

**ELEKTROFORETİK BİRİKTİRME METODU İLE YÜZEYİ
MODİFİYE TİTANYUM İMPLANTLARIN HAZIRLANMASI
VE KARAKTERİZASYONU**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SURFACE
MODIFIED TITANIUM IMPLANTS VIA
ELECTROPHORETIC DEPOSITION**

KÜBRA KICIR

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ ve NANOTİP

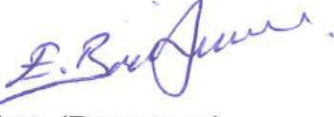
Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013


Kübra KICIR'ın hazırladığı, **Elektroforetik Biriktirme Metodu ile Yüzeyi Modifiye Titanyum İmplantların Hazırlanması ve Karakterizasyonu** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Başkan (Danışman)
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ


Üye
Doç. Dr. Mahmut UĞURLU


Üye
Doç. Dr. Serdar ABACI


Üye
Doç. Dr. Halil Murat AYDIN


Üye
Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak onaylanmıştır.

Prof.Dr. Fatma Sevin DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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.

15 / 03 / 2013

İmza

KÜBRA KICIR

ÖZET

ELEKTROFORETİK BİRİKTİRME METODU İLE YÜZEYİ MODİFİYE TİTANYUM İMPLANTLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

KÜBRA KICIR

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp

Tez Danışmanı, Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Mart 2013, 87 sayfa

Yüzeyi modifiye edilmiş titanyum malzemeler yüksek aktiviteleri ve biyouyumluluklarından dolayı medikal alanda büyük ilgi görmekte ve implant teknolojisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu bağlamda yapılan tez çalışmasında; yüzeyi zımparalanarak pürüzlendirilmiş titanyum plakalar üzerine, etilen glikol (EG) + NH_4F elektrolit çözeltisi içerisinde, değişik gerilimlerde (10–20–30 V) anotlama işlemi uygulanmıştır. Bu sayede yüzey üzerinde nano-boyutta tübüler yapılar oluşturularak yüzey alanı genişletilmiştir. Modifiye edilen titanyum plakaların yüzeyinin morfolojik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM), kimyasal analizi enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ve ıslanabilirliği su temas açısı ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Anotlanan titanyum plakalar osteoblast hücreleriyle etkileştirilerek hücre davranışları incelenmiştir. Aljinat biyopolimeri, elektroforetik biriktirme (EPD) metodu ile yüzeyi modifiye edilen titanyum plakalar üzerine kaplanmıştır. Biriktirme süresi, biriktirme gerilimi ve aljinat konsantrasyonu değiştirilerek, farklı parametrelerin aljinat kaplanması üzerine etkisi incelenmiştir.

Aljinat optimizasyonunun ardından hidroksiapatitin hücre davranışı üzerine etkisini incelemek amacıyla sol-jel metodu ile sentezlenen hidroksiapatit sentezlenmiştir. Sentezlenen hidroksiapatitin boyut analizi zeta-sizer, kimyasal analizi ise enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile yapılmıştır. Yüzeyi zımpara ve anotlanmış titanyum implantlar üzerine değişik oranlarda aljinat/hidroksiapatit kompoziti elektroforetik biriktirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, farklı parametrelerde biriktirme yapılarak osteoblast hücrelerinin yapışma ve çoğalma davranışları incelenmiştir. Anotlanmış yüzeyler üzerine elektroforetik biriktirilen aljinat ve aljinat/hidroksiapatitin morfolojik karakterizasyonunda taramalı elektron mikroskobu SEM, kimyasal analizinde Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve ıslanabilirliğinde su temas açısı ölçülmüş ve değerlendirilmiştir. Yüzeyi modifiye edilen titanyum implantların hücre etkileşimleri incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Titanyum, TiO_2 nanotüpler, Yüzey modifikasyonu, Anodizasyon, Elektroforetik biriktirme (EPD), Aljinat, Hidroksiapatit, Osseointegrasyon

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SURFACE MODIFIED TITANIUM IMPLANTS VIA ELECTROPHORETIC DEPOSITION

KÜBRA KICIR

Master of Science, Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor, Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

March 2013, 87 pages

Surface modified titanium materials are frequently used in implant technology and draw a great attention in medical field due to their high activities and biocompatibilities. Concordantly in committed thesis study; anodizing process was carried out over surface rubbed and roughened titanium plates by varied voltages (10 – 20 – 30 V) in ethylene glycol (EG) + NH₄F electrolyte solution. Thus, the surface area was expanded via constituted nano-sized tubular structure on the surface. Surface morphologic characterization of modified titanium plates was evaluated by scanning electron microscope (SEM), chemical analysis was evaluated by energy dispersive x- ray spectroscopy (EDX) and wettability was evaluated by water contact measurement. Cell behavior of anodized titanium plates was examined after treatment with osteoblast cells. Alginate biopolymer was used to coat the surface modified titanium plates via electrophoretic deposition method. Deposition time, deposition voltage and alginat concentration were varied to examine the effect of different parameters upon alginate coating. After the optimization of alginate, hydroxyapatite was synthsized to investigate the hydroxyapatite on cell behaviour by using sol – gel method.

Different ratios of alginat/hydroxyapatite composites were deposited electrophoretically over the surface rubbed and anodized titanium implants.

In the study, adhesion and proliferation of osteoblast cells were investigated through the deposition carried out in different parameters. Scanning electron microscope (SEM) was used to analyze the morphologic characterization of electrophoretically deposited alginate and alginate/hydroxyapatite over anodized surfaces, fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to examine the chemical analysis and wettability was analysed by water contact measurement. Cell interaction of surface modified titanium implants were also investigated.

Keywords : Titanium, TiO₂ nanotubes, Surface Modification, Anodization, Electrophoretic Deposition (EPD), Alginat, Hydroxyapatite, Osteointegration

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca ilgi ve yardımını esirgemeyen, her adımda fikirleriyle bana yön veren, maddi manevi her türlü desteği sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a;

Bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmamda büyük emeği olan Dr. Cem Bayram'a;

Hücre çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı Dr. Murat Demirbilek'e;

Hücre çalışmalarım için laboratuvarını açan ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa Türk'e;

Maddi ve manevi desteğiyle zorda kaldığım her anda yanımda bulduğum, hayatımda farklı bir yere sahip olan arkadaşım, dostum Göknur Kara'ya;

Tezimi büyük bir titizlikle inceleyen ve düzeltilmesine yardımcı olan canım dostum Sema Tuncer'e;

Tez çalışmaları boyunca bilgilerini bana aktaran sevgili arkadaşlarım Gökçe Bozokafa ve Nazlı Çalışkan'a;

Deney yapmayı keyifli hale getiren, her zaman yardımına koşan, yüzümü güldüren, tez çalışmam süresince kazandığım ve okul hayatım dışında da hep yanımda olacaklarına inandığım canım arkadaşlarım Ebru Erdal, Zeynep Karahaliloğlu, Damla Türkay, Deniz İrem Bulut, Burcu Cengiz, Doğa Kavaz başta olmak üzere tüm Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu (BSRG) üyelerine;

Eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen, büyük emekler vererek bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan ve bana cesaret veren sevgili Ailem'e;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	
ETİK	
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Titanyum	4
2.1.1. Yüzey Özellikleri	4
2.1.1.1. Korozyon Özellikleri	5
2.1.1.2. Mekanik Özellikleri	5
2.1.1.3. Biyolojik Özellikleri	6
2.1.2. Biyomedikal Uygulamaları	7
2.1.2.1. Sert Doku Uygulamaları	7
2.1.2.1.1. Ortopedik İmplantlar	7
2.1.2.2. Kalp ve Damar Uygulamaları	9
2.1.2.3. Diğer Uygulamalar	10
2.2. Yüzey Modifikasyonu	10
2.2.1. Kimyasal Yöntemler	12
2.2.1.1. Asitle Muamele	12
2.2.1.2. Sol-Jel	12

2.2.1.3. CVD	13
2.2.1.4. Anodizasyon	13
2.2.1.5. EPD	16
2.2.1.5.1. EPD'yi Etkileyen Parametreler	18
2.2.2. Mekanik Yöntemler	20
2.2.2.1. Talaşlı İşleme	20
2.2.2.2. Kuşlama	20
2.2.2.3. Zımparalama	20
2.2.2.4. Polisaj	21
2.2.3. Fiziksel Yöntemler	21
2.2.3.1. Plazma Püskürtme	21
2.2.3.2. İyon Plantasyonu	22
2.3. Biyouyumluluk	22
2.4. Biyomalzemeler	23
2.4.1. Biyopolimerler	24
2.4.1.1. Aljinat	24
2.4.1.2. Aljinatın Rejeneratif Tıpta Kullanımı	25
2.4.1.3. Biyopolimerlerin Elektroforetik Biriktirilmesi	26
2.4.2. Biyoseramikler	26
2.4.2.1. Hidroksiapatit	28
2.4.2.2. Biyopolimerlerin Elektroforetik Biriktirilmesi	30
2.4.3. Polimer–Seramik Kompozit Kaplamalar	30
2.4.3.1. Alg/HAp Kompozit Kaplamalar	33
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	34
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	34
3.2. Titanyum Plakaların Hazırlanması	34
3.3. Titanyum Plakaların Anodizasyon İşlemi	35

