilen görüntülerde uygulanan potansiyel gerilim değerleri 15 V'dan 35 V'a doğru arttığında yüzey morfolojisinin değiştiği gözlemlenmiştir. Buna

göre 15 V potansiyel gerilim uygulanan örneklerde çap genişlikleri 40 – 70 nm arasında değişen (ortalama 51 ± 7 nm) nanotübüler bir yapılanma görülürken, voltaj değeri 20 V'a çıkarıldığında ise çap genişliği %11 artmış ve ortalama 57 ± 8 nm olarak hesaplanmıştır. Uygulanan voltaj arttırıldığında ise yüzeydeki düzenli yapının bozulma gösterdiği, öncelikle gözenek çaplarının artmaya başladığı ve sonrasında da düzenli yapının tamamen kaybolduğu, tüplerin birbiri ile birleştiği, pürüzlü bir morfoloji gözlemlenmiştir.

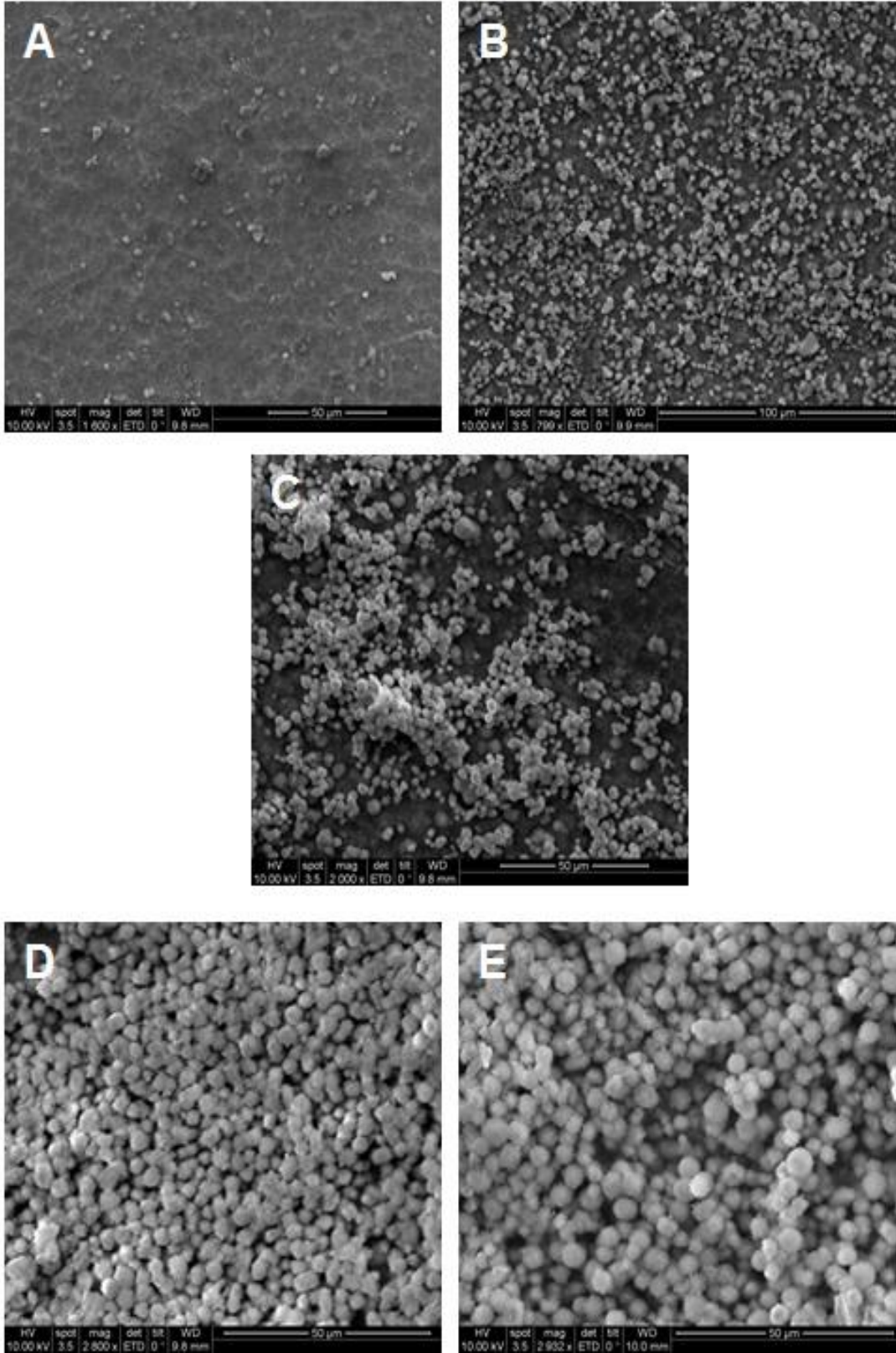
Anodizasyon esnasında nano gözenek yapıların oluşması titanyum iyonlarının titanyum oksit – elektrolit arayüzüne doğru göçü sırasında geride bıraktığı boşluklar sonucu oluşmaktadır. Yükselen anodizasyon voltajı ile titanyum iyonlarının mobilizasyonunun hızlanması sonucu gözenekler arası boşluğun da arttığı ve oksit yapılarındaki nanogözeneklerin çaplarının büyüdüğü gözlemlenmiştir[49]. Anodizasyon voltajının elektrolit konsantrasyonu sabit tutularak arttırılmasıyla florür iyonlarının titanyum çözünmesi ile oluşan boşlukların içine doğru penetrasyonu hızlanır[103]. Deneylerde de nanotübüler yapıları birbirinden ayıran duvarlarda çözünmenin hızlandığı ve duvarların incelendiği görülmüştür. Bu yüksek voltajlarda düzenli tekli tüp duvarlarının bozularak birbirine bağlanması ile oluşan pürüzlü yapıların sebebidir. 25 V ve yukarı anodizasyon potansiyellerinde alan destekli çözünme hızı oksit birikme hızından fazla olduğu için elde edilen morfoloji düzensiz bir yapılanmada gözlemlenmiştir. Anodizasyon voltajının titanyum dioksit yüzeylere şekilsel etkisi Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Elektrolit 1 ile gerçekleştirilen anodizasyon işleminde farklı potansiyel gerilimleri uygulanmış titanyum yüzeylerin morfolojileri. Beyaz çubuk 500 nmyi göstermektedir.

4.1.2. Kalsiyum Fosfat Çöktürülmüş Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu

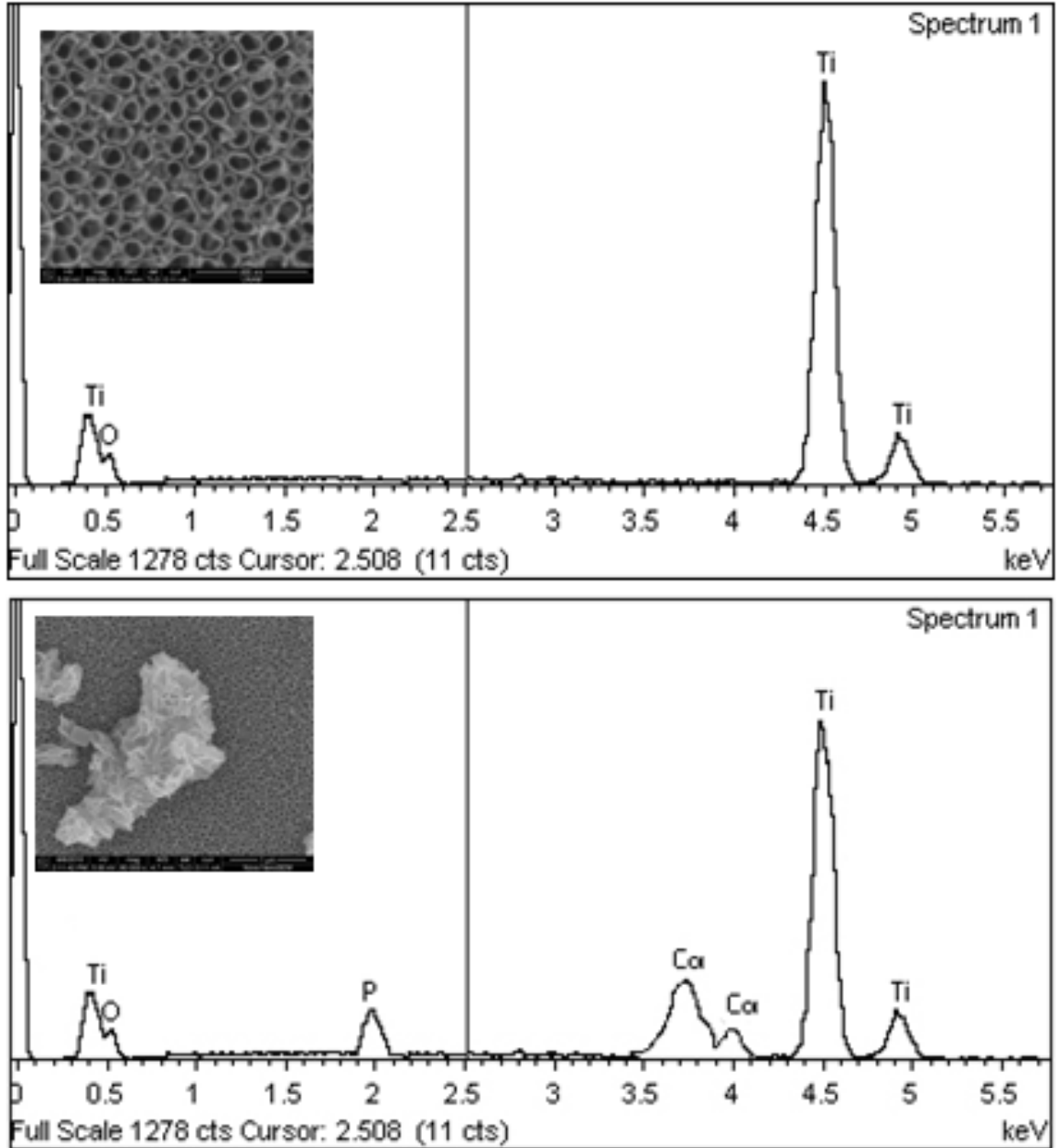
Tez çalışmalarında elektrolit 1 kullanılarak 20 V luk potansiyel gerilimde 20 dakika boyunca anodizasyon işlemine tabi tutulan örnekler, 10X SBF çözeltisinde bekletilerek yüzeylerinde apatitik kalsiyum fosfat biriktirilmiştir. Farklı zamanlarda apatitik kalsiyum fosfat biriktirilmiş yüzeyler SEM ile morfolojik olarak karakterize edilmiştir. 10X SBF'de 1, 2, 3, 5 ve 8 saat boyunca bekletilen yüzeylerdeki kalsiyum fosfat birikmesinin artan bekleme zamanı ile arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.). Kalsiyum fosfatın 1 saat sonunda yüzeyde çok az miktarda birikmeye başladığı, ikinci saatin sonunda ise kalsiyum fosfatın 1-2 µm çapında çiçek yaprağı şeklinde bir kümelenme ile yüzeyde yer aldığı, bu kompozisyonun 3. saatte yüzeyde artan bir yoğunlukta devam ettiği gözlemlenmektedir. 3. saat sonunda yüzey tamamen titanya nanotüp ve kalsiyum fosfat kümelenmelerinden oluşan hibrit bir morfoloji göstermektedir. 10X SBF çözeltisinde bekleme süresi daha da arttığında gözlemlenen değişim 5. ve 8. saatlerde çok açıktır. Yüzey tamamen kalsiyum fosfattan oluşmaktadır ve titanya nanotüp yüzeyi kalsiyum fosfat bileşeninin altında yer almaktadır.



Şekil 4.3. Kalsiyum fosfat çöktürülen yüzeylerin SEM görüntüleri. (A) 1 saat ; (B) 2 saat ; (C) 3 saat ; (D) 5 saat (E) 8 saat

4.1.3. Titanyum Yüzeylerin EDX Spektrum Analizi

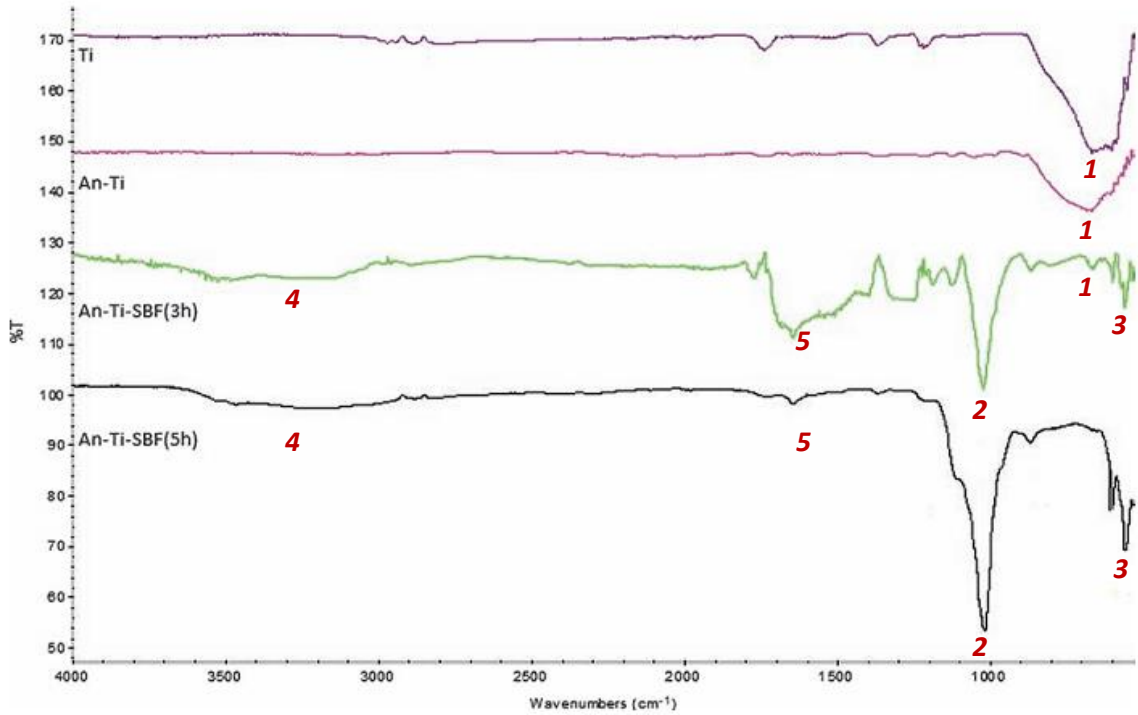
Anodize titanyum (AnTi) ve sonrasında SBF çözeltisinde bekletilmiş anodize titanyumların (AnTiSBF) EDX spektrumları aşağıdaki şekilde yüzeylerin temsili resimleri ile birlikte gösterilmiştir. Anotlanmış titanyum örnekte mevcut olmayan Ca ve P elementlerine ait pikler SBF içinde bekletilmiş örneklerin spektrumlarında sırasıyla 3,7-4 ve 2 keV dolaylarında görülmektedir.



Şekil 4.4. AnTi ve AnTiSBF yüzeylerin EDX spektrumları

4.1.4. Titanyum Yüzeylerin Kızıl Ötesi Spektrum Analizi

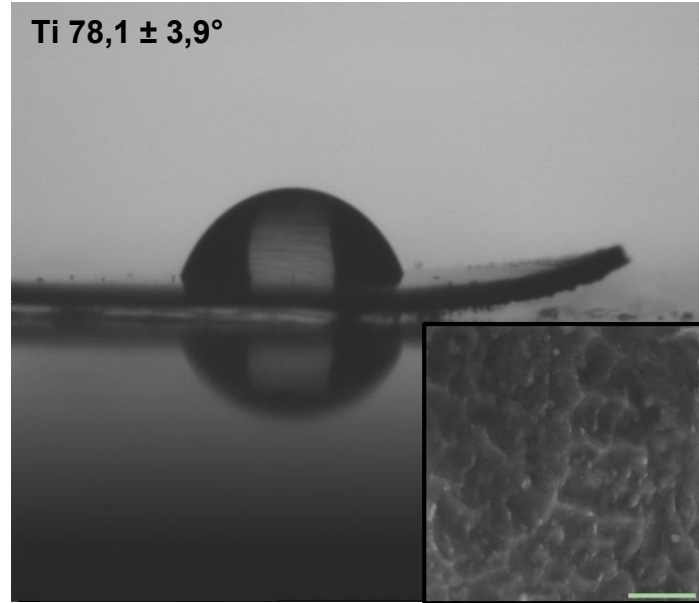
Ti, AnTi, AnTiSBF(3h) ve AnTi SBF(5h) örnek gruplarının FTIR spektrumları Şekil 4.5.'te gösterilmektedir. Ti, AnTi, AnTiSBF(3h) örneklerinde gözlemlenen 670 cm^{-1} deki Ti-O-Ti bağ gerilim frekansındaki pik (1) SBF içinde bekletme süresi 3 saate çıktığında azalmış ve 5 saat SBF içinde bekletilmiş örnekte ise kaybolmuştur. Ti-O-Ti bağ gerilim pikinin kaybolmuş olması yüzeyde birkaç mikrometre kalınlığında bir kaplama olduğunu göstermektedir ki kızılötesi ışınlar kaplama altındaki titanyum ile etkileşmemişlerdir. PO_4^{3-} iyonuna özgü olan 1020 cm^{-1} 'deki P-O gerilme (2) ve $560, 600\text{ cm}^{-1}$ P-O eğilme frekanslarına ait pikler (3) titanyum ve anodize titanyum yüzeylerde görülmezken SBF bekleme süresi 3 saat olan örnekte belirgindir. Ayrıca 3300 cm^{-1} 'deki geniş (4) ve 1650 cm^{-1} 'deki küçük (5) pikler de sırası ile absorblanmış ve yapısal su piklerini (apatit formülasyonundaki hidroksil grubu) işaret etmektedir. SBF'de 5 saat bekletilen örnek yüzeyinde de P-O pikleri daha da belirginleşirken, titanyum dioksit piki görülmemektedir. AnTiSBF(3h) örneğinde ise yüzey titanyum dioksit ve apatitik kalsiyum fosfatın oluşturduğu melez bir karaktere sahiptir.