3.4. Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Sentezi	36
3.5. Sentezlenen HAp Nanopartiküllerinin Analizi	38
3.5.1. Elemental Analizi	38
3.5.2. Boyut Analizi	38
3.5.3. Yapısal Analizi	38
3.6. Anotlanmış Titanyum Yüzeylerin Elektroforetik Kaplanması	38
3.6.1. Titanyum Yüzeylerin Aljinat İle Elektroforetik Kaplanması	38
3.6.2. Titanyum Yüzeylerin Alg/HAp İle Elektroforetik Kaplanması	39
3.7. Anotlanmış ve Elektroforetik Biriktirme İşlemi Uygulanmış Titanyum Yüzeylerin İncelenmesi	39
3.7.1. Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu	39
3.7.2. Yüzeylerin Elemental Analizi	40
3.7.3. Yüzeylerin Yapısal Analizi	40
3.7.4. Titanyum Metal Plakaların Yüzey İslanabilirliğinin İncelenmesi	40
3.8. Hücrelerin Hazırlanması	40
3.9. Hücrelerin Çoğalma Oranı Testi	41
3.10. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	42
3.11. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivite Testi	43
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	44
4.1. Titanyum Metal Plakaların Anotlama İşlemi Sonrası Yüzey Karakterizasyonu	44
4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Yüzeylerin Morfolojik İncelenmesi	44
4.1.2. Enerji Dağılımlı X-Işınları Spektroskopisi (EDX) İle Titanyum Yüzeyin Kimyasal Karakterizasyonu	47
4.2. Sentezlenen Hidroksiapatit Nanokristallerinin Elemental Analizi	48
4.3. Sentezlenen Hidroksiapatit Nanokristallerinin Boyut Analizi	50

4.4. Sentezlenen Hidroksiapatit Nanokristallerinin FTIR Spektroskopisi İle Yapısal Analizi.....	50
4.5. Elektroforetik Biriktirme Metodu İle Titanyum Plakalar Üzerine Aljinat Kaplanması Sonucu Oluşan Yüzeylerin Karakterizasyonu	51
4.6. Aljinat/Hidroksiapatit Kompozit Kaplaması İle Oluşan Titanyum Metal Yüzeylerinin Değerlendirilmesi	56
4.7. Modifiye Edilmiş Titanyum Plakalarda Su Temas Açısı Ölçümleriyle Yüzey Hidrofilitesinin İncelenmesi	58
4.8. Elektroforetik Biriktirme Sonrası Yüzeylerin FTIR Spektrumları İle Yapısal Karakterizasyonu	60
4.9. <i>In Vitro</i> Hücre Kültür Test Sonuçları	63
4.9.1. Hücre Canlılığı (MTT) Testi.....	63
4.9.2. Toplam Hücre İçi Protein Miktarı	66
4.10. ALP Aktivitesi Ölçümü	67
4.11. Hücre İle Etkileştirilen Ti İmplantların Morfolojik Karakterizasyonu	68
5. SONUÇLAR	72
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Titanyum metali ile üretilmiş ortopedik implantın şematik görüntüsü .8
Şekil 2.2.	Anotlama işlemi ile titanyum dioksit nanotüplerinin oluşum mekanizması 14
Şekil 2.3.	İşlenmemiş saf titanyum yüzeylerin anodik oksidasyonu üzerine elektroforetik biriktirme işlemi 17
Şekil 2.4.	Farklı üretim yöntemleri ile elde edilen kaplamaların tipik kalınlıklarının karşılaştırılması 18
Şekil 2.5.	Hekzagonal hidroksiapatit molekül yapısı 28
Şekil 2.6.	Biyomedikal alanda kullanılabilen olası kalsiyum–fosfat ve polimer Kombinasyonları 31
Şekil 2.7	Kolloidal sistemlerde sağlanan polimerik kararlılık çeşitleri (a) sterik kararlılık, (b) bitme kararlılığı 32
Şekil 2.8.	Yüksüz parçacıklara polielektrolit tutturulması ile oluşan elektrosterik stabilizasyon 32
Şekil 3.1.	Titanyum plakaların anodizasyon işlemi şematik görünümü 36
Şekil 3.2.	Sol–jel prosesi ile çöktürülen hidroksiapatit nanokristallerinin hazırlanış şeması 37
Şekil 4.1.	Anotlanmamış Ti(a), 10V(b), 20V(c), 30V(d) gerilim altında anotlanmış Ti metallerinin SEM görüntüleri 45
Şekil 4.2.	Anotlanmış titanyum metali üzerinde oluşan TiO ₂ nanotüplerinin alttan çekilmiş SEM görüntüsü 46
Şekil 4.3.	Anotlanmış Ti metalinin EDX spektrumu 47
Şekil 4.4.	Ticari hidroksiapatit kristallerinin EDX spektrumu 48
Şekil 4.5.	Sentezlenen hidroksiapatit nanokristallerinin EDX spektrumu 48

Şekil 4.6.	Sol-jel yöntemi ile sentezlenen hidroksiapatit nanokristallerinin FTIR spektrumu	51
Şekil 4.7.	Anotlanmamış Ti metal yüzeylerine aljinatın elektroforetik biriktirilmesi SEM görüntüsü, (a) 30s, (b) 60s, (c) 90s	53
Şekil 4.8.	Anotlanmış Ti metal yüzeyler üzerine, farklı gerilimlerde 30 s boyunca aljinatın elektroforetik biriktirilmesi ile elde edilen SEM görüntüsü, (a) 10V, (b) 20V, (c) 30V	54
Şekil 4.9.	Anotlanmış Ti metal yüzeyler üzerine gerilim 20 V'da sabit tutulmak koşulu ile, farklı sürelerde aljinatın elektroforetik biriktirilmesi, (a) 30s, (b) 60s, (c) 90s	55
Şekil 4.10.	Sodyum aljinatın molekül yapısı	56
Şekil 4.11.	Anotlanmış titanyuma Alg/HAp nanokompozitinin biriktirilmesi ile elde edilen yüzeylerin farklı boyutlarda SEM görüntüsü	57
Şekil 4.12.	Yüzeye Alg/HAp kaplanmış titanyum metalinin EDX spektrumu	58
Şekil 4.13.	Alg/HAp kaplanmış titanyum yüzeyinin FTIR spektrumu	59
Şekil 4.14.	Anotlanmamış Ti metali su temas açısı ölçümlerindeki hidrofobik yüzey görünümü	61
Şekil 4.15.	Anotlanmış Ti metali su temas açısı ölçümlerindeki kısmen hidrofobik yüzey görünümü	61
Şekil 4.16.	Anotlanmamış Ti metali üzerine biriktirilen aljinat su temas açısı ölçümlerindeki hidrofilik yüzey görünümü	62
Şekil 4.17.	Anotlanmış Ti metali üzerine biriktirilen aljinat ve Alg/HAp su temas açısı ölçümlerindeki tamamen ıslanabilir yüzey görünümü	62
Şekil 4.18.	Titanyum plakalar üzerine kültüre edilen Saos-2 hücrelerinin 3., 7. ve 14. gün MTT testi sonucu 570 nm'de okunan absorbans değerleri	64
Şekil 4.19.	Saos-2 hücreleri ile kültüre edilen titanyum plakalarda 3., 7. ve 14. günlerde ölçülen toplam hücre içi protein miktarı	66
Şekil 4.20.	Titanyum plakalar üzerine kültüre edilen Saos-2 hücrelerinin 3., 7. ve 14. gün ALP testi sonucu elde edilen alkalen fosfataz aktivitesi	67

Şekil 4.21.	Saos–2 hücreleri ile etkileşen anotlanmamış implantların SEM görüntüsü	69
Şekil 4.22.	Saos–2 hücreleri ile etkileşen anotlanmış titanyum implantların SEM görüntüsü	69
Şekil 4.23.	Saos–2 hücreleri ile etkileşen Alg kaplı titanyum implantların SEM görüntüsü	70
Şekil 4.24.	Saos–2 hücreleri ile etkileşen Alg/HAp kaplı titanyum implantların SEM görüntüsü.....	70
Şekil 4.24.	Saos – 2 hücreleri ile etkileşen Alg/HAp kaplı implantların yüksek büyütmede SEM görüntüsü	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Saf Titanyum metalinin mekanik özellikleri.....	6
Çizelge 2.2. İmplant doku arayüzey ilişkisini etkileyen faktörler	9
Çizelge 2.3. İmplant yüzey modifikasyon yöntemleri.....	11
Çizelge 2.4. İskelet sistemi implant cihazlarında kullanılan doğal ve sentetik malzemeler.....	23
Çizelge 2.5. Farklı Ca–P seramik fazlarının fiziksel özellikleri	28
Çizelge 2.6. HAp'nın fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özellikleri	29
Çizelge 3.1. Saos – 2 hücrelerinin çoğaltılması amacıyla çalışılan kültür ortamı özellikleri	41
Çizelge 4.1. Ticari hidroksiapatitin EDX spektrumu ile elemental analizi	49
Çizelge 4.2. Sentezlenen hidroksiapatit nanokristallerinin EDX spektrum ile elemental analizi.....	49
Çizelge 4.3. Hidroksiapatit FTIR spektrumu sonucu elde edilen bağ gerilmeleri.	50
Çizelge 4.4. Saf aljinatın karakteristik bantlarına karşılık gelen dalga sayıları	59
Çizelge 4.5. Modifiye edilmiş titanyum metallerin su temas açısı ölçümleri.....	60
Çizelge 4.6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan metal implant grupları ve uygulanan işlemler	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Amper
Al	Aluminyum
ALP	Alkalen Fosfataz
Alg	Aljinat
An	Anodize
Ca	Kalsiyum
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Kalsiyum Nitrat
CO ₃ ²⁻	Karbonat iyonu
cpTi	Ticari olarak saf Titanyum
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır Sülfat Pentahidrat
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme
EDX	Enerji Dağılımlı X-ışınları Spektroskopisi
EG	Etilen glikol
EPD	Elektroforetik Biriktirme
F	Flor
FCS	Fetal Sığır Serummu
Fe	Demir
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
H ₃ PO ₄	Fosforik Asit
HAp	Hidroksiapatit
HCl	Hidroklorik Asit

HF	Hidroflorik Asit
HMSCs	İnsan Mezenkimal Kök Hücreleri
HNO ₃	Nitrik Asit
KI	Potasyum İyodür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
Mo	Molibden
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nb	Niyobyum
NH ₄ F	Amonyum Florür
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
nm	Nanometre
OCP	Oktakalsiyum Fosfat
P	Fosfor
pH	Hidrojen Gücü
PLA	Poliakrilik Asit
Pt	Platin
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme
s	Saniye
Saos-2	İnsan Osteosarkom Hücresi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
STA	Su Temas Açısı
Ta	Tantal

TCP	Trikalsiyum Fosfat
ThO ₂	Toryum Oksit
Ti	Titanyum
TiCl ₄	Titanyum Tetraklorür
TiO	Titanyum Oksit
TiO ₂	Titanyum Dioksit
V	Gerilim (Volt)
XRD	X-Ray Diffraction
Zr	Zirkonyum

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasında uzayan ömürle paralel olarak yaşa bağlı hastalıklarda da artış başlamıştır. Bu nedenle, insanoğlu, yaşam kalitesini artırmak, sağlıklı bir hayat sürdürmek amacıyla mevcut tekniklerin yanı sıra, implant, protez, uzun süreli ilaç kullanımları gibi farklı tedavi şekilleri arayış yoluna gitmiştir. Bugünkü tahminlere göre, özellikle 40 yaş üzeri nüfusun %90'a yakın bölümü, eklem rahatsızlıklarından şikayet etmektedir. Bu durum, eklem hastalıklarını iyileştirmek ya da azaltmak amacıyla yeni tıbbi uygulamaları da beraberinde getirmiştir. Bu uygulamalardan en dikkat çeken, hasarlı eklem dokusunun tamamının ya da bir kısmının yerine vücut ile uyumlu metal implantların yerleştirilmesine dayanan ortopedik implant teknolojisidir. Titanyum ve alaşımları, korozyon direnci, mekanik mukavemeti, biyouyumluluğu, hafif, yumuşak ve dayanıklı olması sebebiyle ortopedik implant uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

İmplantın vücuda başarıyla yerleştirilmesi kadar, yerleştirildiği ortama uyum sağlaması ve devamında sağlıklı hücrelerin çoğalarak hasarlı dokuların iyileşmesi de önemlidir. Günümüzde, ortopedi alanında, özellikle osseointegrasyon sürecini artırarak, kemik ile implantın daha güçlü, dayanıklı ve stabil yapışmasını sağlayacak biyoaktif malzemelerin geliştirilmesi için çalışılmaktadır. İnsan vücudu ile implantın entegrasyonunun belirlenmesinde implant üretiminde kullanılan metal kadar bu metalin yüzeyi de kritik rol oynamaktadır. Yüzeyi değiştirilmemiş, saf titanyumun, biyoaktif özelliğinin az olması ve dolayısıyla kemik-implant bağlanmasını geliştirememesi önemli problemlerdendir. Bu sorunu aşmak amacıyla, ortopedik titanyum bazlı implantların fonksiyonel ve daha biyouyumlu hale gelmesi için çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri geliştirilmektedir. Örneğin, Ti implantların oksijenle teması halinde, yüzeyde oluşan ince TiO_2 tabakası, implantın biyolojik uyumluluğunu ortaya koymaktadır. Uygun kaplanmış yüzeyler, implantın biyolojik kabulü ve sürekli işleyişi için avantaj oluşturmaktadır. Yüzey üzerinde mümkün olduğu kadar çoklu kaplama uygulanması, özellikle ortopedik implantlarda hücre yapışması ve çoğalması teşvik edilebilir, böylelikle kemik büyümesi geliştirilebilmektedir [1].

Yapılan tez çalışmasında, titanyum bazlı ortopedik implantların yüzey özellikleri değiştirilerek, kemik–implant arayüzeyinde temas alanını artırmak ve osseointegrasyonu sağlamak öncelikli hedef olarak görülmüştür. Bu bağlamda, zımparalanarak yüzeyi aşındırılmış Ti plakalar üzerine anotlama işlemi uygulanmıştır. Sıvı bir elektrolit çözeltisi içerisine daldırılan iki elektrot ve uygulanan gerilimle çözeltideki iyonların hareketine dayanan bu yöntemde, titanyum anot ve platin katot kullanılarak, titanyum yüzeyler üzerinde nanotübüler yapıda gözenekler oluşması sağlanmıştır. Kullanılan çözelti tipi, konsantrasyonu, pH'ı, uygulanan gerilim ve uygulama süresi gibi farklı parametrelerin değiştirilmesi sonucu değişik morfolojiye sahip gözenekler elde etmek mümkündür.

Kemik, tüm omurgalıların iç iskelet sistemini oluşturan sert bir dokudur. Günlük hayatta meydana gelen düşme, çarpma, travma ya da tümör rezeksiyonu sonucu oluşabilecek kemik deformasyonlarının yeniden inşası ya da tamiri amacıyla ortopedik veya kraniyofasiyal ameliyatlara kemik rejenerasyonu yapılabilmektedir. Kemik defektlerinde otolog kemik greftleme popüler yöntem olarak kabul edilmekle birlikte uzun çalışma süresi ve donör bölgesi morbiditesi gibi olumsuzlukları, yeni ve daha etkili yöntem arayışlarına neden olmuştur [2]. Osseöz doku rejenerasyonunu sağlamak amacıyla doku mühendisliğinde başarılı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Taşıyıcı hücre olarak hareket eden yapı iskeleleri, kusurlu kısımlarda hücre korunmasını sağlarken, kemik oluşumunu da kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, polimerik malzemeler ve seramikler de kemik defektlerini onarmakta büyük önem taşımaktadır [3]. Özellikle doğal polimerler, üstün mekanik özellikleri, biyobozunur olmaları ve kolayca şekil alabilmeleri sayesinde implant teknolojisinde önemli kullanım alanına sahiptirler. Ayrıca biyoyumlu olmaları, hücrenin doğal ortamında kullanılabilmesine olanak vermektedir. Doğal polimerler arasında, polisakkaritler, sinyal molekülleri sayesinde inorganik bileşenlerle etkileşebilme yeteneğine sahiptirler. Bu sebeple, doğal polisakkarit olan aljinat, özellikle kemik yapısında bulunan inorganik bölgelerle etkileşime girebilmesi sebebiyle, implant tasarımları ve kemik defekt tamirlerinde son yıllarda rağbet görmeye başlamıştır [4].