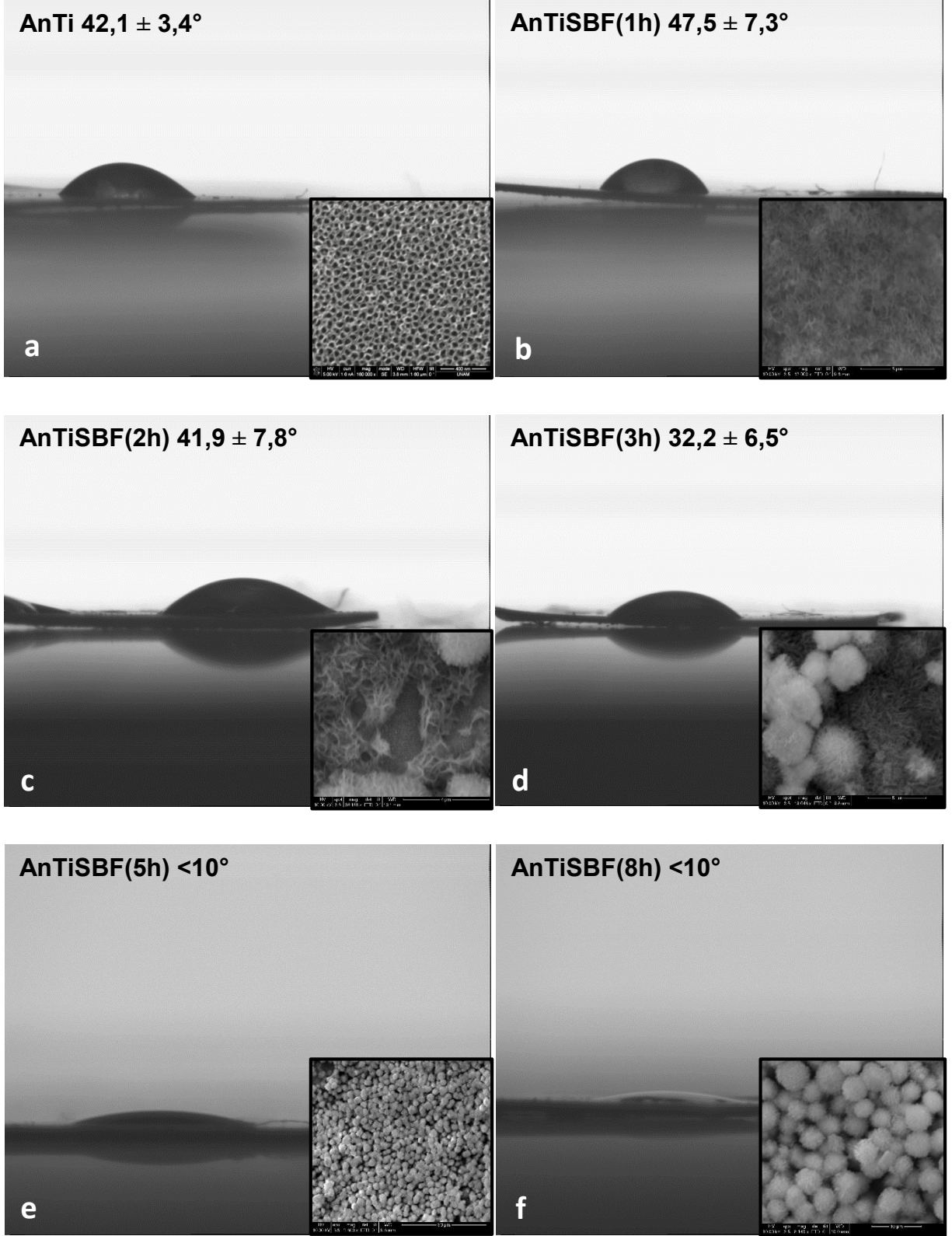
Şekil 4.5. Ti, AnTi, AnTiSBF(3h) ve AnTiSBF(5h) yüzeylerin FTIR spektrumları

4.1.5. Titanyum Yüzeylerin İslanabilirlik Ölçümleri

Titanyum metali herhangi bir işlem görmeden önce $78,1 \pm 3,9^\circ$ lik bir su temas açısına sahiptir (Şekil 4.6.). Anodizasyon prosedüründen sonra su temas açısının oldukça düştüğü ($42,1 \pm 3,4^\circ$) ve yüzeyin hidrofilik bir karakter kazandığı görülmektedir. 10X SBF çözeltisi içinde 1 saatlik kalsiyum fosfat çöktürme işlemi tamamlandığında yüzey morfolojisinde meydana gelen değişikliklerle beraber yüzey hidrofilik olarak kalsa da temas açısı %12 artarak $47,5 \pm 7,3^\circ$ değerine ulaşmıştır. Bu örnekte (AnTiSBF(1h)), kalsiyum fosfat yapısı nanotübüler yapı üstünde yeni oluşmaya başlamış ve tam bir birikme meydana gelmemiştir. 10X SBF çözeltisinde bekleme süresi uzadıkça yapıdaki kalsiyum fosfat birikiminin artışıyla beraber ıslanabilirlik de artmıştır. 10X SBF çözeltisinde 2 ve 3 saat bekletilmiş örneklerde (AnTiSBF(2h) ve AnTiSBF(3h)) temas açıları sırasıyla $41,9 \pm 7,3^\circ$ ve $32,2 \pm 6,5^\circ$ olarak ölçülmüştür. Kalsiyum fosfatın aşırı kaplandığı örnekler olan 5 saat ve 8 saatlik bekletilme süresine sahip anodize titanyumlarda (AnTiSBF(2h) ve AnTiSBF(3h)) ise temas açıları 10° den küçük olarak ölçülmüş ve yüzey tamamen ıslanabilir niteliktedir (Şekil 4.7.).



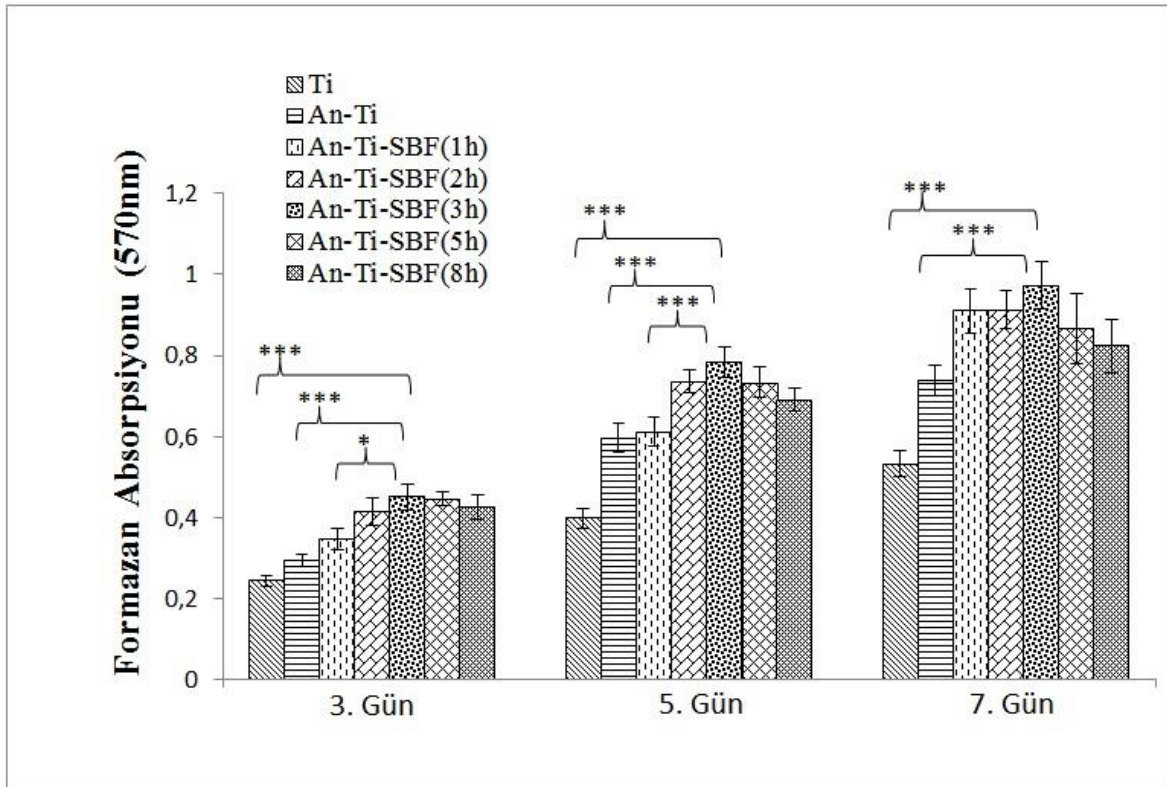
Şekil 4.6. İşlem görmemiş titanyum yüzeyin su temas açısı



Şekil 4.7. Anotlanmış (a) ve anotlanıp farklı saatlerde (b, 1 saat ; c, 2 saat ; d, 3 saat ; e, 5 saat ; f, 8 saat) SBF içinde apatitik kalsiyum fosfat çöktürülmüş yüzeylerin su temas açıları ve küçük resimlerde SEM görüntüleri.

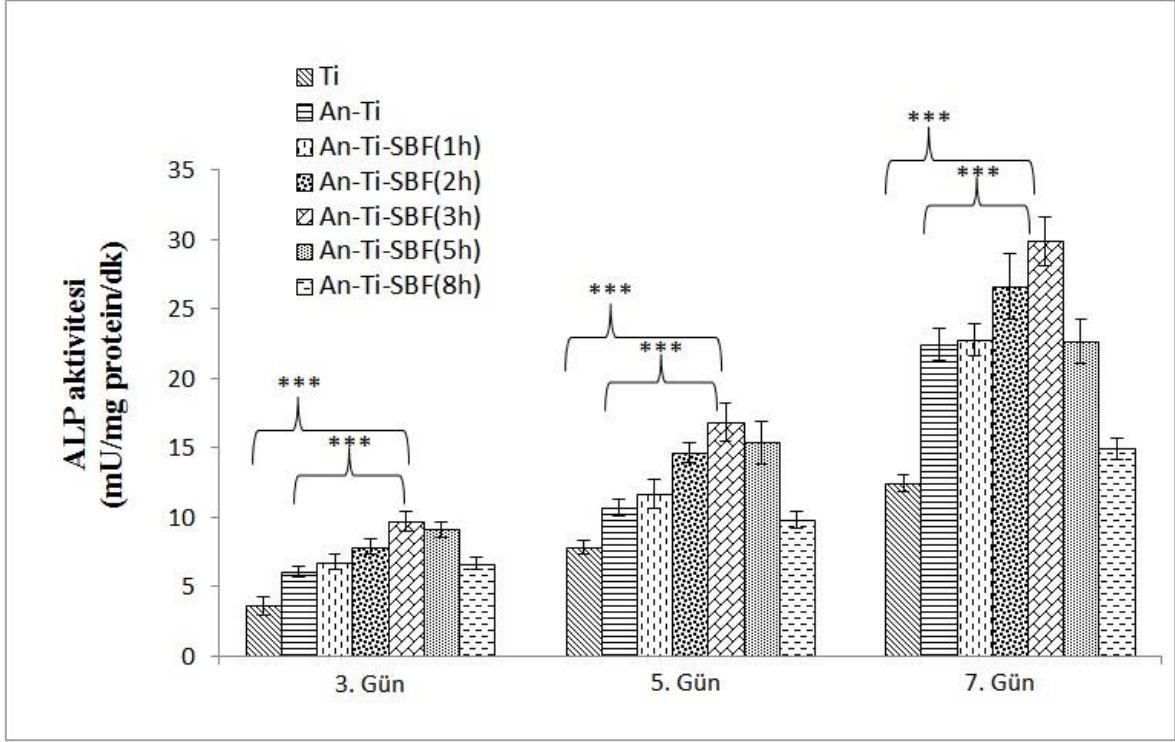
4.1.6. Titanyum yüzeylerin *in vitro* hücre kültür çalışmaları

Farklı sürelerde 10X SBF çözeltisi içinde bırakılarak yüzeylerinde dereceli bir şekilde kalsiyum fosfat kaplanan örneklerin *in vitro* biyoyumluluk testlerinde Saos-2 hücre hattı kullanılmış ve MTT formazan kristallerinin 570 nm görünür bölgedeki göreceli absorpsiyonları değerlendirilmiştir. Şekil 4.8., 3, 5 ve 7 gün boyunca Ti, AnTi, AnTiSBF(1h), AnTiSBF(2h), AnTiSBF(3h), AnTiSBF(5h), AnTiSBF(8h) örnek grupları ile etkileştirilmiş Saos-2 hücrelerinin formazan absorpsiyonlarını göstermektedir (ortalama değer \pm standart sapma, n=8). Canlı hücre sayısı inkübasyon süresi arttıkça tüm gruplarda artış göstermiştir ($p < 0.05$). Tüm test günlerinde en fazla canlı hücre sayısı AnTiSBF(3h) grubuna ait olup değer AnTi ve Ti grupları ile karşılaştırıldığında, fark 3 inkübasyon gününde de istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.8. Ti, AnTi, AnTiSBF(1h), AnTiSBF(2h), AnTiSBF(3h), AnTiSBF(5h), AnTiSBF(8h) örnek gruplarında kültüre edilen hücrelerin 3. 5. ve 7. günlerdeki bağıl hücre canlılık değerleri

Benzer şekilde ALP aktiviteleri de inkübasyon süresi arttıkça tüm gruplarda artış göstermiştir. ALP aktivitelerinin 3., 5. ve 7. günlerdeki ölçümleri (ortalama değer \pm standart sapma , n=8) Şekil 4.9'da grafik haline getirilmiştir. Tüm test günlerinde en fazla ALP aktivitesi AnTiSBF(3h) grubuna ait olup değer AnTi ve Ti grupları ile karşılaştırıldığında, fark 3 inkübasyon gününde de istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.9. Ti, AnTi, AnTiSBF(1h), AnTiSBF(2h), AnTiSBF(3h), AnTiSBF(5h), AnTiSBF(8h) örnek gruplarında kültüre edilen hücrelerin 3. 5. ve 7. günlerdeki ALP aktivite değerleri

Yüzey topografisindeki değişiklikler, hücresel cevaba etki eden bir unsur olan yüzeyin ıslanabilirliğini de değiştirmektedir[104,105]. Çalışmalarda ölçülen yüzey temas açıları incelendiğinde anodizasyon ve kalsiyum fosfat çöktürülmesi sonrasında su temas açılarının düştüğü gözlemlenmektedir. Yüzeydeki kalsiyum fosfat birikmesi arttıkça da ıslanabilirliğin artışı hücre tutunması ile paralellik göstermektedir. Bu paralellik 10XSBF sıvısında 3 saat bekletilme süresine kadar devam etmekte olup bu süreyi aşan örnek gruplarında daha düşük hücre tutunması ve proliferasyonu gözlenmiştir. AnTiSBF(5h) ve AnTiSBF(8h) örnek grupları daha az süre kalsiyum fosfat çöktürülen gruplara çok daha fazla hidrofilik

bir karaktere sahip olsa da tüm test günleri boyunca daha az canlı hücre barındırmışlardır. Bu iki örnek grubunda hücreler, SEM fotoğrafları ve kızılötesi spektrum verilerinden anlaşılacağı üzere sadece apatitik kalsiyum fosfat ile etkileşmişlerdir. Hücre kültür testlerinde en iyi cevabı veren AnTiSBF(3h) grubunun sahip olduğu ve anodize titanyum dioksit nanotüp ve apatitik kalsiyum fosfattan oluşan hibrit yüzeyin karakterizasyonu da hem morfolojik hem de spektroskopik olarak yapılmıştır.

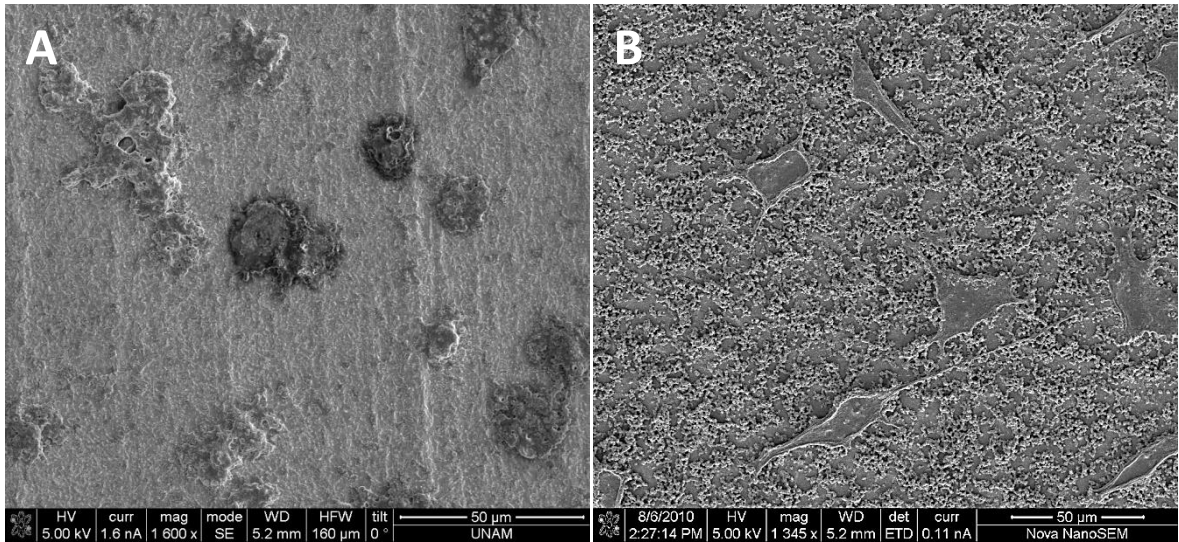
Bir biyomalzeme yüzeyine hücre yapışmasının hemen öncesinde birbirleri ile ilişkili bazı olaylar gerçekleşmektedir [106]. Serumdaki su molekülleri yüzey ile anında etkileşerek biyolojik reaksiyonlar için bir katman hazırlarlar. Bu etken hücre kültür çalışmalarında ıslanabilir bir yüzeyin başlıca gereksinimidir. Bu hızla gelişen olayın hemen ertesinde yüzeyin fizikokimyasal, biyokimyasal ve topografik özellikleriyle ilintili olan protein adsorpsiyonu gerçekleşir. Farklı implant yüzeylerine hücre sel tutunmayı inceleyen çalışmalarda iki ya da daha fazla yüzey parametresinin değerlendirmeye alınması sonucu hangisinin daha baskın olduğunun kestirilmesi zorlaşmaktadır. Genel olarak hidrofobik karaktere sahip yüzeylerin daha fazla protein adsorpsiyonuna ve dolayısıyla da daha fazla hücre sel çekime sahip olacağı düşünülmektedir. Bununla beraber, implant yüzeyinin hücre adesif özelliği, protein yayılması (unfolding) denen bir olay ile azalabilir. Protein yayılmasında proteinin hidrofobik uçları (hücreler ile etkileşecek olan) da yüzey ile etkileşirler ve dolayısıyla sulu ortamda hücreler ile etkileşecek aktif kısımlar azalmış olur [107,108].

Öte yandan hücre altı ve nano boyutlardaki kavite lerin de yapışma verimliliğini arttırdığı rapor edilmiştir [64,65,109]. Nanotüp benzeri bir yapılanma ile metal yüzeyin alanı artırılarak proteinler ile etkileşecek daha fazla reaktif bölgeye sahip olunur. Titanyumun direkt bağlantı kurma kabiliyetinin anodik oksidasyon sonucu yüzeyde oluşan titanya tabaka ile daha da arttığına dair bulgular da yaygındır [110,111]. Das ve arkadaşlarının osteoblast öncül hücreleri farklı elektrolitlerde anodize edilmiş titanyumlar ile etkileştirerek yaptığı bir çalışmada, 11 günlük inkübasyon sonrası tüm anodize yüzeylerdeki hücre sayısı ve ALP aktivitelerinin Ti kontrol grubuna göre daha fazla olduğu belirtilmiştir [112]. Benzer şekilde tez çalışmalarında da nanotübüler titanya yüzeye sahip örneklerde hücre sayısı ve

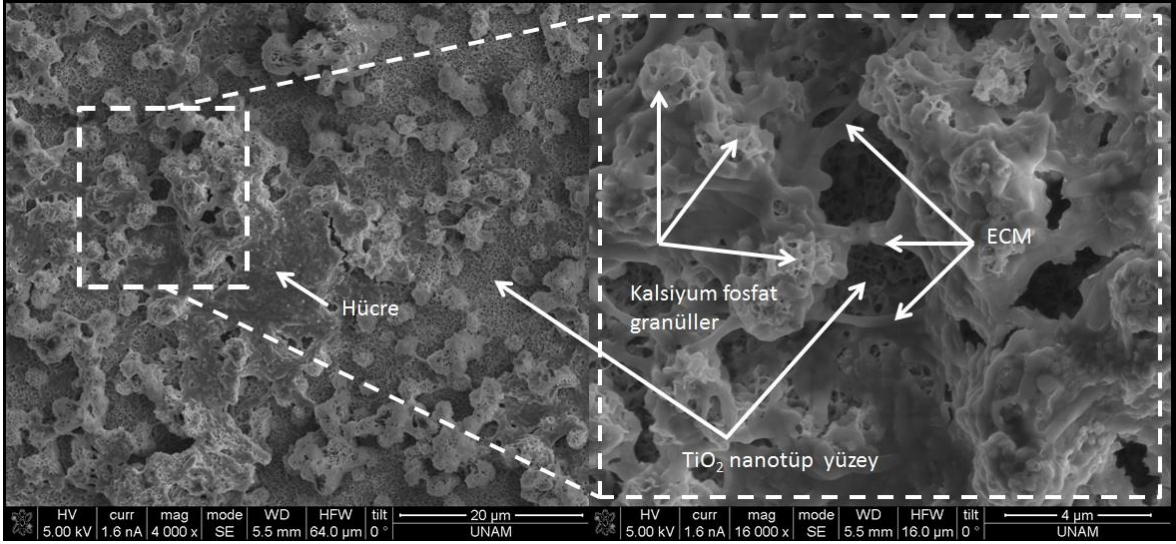
ALP aktiviteleri anodizasyon yapılmamış örnek grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Bununla beraber hidrate olmuş Ca^{2+} ve PO_4^{4-} iyon salımının da hücrel aktivite cevabını arttırdığı açıktır [113]. Kemiğin doğal ve temel bir inorganik bileşeni olan hidroksiapatitin kaplama olarak kullanıldığı titanyum malzemelerin biyouyumluluğunun arttığı bilinmektedir [114]. Tez çalışmalarında da görüldüğü üzere alınan sonuçlar literatür ile paralellik göstermekte ve kalsiyum fosfat kaplaması ile beraber hücrel proliferasyon ve ALP aktivitesindeki değişim sadece anodize edilmiş örnekler nazaran artış göstermektedir. MTT ve ALP sonuçlarından yola çıkılarak yapılan değerlendirmede 3 saatlik kalsiyum fosfat çöktürme süresi optimum değer olarak bulunmuştur.