Makroskopik olarak incelendiğinde kemik, kortikal (sıkı) ve trabeküler (süngerli) yapılardan oluşmaktadır. Sıkı yapılı kemik, ağırlıkça %69 kalsiyum fosfat mineralleri, %22 organik bileşikler ve %9 oranında su içermektedir [5]. Biyomedikal alanda farklı amaçlarla kullanılmakta olan kalsiyum fosfat bazlı biyoseramikler, yüksek biyouyumlulukları sayesinde kemik kusurlarını iyileştirmek, implant ile kemik arayüzeyindeki boşlukları doldurarak hücre yapışmasını artırmak amacıyla ortopedik uygulamalarda önemli kullanım alanına sahip olmuştur. Kalsiyum fosfat biyoseramiklerinden biri olan hidroksiapatit, vücut sıvısı içerisinde kararlı bir yapı gösterir, çok yüksek sıcaklıklara kadar bozulmadan kalabilir ve rezorbe davranışlarından dolayı yüksek biyoaktiviteye sahiptir [6].

İmplant–kemik arayüzey yapışmasını maksimum düzeye getirmek, hücrelerin çoğalıp gelişmesini sağlamak amacıyla, implantolojide biyopolimer ve biyoseramiklerin kullanılabilirliğini artırmak temel hedeftir. Bu amaçla biyomalzemelerin implant yüzeyine elektroforetik biriktirilmesi (EPD) son yıllarda üzerinde çalışılan popüler bir uygulamadır. Bir elektrolit çözeltisi içerisinde ve belirli bir gerilim altında titanyum implant yüzeyine çeşitli biyomalzemelerin kaplanması bu yöntemle sağlanabilir. Basit, ucuz ve etkin olması, karmaşık şekiller üzerinde homojen ve kararlı kaplama oluşturabilmesi, EPD kullanımı için büyük avantaj oluşturmaktadır [7]. Tez çalışmada ikinci basamak olarak aljinat biyopolimeri ve hidroksiapatit seramik nanokristalleri kullanılarak titanyum implant üzerine EPD yöntemi ile kaplama oluşturularak hücre cevapları gözlenmiştir. Kullanılan osteoblast hücrelerinin yüzeyi değiştirilmiş implantlar üzerine yapışma, burada yayılma ve çoğalma aktiviteleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Titanyum

Yaklaşık yarım asırdır bilinen şekliyle kullanılmakta olan titanyum, 1791 yılında İngiliz kimyager ve mineralog William Gregor tarafından keşfedilmiştir. Titanyumun yüksek reaktivitesi, saf olarak elde etmeyi zorlaştırmıştır. Gregor tarafından bulunan ve saf olmayan bu oksit bileşik, 1795 yılında Alman kimyager Martin Heinrich Klaproth tarafından Rutil mineralinden titanyum oksit olarak izole edilmiş ve Yunan mitolojisindeki 'Titan' dan esinlenerek titanyum olarak adlandırılmıştır. Saf metalik titanyum, ilk olarak Matthew Albert Hunter tarafından 1910 yılında $TiCl_4$ ile sodyumun yüksek sıcaklıkta ısıtılmasıyla elde edilmiştir. Fakat bu yöntemin, yüksek enerji ve pahalı kimyasallar gerektirmesi, saf titanyum elde etmenin maliyetini artırmıştır.

Günümüzde, alüminyum, demir ve magnezyumdan sonra yeryüzünde en fazla rezerve sahip dördüncü element olan titanyum, periyodik cetvelde 4. Periyot, 4B grubunda yer alan, atom numarası 22 olan bir geçiş metalidir [8].

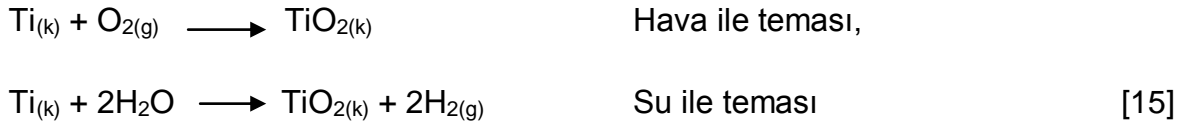
Yüksek mukavemeti, mükemmel korozyon direnci ve hafif olması sayesinde titanyum ve alaşımları havacılık sanayisi başta olmak üzere mimarlık, kimyasal işleme, tıp, enerji üretimi, denizcilik, spor, eğlence ve ulaşım alanlarında da artarak talep görmeye başlamıştır [9].

2.1.1. Yüzey Özellikleri

Titanyumun metal özelliği, kristal örgü içerisindeki atomların metalik bağlanmasına dayanmaktadır. Böylece, örgüdeki serbest ve hareketli değerlik elektronları, metale elektriksel iletkenlik, kristal örgü içerisindeki atomik kayma ile oluşan plastik deformasyon, azalan yumuşaklık, artan sertlik ve mukavemet, kristal örgü içinde saf olmayan atomların bir araya gelmesiyle oluşan alaşımlar gibi farklı metalik özellikler kazandırmaktadır [10].

2.1.1.1. Korozyon Özellikleri

Titanyum, hava, su ya da oksijen içeren herhangi bir ortamda, alt kısmını korumak amacıyla yüzeyinde çok hızlı bir biçimde oksit tabakası oluşturur. Bu özellik, titanyum bazlı alaşımlara mükemmel korozyon direnci kazandırır [11]. TiO_2 , organik ve inorganik birçok ortamda kararlı yapıya sahiptir ve bozunmaz. Yalnızca yoğun konsantrasyonlu H_2SO_4 ve HF içerisinde çözünebilir [12]. Bu tabaka sayesinde, insan vücuduna implante edildikten sonra metalik katyonların tekrar serbest kalması engellenir. Ayrıca, yüzeyi oksit tabakası ile kaplanan titanyum, bu özelliği ile eklem bölgelerinde bulunan kayganlaştırıcı hidrofilik proteinler gibi görev yapabilir ve kemik sürtünmelerini azaltmaya yardımcı olur [13] [14].



2.1.1.2. Mekanik Özellikleri

Hille [16], vücut ortamındaki aşındırıcı kuvvetlere karşı yeterli direnç göstermesi, ana dokuda tolere edilebilir bir reaksiyon indüklemesi ve gerekli mukavemete, yumuşaklığa ve dayanım sınırına sahip olması nedeniyle titanyumun, bir implant malzemesi olarak kullanılabileceğini öngörmüştür [17].

'Ticari saf' olarak adlandırılan titanyum, az miktarda da olsa oksijen, karbon, azot ve demir içermektedir. Farklı elementlerin varlığı, titanyumun mekanik özelliklerinde de farklılığa neden olmaktadır. Özellikle içerdiği oksijen ve demir oranı arttıkça, saf titanyumun akma ve çekme mukavemeti de artmaktadır. Mekanik özelliklerde meydana gelen bu değişiklikler, malzemenin sertlik, korozyon direnci, ısı dayanımı gibi özelliklerinde değişikliğe neden olmaktadır. Böylelikle, elde edilen titanyumun kalitesi de değişmektedir. Farklı mukavemet özellikleri gerektiren çalışmalar için, istenilen kalitede cpTi kullanımı bu şekilde mümkün olmaktadır.

Çizelge 2.1. Saf Titanyum metalinin mekanik özellikleri [18]

ASTM STANDARDI	Akma Mukavemeti (MPa)	Çekme Mukavemeti (MPa)	Dönüşüm Sıcaklıkları (°C)		Katkı Elementleri (% ağırlıkça)					
			Alfa	Beta	N	C	H	Fe	O	Pd
Grade 1	170	240	888	880	0.03	0.10	0.015	0.20	0.18	0
Grade 2	280	340	913	890	0.03	0.10	0.015	0.30	0.25	0
Grade 3	380	450	920	900	0.03	0.10	0.015	0.30	0.35	0
Grade 4	480	550	950	905	0.03	0.10	0.015	0.50	0.40	0
Grade 7	280	340	913	890	0.03	0.10	0.015	0.30	0.25	0.2

2.1.1.3. Biyolojik Özellikleri

Yapılan biyolojik testlerde stelit ve çelik ile karşılaştırıldığında titanyumun daha düşük bir toksisiteye sahip olduğu görülmüştür. Bu da, implant teknolojisinde titanyum kullanımının bir avantajını ortaya koymaktadır [19].

Biyolojik sıvılar, hücre ve dokular ile etkileşimleri açısından yüksek hidrofiliğe sahip yüzeyler, hidrofobik yüzeylere göre daha fazla tercih edilmektedir. Titanyum implantların yüzey kimyasal bileşiminin değiştirilmesi, aynı zamanda yüzeyin hidrofiliğini de etkileyerek, biyolojik ortamlara uyum sağlamasını kolaylaştırmaktadır [20]. Ayrıca, yüzeyi modifiye edilmemiş titanyum, implant yetersizliğine neden olabilecek bakteri enfeksiyonlarına duyarlıdır. Bu tür enfeksiyonlar yüksek morbidite ve tedavi maliyetleri ile yıkıcı komplikasyonlara neden olabilirler [21]. Yüzeye bakteri yapışmasını azaltarak ya da bakterileri öldürerek implantın bakteri enfeksiyonunu en aza indirmek amacıyla malzemenin yüzey kimyası değiştirilerek biyolojik uyumluluğu artırılmaktadır [22] [23].

2.1.2. Biyomedikal Uygulamaları

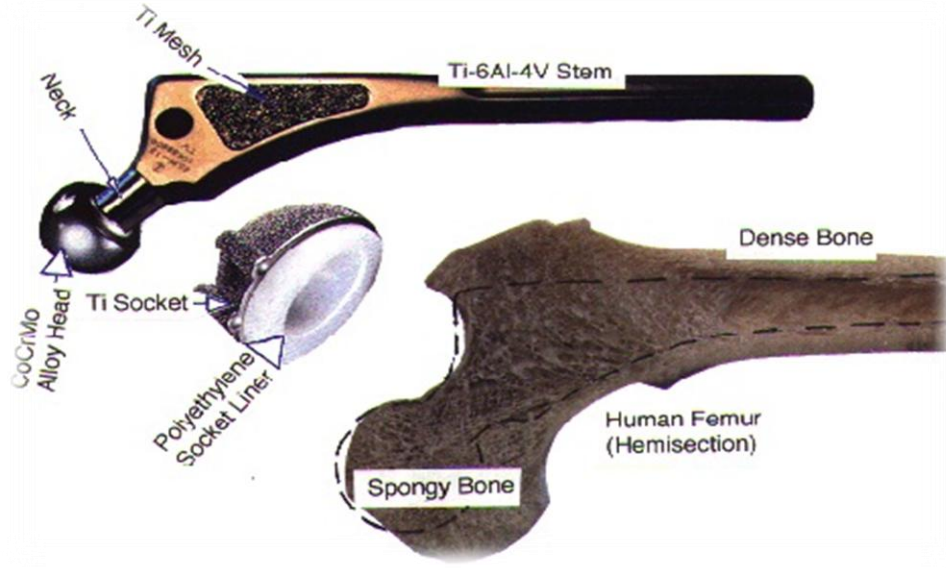
2.1.2.1. Sert doku Uygulamaları

Sert dokular, kaza, çarpma ve yaşlanmaya bağlı olarak zarar görebilmektedir. Zarar gören dokuların yapay malzemelerle yer değiştirilmesi, yaygın olarak kullanılan bir cerrahi işlemdir [24]. Titanyum (Ti) biyouyumlu bir malzeme olması ve gelişmiş mekanik özellikleri nedeniyle dental ve ortopedik implantlarda yaygın olarak kullanılmakta olan bir metaldir [25].

2.1.2.1.1. Ortopedik İmplantlar

İmplant teknolojisi, biyolojik yapıların bir kısmının ya da tamamının görevini üstlenmek ya da bu yapılara destek olmak amacıyla kullanılmakta ve gün geçtikçe gelişmekte olan bir alandır. Günümüzde implantlar, kalp pillerinden kardiyovasküler stentlere, yapay sinir protezlerinden ilaç dağılım sistemlerine, diş ve ortopedik uygulamalara kadar vücudun birçok bölgesinde kullanılmaktadır.

1950'lerde yaygın olarak kullanılan subperiosteal implantların yerini, 1960'ların sonlarına doğru endosteal implantlar almaya başladı. Klinik olarak başarı elde edilebilmesi için, yerleştirilen malzemenin, çevre dokular ile kararlı bir arayüzey oluşturması önemlidir. Ayrıca bu malzeme, doğal dokunun mekanik özellikleriyle de uyumlu olacak şekilde seçilmelidir. Yerleştirildiği bölgede ağır yüklenmeye neden olabilecek malzemelerin seçimi implantasyon için uygun değildir. Brattle, (1960) implant üretimi için kullanılabilecek mekanik özelliğe sahip ve en inert malzemenin titanyum olduğunu belirtmiştir. Saf titanyum, sağlam, hafif, yumuşak olması sebebiyle ortopedik implantlarda kullanımını cazip hale getirmiştir.



Şekil 2.1. Titanyum metali ile üretilmiş ortopedik implantın şematik görüntüsü

Geçmişte özellikle Ti – 6Al – 4V gibi alaşımlar implant teknolojisinde kullanılırken, Vanadyumun toksik etkisi olabileceği düşüncesi, daha yeni ve biyouyumlu alaşım implantlar üretmeyi mecburi hale getirmiştir. Nb, Ta, Zr, ve Mo gibi farklı elementlerle alaşımlanmış titanyum ile daha az toksisiteye sahip implantlar elde edilmiştir. Bunlardan en yaygın kullanılanı Ti – 6Al – 7Nb ve Ti – 5Al – 2.5Fe alaşımlardır [8]. Branemark ve Schroeder ticari saf titanyum implantlar kullanarak hayvanlar üzerinde yaptıkları araştırmalarda direkt kemik ile temas eden implant demirlemesi elde edilebileceğini gözlemlemişlerdir. Bu direkt kemik–implant arayüzü ‘osseointegrasyon’ olarak adlandırılmıştır [26]. Osseointegrasyonu sağlamak ve sürdürmek olasılığı üzerine çok farklı görüşler yayınlanmıştır. Collins (1954), histolojik olarak etkisiz olmasına rağmen, implante edilmiş nesnenin hiçbir zaman kemik içine dahil edilemeyeceğini belirtmiştir. Southam ve ark. (1970), herhangi bir metalik cihaz kemiğe implante edildiğinde, cihaz etrafında devamlı bir fibröz doku tabakasının gelişeceğini ve kemikte yerleştirildiği zaman olduğu kadar güvenli olmayacağını belirtmişlerdir. Bazı araştırmacılar ise, implant ile kemiğin direkt temasının implante edilecek malzemenin metal yerine seramik olmasıyla sağlanabileceği görüşünü savunmuştur [27] [28] [29]. Jacobs’a göre, osseointegrasyon yalnızca seramik implantlar ya da kaplanmış metal implantlarla mümkündür.

Titanyum yüzeyi, yüksek vakum ya da benzeri koşullar altında, birden oksit tabakası kaplı hale gelir. Titanyum implanttaki metal olan ya da olmayan bileşikler, çevre dokulara direk maruz kalırlar. TiO , TiO_2 , Ti_2O_3 ve Ti_3O_4 kombinasyonları yaklaşık 100 Å kalınlığında kararlı oksit tabakaları oluşturarak, kemik ve metal arasındaki direk temas önlenir. Bu da implant olarak titanyumun aslında metal değil, bir seramik olarak kabul edilebileceğini gösterir. İmplant yüzeyinde oluşturulan oksit tabakasının korozyon riskini ve implantı çevreleyen hücrelerdeki toksik reaksiyonları azalttığı gözlenmiştir. [17].

Çizelge 2.2. İmplant doku arayüzey ilişkisini etkileyen faktörler [30]

Doku Tarafı	İmplant Tarafı
Doku Tipi	İmplant Bileşimi
Doku Yaşı	Faz Sayısı
Doku Sağlığı	Faz Sınırları
Doku İçi Kan Sirkülasyonu	Yüzey Morfolojisi
Arayüzey Hareketliliği	Yüzey Gözenekliliği
Arayüzey Kan Sirkülasyonu	Kimyasal Reaksiyon
Boyutlar Arası Uygunluk	Boyutlar Arası Uygunluk
Mekanik Yükleme	Mekanik Yükleme

2.1.2.2. Kalp ve Damar Uygulamaları

Kardiyovasküler uygulamalar için, güçlü, inert ve manyetik olmayan malzeme seçimi önemlidir [24]. Üstün fizikokimyasal özellikleri, titanyumu implante edilebilen ya da ekstrakorporal kanla temas eden cihazların üretiminde cazip hale getirmiştir. Kendi kendine genişleyebilen Nitinol stentler, implante edilebilir titanyum cihazlardan biridir. Titanyum ve nikel kombinasyonu olması, stente süperelastiklik ve vücut sıcaklığındaki sıkışmalara karşı direnç gösteren termal biçim belleği gibi özellikler kazandırır [31].

2.1.2.3. Diğer Uygulamalar

Doku mühendisliği, ilaç salım sistemleri ve yapay organlar gibi birçok alanda, özellikle TiO₂ olmak üzere titanyum bileşikleri ve alaşımları kullanılmaktadır. TiO₂ nanotüp filmleri, kemik ve kök hücreleri için yapışma ve gelişme aktivitelerinin artmasına, bakteri adezyonunun önlenmesine ve kanamayı kontrol altına almak amacıyla kan pıhtılaşmasını sağlamaya yardımcı olmaktadır [32].