AnTiSBF(3h) grubunda kültüre edilen hücreler iyi yayılmış ve birden çok uzamış filopedyaya sahip morfolojiye sahipken, modifikasyona uğramayan yüzeylerdeki (Ti) hücreler daha yuvarlak hatlara sahip ve yayılmamış bir biçimde görülmektedir. (Şekil 4.10.). AnTi SBF(3h) grubundaki bir alana yüksek büyütme yapılarak elde edilen bir SEM görüntüsünde; hücrenin hibrit yüzey ile entegrasyonu, kalsiyum fosfatın yüzeyde kümelenmesi ve hücre dışı matriks (ECM) oluşumları gözlenmektedir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.10. Modifikasyona uğramamış (A) ve anotlanıp SBF'de 3 saat apatitik kalsiyum fosfat çöktürülmüş (B) yüzeylerde kültür edilen hücrelerin görüntüleri



Şekil 4.11. AnTi SBF(3h) grubundaki bir alana ait yüksek büyütme SEM görüntüsü

Tez çalışmalarının bu bölümünde, hızlı kalsiyum fosfat çöktürülmesi ve çöktürme zamanıyla değişen yüzey karakterinin osteoblast benzeri hücre fonksiyonlarına etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak hem titanya nanotüp hem de kalsiyum fosfat içeren hibrit yüzeylerde osteoblast çoğalması ve ALP aktivitesinin en fazla olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) Yani anodize yüzeydeki kalsiyum fosfat oranının kontrolü ile yukarıda sayılan her iki pozitif etkiyi de yakalamak mümkündür.

4.2. Elektroeğrilmiş İpek Fibroin Nanofiberler ile Hazırlanan Yüzeyler

4.2.1. İpek Fibroinin Elektroeğrilmesi

4.2.1.1. Elektroeğirme Sistem Parametrelerinin Değerlendirilmesi ve Optimizasyonu

Elektroeğirme işlemlerinde kullanılan ipek fibroin çözeltisinin sağlıklı bir şekilde proses edilebilmesi için ilk olarak çözelti parametrelerinin uygunluğu test edilmiştir. Çözelti sisteminin elektroeğirmeye uygunluğunu viskozitesi, elektriksel iletkenliği ve yüzey gerilimi belirler. Kullanılan polimer tüm örneklerde ipek fibroin olduğu için moleküler ağırlık, moleküler ağırlık dağılımı ve polimer zincir özellikleri sistem parametrelerinde değerlendirmeye tabi tutulmamıştır. Viskozite ölçümlerinde ipek fibroinin formik asit içinde kütle/hacim oranınca (w/v) %5'lik çözeltisinin %25'e kadar artırılması sonucu viskozitenin eksponansiyel olarak artış gösterdiği gözlemlenmiş ($R^2=0,9931$) ve kesintisiz nanofiberler %15 (w/v) lik konsantrasyondan yukarıdaki derişimlerde elde edilmiştir.

İpek fibroinin artan konsantrasyonu ile yüzey geriliminin lineer olarak arttığı bulunmuştur ($R^2=0,9949$). Elektrohüdrodinamik proseslerde stabil bir jet konisi oluşturmak için tercihen düşük yüzey gerilim değerleri gerekmektedir. Oda koşullarında 36 mN m^{-1} değerinde olan formik asitin yüzey gerilimi ipek fibroin eklenmesi ile %17 - %27 dolayında artsa da (%15 – 25 w/v konsantrasyon aralığında) elde edilen en yüksek değer olan 46 mN m^{-1} , elektroğirme için uygun olmayan suyun oda koşullarındaki yüzey gerilim değeri olan 72 mN m^{-1} den oldukça düşüktür.

Elektroğirme işlemi için gerekli olan çözelti özelliklerinden sonuncusu ise elektriksel iletkenlik olup, çözücü formik asitin elektriksel iletkenliği $0,8 \text{ mS m}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Çözünen ipek fibroin ile çözelti sisteminin elektriksel iletkenliği artmış ve uygulanan potansiyel ile elektroğirme işlemine daha uygun hale gelmiştir.

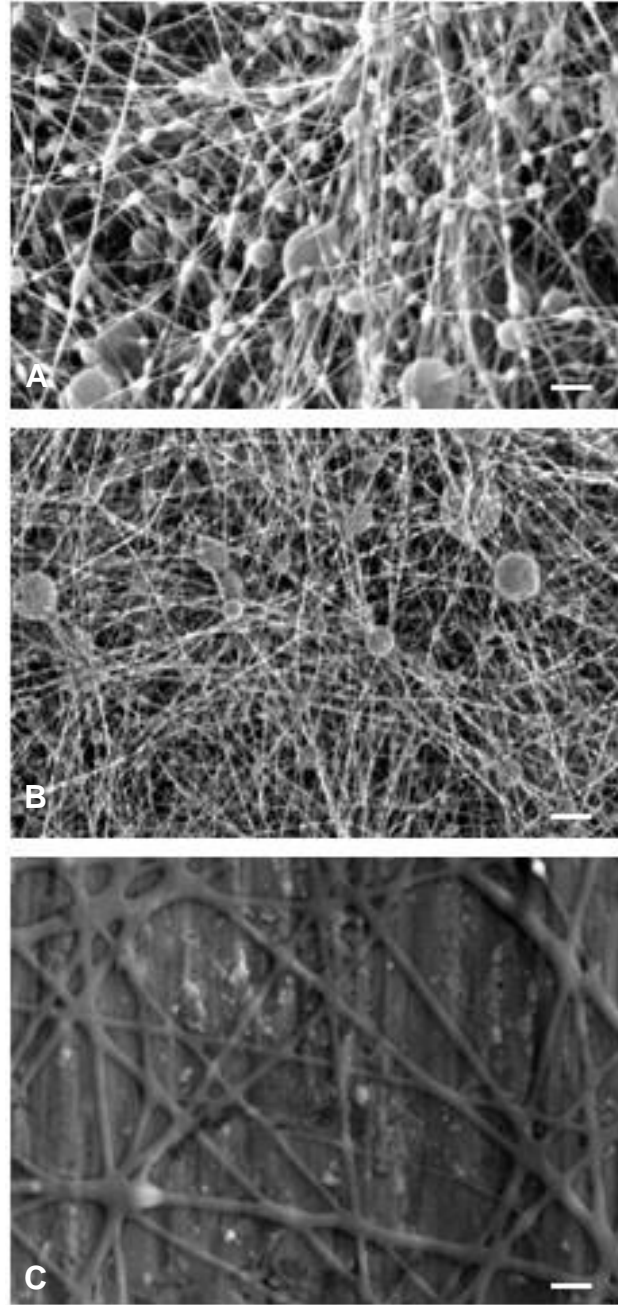
Sistem parametrelerinin optimizasyonunda elde edilen değerler çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Elektroğirme işleminde kullanılan ipek fibroin çözelti sistem parametreleri

	Viskozite (mPa s)	Yüzey gerilimi (mN m⁻¹)	Elektriksel iletkenlik (mS m⁻¹)
Formik asit	<15	36	0,8
%5 SF	25	37	2,3
%10 SF	46	39	3
%15 SF	68	42	4,1
%18 SF	100	43	5,3
%20 SF	112	44	8,6
%22 SF	128	45	11,5
%25 SF	190	46	12,1

4.2.1.2. Elektroeğirme Proses Parametrelerinin Değerlendirilmesi ve Optimizasyonu

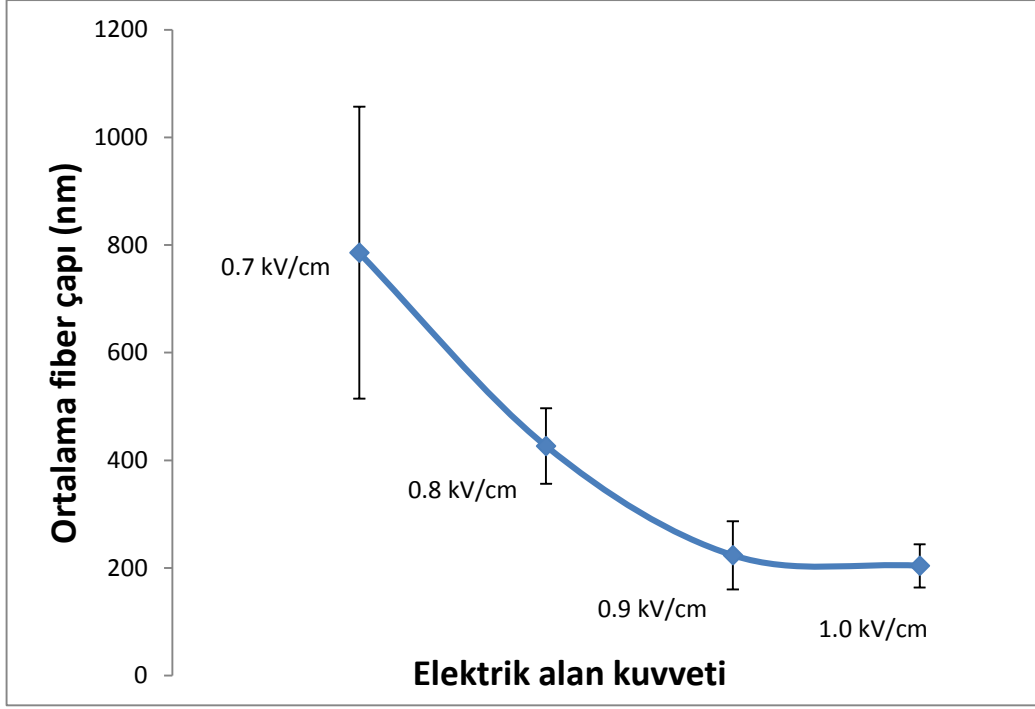
Proses parametrelerinin optimizasyon sürecinde kolajen benzeri SF nanofiberlerin eldesi için denenen derişimlerden %10 SF (w/v) ve yukarı değerlerde stabil ve sürekli fiberler oluştuğu gözlemlenmiştir ve artan SF derişimi ile de fiber çaplarının arttıkları görülmüştür; ancak elektroeğirmede bağıl olarak düşük konsantrasyonlarda karşılaşılan boncuklanma (beading) oluşumunun artan konsantrasyon ile beraber azaldığı, %25 derişimde ise kaybolduğu anlaşılmıştır. Elektroeğirme proses parametrelerinin değerlendirilmesine boncuklanmanın gözlemlenmediği en düşük konsantrasyon olan %25 SF ile devam edilmiştir. %10 - %25 arası SF konsantrasyonlardaki nanofiber morfolojileri Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. %10 - %18 SF derişimlerinde fiber çaplarının yer yer 100 nm altına düştüğü fakat eğrilmiş ipeğin çoğunlukla birkaç yüz nanometrelik boncuk oluşumları ile dolu olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.12. %10 (A), %18 (B) ve %25 (C) konsantrasyonlardaki SF çözeltilerinin elektroğrilmesi ile elde edilen nanofiber morfolojileri. Beyaz çubuk 500 nm'yi göstermektedir.

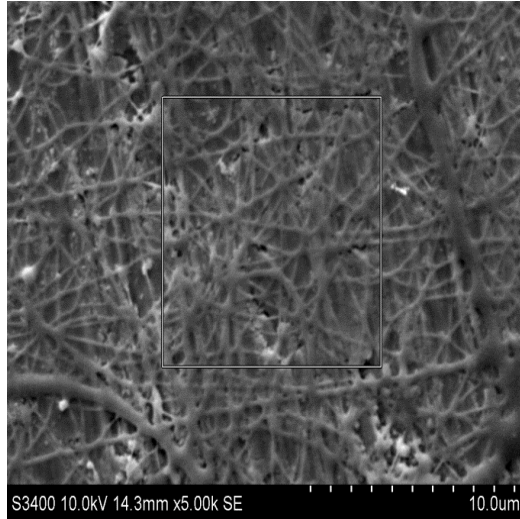
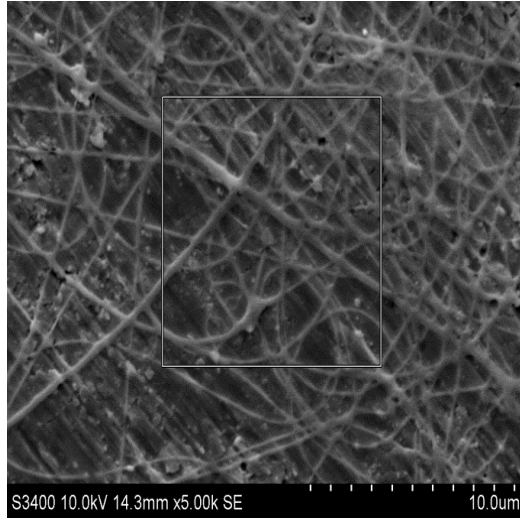
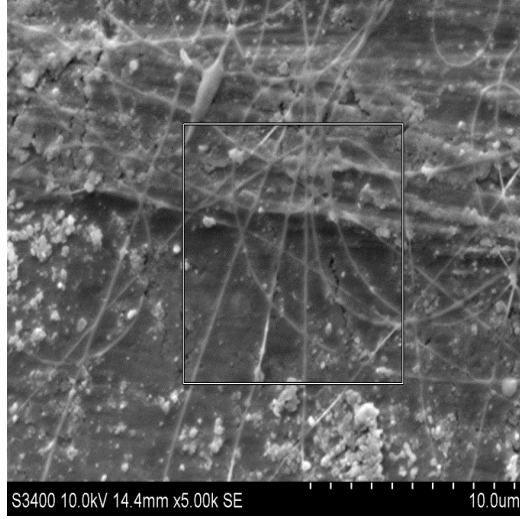
Proses parametrelerinin değerlendirmesinde ikinci olarak elektrik alan kuvvetinin ortalama fiber çapına etkisi incelenmiştir. 20 cm mesafeden yapılan eğrilme işleminde çözelti ile toplayıcı arasına 14 – 20 kV potansiyel farkı uygulanmış ve elektrik alan kuvvetinin nanofiberlerin çaplarına etkisi Şekil 4.13.'te gösterilmiştir. Artan elektrik alan ile beraber çapta düşüş görülmektedir ve elde edilen grafik literatürde de rapor edildiği gibi önce artan elektrik alan kuvveti ile azalmış sonrasında ise sabit kalarak grafik düzlüğe ulaşmıştır. Elektrik alan kuvveti 0.7

kV/cm iken ortalama 790 ± 271 nm olan fiber çapı, 0.8 kV/cm alan kuvvetinde 427 ± 70 ; 0.9 kV/cm değerinde ise 220 ± 63 kadar düşmüştür. Elektrik alan kuvveti 1.0 kV/cm değerine çıkarıldığında ise nanofiber çapı 213 ± 40 değerine gelmiştir. SF nanofiber ve nanohidroksiapatit katkılı SF nanofiberlerin elektroçirme proseslerine, standart sapmanın azaldığı ve ortalama fiber çapının platoya ulaştığı değer olan 0.9 kV/cm elektrik alan kuvveti değeri ile devam edilmiştir.



Şekil 4.13. Elektrik alan şiddetinin ortalama SF fiber çapına etkisi

Eğirme süresinin yüzeyde elde edilen nanofiber-titanyum hibrit kompozisyona etkisi test edilen bir diğer proses parametresi olmuştur. Yüzeyin fiberlerce zengin bir hale gelmesinin incelenmesinde 0,9 kV/cm elektrik alan kuvveti ve %25 lik SF konsantrasyonu sabit tutulup 2, 5 ve 10 dakikalık elektroçirme süreleri değişken parametre olarak kullanılmıştır. Buna göre sürenin artışı ile yüzeyde birim alandaki ($100 \mu\text{m}^2$) fiber sayısının artışının doğrusallık gösterdiği ($R^2=0,9931$) bulunmuştur. Birim alandaki fiber sayıları 2, 5 ve 10 dakikalık elektroçirme işlemleri sonucunda sırası ile 8, 19 ve 35 fiber/ $100 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.14.) ve in vitro deneylerde kullanılacak malzeme hazırlanmasında yüzeydeki hibrit yapıyı en belirgin şekilde yansıtan 5 dakikalık eğirme zamanı kullanılmıştır.



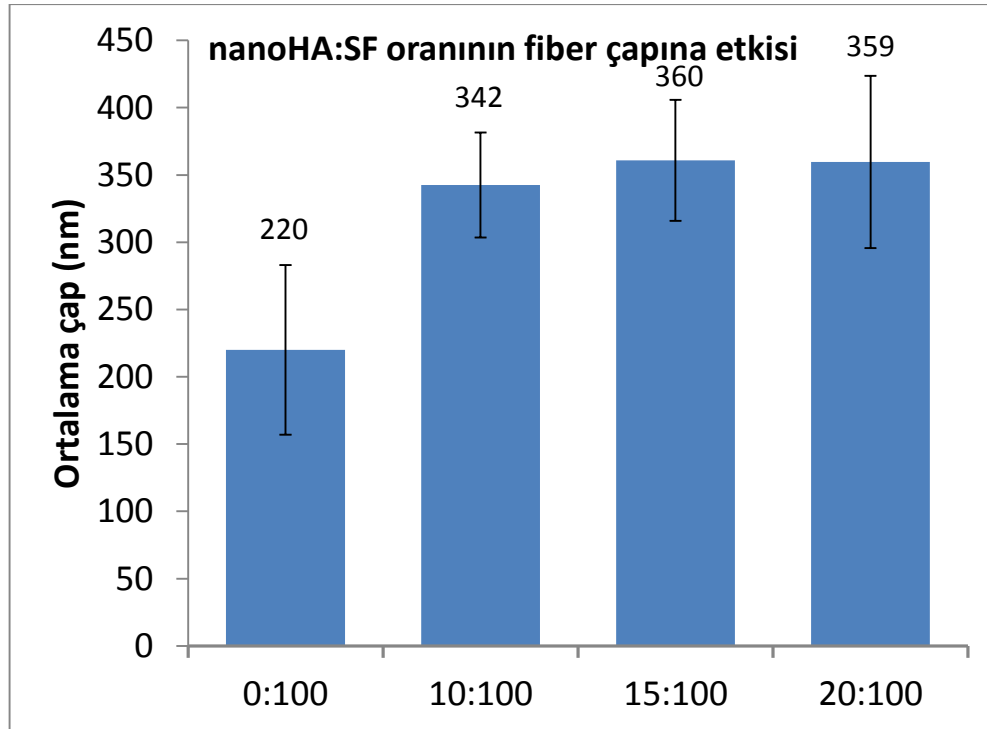
Şekil 4.14. 2, 5 ve 10 dakikalık elektrodeğirme işlemleri sonucunda elde edilen yüzey görüntüleri

4.2.2. Nano Hidroksiapatit Katkılı İpek Nanofiberler Kullanılarak Elde Edilen Yüzeylerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Parçacık boyutu 200 nm altı olan hidroksiapatit katkılı ipek nanofiberlerin karakterizasyonunda bir önceki basamakta optimize edilen 0.9 kV/cm elektrik alan kuvveti ; %25 SF konsantrasyonu ve 5 dakikalık eğirme süresi sabit tutulmuş ve elektroegirme işleminin hemen öncesinde eğirme çözeltisine ağırlık / hacimce %10 , %15 ve %20 lik oranlarda eklenen nano hidroksiapatit parçacıkların fiber kalınlık oranına etkileri incelenmiştir.

4.2.2.1. nanoHA:SF Oranının Fiber Çapına Etkisi

%25 SF çözeltisinin elektroegirmesiyle elde edilen nanofiberlerin 220 ± 63 nm olan ortalama çapı %10 nHA eklendikten sonra %55 artarak 342 ± 39 nmye çıkmıştır. nHA'nın %15e artırılması ile yine %5 bir artış gözlemlenmiş ve ortalama çap 360 ± 45 olarak hesaplanmıştır. %20 nHA katkılı çözeltinin elektroegirmesi sonucu elde edilen nanofiberlerin çapında bir artış gözlemlenmemiş ve ortalama kalınlık 359 ± 64 olarak bulunmuştur. (Şekil 4.15.)



Şekil 4.15. nanoHA:SF oranının nanofiber çapına etkisi

Optimize edilen eğirme parametreleri sonucunda *in vitro* biyolojik uyumları test edilecek örnek grupları aşağıdaki gibi seçilmiştir.

Ti kontrol (Herhangi bir yüzey işlemi görmemiş titanyum)

AnTi (a)

TiSF (b)

AnTiSF (a,b)

TiSFnHA (c)

AnTiSFnHA (a,c)

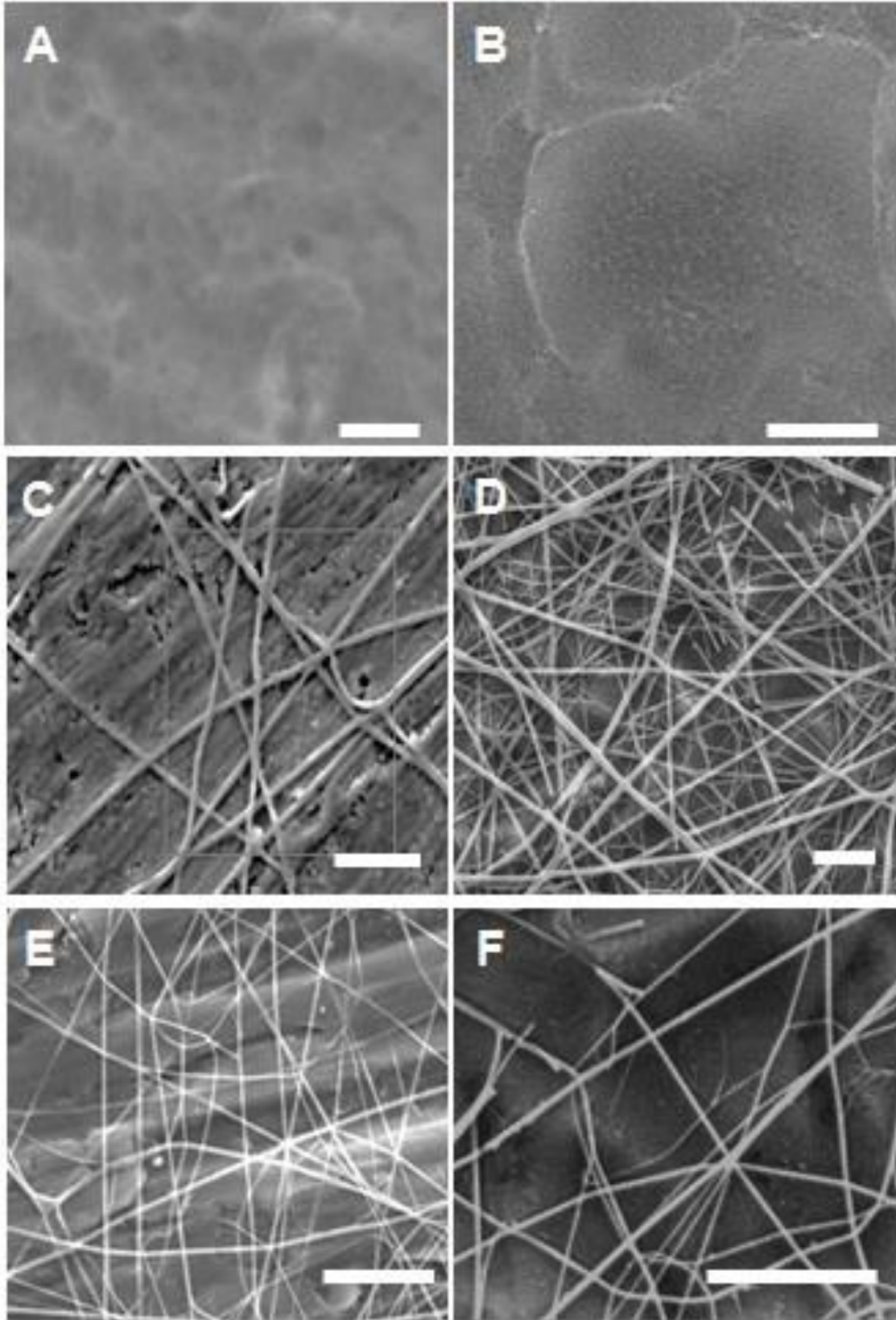
(a) 0.2 M HF elektroliti ile 20 dakika boyunca 20 V anodizasyon işlemi görmüş

(b) %25 SF çözeltisinin 0.9 kV/cm elektrik alan kuvveti altında 5 dakika elektroğrilmesine maruz bırakılmış

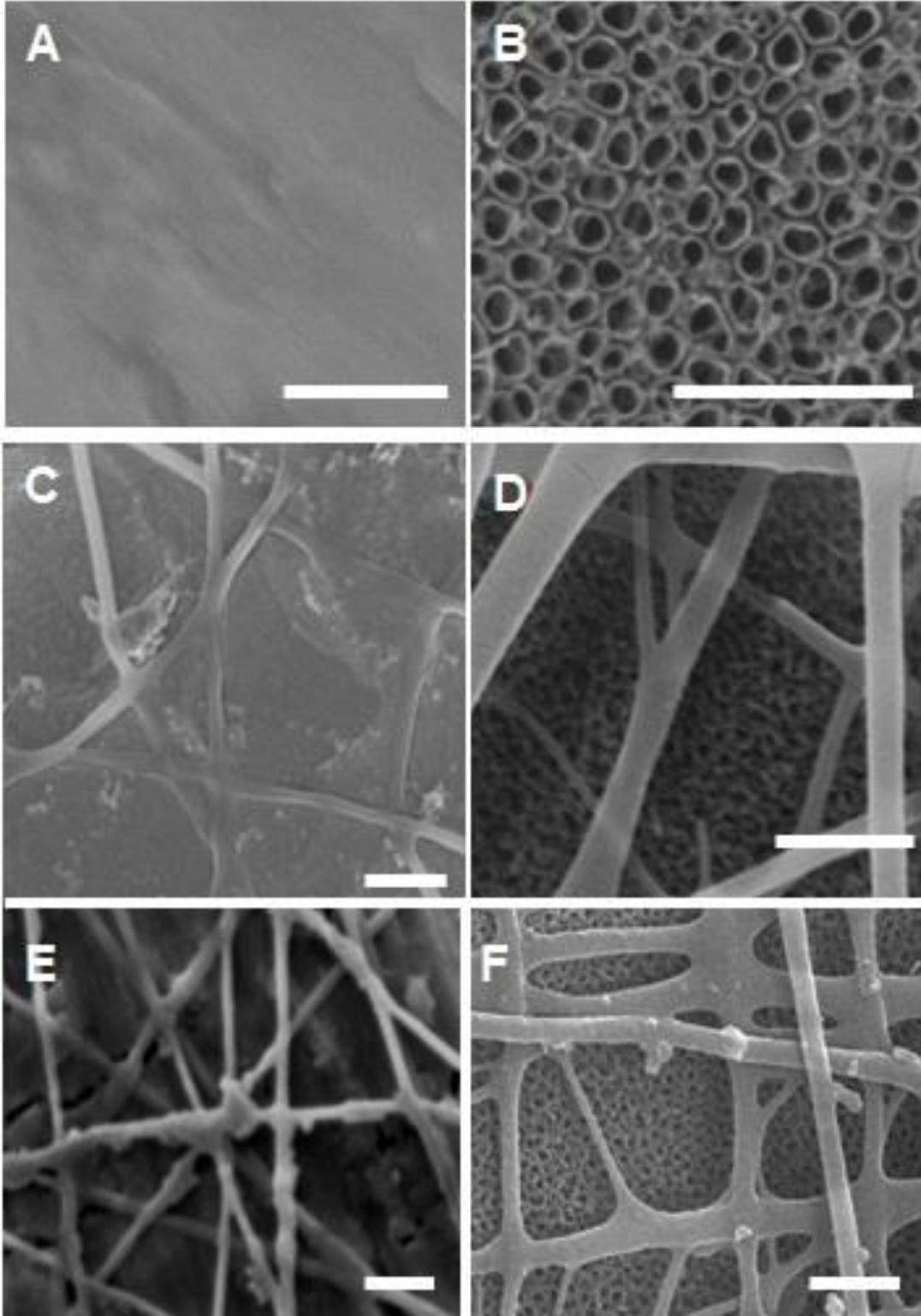
(c) Ağırlıkça %20 nanoHA katkılı %25lik SF çözeltisinin 0.9 kV/cm elektrik alan kuvveti altında 5 dakika elektroğrilmesine maruz bırakılmış

4.2.3. İpek Fibroin ve Nanohidroksiapatit Katkılı İpek Fibroin Nanofiber Elektroğrilmiş Titanyum Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonları

Elektroğrilmiş ipek nanofiber ve nano hidroksiapatit katkılı ipek nanofiber ile modifiye edilmiş titanyum ve anodize titanyum yüzeylerin morfolojik karakterizasyonları SEM ile gerçekleştirilmiştir. 6 farklı örnek grubunun düşük (Şekil 4.16.) ve yüksek (Şekil 4.17.) büyütmelelerdeki görüntüleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.16. Ti(A), AnTi(B), TiSF(C), AnTiSF(D), TiSFnHA(E) ve AnTiSFnHA(F) örnek gruplarının düşük büyütmede elde edilen SEM görüntüleri. Beyaz çubuk 5 mikrometreyi göstermektedir.



Şekil 4.17. Ti(A), AnTi(B), TiSF(C), AnTiSF(D), TiSFnHA(E) ve AnTiSFnHA(F) örnek gruplarının yüksek büyütmede elde edilen SEM görüntüleri. Beyaz çubuk 1 mikrometreyi göstermektedir.

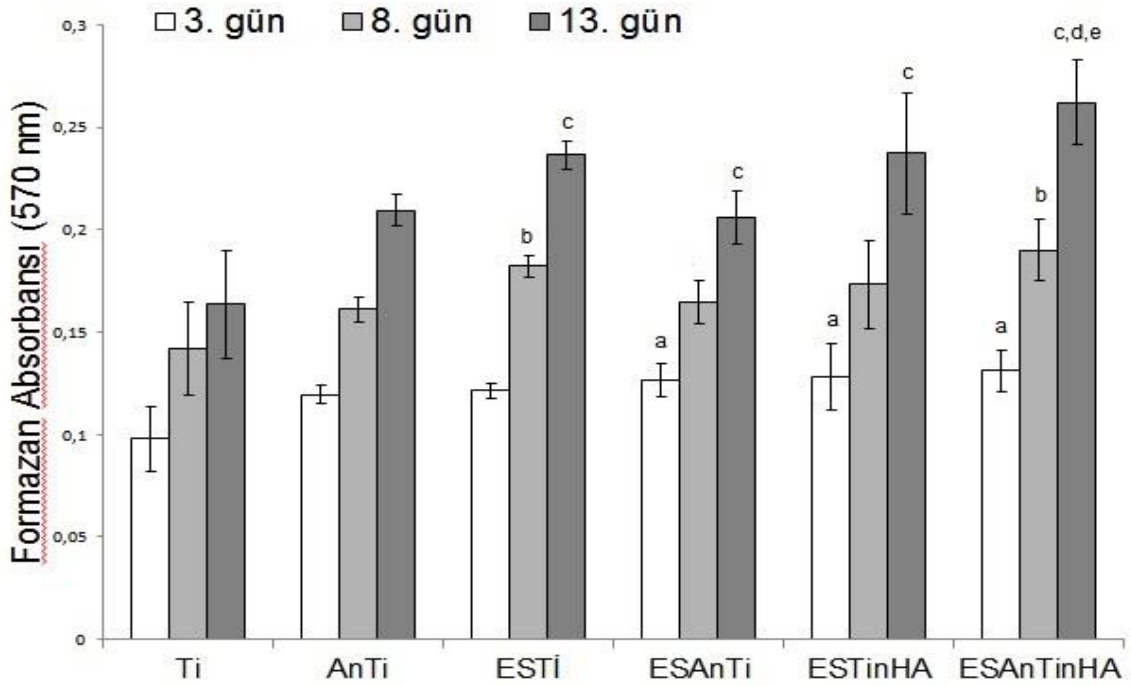
Düşük büyütmeli görüntüler incelendiği zaman elektroğirme sonrasında hem anodize (D ve F) hem de anodize olmayan (C ve E) yüzeylerde nanofiber yapıların biriktiği; ancak bu birikimin optimize edilen süre sonucu metali tamamen kaplayan bir şekilde gerçekleşmediği ve/veya fiberlerin kalın bir membran oluşturarak yüzeyden soyulabileceği bir oluşum içine girmediği gözlemlenmektedir. Elektroğirme işlemi yapılan yüzeyler titanyum metali ve ipek nanofiberlerin ortak bir şekilde buldukları melez bir morfolojik karaktere sahiptir.

Yüksek büyütmeli görüntülerde fiber boyutları daha net olarak seçilirken TiSFnHA (E) ve AnTiSFnHA (F) yüzeylerde ipek nanofiberlerin yapılarında bulunan nanohidroksiapatit katkıları (<200nm parçacık boyutu) da görülebilmektedir. Hazırlanan TiSFnHA ve AnTiSFnHA yüzeylerde nano hidroksiapatit katkılamının elektroğirme sonrası yüzeye çöktürme ya da püskürtme yerine eğirme çözeltisine katılma işlemi şu avantajları beraberinde getirmiştir. İlk olarak metalik yüzeyde elde edilmesi planlanan ikili modifikasyonun tek bir basamağa düşürülmesi zaman açısından daha ekonomik bir yöntem olup ekstra bir çöktürme/biriktirme prosedürüne gerek kalmamıştır. İkincil ve daha önemli olan avantaj ise kemik yapısındaki kolajen nanofiber – hidroksiapatit nanokristallerinin daha gerçekçi bir şekilde taklit etmesidir. Genel Bilgiler bölümünde de anlatıldığı üzere kemik dokusundaki ekstrasellüler matriks yapısında kolajen nanofiberlerin oluşturduğu iskele yapısı, matriksin büyük bir çoğunluğunu oluşturan nano hidroksiapatit kristalleri için bir destek görevi görmekte ve nano kristaller fiberlerin üzerinde / kesişim noktalarındaki ara boşluklarda yerlerini almaktadırlar. Hücre dışı matriksin bu özelliğinin taklit edilebilmesi ve hidroksiapatit mineralinin çöktürülmesi ile yüzeyde istenmeyen birikimlere neden olmaması sebebiyle deney dizaynı bu yönde şekillenmiştir.

4.2.4. İpek Fibroin ve Nanohidroksiapatit Katkılı İpek Fibroin Nanofiber Elektroğirilmiş Titanyum Yüzeylerin *in vitro* Hücre Kültür Testleri

Saos-2 hücre hattının deney gruplarındaki çoğalmaları MTT testi ile incelenmiştir ve incelemenin ilk günü olan 3. gün sonuçlarına bakıldığında tüm modifikasyona sahip yüzeylerdeki canlı hücre sayısının, işleme tabi tutulmamış titanyum kontrole göre daha fazla olduğu ve ESanTi , ESTinHA ile ESanTinHA örnek gruplarında bu farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). 8. gün sonuçlarına bakıldığında ise ESTi ve ESanTinHA örnek gruplarındaki hücre proliferasyon artış

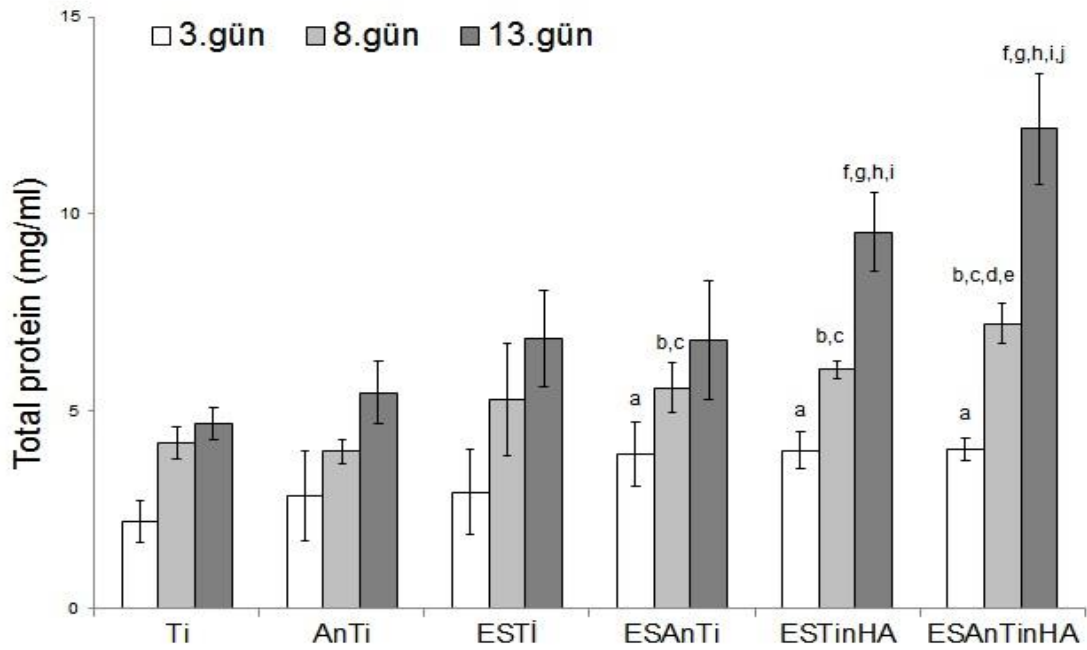
oranının (sırasıyla %49 ve %45) istatistik olarak Ti kontrol grubuna göre daha anlamlı olarak fazla olduğu ($p<0.05$), AnTi, ESanTi ve ESTinHA örnek gruplarındaki artışlarda ise (sırasıyla %33, %31 ve %34) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. MTT testlerinin son günü olan 13. gün sonuçları karşılaştırıldığında ise elektroçirime ile ipek fibroin nanofiberler içeren tüm yüzeylerdeki (ESTi, ESanTi, ESTinHA, ESanTinHA) canlı hücre sayısı istatistiki olarak Ti kontrol grubuna göre daha fazla bulunmuştur. Elektroçirime işlemi yapılan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise anodize titanyuma nanohidroksiapatit katkılı ipek fibroin elektroçirilmiş yüzeylerdeki (ESanTinHA) hücre sayısı en fazladır ve bu değer nanohidroksiapatit katkılanmamış ipek fibroinin elektroçirildiği her iki titanyum yüzeye sahip gruba (ESTi ve ESanTi) göre istatistiksel olarak anlamlı fark içermektedir ($p<0.05$)(şekil 4.18).



Şekil 4.18. Ti, AnTi, ESTi, ESanTi, ESTinHA ve ESANTinHA örnek gruplarındaki hücrelerin bağıl canlılık oranları. Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a)

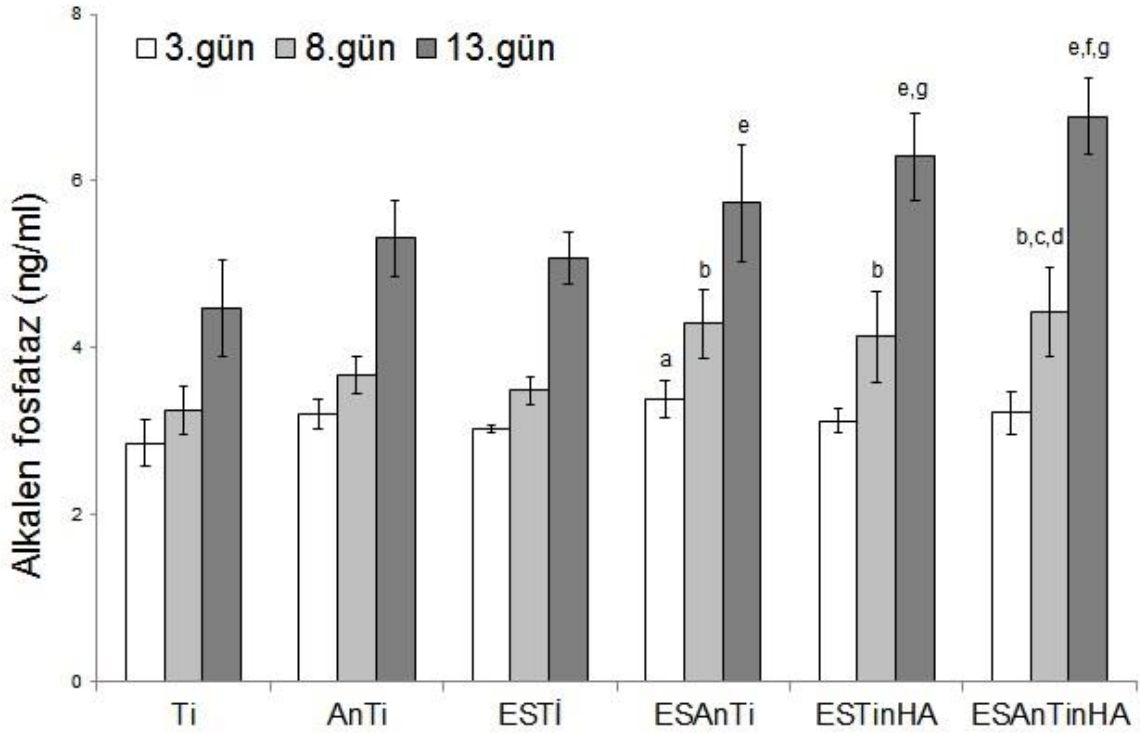
3. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; b) 8. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; c) 13. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; d) 13. günde ESTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; e) 13. günde EsAnTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$).

Toplam protein miktarları incelendiği zaman 3. gün itibariyle ESAnTi, ESTinHA ve ESAnTinHA örnek gruplarındaki toplam protein miktarının Ti kontrole göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu ve bu durumun 8. gün içinde de geçerli olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Toplam protein miktarlarındaki artış ESAnTi, ESTinHA ve ESAnTinHA gruplarında 8. günde AnTi örnek grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anodize titanyum yüzeylere nanohidroksiapatit katkıli ipek fibroin elektroeğrilmiş yüzeylerdeki (ESAnTinHA) toplam protein miktarı da yine sadece ipek fibroin elektrospinlenmiş yüzeylerdeki (ESTi ve ESAnTi) toplam protein miktarlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 8. günde fazladır. Toplam protein miktarının 13. gün analizindeki sonuçlara bakıldığında ise nanohidroksiapatit katkılamanın etkisi açıkça görülmekte olup ESTinHA örnek grubunda Ti kontrol, AnTi, ESTi ve ESAnTi ; ESAnTinHA grubunda ise tüm diğer gruplara göre istatistiksel olarak fazla olduğu bulunmuştur (şekil 4.19).