2.2. Yüzey Modifikasyonu

Titanyum, kemiğe bağlanabilme özelliğine sahip olmasına rağmen, yüzeyi modifiye edilmemiş Ti metali, biyolojik olarak pasif olması sebebiyle osseointegrasyonu ve kemik iyileşmesini gerçekleştirmek için yetersizdir. Bu tür zorlukların üstesinden gelmek için yüzeyin çeşitli yöntemlerle modifiye edilmesi ya da kaplanması gerekmektedir [33]. Yüzey pürüzlülüğü, osseointegrasyonun hızını ve kalitesini artıran bir etki sağlamaktadır [14]. Ayrıca titanyumun yüzey kimyasal bileşimi de implant osseointegrasyonunu etkileyen bir parametredir. Titanyum yüzeyindeki flor iyonlarının in vivo ortamda osteoblast proliferasyonunu ve fonksiyonunu artırdığı [34], yeni kemik oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir [35].

Mikro ve üzeri yüzeylerle karşılaştırıldığında, nano boyutlu yüzeylerin hücre davranışları için daha uygun olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Nano-yüzeyler, hücrelerin bulunduğu ve etkileşim içinde olduğu doğal ekstraselüler matrikse benzer yapı gösterir. Bu sebeple, hücreler, küçük topografik nesnelere algılayabilir ya da onlarla tepkime verebilir. Başka bir deyişle, bu benzerlik hücre fonksiyonlarını düzenleyebilir. Bir malzemenin yüzey topografyasının nano-boyutta tasarlanması, o yüzeye proteinin tutunmasını kolaylaştırarak hücre büyümesine etki edebilir. Nano-boyutta modifiye edilmiş implantların vücuda takılması ardından proteinlerin yüzeye yapışması başlar ve protein varlığını tespit eden hücreler yüzeye yapışmaya ve orada büyümeye başlar [36]. İmplant yüzeyinin topografyası ve pürüzlülüğü, oluşan oksit tabakasının kalınlığı, mikroyapısı, bileşimi, safsızlık dereceleri, kullanılan yüzey modifikasyon türüne bağlı olarak çeşitlilik gösterir [37]. Çeşitli gözenekli yüzeylere sahip ortopedik implantlar 1960'ların sonlarına doğru yaygın olarak incelenmiştir [38].

Yıllardır süregelen çalışmalar ve morfolometrik analizler sonucunda implant yüzeyinin artan pürüzlülüğünün, kemik ile implant arasındaki temas alanını artırdığı gözlemlenmiştir [39] [40]. Pürüzsüz malzemelerle karşılaştırıldığında, kumlanmış yüzeylerde daha geniş yüzey alanının oluşmasının, bağ dokusu hücre bağlanmasına katkı sağladığı görülmüştür [41]. Bunun üzerine çok düzgün yüzeyler yerine daha pürüzlü yüzey türleriyle implant üretimi üzerinde çalışılmaya başlanmıştır [26]. Yüzey pürüzlülüğü kemik ile implantın temas alanını genişleterek, protein adsorpsiyonunu, osteoblastik hücrelerin yapışmasını, başlangıçtaki kan pıhtısını tutma gücünü artırarak osseointegrasyonu artıran bir etki sağlamaktadır [14] [42] [43].

Kemik–bağlanma kapasitesini artırmak, implantasyon sırasında oluşabilecek bakteri enfeksiyonlarını önlemek ya da bakterilerin ölümünü teşvik etmek amacıyla implant yüzeyi çeşitli yöntemlerle modifiye edilebilmektedir [44].

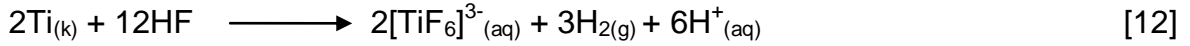
Çizelge 2.3. İmplant Yüzey Modifikasyon Yöntemleri

Kimyasal Yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> • Asitle Muamele • Sol-jel • CVD • Anodizasyon • EPD
Mekanik Yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> • Talaşlı İşleme • Kumlama • Zımparalama • Polisaj
Fiziksel Yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> • Plazma Püskürtme • İyon Plantasyonu

2.2.1. Kimyasal Yöntemler

2.2.1.1. Asitle Muamele

Titanyum implantlar, yüzeyi pürüzlendirmek amacıyla HCl, H₂SO₄, HNO₃ ve HF gibi çeşitli kuvvetli asitlerle aşındırılabilirler. Guo ve ark. [45], HF ile muamele ettikleri kumlanmış cpTi implantlarda nanoboyutta özellikler gösteren yüzeyler elde etmişlerdir. Hücre kültürü çalışmalarında ise asitle muamele edilen yüzeylerin yapışık hücre osseoindüktifi ve kemiğe özgü mRNA ekspresyonunu artırdığı görülmüştür. Asitle muamele işleminde, elektrolit çözeltisindeki F⁻ iyonları, oksit tabakası üzerindeki titanyum ile tepkimeye girerek, çözünebilir bir kompleks oluşturmuştur.



Yapılan çalışmalarda, kumlanmış TiO₂ yüzeylerin F iyonu ile etkileşimi, yüzey üzerinde önemli bir değişiklik oluşturmasa da insan mezenkimal kök hücrelerinde bağlanmış osteoblastik farklılaşmasını sağladığı ve implant–kemik etkileşimini artırdığı gözlenmiştir. Flor iyonlarının kemik oluşumu ve hücresel faaliyetlere etkisi tam olarak çözülememiş olmasına rağmen, bu iyonların osteoblastik hücrelere direkt etkisi ya da protein adsorpsiyonu üzerine flor iyonlarının dolaylı etkisi ve sonraki hücre adezyonu ya da titanyum yüzey üzerine dolaylı olarak flor tutunması, lokal kalsiyum konsantrasyonu ve hücre davranışlarını etkileyen kalsiyum fosfat birikimini sağlıyor olabileceği düşünülmektedir [34].

2.2.1.2. Sol-jel

Substrat üzerine TiO₂ filmlerinin hazırlanmasında sol-jel, özel aparatlar gerektirmeyen, kolay ve ucuz bir yöntemdir. Homojen bir çözelti ile, düzgün çok bileşenli filmler kolaylıkla oluşturulabilir, filmlerin faz yapısı kumanda edilebilir ve böylece TiO₂ (anataz) elde edilebilir. Jelin geniş alan özellikli gözenekli yapısı ile elde edilen film karakterize edilebilir.

Sol–jel yöntemiyle yüksek fotokatalitik aktiviteye sahip TiO_2 filmler elde edilmiştir. Son zamanlarda, yüksek katalitik aktiviteli TiO_2 ince film elde etmek için peroksotitanik asit çözeltisinin hidrotermal muamele ile hazırlanmış TiO_2 çözeltileri, bir alkoksit–türevi TiO_2 jel, sülfürik asit, kullanılmaktadır [46].

2.2.1.3. Kimyasal Buhar Biriktirme (CVD)

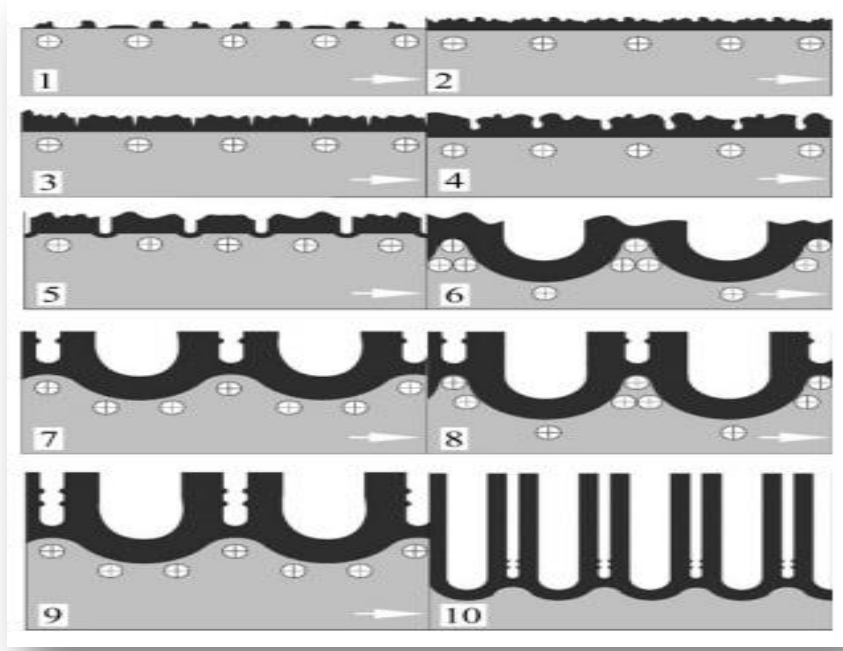
Karmaşık yapılı yüzeyler üzerine homojen nanokristal kaplamalar elde etmek için kullanılan bir yöntemdir. Oksijenli ortamda, titanyum tetraklorür ($TiCl_4$) ve çeşitli gazlar kullanılarak TiO_2 biriktirilmesi temeline dayanır. Fakat, depozisyonda oluşan klor kirlilikleri, klor ve oksijenin farklı iyon yarıçaplarına bağlı olarak istenmeyen kafes genişlemesi, kimyasal ve mekanik özelliklerinin düşük olmasına neden olmaktadır. Düşük sıcaklıklarda, metal alkoksitler gibi daha önceden metal-oksijen bağı yapmış bileşiklerin kullanılması, kirliliklerin azalmasını ve daha verimli kaplama yapılmasını sağlayabilmektedir [47].