Şekil 4.19. Ti, AnTi, ESTi, ESAnTi, ESTinHA ve ESANTinHA örnek gruplarındaki hücrelerin total hücre içi protein konsantrasyonları. Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a) 3. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; b) 8. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; c) 8. günde AnTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; d) 8. günde ESTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; e) 8. günde EsAnTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; f) 13. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; g) 13. günde AnTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; h) 13. günde ESTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; i) 13. günde ESAnTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$) ; j) 13. günde ESTinHA kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p<0.05$).

Osteoblast hücre fonksiyonlarının önemli bir parametresi olan ALP aktiviteleri de 3, 8 ve 13. günlerde analiz edilmiştir. Hücre kültürünün ilk analiz günü olan 3. Günde ALP aktivitesi ESAnTi örnek grubunda Ti kontrol grubuna göre istatistiki olarak daha fazla bulunmuştur. 8. günde ise ESAnTi, ESTinHA ve ESAnTinHA gruplarında Ti kontrol grubuna ; ESAnTinHA grubunda da AnTi ve ESTi grubuna göre pozitif yönde bir anlamlı farklılık görülmektedir. ALP aktivitelerinin ölçüldüğü son gün olan 13. günde ise yine benzer bir eğilim görülmekte olup 8. gündeki anlamlı farklılıklar bu gün için de geçerlidir. Aynı zamanda ESAnTinHA grubundaki artış 13. günde ESTinHA grubuna göre de istatistiksel olarak fazla bulunmuştur (şekil 4.20).



Şekil 4.20. Ti, AnTi, ESTi, ESAnTi, ESTinHA ve ESANTinHA örnek gruplarındaki hücrelerin Alkalen Fosfataz aktiviteleri. Küçük harfler istatistiksel farkı göstermektedir. a) 3. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p < 0.05$) ; b) 8. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p < 0.05$) ; c) 8. günde AnTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p < 0.05$) ; d) 8. günde ESTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p < 0.05$) ; e) 13. günde Ti kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p < 0.05$) ; f) 13. günde AnTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p < 0.05$) ; g) 13. günde ESTi kontrol grubuna göre anlamlı fark ($p < 0.05$).

Hücre proliferasyonlarındaki artış oranlarına bakıldığında analiz günlerindeki istatistiksel olarak anlamlı farklar çoğunlukla Ti kontrol grubuna karşı elde edilmiştir. Anodizasyon sonrası artan yüzey alanı ile birlikte nanotübüler kavitelere daha fazla adsorplanabilecek yapışma proteinlerinin hücreler tarafından daha kolay algılanabileceği ve yapışmanın hızlanacağı daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir [64,65,109]. Nanometrik boyuttaki yüzey bileşenlerine sahip olan materyallerin üstünlüklerinin topografik yapıdan mı yoksa sağladıkları yüksek yüzey enerjisi, ıslanabilirlik gibi fizikokimyasal özelliklerden dolayı mı kaynaklandığına dair tartışmalara kesin bir cevap bulunmamaktadır. Tezin bu kısmındaki çalışmalarda da yüzeyde uygulanan işlemler ıslanabilirliği değiştirirken aynı zamanda yüzey pürüzlülüğü ve kimyasal bileşim de değişmektedir. Bu yüzden ıslanabilirliğin hücre çoğalması ve fonksiyonlarına etkisi arasında bir korelasyon belirlenememiştir.

Tian ve arkadaşlarının yayınladıkları yeni bir çalışmada ise anodizasyon ile işlenen yüzeylerde, hücre ayaklarının gözenek yapılarına doğru nüfuz ederek fiziksel bir kenetlenme yapabildiği hipotezini savunmuşlardır. Yüzeyde elde edilen nanoporöz karakterin, kemik matriksindeki trabeküler benzeri olduğuna vurgu yapılarak artan hücre tutunması ve osteoblast fonksiyonlarına biyobenzer çevrenin etki ettiğini bildirmişlerdir [115]. Yapılan çalışmada yüzey biyoyumluluğunu artırması yönünde yapılan diğer işlemlerden ipek fibroin nanofiberlerin elektroğrılması da hücre tutunma ve yapışmasına etki ettiği açıkça görülmektedir. İpek fibroinin kullanılmasında başlıca neden malzemenin biyomalzeme ve biyomedikal uygulamalarda uyumu, toksik olmayan bozunması ve mekanik dayanımı gibi özellikleriyle kendini ispatlamış olmasıdır [116,117]. Nanofiberlerin yüzeyde arttırdığı alan ve protein-protein etkileşimleri sonucunda hücre yapışması da elektroğrilmemiş yüzeylere göre daha fazla elde edilmiştir. Fibroinde bulunan karboksil ve karbonil fonksiyonel grupların hem proteinler ile etkileşecek hem de vücut sıvısındaki iyonlar için mineralizasyonun gerçekleşeceği çekirdek bölgeleri teşkil etmektedir. Nano hidroksiapatit katkılanması ile beraber metal yüzeylerindeki hücre yapışma ve çoğalmasının da arttığı görülmektedir. İlk olarak, hidroksiapatitin yüzey ıslanabilirliğe yaptığı pozitif etki vücut sıvısı ile etkileşebilirliğini iyileştiren bir unsurdur [75]. Nanotopografiye sahip yüzeylerin hücre yapışması, çoğalması, farklılaşması ve ekstrasellüler matriks sentezinde önemli rol oynadığı da daha

önceki literatür çalışmalarında ortaya konmuştur [118,119]. Bu çalışmada da hızlandırılmış osseoentegrasyonun temeli olan ilk hücre yapışmasının nanohidroksiapatit katkılı nanofiber yapılar ile geliştirildiği görülmektedir. Hidroksiapatit katkılı elektroğrılmış yüzeylerdeki canlı hücre sayıları diğer örnek gruplarına göre daha fazla olup hücre canlılığına fibroin-nHA bileşiminin sinerjik bir katkısı olduğu söylenebilir. Bu sinerjik etkinin anodizasyon ile elde edilen nanotübüler tabakalar üzerinde daha da fazla olduğu proliferasyon testlerinde görülmektedir.

Hücre tutunma, yayılma ve çoğalması biyomalzeme ile etkileşimde ilk fazda gerçekleşen cevaplardır ve sonrasında da mineralizasyon ve farklılaşmaya etki eder. Alkalin fosfataz membrana bağlı bulunan bir enzim olup osteoblastik farklılaşma için bir belirteç olarak kabul edilir [111] ve sadece mineralize olmuş ekstrasellüler matrikslerdeki hücreler tarafından üretilir. Şekil 4.20'den anlaşılacağı gibi ALP aktivitesi hücre kültürünün ilk analiz günü olan 3. günde tüm örnek gruplarında birbirine yakın bir değer olup anlamlı bir fark sadece ESAnTi grubu ve Ti kontrol arasında görülmektedir ($p<0.05$). Aktivitelerdeki 8. günden itibaren gruplar arası anlamlı farklılıklar oluşmaya başlamış ve nanohidroksiapatit katkılı fibroin nanofiberlerin bulunduğu yüzeylerdeki aktivite Ti kontrol grubuna göre fazla bulunmuştur. ESTinHA ve ESAnTinHA gruplarındaki 3 -8. günler arasındaki artış sırasıyla %32 ve %37 oranlarında gerçekleşirken, Ti ve AnTi gruplarındaki %13 ve %14 dolayındaki ALP aktivite artışları gözlenmiştir. Hücre çoğalmasına bakıldığında Ti kontrol ve AnTi gruplarında 3 – 8. günler arasında %35 dolayında bir artış söz konusudur; ancak bu oran ALP aktivitesine yansımamıştır. Bunun sonucunda bu yüzeylerdeki hücrelerin osteojenik farklılaşmaya 8. gün sonunda girmediği söylenebilir. ESTinHA ve ESAnTinHA gruplarındaki ALP aktivitesinin 8 - 13. günler arasındaki artışını incelediğimiz zaman sırasıyla %52 ve %53 oranlarında bir artış gözlemlenmektedir. Aynı zaman aralığında söz konusu gruplarda bulunan hücre sayısındaki artışın yine sırasıyla %37 ve %38 olduğunu göz önünde bulundurursak osteoblastik hücre farklılaşmasının bir parametresi olan ALP aktivitesinin hücre proliferasyonundan daha fazla bir oranda arttığını görebiliriz. Elde edilen bu bulgu Lian ve Stein'in yaptıkları bir çalışmada ortaya koydukları hipotezle örtüşmektedir. Hipotezde daha düşük bir çoğalma profili

ortaya koyan örneklerdeki hücrelerin daha özelleşmiş bir fenotipe sahip oldukları savunulmaktadır [120].

8-13. Günlerde hücre tutunmasının %45 ve %34 olarak arttığı Ti kontrol ve AnTi örnek gruplarındaki ALP aktivitesi artışı sırasıyla %37 ve %47 olarak bulunmuştur. Buna göre Ti kontroldeki hücrelerin yüksek proliferasyon göstermesine karşın osteoblastik farklılaşma parametrelerinden ALP aktivitesine diğer örnek gruplarında olduğu kadar sahip değildiler. Anodizasyon sonrasında ise %47lik ALP aktivitesi artışı hücre proliferasyonuna göre daha yüksek olarak bulunmuştur ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Anodizasyon sonrası nanotübüler yapılar üzerinde kültüre edilen osteoblastların ALP aktivitelerindeki artışlar literatürdeki benzer çalışmalarda rapor edilmiş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı [62,111] ya da anlamsız [65,121] olduğuna dair karşılıklı bulgular bulunmaktadır.

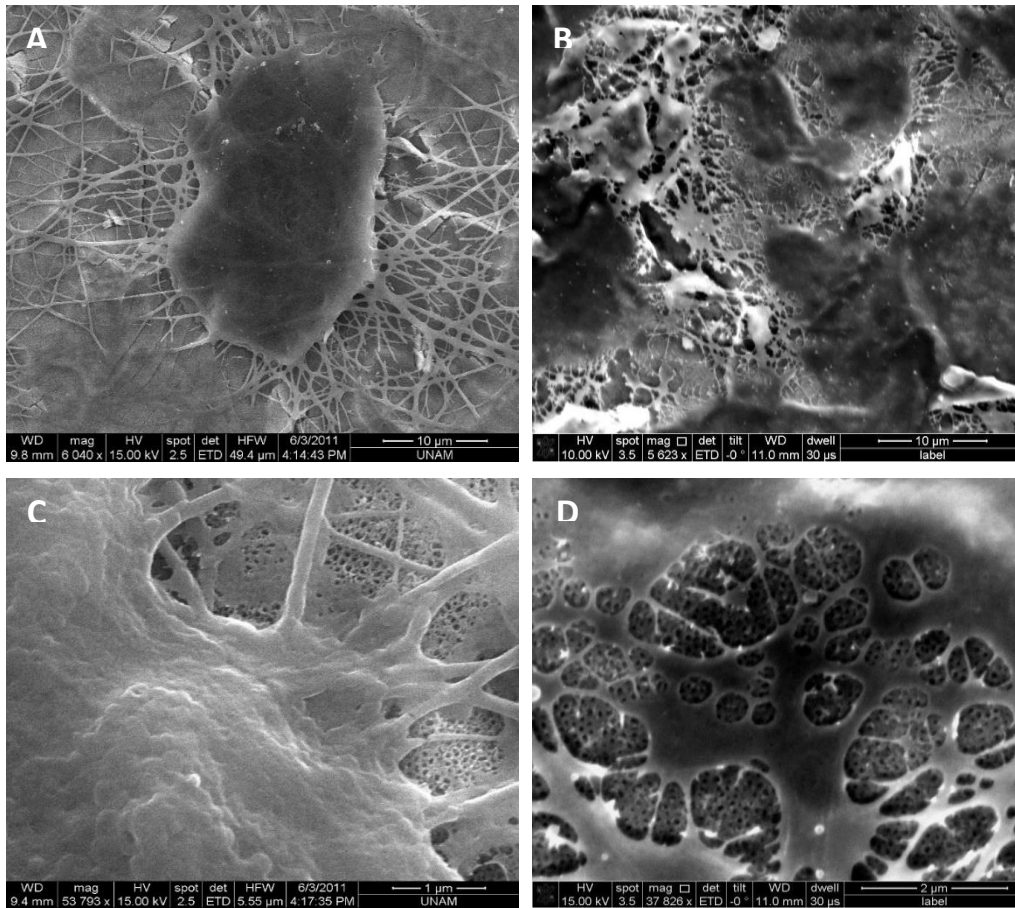
Ortamda nHA katkılmasını dikkate almaksızın sadece fibroin nanofiberlerin hücre proliferasyon ve ALP aktivitelerine yaptıkları etki incelendiğinde hem anodize hem de anodize olmamış yüzeylere yapılan elektroçirme işleminin başlangıç hücre tutunmasına etki ettiği ve bu etkinin ESAnTi grubunda Ti kontrole göre anlamlı olduğu görülmüştür. Kültürün 8 ve 13. günlerinde yapılan MTT testlerinde ESTi grubundaki hücre çoğalması ESAnTi grubuna nazaran daha anlamlı olsa da bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna karşılık aynı grupların ALP aktiviteleri incelendiği zaman ortaya çıkan tabloda zıt bir durum ortaya çıkmaktadır. ESAnTi örnek grubunda kültüre edilen hücrelerin proliferasyonu daha düşük olarak gerçekleşse de ALP aktiviteleri ESTi grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan bu fark yine AnTi – ESAnTi grubu kıyaslaması ile aynı tabloyu çizmektedir. İstatistiksel olarak 3 analiz gününde de anlamlı fark ESAnTi – Ti kontrol grupları arasında olup hem nanotübüler hem de nanofiber ortak yüzey yapılanmasının osteojenik farklılaşma üzerine ortak bir sinerjik etkide bulunduğu söylenebilir.

İmplant yüzeyinde hücre kolonizasyonunun yanında titanyum yüzeyin hücrelerin olgun osteoblastlara dönüşmesini ve hücre dışı matriks sentezini de provoke etmesi önem teşkil eder. Bu sebepten dolayı yüzeydeki gerek anodizasyon sonucu ortaya çıkan nanotüpler, gerekse elektroçirilmiş nanofiberlerin yarattığı pürüzlü

yapıların hücre özelleşmesini ve osteogenezi provoke ederek daha elverişli bir ortam yarattıkları sonucuna varabiliriz.

4.2.5. Nanohidroksiapatit Katkılı İpek Fibroin Nanofiber Elektroeğrilmış Titanyum Yüzeylerdeki Hücrelerin Morfolojik İncelemesi

Nanohidroksiapatit katkılı ipek fibroin elektroeğrilmış yüzeylerde kültüre edilen osteoblastların 8. kültür gününde elde edilen düşük ve yüksek büyütmedeki elektron mikroskop görüntüleri şekil 4.21.'de verilmiştir. Görüntülerde de görüldüğü üzere hücreler yüzeyde iyi yayılma göstermiş ve çoklu filopedyalara sahiptir. Hücreler ve elektroeğrilmış nanofiberler ile bir bütünleşme göstermiş olup yüksek büyütmede elde edilen görüntülerde hücreler arası matriks benzeri oluşumlar gözlemlenmektedir. 8 günün ardından elektroeğrilmış nanofiberler yapıda varlıklarını ve bütünlüklerini korumakta olup yüzeyde nanotüp-nanofiber kompozisyonun devam ettiği açıkça görülmektedir.

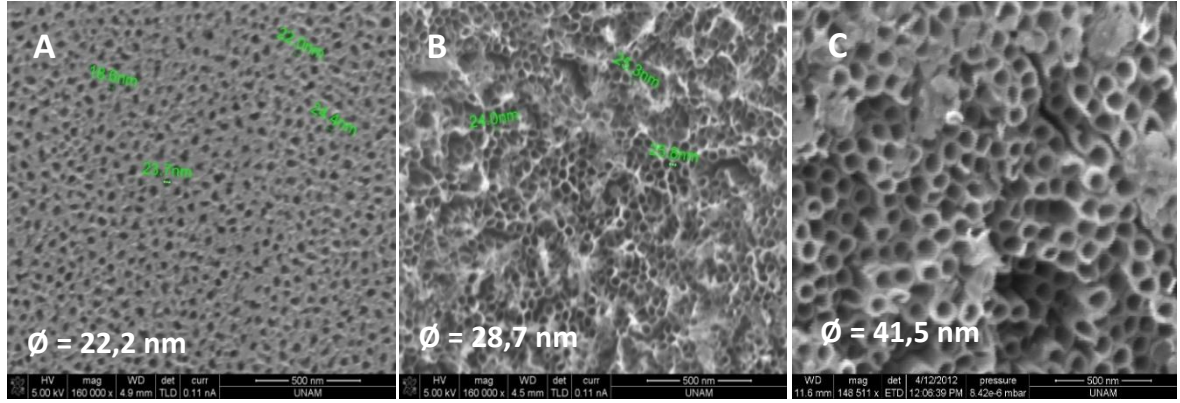


Şekil 4.21. ESanTi ve ESanTiHA örnek gruplarında hücrelerin düşük ve yüksek büyütmedeki görüntüleri. ESanTi düşük büyütme (A) ; ESanTiHA düşük büyütme (B) ; ESanTi yüksek büyütme (C) ; ESanTiHA yüksek büyütme (D).

4.3. Boy-En Oranı Yüksek Nanotüpler ile Lokal İlaç Salımı

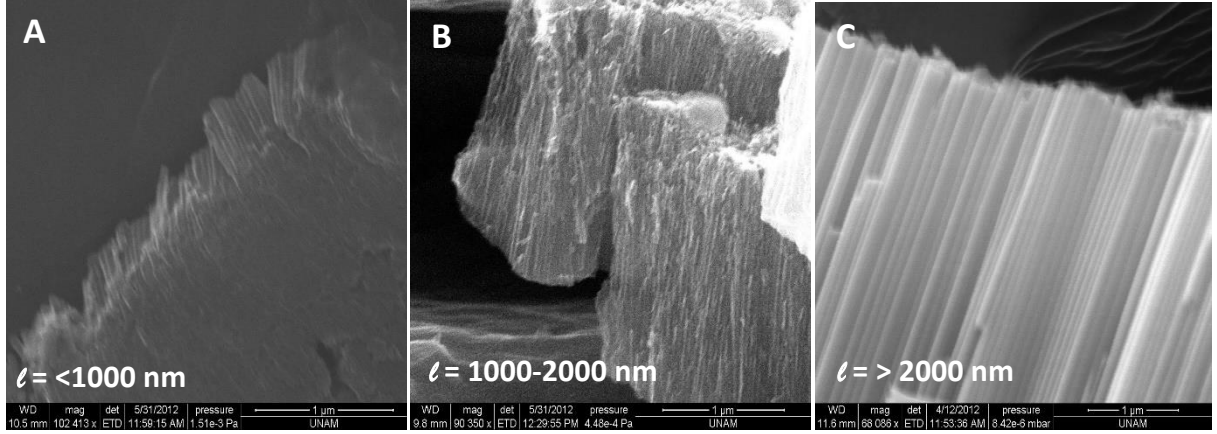
4.3.1. Boy-En Oranı Yüksek Nanotüplerin Morfolojik Karakterizasyonu

Elektrolit 2 kullanılarak elde edilen nanotüp tabakalarının karakterizasyonu SEM ile morfolojik ve boyutsal olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda anodizasyon voltajının nanotüp çapına ve anodizasyon süresinin de nanotüp uzunluğuna etkileri incelenmiştir. Buna göre; 20 dakikalık anodizasyon süresi sabit tutularak 15, 25 ve 35 V potansiyel gerilimler kullanılarak elde edilen tüplerin çaplarında artan gerilim ile beraber bir büyüme gözlemlenmiş olup elde edilen ortalama çaplar sırasıyla 22.2, 28.7 ve 41.5 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.22.).