2.2.1.4. Anodizasyon

Fonksiyonel ince filmlerin elektrokimyasal fabrikasyonu, çevreye zararsız koşullar altında yürütülen, düşük enerjili bir süreç olmasından dolayı yumuşak çözeltili elektrokimyasal süreç olarak da tanımlanabilmektedir. Yumuşak çözeltili bu işlemlerle epitaksiyel, süper-örgü, kuantum-noktacıkları ve nano-gözenekli gibi ince filmler elde etmek mümkündür [48].

Anotlama işlemi, titanyum yüzeyler üzerine nanogözenekli TiO_2 filmleri oluşturmak amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Böylelikle kontrol edilebilen gözenek boyutlarına sahip, homojen, düşük maliyetli ve geniş alanda uygulanabilen filmler oluşturulabilir. Bu filmler, kendi kendini temizleme, kontrol edilebilir ıslanabilirlik, yüksek biyoyumluluk gibi özelliklerinden dolayı farklı uygulamalarda tercih edilebilmektedir [49]. Nanogözenekli titanyum oksit ince filmler, geniş yüzey alanı oluşturmaları ve yüksek reaktivitelerinden dolayı katalizör ve gaz algılama sensörü olarak kullanılabilir [50].

Biyomedikal alanda ise TiO_2 nanotüplerin, ilaç salım sistemlerinde, kemik ve kök hücre yapışma ve gelişmesini sağlamada kullanılmaya başlandığı görülmektedir [51]. Nanotüpler, Ti yüzey alanını genişleterek daha reaktif bölgeler oluşturmakta ve böylece osteoblast yapışmayı sağlayacak ilk protein etkileşimini artırmaktadır [11].



Şekil 2.2. Anotlama işlemi ile titanyum dioksit nanotüplerinin oluşum mekanizması

Tahmini TiO_2 oluşum mekanizması şu şekildedir:

- 1) Gevşek bir katman oluşumu,
- 2) Yoğun tabakalaşma süreci,
- 3) Mikro-çatlakların ortaya çıkışı,
- 4) Mikro-çatlakların gelişimi,
- 5) Korozyon çukurlarının oluşumu,
- 6) Korozyon çukurlarının gelişmesi,
- 7) Gözenek içlerinin bozulması,
- 8) Gözenek içlerinde oluşan kimyasal çözülme,
- 9) Gözenek içlerinin yeniden bozulması,
- 10) Düzgün sıralanmış nanotüp dizilerinin oluşması [52].

Anodizasyon işlemi sırasında titanyum anot yüzeyinde meydana gelen tepkimeler:

- Ti – TiO₂ arayüzeyinde : $Ti \longrightarrow Ti^{2+} + 2e^{-}$
- TiO₂ – Elektrolit arayüzeyinde : $2H_2O \longrightarrow 2O^{2-} + 4H^{+}$
 $2H_2O \longrightarrow O_2 + 4H^{+} + 4e^{-}$
- İki arayüzey arasında : $Ti^{2+} + 2O^{2-} \longrightarrow TiO_2 + 2e^{-}$ [53]

Titanyumun anodizasyonu, asidik sulu çözeltilerde, yüzey üzerine TiO₂ biriktirme esasına dayanan bir tekniktir [48]. Titanyum oksit filmler HF [50], etilen glikol [51], (NH₄)₂SO₄ + NH₄F [49] gibi farklı elektrolit çözeltilerinde anotlama işlemiyle elde edilebilmektedir. Paulose ve ark. [51], etilen glikol çözeltisi içerisinde son derece hızlı ve altıgen biçiminde tüpler oluştuğunu görmüşlerdir. İleriki çalışmalarında ise, etilen glikol + NH₄F çözeltisinde, çok daha uzun (360 µm) tüplere sahip gözenekli titanyum yüzeyler oluşturmuşlardır. Tüp uzunluğu arttıkça oluşan yüzey alanı, özellikle biyomedikal uygulamalar için avantaj oluşturmaktadır.

Nanotübüler yapıların oluşumu sırasında, titanyum dioksitin bir kısmı çözülür fakat anodizasyonu etkileyecek herhangi bir yan reaksiyon göstermez. Bu durumda bulk çözeltisi içerisindeki TiO₂ nanotüplerinin kimyasal çözülmesi ihmal edilebilir. Fakat, bu elektrolit çözeltisi tekrar kullanıldığında, ya da uzun süreli anotlama işlemi yapıldığında çözelti içerisindeki H⁺ ve F⁻ iyonlarının tükenmesi nedeniyle nanotüp yerine, birkaç yüz nm kalınlığında ve homojen bir oksit tabakası oluşturur. NH₄F ilavesi ile bariyer tabakası sınırlandırılarak asitlenme bölgeleri tekrar oluşturulur ve nanotüp dizilerinin sentezi başlar. Kalın Ti film tabakalarından uzun nanotüpler elde etmek için, elektrolit çözeltisindeki NH₄F ve H₂O konsantrasyonunu artırmak gerekmektedir [51]. Gözenekli tabakanın kalınlığı, gözenegin tabanındaki TiO₂'nin elektrokimyasal oluşumu ile, bu TiO₂'lerin F⁻ iyonları içeren çözelti içerisindeki çözülmesinin dengesine bağlıdır. TiO₂'nin kimyasal çözülme hızı, çözelti pH'ına bağlıdır [49].

2.2.1.5. Elektroforetik Biriktirme (EPD)

100 yılı aşkın süredir kullanılmakta olan elektro-kaplama teknolojisi, yüksek çözünürlüğe sahip elektrolit ve metal tuzları içeren, yüksek iletme yeteneğine sahip sulu çözeltilerin kullanımı esasına dayanmaktadır. Bu teknikte, sulu çözeltiler kullanma sebepleri şu şekilde sıralanabilir;

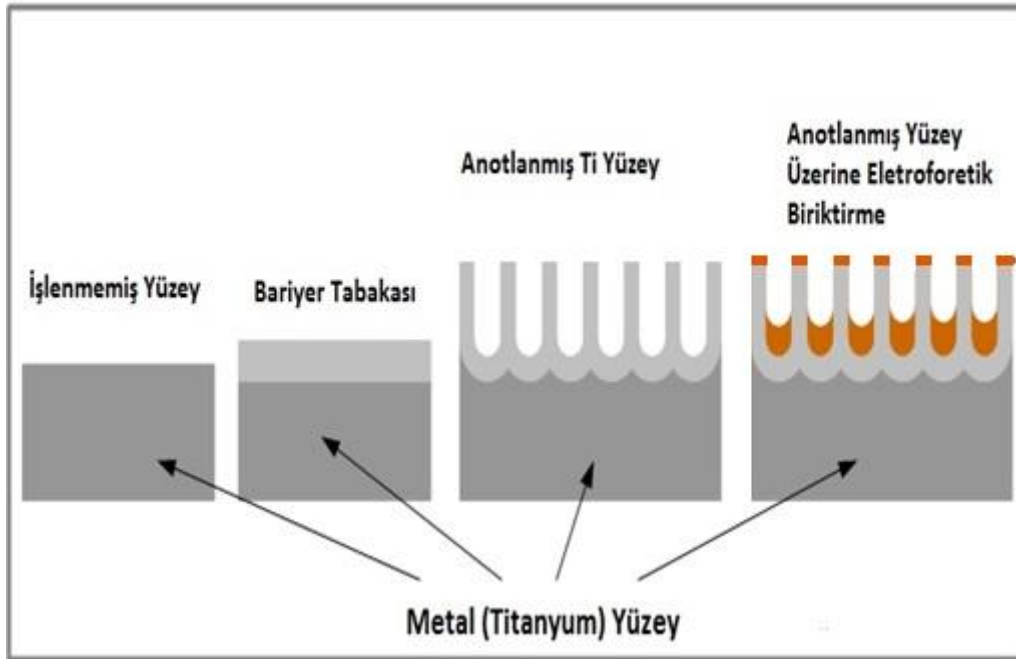
- Geniş potansiyel pencereler sunması,
- Metal tuzlarının yüksek çözünürlüğü,
- Su ve metal/su kimyasından kaçınma,
- Susuz çözücülerle kıyaslandığında yüksek iletkenlik özelliği,
- Verimli, kolay ve tekrar kullanılabilir olması,
- Çevreye zarar vermemesi.