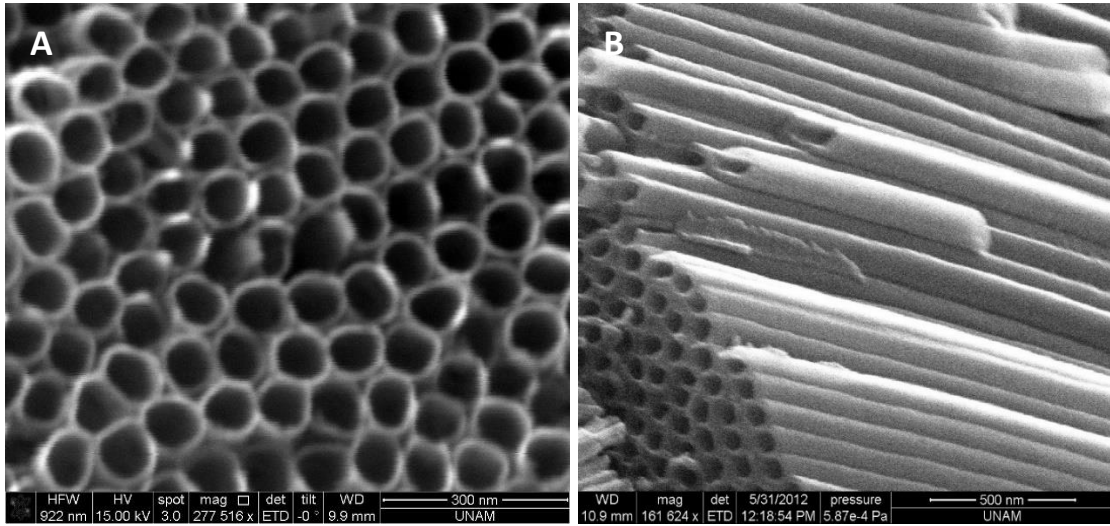


Şekil 4.22. Elektrolit 2 kullanılarak 15 V (A), 25 V (B) ve 35 V (C) potansiyel gerilimlerde 20 dakika boyunca anodik oksidasyona maruz bırakılan titanyum yüzeyler ve ortalama tüp çap değerleri

İkinci olarak anodizasyon süresinin nanotüp boyuna uzunluğu incelenmiş olup, 25 V potansiyel gerilim sabit tutularak örneklere 20, 40 ve 80 dakikalık anodizasyon süreleri uygulanmıştır. İşlemler sonucunda 20 dakikalık anodizasyon sonucu birkaç yüz nanometre; 40 dakikalık anodizasyon sonucun 1-2 mikrometre arası ve 80 dakikalık anodizasyon sonucunda ise 2 mikrometreden daha uzun boyutlara sahip nanotüpler elde edilmiştir (Şekil 4.23.).



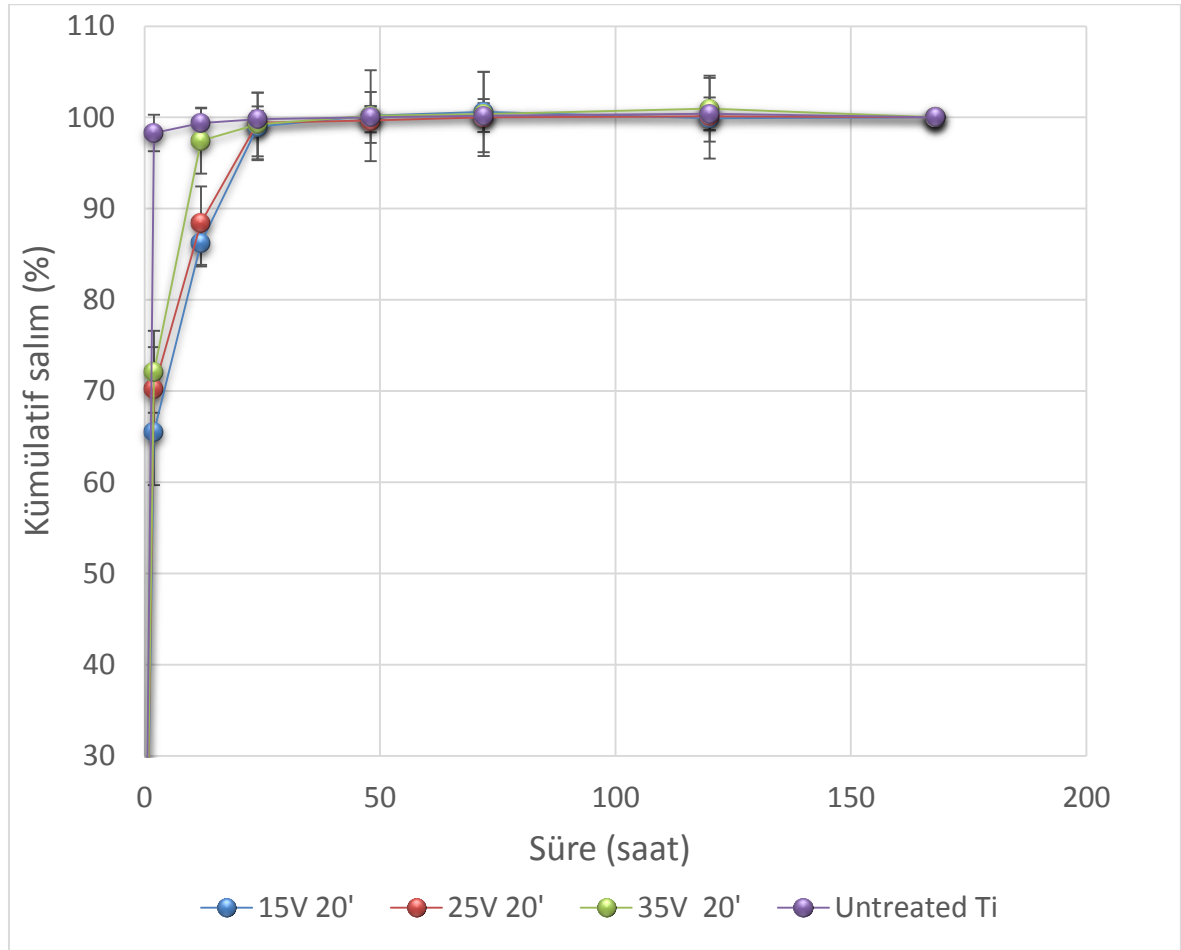
Şekil 4.23. Elektrolit 2 kullanılarak 20 dk (A), 40 dk (B) ve 80 dk (C) sürelerde 25 V potansiyel gerilim uygulanarak anodik oksidasyona maruz bırakılan titanyum yüzeyler ve yaklaşık tüp uzunluk değerleri



Şekil 4.24. Elektrolit 2 kullanılarak 80 dk süre ve 25 V potansiyel gerilim uygulanarak anodik oksidasyona maruz bırakılan titanyum yüzeylerde elde edilen yüzeylerin yukarıdan (A) ve yandan (B) görüntüleri.

4.3.2. Anodizasyon Geriliminin (Nanotüp Çapının) İlaç Salım Profiline ve Yükleme Miktarına Etkisi

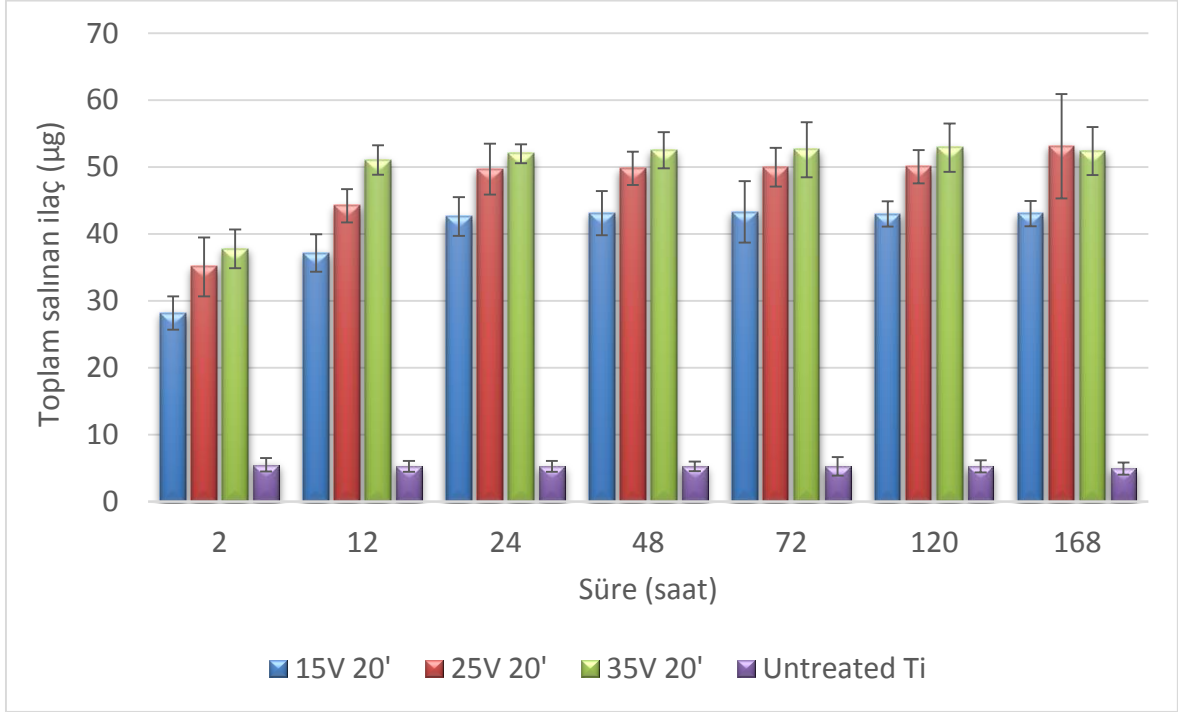
Anodizasyon süresinin 20 dakika olarak sabit tutulması ile farklı potansiyel gerilimlerde (15, 25 ve 35 V) anotlanan yüzeylere ilaç yükleme işlemlerinden sonra elde edilen salım profilleri şekil 4.25.'te grafik haline getirilmiştir. Elde edilen verilere göre artan nanotüp çapının ilaç salım süresine pozitif yada negatif yönde bir etkisi bulunmadığı görülmüş ve yüklenen ilacın ilk 24 saatte ortama salındığı bulunmuştur.



Şekil 4.25. Elektrolit 2 kullanılarak 20 dk sabit sürede 15, 25 ve 35 V potansiyel gerilim uygulanan yüzeylerden ortama salınan ilaç profili

Nanotüp yüzeylere yüklenen ilaç miktarlarına bakıldığında ise artan anodizasyon voltajının – diğer bir deyişle artan çap genişliğinin – yüklenen ilaç miktarını doğrudan etkilediğini görebiliriz. Deneyler sonucunda 15, 25 ve 35 V potansiyel gerilimde anodize edilmiş nanotübüleri titanya tabakalara yüklenen vankomisin

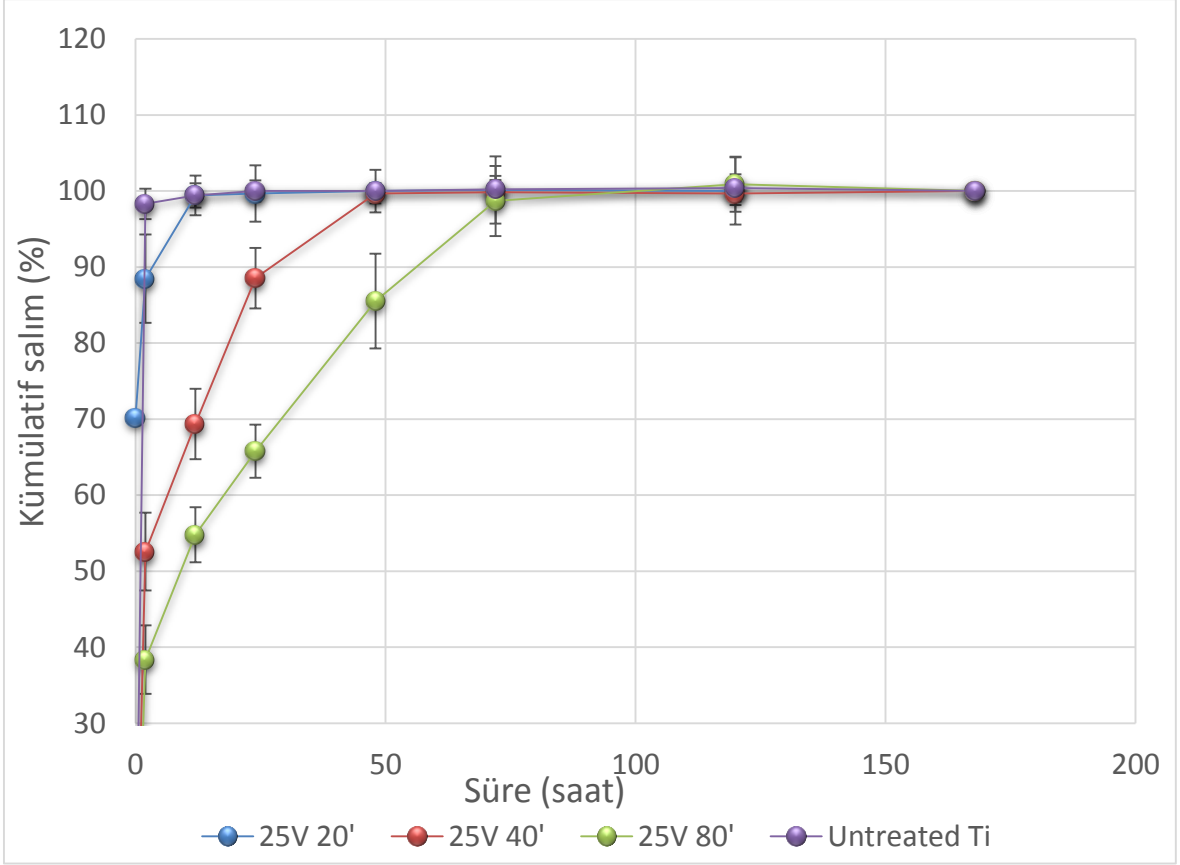
miktarı sırasıyla 43.1 ± 1.9 , 52.1 ± 7.8 ve 52.4 ± 3.6 μg olarak hesaplanmıştır. İlaç salım profili sırasında ortama salınmış toplam vankomisin miktarı $\mu\text{g/ml}$ cinsinden şekil 4.26'da grafik haline getirilmiştir.



Şekil 4.26. Elektrolit 2 kullanılarak 20 dk sabit sürede 15, 25 ve 35 V potansiyel gerilim uygulanan yüzeylerden ortama salınan toplam ilaç miktarı

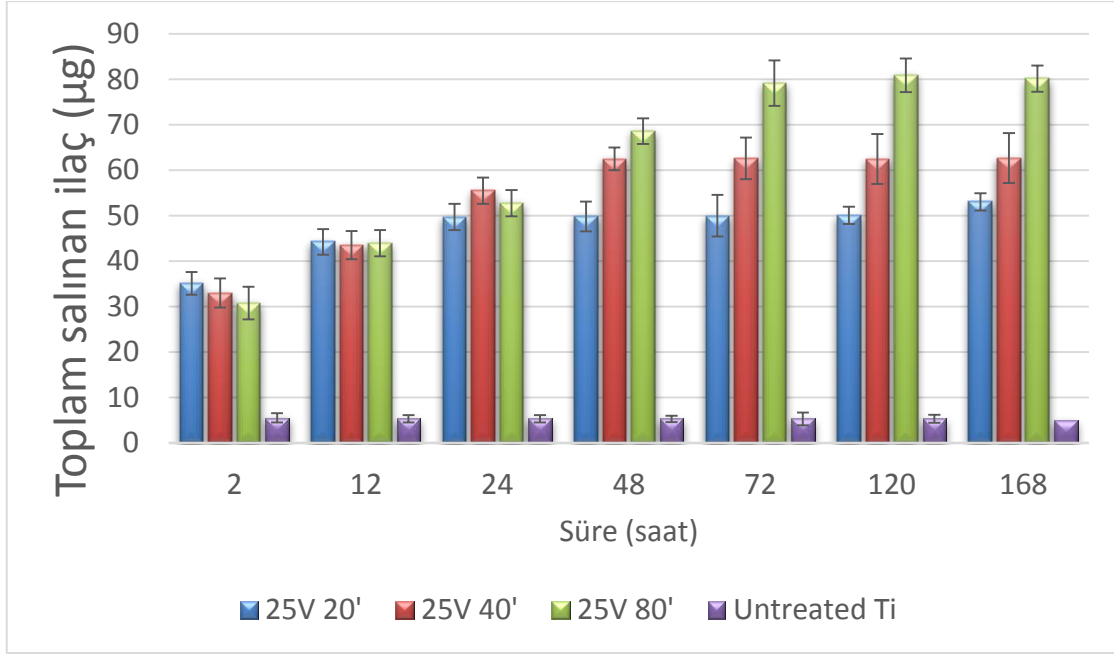
4.3.3. Anodizasyon Süresinin (Nanotüp Uzunluğunun) İlaç Salım Profiline Etkisi ve Yükleme Miktarına Etkisi

Anodizasyon voltajının 25 V dakika olarak sabit tutulması ile farklı sürelerde anotlanan yüzeylere ilaç yükleme işlemlerinden sonra elde edilen salım profilleri şekil 4.27'de grafik haline getirilmiştir. Elde edilen verilere göre artan nanotüp uzunluğunun ilaç salım süresini de arttırdığına dair bulgular elde edilmiştir. Buna göre 20 dakikalık anodizasyon süresinde elde edilen titanya tabakalardan ilacın ilk 24 saatte ortama salındığı görülürken, 40 dakikalık anodizasyon sonrasında bu sürenin 48 saate çıktığı gözlenmiştir. Sürenin 80 dakikaya çıkarılması sonucunda ise ilaç salımının 72-96. saatler arasında tamamlandığı görülmektedir.



Şekil 4.27. Elektrolit 2 kullanılarak 25 V sabit potansiyel gerilimde 20, 40 ve 80 dk süre ile anotlanan yüzeylerden ortama salınan ilaç profili

Nanotüp yüzeylere yüklenen ilaç miktarlarına bakıldığında ise artan anodizasyon süresinin – diğer bir deyişle artan tüp uzunluğunun – yüklenen ilaç miktarını da doğrudan etkilediğini görebiliriz. Deneyler sonucunda 25 V sabit potansiyelde 20, 40 ve 80 dakikalık sürelerde anodize edilmiş nanotübüler titanya tabakalara yüklenen vankomisin miktarı sırasıyla 52.1 ± 7.8 , 62.7 ± 5.5 ve 80.2 ± 2.9 μg olarak hesaplanmıştır. İlaç salım profili sırasında ortama salınmış toplam vankomisin miktarı $\mu\text{g/ml}$ cinsinden şekil 4.28’de grafik haline getirilmiştir.

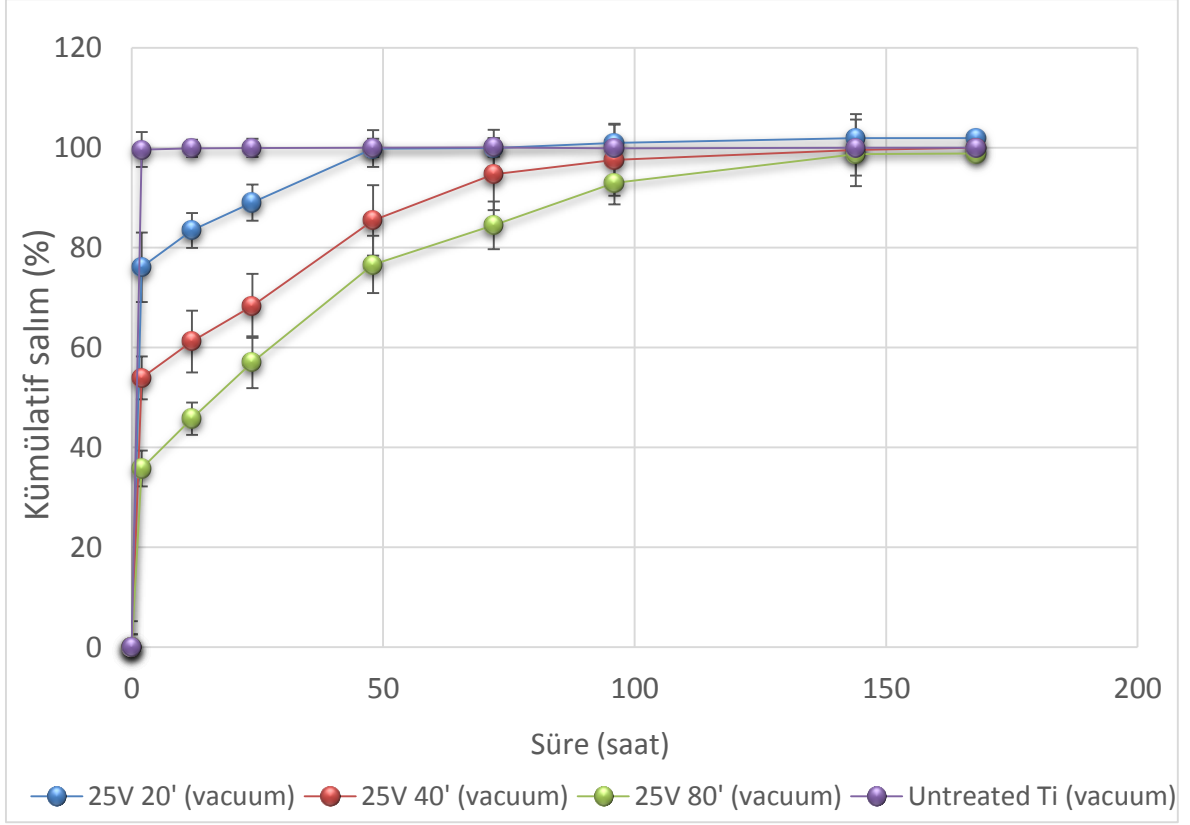


Şekil 4.28. Elektrolit 2 kullanılarak 25 V sabit potansiyel gerilimde 20, 40 ve 80 dk süre ile anotlanan yüzeylerden ortama salınan toplam ilaç miktarı

4.3.4. Vakum Ortamında Yüklemenin İlaç Salım Profiline ve Yükleme Miktarına Etkisi

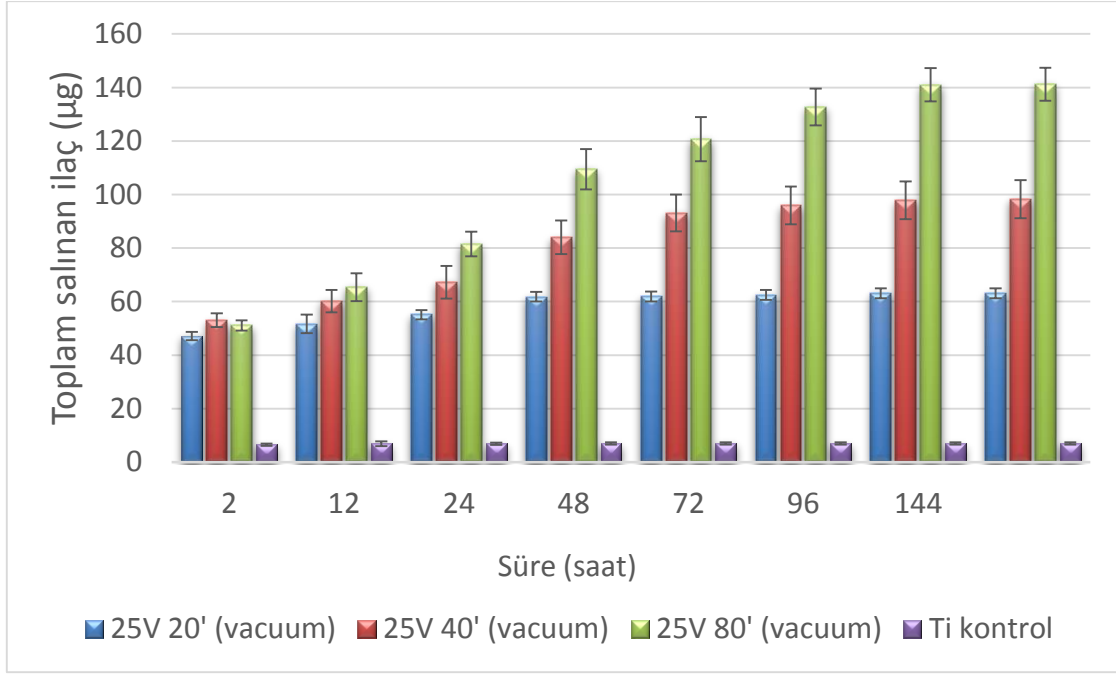
Kısım 3.4.2'de anlatıldığı üzere yükleme çalışmalarının nanotübüler yüzeylere vakum altında yüklenmesinin ilaç salım ve yükleme miktarlarına etkisi incelenmiştir. Çalışmada 25 V potansiyel gerilim sabit tutularak 20, 40 ve 80 dakikalık sürelerde anotlanmış örnekler vakum ortamında vankomisin yüklemesi yapılmış ve sonuçlar aynı örnek gruplarının vakum uygulanmadan ilaç yüklenmiş türleri ile karşılaştırılmıştır.

Vakum etkisiyle yapılan yükleme deneylerinde elde edilen salım profilleri şekil 4.29.'da grafik haline getirilmiştir. Elde edilen grafikte yine artan nanotüp uzunluğunun ilaç salım süresini arttırdığı görülmektedir ve buna ek olarak vakum ortamında gerçekleştirilen yükleme işleminin salım profilini uzattığına yönelik bulgular da elde edilmiştir. Buna göre 20 dakikalık anodizasyon süresinde elde edilen titanya tabakalardan ilacın 24 – 48. saatler arasında ortama salındığı görülürken, 40 dakikalık anodizasyon sonrasında bu sürenin 96 saate kadar çıktığı gözlenmiştir. Sürenin 80 dakikaya çıkarılması sonucunda ise ilaç salımı 168. saatte tamamlanmıştır.



Şekil 4.29. Elektrolit 2 kullanılarak 25 V sabit potansiyel gerilimde 20, 40 ve 80 dk süre ile anotlanan yüzeylere vakum ortamındaki yüklemmeden sonra ortama salınan ilaç profili

Vakum ortamında yapılan yüklemenin titanya yüzeylere yüklenen toplam ilaç miktarına da etki ettiği şekil 4.30.'da görülmektedir. Bir önceki deneyde vakum etkisi olmaksızın yapılan yükleme çalışmalarında 20, 40 ve 80 dakikalık sürelerde anotlanan yüzeylere yüklenmiş vankomisin miktarları sırasıyla 52.1 ± 7.8 , 62.7 ± 5.5 ve 80.2 ± 2.9 μg olarak gerçekleşirken vakum etkisiyle aynı örnek gruplarına ait yüklenmiş toplam vankomisin miktarları 61.8 ± 1.8 , 98.3 ± 7.1 ve 142.9 ± 6.2 μg olarak ölçülmüştür. Vakum etkisi sonucunda yüklenen vankomisin miktarlarında sırasıyla, %18.2, %56.7 ve %78.2'lik artışlar kaydedilmiştir.



Şekil 4.30. Elektrolit 2 kullanılarak 25 V sabit potansiyel gerilimde 20, 40 ve 80 dk süre ile anotlanan yüzeylere vakum ortamındaki yüklemekten sonra ortama salınan toplam ilaç miktarı

Basit daldırma ya da pipetleme yöntemleri ile titanya nanotüplere yüklenen etken maddelerin yüzeyden salım sürelerinin hidrodinamik çap ve hidrofobisiteye bağlı olarak 1-5 gün arasında sürdüğüne dair bulgular literatürde rapor edilmiştir [94, 98]. Seramik ya da polimer bariyer kaplamalar ile salım süresinin haftalar mertebesine taşınması mümkün olmakla beraber [95, 98] nanotüp boyutuna göre oldukça kalın olan bu kaplama materyalinin delaminasyonu sonucu implant başarısızlığı da görülebilir. Malzeme yüzeyindeki nanotüp tabakasının daha kalın olması salımın süresini uzatmak için tercih edilen yöntemlerden biridir [96]. Bariyer kaplama yapılmaksızın salım süresini uzatmaya yönelik olan yaklaşımlardan biri de vakum ortamında yapılan yüklemedir. Vakum yardımıyla nanotübüler boşluklardan uzaklaştırılan havanın yerini yüklenecek madde alır ve basit pipetleme ve daldırma metodlarından daha verimli bir şekilde yükleme gerçekleşir [97].

Çalışmada titanya nanotüp boyutunun uzatılmasına rağmen yüklenen ilacın 4. gün içinde ortama salındığı görülmüştür; ancak vakum ortamında yapılan yükleme ile 80 dakikalık sürede anotlanan örneklerden vankomisin salımı 7 gün sürmüştür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmaları kapsamında ortopedik implant ve fiksasyon cihazlarında kullanılan bir malzeme olan titanyum metali yüzeyinde nano boyutlarda yapılan modifikasyonların implant-hücre etkileşimlerine ve osteojenik farklılaşmaya etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Yüzeydeki nano boyuttaki morfolojik ve fizikokimyasal değişiklikler anodizasyon, kalsiyum fosfat çöktürme, elektroçirime yöntemleri ile gerçekleştirilmiş ve incelenecek başlıklar osteoblast benzeri insan osteosarkoma hücre hattı kullanılarak *in vitro* koşullarda test edilmiştir.

Tezde incelenen başka bir başlık olan ve herhangi bir kaplama ya da ikinci bir malzeme kullanılmaksızın “doğrudan implant yüzeyinden etken madde salımı” çalışmalarında da vankomisin model ilaç olarak kullanılmıştır. Vankomisin, boy-en oranı kontrol edilebilen nanotübüler tabaka yüzeylerinden salımı da *in vitro* ortamda analiz edilmiştir.

Buna göre;

- Elektrolit 1 (0.2 M HF) kullanılarak yapılan anodik oksidasyon işleminde 15 ve 20 V anodizasyon potansiyelinde 40-70 nm arasında değişen ve içe doğru büyüyen tekli tüp yapıları yüzeyde gözlemlenirken; potansiyelin 25 V üstüne çıktığında alan destekli oksit çözünme hızının oluşma hızından daha fazla olmasıyla birlikte tüp duvarlarının yer yer çözünerek birbiri ile kaynaştığı düzensiz bir yapı elde edilmiştir.
- 10XSBF çözeltisi kullanılarak yüzeylerine apatitik kalsiyum fosfat çöktürülen yüzeylerin morfolojilerinin ilk 1 saat sonunda tüp ağızlarındaki birikmeler ile hafifçe değişmeye başladığı, 2-3 saat sonunda kalsiyum fosfat ve nano tüplerin beraber oluşturduğu melez bir yapılanma gösterdiği, 5 saat sonunda ise nanotüp formlarının kapanarak tamamen kalsiyum fosfattan oluşan bir yüzey meydana geldiği gözlemlenmiştir.
- 10XSBF çözeltisi ile apatitik kalsiyum fosfatın çöktürüldüğü yüzeylerin spektroskopik karakterizasyonu sonucunda da 3 saatlik çöktürme işlemi sonucu elde edilen yüzeyin kimyasal olarak da titanyum-kalsiyum fosfat karışımı olduğu analiz edilmiştir.

- İslanabilirlik ölçümlerinde anodizasyon sonrası bir artışın gözleendiği, kalsiyum fosfat çöktürülmesinin ardından ıslanabilirliğin artmaya başladığı ve yüzey tamamen kalsiyum fosfat kaplandığında ise tamamen ıslanabilir bir hal aldığı görülmüştür.
- *in vitro* hücre kültür testlerinde anodizasyon sonrasında proliferasyonun arttığı, kalsiyum fosfat birikmesi ve artan ıslanabilirlik değeri ile de bu değerin paralellik gösterdiği; ancak yüzeyin tamamen kalsiyum fosfattan oluştuğu örnek gruplarında ise nanotüp-kalsiyum fosfat karışımı yüzeylere göre bir düşüş olduğu görülmüştür.
- Kültüre edilen hücrelerin ALP aktivitelerine bakıldığında hücre proliferasyon sonuçları ile paralel bir eğilim görülmekte olup, bu düşüş yüzeyin 8 saat kalsiyum fosfat çöktürme işlemine tabi tutulduğu örnek grubunda anlamlı olduğu görülmüştür.
- Hücre morfolojileri nanotüp - kalsiyum fosfat bileşimli yüzeylerde modifikasyona uğratılmamış titanyum yüzeylere nazaran daha iyi yayılmış ve filopedyalara sahip olduğu görülmüştür. Hücreler arası ekstrasellüler matriks oluşumları gözlemlenmiştir.
- İpek fibroinin titanyum yüzeylere elektroğrilmesinin optimizasyonu çalışmalarında %25lik konsantrasyon, 0,9 kV/cm elektrik alan kuvveti ve 5 dakikalık elektroğirme süresi proses parametreleri olarak kabul edilmiş ve böylelikle 220±63 nm kalınlıkta ve 19 fiber/100 µm² yoğunlukta nanofiberler elde edilmiştir.
- Nano hidroksiapatit katkılı ipek fibroin nanofiberlerin eğrilmesinde ağırlıkça %20lik nHA kullanılmış ve fiber kalınlığı 359±64 olarak hesaplanmıştır.
- İpek fibroin ve nano hidroksiapatit katkılı ipek fibroin katkılı yüzeylerin morfolojik değerlendirmesinde kullanılan SEM görüntülerinde nanotüp – nanofiber ortak yüzey karakterinin sağlandığı görülmüş ve nano hidroksiapatitin nanofiberler üzerindeki varlığı tespit edilmiştir.
- Nano hidroksiapatitin ipek fibroin çözeltisine katılarak elektroğrilmesi sonucu, kemiğin doğal bileşeni olan hidroksiapatit-kolajen nanofiber benzeri bir yapılanmanın tek basamakta gerçekleştirildiği bir yüzey modifikasyonu sağlanmıştır.

- MTT testi ile incelenen hücre proliferasyon çalışmalarında yüzey modifikasyonlarının kontrol grubuna göre proliferasyonu tüm analiz günlerinde arttırdığı gözlenmiştir.
- Elektroeğrilme bölümünde test edilen örnek gruplarındaki hücre çoğalma, protein sentezleme ve ALP enzim aktivitelerinin yüzey değiştirme işlemlerine maruz bırakılan örneklerde kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür.
- Anodik oksidasyonu izleyen ipek fibroinin elektroeğrilmesi çalışmaları sonrası implant malzemesi yüzeyinde kemik matrikse biyobenzer bir yapı elde edilmeye çalışılmış ve hücre tutunma, çoğalma ve osteoblastik aktivitenin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir.
- Örnekler arasında ipek fibroin elektroeğrilmiş gruplardaki hücre yapışması artışı artan yüzey alan ve protein-protein etkileşimlerinde kaynaklı olduğu sonucuna varılabilir.
- ALP aktivitesindeki anlamlı farklar nano hidroksiapatit katkılı ipek nanofiberlerin elektroeğrildiği yüzeylerde diğer gruplara nazaran daha fazladır. Ayrıca bu örnek gruplarındaki hücre proliferasyon artış oranının ALP aktivitesi artış oranından düşük olması, hücre fenotipinin özelleşmeye ve osteojenik farklılaşmanın başladığının bir işareti olarak görülmektedir.
- Anodik oksidasyon işleminin ALP aktivitesine ya da farklı bir deyişle hücre farklılaşmasına etkisi pozitif yönde olsa da istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.
- İpek fibroin ve nano hidroksiapatitin ortak elektroeğrildiği gruplardaki artışın yüzey karakterine protein-biyoseramik kompozitinin kattığı sinerjik bir etkinin neden olduğu söylenebilir.
- Hücrelerin morfolojilerine bakıldığında 8 günün ardından kültür ortamında iyi yayılmış, nanotüp ve nanofiberler ile kaynaşmış bir görüntü elde edilmiştir. *in vitro* hücre kültürü esnasında nanofiber yapıları kültür ortamında bozulmadan kalmıştır; ancak yüzeydeki bu yapılanmanın stabilitesinin sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için *in vivo* hayvan testleri gerçekleştirilmelidir.
- Elektrolit 2 kullanılarak gerçekleştirilen anodik oksidasyon çalışmaları sonucunda yüzeydeki nanotüp tabakalarının kontrollü bir şekilde boy-en oranının ayarlanabildiği bulunmuştur.

- Nanotüp çapının artan potansiyel gerilim ile, nanotüp uzunluğunun ise artan anodizasyon süresi ile arttığı görölmüştür.
- Anodizasyon voltajının yani nanotüp genişliğinin vankomisin salım süresine negatif ya da pozitif bir etki yapmadığı; ancak birim alan başına yüklenen vankomisin miktarını arttırdığı bulunmuştur.
- Anodizasyon süresinin yani nanotüp uzunluğunun ise hem birim alan başına yüklenen vankomisin miktarına hem de salım süresinin uzamasına pozitif yönde bir etkide bulunduğu görölmüştür.
- Vakum ortamında gerçekleşen vankomisin yüklemesinin ardından nanotüp yapıların içine yüklenen miktarının arttığı ve vakum etkisi ile de daha derinlere yüklenen vankomisinin salım ortamına daha geç çıktığı görölmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Kaplan, F.S., Hayes, W.C., Keaveny TM, Boskey A, Einhorn TA, and Iannotti, J., , Form and function of bone. In: Orthopaedic Basic Science, Simon SR, (ed.), *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, Columbus, OH, pp. 127-185, **1994**.
- [2] Webster, T.J., Nanophase ceramics: The future orthopedic and dental implant material. In: *Advances in Chemical Engineering, Vol. 27, Nanostructured Materials*, Ying JY (ed.), Academic Press, San Diego, CA, pp. 126-160, **2001**.
- [3] Webster, T.J, Nanophase ceramics as improved bone tissue engineering materials. *American Ceramic Society Bulletin* 82(6): 23-28, **2003**.
- [4] Smith, R., Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General, Rockville, MD, pp. 68-70, **2004**.
- [5] Giraud-Guille, M.M., Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons, *Calcified Tissue International* 42(3): 167-180, **1998**.
- [6] Bronzino, J.D., *The Biomedical Engineering Handbook*, CRC Press, Boca Raton, FL: pp. 274-706, **2000**.
- [7] Liu, H. and Webster, T.J., , Bioinspired Nanocomposites for Orthopedic Applications. In: *Nanotechnology for the Regeneration of Hard and Soft Tissues*, Webster TJ (ed.) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp 8, **2007**.
- [8] Trippel, S.B., Potential role of insulin like growth factors in fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355S: S301-313, **1998**.
- [9] Marra, K.G., Szem, J.W., Kumta, P.N., DiMilla, P.A., and Weiss, L.E., *In vitro* analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(3): 324-335, **1999**.
- [10] Nather, A., , Biology of healing of large deep-frozen cortical bone allografts. In: *Bone Biology and Healing* Phillips GO (ed.), pp. 50-65, **2003**.
- [11] McManus, A.J., Doremus, R.H., Siegel, R.W., and Bizios, R., Evaluation of cytocompatibility and bending modulus of nanoceramic/polymer composites. *Journal of Biomedical Materials Research* 72A(1): 98-106, **2005**.
- [12] Palin, E., Liu, H., Webster, T.J., Increased osteoblast adhesion on polymer casts of nanostructured ceramics. *Nanotechnology* 16: 1828-1836, **2005**.

- [13] Emery, D.F.G., Clarke, H.J., Grover, M.L., Stanmore total hip replacement in younger patients: review of a group of patients under 50 years of age at operation. *Journal of Bone and Joint Surgery* 79: 240-246, **1997**.
- [14] Scott, N.R., State of the art Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.: 24: 425-434, **2005**.
- [15] Murray, C.B., Kagan, C.R., Bawendi, M.G., Advances in technology. *Science*: 287: 1989-1994, **2000**.
- [16] Anderson, J.M., Gristine, A.G., Hanson, S.R., Cell interactions with materials. In: *Biomaterial Science Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (eds.)*, Academic Press, Inc., San Deigo, pp. 165-214, **1996**.
- [17] de Jonge, L.T., Leeuwenburgh, S.C.G., Wolke, J.G.C., Jansen, J.A., Organic-Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces. *Pharmaceutical Research* 25: 2357-2369, **2008**.
- [18] Dee, K.C., Puleo, D.A., Bizios, R., Biomaterials. In: *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions, Dee KC, Puleo DA, Bizios R (eds.)*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 37-52, **2002**.
- [19] Webster, T.J., Nanotechnology for the next generation of orthopedic implants. In: *Advances in Chemical Engineering, Ying J (ed)*, Academic Press Inc., CA, pp. 125-166, **2003**.
- [20] El-Ghannam, A., Ducheyne, P., Shapiro, I.M., Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite. *Journal of Orthopaedic Research*. 17: 340-345, **1999**.
- [21] Ruoslahti, E., RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12:697-715, **1994**.
- [22] Soballe, K., Overgaard, S., Hansen, E.S., Brokstedt-Rasmussen, H., Lind, M., Bunger, C., A review of ceramic coatings for implant fixation. *Journal of Long Term Effects of Medical Implants* 9: 131-151, **1999**.
- [23] Underwood, P.A., Steele, J.G., Dalton, B.A., Effects of polystyrene surface chemistry on the biological activity of solid phase fibronectin and vitronectin, analysed with monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science*, 104: 793-803, **1993**.
- [24] Anselme, K., Bigerelle, M., Noel, B., Iost, A., Hardouin, P., Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *Journal of Biomedical Material Research*, 60: 529-540, **2002**.
- [25] Boyan, B.D., Lohmann, C.H., Sisk, M., Liu, Y., Sylvia, V.L., Cochran, D. L., Dean, D.D., Schwartz, Z., Both cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mediate osteoblast response to titanium surface roughness. *Journal of Biomedical Material Research* 55: 350-359, **2001**.

- [26] Fujibayashi, S., Neo, M., Kim, H., Kobuko, T., Nakamura, T., Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Key Engineering Materials*, 254: 443-450, **2004**.
- [27] Price, R.L., Gutwein, L.G., Kaledin, L., Tepper, F., Webster, T.J., Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *Journal of Biomedical Material Research part A*. 67: 1284-1294, **2003**.
- [28] Chun, A.L., Morales, J.G., Webster, T.J., Fenniri, H., Helical rosette nanotubes: a biomimetic coating for orthopedics? *Biomaterials* 26: 7304-7309, **2005**.
- [29] Webster, T.J., Ejiogor, J.U., Increased osteoblast adhesion on nanostructured metals. *Biomaterials* 19: 4731-4739, **2004**.
- [30] Webster, T.J., Smith, T.A., Greater osteoblast functions on nanoceramic polymer composites. *Journal of Biomedical Material Research part A* 74: 677-688, **2005**.
- [31] Kay, S., Thapa, A., Webster, T.J., Increased chondrocyte and osteoblast functions on nanoceramic polymer composites. *Tissue Engineering*. 5: 753-760, **2002**.
- [32] Webster, T.J., Siegel, R.W., Bizios, R., Increased osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* 20: 1221-1225, **2000**.
- [33] Woo, K.M., Chen, V.J., Ma, P.X., Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *Journal of Biomedical Material Research part A* 67: 531-540, **2003**.
- [34] Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., Siegel, R.W., Bizios, R., Enhanced osteoblast functions on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Material Research part A*. 51: 475-479, **2000**.
- [35] Wen, S., Yan, D., Grain boundary in some nanomaterials. *Ceramics International*, 2: 109-115, **1995**.
- [36] Klabunde, K.J., Stark, J., Koper, O., Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. *Journal of Physical Chemistry*, 100: 121-125, **1996**.
- [37] Thomas, C.H., McFarland, C.D., Jenkins, M.J., Reznia, A., Steele, J.G., Healy, K.E., The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on materials with patterned surface chemistry. *Journal of Biomedical Material Research* 37: 81-93, **1997**.
- [38] Kay, S., Thapa, A., Haberstroh, K.M., Webster, T.J., Greater chondrocyte functions of nanophase ceramic composites. *Tissue Engineering* 8: 753-759, **2002**.

- [39] Brunette, D.M., Tengvall, P., Textor, M., and Thomsen, P., Mechanical, thermal, chemical and electrochemical surface treatment of titanium. In *Titanium in Medicine Thomsen P* (ed.), Springer, New York, NY, p. 171, **2001**.
- [40] Larsson, C., Thomsen, P., Aronsson, B.O., Rodahl, M., Lausmaa, J., Kasemo, B. and Ericson, L.E., Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* 17: 605, **1996**.
- [41] Kim, H.M., Miyaji, F., Kokubo, T., Nakamura, T., Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *Journal of Materials Science: Materials Medicine*, 8: 341, **1997**.
- [42] Kokubo, T., Kim, H.M., Kawashita, M., Nakamura, T., Bioactive metal: preparation and properties. *Journal of Materials Science: Materials Medicine* 15: 899, **2004**.
- [43] Sittig, C., Textor, M., Spencer, N.D., Wieland, M., Vallotton, P.H, Surface characterization of implant materials c.p. Ti, Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V with different pretreatments. *Journal of Materials Science: Materials Medicine* 10: 35, **1999**.
- [44] Furlong, R., Osborn, J.F., Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *Journal of Bone Joint Surgery*, 73B: 741, **2001**.
- [45] Kim, S.S., Park, M.S., Jeon, O., Choi, C.Y., Kim, B.S., Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27, 1399-1409, **2007**.
- [46] Baker, K.C., Anderson, M.A., Oehlke, S.A., Astashkina, A.I., Haikio, D.C., Drelich, J., Donahue, S.W., Growth, characterization and biocompatibility of bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic substrata. *Materials Science and Engineering C* 26: 1351, **2007**.
- [47] Sato, M., Slamovich, E.B., Webster, T.J., Enhanced osteoblast adhesion on, hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly(lactide-co-glycolide) sol-gel titanium coatings. *Biomaterials* 26: 1349, **2005**.
- [48] Sul, Y.T., Johansson, C.B., Jeong, Y., Albrektsson, T., The electrochemical oxide growth behavior on titanium via acid and alkaline electrolytes. *Medical Engineering & Physics* 23: 329, **2001**.
- [49] Gong, D., Grimes, C.A., Varghese, O.K., Hu, W., Singh, R.S., Chen, Z., Dickey, E.C., Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *Journal of Materials Research*, 16: 3331, **2001**.
- [50] Mor, G.K., Varghese, O.K., Paulose, M., Mukherjee, N., Grimes, C.A., Fabrication of tapered, conical-shaped titania nanotubes. *Journal of Materials Research*, 18:2588, **2003**.

- [51] Beranek, R., Hildebrand, H., Schmuki, P., Self-organized porous titanium oxide prepared in H₂SO₄/HF electrolytes. *Electrochemical and Solid-State Letters* 6:B12, **2003**.
- [52] Tsuchiya, H., Macak, J.M., Taveira, L., Balaur, E., Ghicov, A., Sirotna, K., Schmuki, P., Self-organized TiO₂ nanotubes prepared in ammonium fluoride containing acetic acid electrolyte. *Electrochemistry Communications* 7: 576, **2005**.
- [53] Choi, J., Wehrspohn, R.B., Lee, J., Gosele, U., Anodization of nanoimprinted titanium: a comparison with formation of porous alumina. *Electrochimica Acta* 49:2645, **2004**.
- [54] Cai, Q., Paulose, M., Varghese, O.K., Grimes, C.A., The effect of electrolyte composition on the fabrication of self-organized titanium oxide nanotube arrays by anodic oxidation. *Journal of Material Research*, 20: 230, **2005**.
- [55] Ghicov, A., Tsuchiya, H., Macak, J.M., Schmuki, P., Titanium oxide nanotubes prepared in phosphate electrolyte. *Electrochemistry Communications* 7: 505, **2005**.
- [56] Zwilling, V., Darque-Ceretti, E., Boutry-Forveille, A., David, D., Perrin, M.Y., Aucouturier, M., Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and T4Al6V alloy. *Surface Interface Analysis*, 27: 629, **1999**.
- [57] Ruan, C., Paulose, M., Varghese, O.K., Mor, G.K., Grimes, C.A., Fabrication of highly ordered TiO₂ nanotube arrays using an organic electrolyte. *Journal of Physical Chemistry B* 109: 15754, **2005**.
- [58] Yao, C., Webster, T.J., Anodization: A promising nano-modification technique for titanium for orthopedic applications. In: *Nanotechnology for the Regeneration of Hard and Soft Tissues*, Webster TJ (ed.) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp 91, **2007**.
- [59] Chiesa, R., Sandrini, E., Santin, M., Rondelli, G., Cigada, A., Osteointegration of titanium and its alloys by anodic spark deposition and other electrochemical techniques: A review. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, 1: 91, **2003**.
- [60] Yang, B., Uchida, M., Kim, H.M., Zhang, X., Kokubo, T., Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials* 25: 1003, **2004**.
- [61] Bauer, S., Park, J., von der Mark, K., Schmuki, P., Improved attachment of mesenchymal stem cells on super-hydrophobic TiO₂ nanotubes, *Acta Biomaterialia*, 4: 1576-1582, **2008**.
- [62] Oh, S., Daraio, C., Chen, L.H., Pisanic, T.R., Finones, R.R., Jin, S., Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes, *Journal of Biomedical Materials Research*, 78A: 97–103, **2006**.

- [63] Anselme, K., Review: Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21:667, 2000.
- [64] Yao, C., Perla, V., McKenzie, J.L., Slamovich, E.B., Webster, T.J., Anodized Ti and Ti6Al4V possessing nanometer surface features enhances osteoblast adhesion. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1:68–73, **2005**.
- [65] Yao, C., Slamovich, E.B., Webster, T.J., Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 85(1):157, **2008**.
- [66] Barnes, C.P., Sell, S.A., Boland, E.D., Simpson, D.G., Bowlin, G.L., Nanofiber Technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1413-1433, **2007**.
- [67] Martins-Green, M., The dynamics of Cell-ECM interactions with implications for tissue engineering. In *Principles of Tissue Engineering; Lanza R, Langer R, Chick W, Eds.*; R.G.Landes Company: Austin, TX, USA, pp. 23-46, **1997**.
- [68] Farach-Carson, M.C., Wagner, R.C., Kiick, K.L., *Extracellular matrix: Structure, function, and applications to tissue engineering. In Tissue Engineering; Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD, Eds.*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp.3-22, **2007**.
- [69] Liu, Q., Ding, J., Mante, F.K., Wunder, S.L., Baran, G.R., The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique, *Biomaterials*, 23: 15, 3103–3111, **2002**.
- [70] Nanci, A., Wuest, J.D., Peru, L., Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules, *Journal of Biomedical Materials Research*, 40: 324-355, **1998**.
- [71] Cai, K., Rechtenbach, A., Hao, J., Bossert, J., Jandt, K.D., Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects, *Biomaterials*. 26:5960–5971 **2005**.
- [72] Cai, K., Hu, Y., Jandt, K.D., Surface engineering of titanium thin films with silk fibroin via layer-by-layer technique and its effects on osteoblast growth behavior, *Journal of Biomedical Materials Research* 82A: 927-935, **2007**.
- [73] Cai, K., Hu, Y., Jandt, K.D., Wang, Y., Surface modification of titanium thin film with chitosan via electrostatic assembly technique and its influence on osteoblast growth behavior, *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 19:499-506, **2008**.
- [74] 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*, 21, 7705, **2011**.

- [75] Ravichandran, R., Ng, C.C.H., Liao, S., Pliszka, D., Raghunath, M., Ramakrishna, S., Chan, C.K., Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning. *Biomedical Materials*, 7, 015001, **2012**.
- [76] Miroiu, F.M., Socol, G., Visan, A., Stefan, N., Craciun, D., Craciun, V., Dorcioman, G., Mihailescu, I.N., Sima, L.E., Petrescu, S.M., Andronie, A., Stamatina, I., Moga, S., Ducu, C., Composite biocompatible hydroxyapatite–silk fibroin coatings for medical implants obtained by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation, *Materials Science Engineering B*, 169, 151-158, **2010**.
- [77] Li, C., Vepari, C., Jin, H.J., Kim, H.J., Kaplan, D.L., Electrospun silk BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 3115-3124, **2006**.
- [78] Esteban, J., Cordero-Ampuero, J., Treatment of prosthetic osteoarticular infections. *Expert Opinions in Pharmacotherapy*, 12, 899-912, **2011**.
- [79] Miclau, T., Schmidt, A.H., Wenke, J.C., Webb, L.X., Infection. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 24, 583–586, **2010**.
- [80] Antoci, V. Jr., Adams, C.S., Parvizi, J., Davidson, H.M., Composto, R.J., Freeman, T.A., Wickstrom, E., Ducheyne, P., Jungkind, D., Shapiro, I.M., Hickok, N.J., The inhibition of Staphylococcus epidermidis biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials*, 29,4684–4690, **5**.
- [81] Antoci, V., Jr., King, S.B., Jose, B., Parvizi, J., Zeiger, A.R., Wickstrom, E., Freeman, T.A., Composto, R.J., Ducheyne, P., Shapiro, I.M., Hickok, N.J., Adams, C.S., Vancomycin covalently bonded to titanium alloy prevents bacterial colonization. *Journal of Orthopaedics Research*, 25,858–866, **2007**.
- [82] Zilberman, M., Elsner, J.J., Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *Journal of Controlled Release*,130, 202–215, **2008**.
- [83] Ewald, A., Glueckermann, S.K., Thull, R., Gbureck, U., Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium, *Biomedical Engineering Online*,5, 22, **2006**.
- [84] Sia, I.G., Berbari, E.F., Karchmer, A.W., Prosthetic joint infections. *Infectious Disease Clinics of North America*,19:885–914, **2005**.
- [85] Sculco, T.P., The economic-impact of infected joint arthroplasty. *Orthopedics*, 18, 871–873, **1995**.
- [86] Lentino, J.R., Prosthetic joint infections: Bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 1157–1161, **2003**.
- [87] Trampuz, A., Osmon, D.R., Hanssen, A.D., Steckelberg, J.M., Patel, R., Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 69–88, **2003**.

- [88] Trampuz, A., Zimmerli, W., Prosthetic joint infections: Update in diagnosis and treatment, *Swiss Medical Weekly*, 135, 243–251, **2005**.
- [89] Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R., The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*, 27, 2331–2339, **2006**.
- [90] Schmalzried, T.P., Amstutz, H.C., Au, M.K., Dorey, F.J., Etiology of deep sepsis in total hip-arthroplasty - The significance of hematogenous and recurrent infections. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 200–207, **1992**.
- [91] Zhao, L., Chu, P.K., Zhang, Y., Wu, Z., Antibacterial coatings on titanium implants, *Journal of Biomedical Material Research B Applied Biomaterials*, 91, 470–480, **2009**.
- [92] Darouiche, R.O., Current concepts—Treatment of infections associated with surgical implants. *New England Journal of Medicine*, 350:1422–1429, **2004**.
- [93] Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318–1322, **1999**.
- [94] Popat, K.C., Eltgroth, M., LaTempa, T.J., Grimes, C.A., Desai, T.A., Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes, *Biomaterials*, 28, 4880-4888, **2007**.
- [95] Yao, C., Webster, T.J., Prolonged Antibiotic Delivery From Anodized Nanotubular Titanium Using a Co-precipitation Drug Loading Method, *Journal of Biomedical Material Research B Applied Biomaterials* 91B: 587–595, **2009**.
- [96] Peng, L., Mendelsohn, A.D., LaTempa, T.J., Yoriya, S., Grimes, C.A., Desai, T.A., Long-Term Small Molecule and Protein Elution from TiO₂ Nanotubes, *Nano Letters*, 9, 1932-1936, **2009**.
- [97] Ma, M., Kazemzadeh-Narbat, M., Hui, Y., Lu, S., Ding, C., Chen, D.D.Y., Hancock, R.E.W., Wang, R., Local delivery of antimicrobial peptides using self-organized TiO₂ nanotube arrays for peri-implant infections, *Journal of Biomedical Material Research* 100A: 278–285, **2012**.
- [98] Gulati, K., Ramakrishnan, S., Aw, M.S., Atkins, G.J., Findlay, D.M., Losic, D., Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion, *Acta Biomaterialia*, 8, 449-456, **2012**.
- [99] Macak, J.M., Tsuchiya, H., Schmuki, P., High-Aspect Ratio TiO₂ Nanotubes by Anodization Titanium, *Angewandte Chemistry International Edition*, 44, 2100-2102, **2005**.
- [100] Shankar, K., Mor, G.K., Prakasam, H.E., Yoriya, S., Paulose, M., Varghese, O.K., Grimes, C.A., Highly-ordered TiO₂ nanotube arrays up to 220 μm in

- length: use in water photoelectrolysis and dye-sensitized solar cells, *Nanotechnology*, 18, 065707, **2007**.
- [101] Uchida, M., Kim, H.M., Kokubo, T., Fujibayashi, S., Nakamura, T., Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid, *Journal of Biomedical Materials Research*, 64A 164-170, **2003**.
- [102] Taş, A.C., Bhaduri SB, Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10x simulated body fluid, *Journal of Biomedical Materials Research* 19 2742-2749, **2004**.
- [103] Yin, H., Liu, H., Shen, W.Z., The large diameter and fast growth of self-organized TiO₂ nanotube arrays achieved via electrochemical anodization, *Nanotechnology*, 21, 035601, **2010**.
- [104] Vankooten, T.G., Schakenraad, J.M., Vandermei, H.C., Busscher, H.J., Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomaterials*, 13, 897, **1992**.
- [105] Papenburg, B.J., Rodrigues, E.D., Wessling, M., Stamatialis, D., Insights into the role of material surface topography and wettability on cell-material interactions. *Soft Matter*. 6, 4377, **2010**.
- [106] Hench, L.L., Bioceramics, *Journal of American Ceramic Society*, 81, 1705, **1998**.
- [107] Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., Perry, C., Modern biomaterials: A review—Bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18, 1263, **2007**.
- [108] Wilson, C.J., Clegg, R.E., Leavesley, D.I., Percy, M.J., Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review, *Tissue Engineering*. 11, 1, **2005**.
- [109] Puleo, D.A., Thomas, M.V., Implant Surfaces, *Dental Clinics of North America*, 50, 323, **2006**.
- [110] Bjursten, L.M., Rasmusson, L., Oh, S., Smith, G.C., Brammer, K.S., Jin, S., Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Journal of Biomedical Materials Research*, 92, 1218-1224, **2010**.
- [111] Bayram, C., Demirbilek, M., Caliskan, N., Demirbilek, M.E., Denkbaz, E.B., Osteoblast Activity on Anodized Titania Nanotubes: Effect of Simulated Body Fluid Soaking Time, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8, 482-490, **2012**.
- [112] Das, K., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia*, 3, 573, **2007**.
- [113] O'Hare, P., Meenan, B.J., Burke, G.A., Byrne, G., Dowling, D., Hunt, J.A., Biological responses to hydroxyapatite surfaces deposited via a co-incident microblasting technique. *Biomaterials*, 31, 515, **2010**.

- [114] Meirelles, L., Arvidsson, A., Andersson, M., Kjellin, P., Albrektsson, T., Wennerberg, A., Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 87A, 299, **2008**.
- [115] Tian, Y., Ding, S., Peng, H., Lu, S., Wang, G., Xia, L., Wang, P., Osteoblast growth behavior on porous-structure titanium surface. *Applied Surface Science*, 261, 25, **2012**.
- [116] Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 24, 1729, **2003**.
- [117] Panilaitis, B., Altman, G.H., Chen, J., Jin, H.J., Karageorgiou, V., Kaplan, D.L., Macrophage responses to silk. *Biomaterials*. 24, 3079, **2003**.
- [118] Ravichandran, R., Liao, S., Ng, C.C.H., Chan, C.K., Raghunath, M., Ramakrishna, S., Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World J. Stem. Cells* 1, 55, **2009**.
- [119] Ravichandran, R., Venugopal, J.R., Sundarrajan, S., Mukherjee, S., Ramakrishna, S., Poly(Glycerol sebacate)/gelatin core/shell fibrous structure for regeneration of myocardial infarction. *Tissue Engineering A*, 17, 1363, **2010**.
- [120] Lian, J.B., Stein, G.B., Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation, *Iowa Orthopedic Journal*, 15, 118-140, **1995**.
- [121] Lee, Y.M., Lee, E.J., Yee, S.T., Kim, B.I., Choe, E.S., Cho, H.W., In vivo and in vitro response to electrochemically anodized Ti-6Al-4V alloy. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 19, 1851-1859, **2007**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Cem Bayram
Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir, 29 Temmuz 1982
Medeni Hali : Bekar
E-posta : cemb@hacettepe.edu.tr
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Beytepe Ankara

Eğitim

Lise : Atakent Anadolu Lisesi, İzmir (1996 – 2000)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2000 – 2005)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim dalı (2005 – 2007)
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim dalı (2007 – 2013)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce – Çok İyi

İş Deneyimi

Aksaray Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Arş. Gör. (2007 – 2008)

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Arş. Gör. (2008 –)

Deneyim alanları

- Metalik biyomalzemeler
- Biyomalzeme yüzey-hücre etkileşimleri
- Lokal ilaç salım stratejileri

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. Ortopedik İmplantların Nanoteknolojik Yaklaşımlarla Fonksiyonelleştirilmesi” Araştırmacı, Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Birimi Projesi, 010BIYP03601001 , 2010, 50000 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. **Bayram C**, Demirbilek M, Caliskan N, Demirbilek ME, Denkbas EB, “Osteoblast Activity on Anodized Titania Nanotubes: Effect of Simulated Body Fluid Soaking Time”, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2012, 8, 482-490.
2. **Bayram C**, Demirbilek M, Yalcin E, Bozkurt M, Dogan M, Denkbas EB, “Osteoblast Response on Co-modified Titanium Surfaces via Anodization and Electrospinning, *Applied Surface Science*, (hakem incelemesinde)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar

1. **Cem Bayram**, Murat Demirbilek, Nazlı Çalışkan, Melike Erol Demirbilek, Tayfun Vural, Emir Baki Denkbaş, Bioactivation of Titanium Based Orthopedic Implants via Titania Nanotubes, NanoTR6, 5th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Izmir Institute of Technology, Çeşme, Türkiye, Haziran 15-18, 2010.
2. **Cem Bayram**, Murat Demirbilek, Nazlı Çalışkan, Melike Erol Demirbilek, Emir Baki Denkbaş, Osteoblast Activity on Anodized Titanium Surfaces: Effect of SBF Immersion Time, Nanomed 2010 IANM Second World Congress, Antalya, Türkiye, 3-6 Ekim, 2010.
3. **Cem Bayram**, Esra Erat, Mustafa Türk, Mohan J Edirisinghe, Emir Baki Denkbaş, Electrospun nanoHA/SF Fibres as an Extracellular Matrix Analogue for Bone Implant Interface, 8th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Ankara, Türkiye, 25-28 Haziran, 2012.
4. **Cem Bayram**, Ebru Erdal, Emir Baki Denkbaş, Controlled drug release from titanium implants via adjustable surface porosity, International Porous and Powder Materials Symposium and Exhibition (PPM 2013), 3-6 Eylül 2013, Çeşme, İzmir.