Ayrıca iyonik sıvılar, düşük buhar basınçları nedeniyle farklı sıcaklık aralıklarındaki çalışmalarda da rahatlıkla kullanılabilirler [54].

Elektroforetik biriktirme (EPD), elektroforez ve depozisyon olmak üzere iki farklı sürecin kombinasyonudur. Elektroforez, bir süspansiyondaki yüklü parçacıkların elektriksel alan altındaki hareketlerini içerir. Hint bilim adamı G.M. Bose tarafından sıvı sifon deneyi sırasında keşfedilmiş (1740), Rus Reuss (1807) su içerisindeki katı parçacıkları elektrik akımıyla indükleyerek hareket ettirmiştir. Diğer işleme teknikleriyle kolayca ulaşılamayacak derecede sitokiyometrik yüksek saflıkta malzeme birikmesine olanak sağlaması ve metal fiber ağ yapıları gibi karmaşık yapılar üzerine kaplama yapılabilmesi sebebiyle biyomedikal uygulamalar için elektroforez önemli bir avantaj oluşturmaktadır [55]. Depozisyon ise küçük parçacıkların koagülasyonu sonucu yoğun kütleler oluşturmasıdır. EPD'nin ilk kez (1937), platin katot üzerine ThO_2 ve tungsten biriktirmek amacıyla kullanıldığı düşünülmektedir [56].

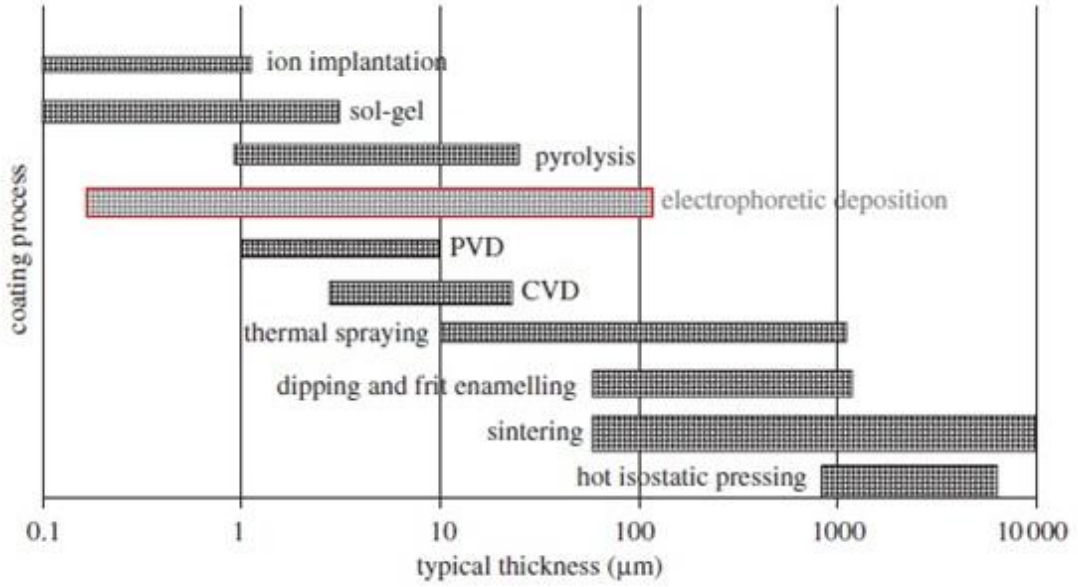
Etkin, homojen ve konformal bir kaplama oluşabilmesi için net yük taşıyan, kararlı kolloidal süspansiyona sahip olmak gerekmektedir [7].

Elektroforetik biriktirme (EPD), kararlı bir süspansiyondan gelen yüklü parçacıkların, zıt yüklü bir substrat yüzeyinde doğru akım altında depolanmasını içeren koloidal oluşum tekniği olarak tanımlanabilir. EPD yöntemi ile, toz halindeki malzemenin karmaşık yapılı elektrotlar üzerine homojen birikmesi sağlanabilir. Yığın seramiklerin oluşması durumunda, biriktirme yapılmış elektrotun depozitten ayrılması gerekir. EPD'nin ticari uygulanabilirliği, substratın depozitten etkin şekilde ayrılmasına bağlıdır. Bu ayrılma işlemi basit geometriler için dikkatli ve kontrollü kurutma ile gerçekleştirilebilirken, daha karmaşık yapılarda sinterleme işlemine başvurulmaktadır [57].



Şekil 2.3. İşlenmemiş saf titanyum yüzeylerin anodik oksidasyonu üzerine elektroforetik biriktirme işlemi [58]

Elektroforetik biriktirmeyi diğer yöntemlerden ayıran özelliklerin başında, oda sıcaklığında uygulanabilmesi ve elektrokimyasal potansiyeli ve elektrolit derişimi değiştirilerek yüzey morfolojisini kontrol etmenin mümkün olmasıdır [59]. Ayrıca basit, ekonomik ve hızlı bir yöntem olması; film kalınlığının ve birikme hızının kontrol edilebilirliği, yüzey kaplama işlemi için EPD'yi cazip hale getirmiştir [60].



Şekil 2.4. Farklı üretim yöntemleri ile elde edilen kaplamaların tipik kalınlıklarının karşılaştırılması

Şekil 2.4.'te, ortopedik uygulamalar için kullanılan titanyum implant yüzeylerinin farklı metotlarla kaplanması karşılaştırıldığında, EPD yöntemiyle çok geniş bir alanda uygun kalınlığa sahip kaplama elde edilebileceği açıkça görülmektedir [61].

2.2.1.5.1. Elektroforetik Biriktirmeyi Etkileyen Parametreler

Elektrokimyasal biriktirme (elektrodepozisyon) tekniği ile elde edilen ince filmin kalitesini etkileyen bazı parametreler vardır. Bu parametreler değiştirilerek istenen özelliklere sahip ince film üretmek mümkündür. Elektrokimyasal biriktirmeyi etkileyen parametreler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- i- Depozisyon potansiyeli

Depozisyon süresince uygulanan potansiyel, oluşturulan ince filmin kalitesi ve parlaklığı üzerinde önemli rol oynamaktadır. Zhitomirsky I. ve ark [55], yaptıkları çalışmada, çeşitli gerilimlerde oluşturulan filmlerin parçacık boyutlarının farklılık gösterdiğini gözlemlemiştir.

ii- Çözelti pH'ı

Çözelti içerisindeki H iyonlarının konsantrasyonu, elektrolitin pH'ını etkileyen diğer bir faktördür. H iyonları ile pH arasındaki bağıntı:

$$\text{pH} = -\log_{10}a_{\text{H}^+}$$

şeklinde gösterilebilir.

H iyonlarının artması pH'ı düşürürken, azalması ise pH'ın artmasına neden olur. Bu şekilde pH değişimi ince filmin kalitesini de etkiler.

iii- Akım yoğunluğu

Akım yoğunluğu, elektrot yüzeyinin birim alanı başına geçen akım olarak tanımlanır. Akım yoğunluğunun düşük ya da yüksek olması filmin kristal yapısını ve yüzey morfolojisini etkiler. Düşük akım yoğunluğu, kaliteli ince film tabakaları biriktirmek için avantaj oluşturmaktadır [62].

iv- Elektrolit sıcaklığı

Elektroforetik birikme süresince istenmeyen faz değişimlerini engellemek amacıyla daha düşük sıcaklıklarda çalışılması uygundur [63].

v- Çözelti içine katılan kimyasal maddeler

Çözeltinin kimyasal kararlılığını artırmak, istenen seviyede elektroforetik hareketliliği sağlamak, ince film tabakası oluşturmak ya da oluşan filmin kalitesini artırmak amacıyla elektrolit çözeltisi içerisine katkı maddeleri eklenebilmektedir.

2.2.2. Mekanik Yöntemler

2.2.2.1. Talaşlı İşleme

Talaşlama, metallerde istenen şekil ve ölçüde yüzeyler elde etmek amacıyla, yüzey üzerinden talaş kaldırarak aşındırma işlemidir. Aşındırıcının cinsi, tane büyüklüğü, birleşimindeki malzemeler, taşın sertliği gibi farklı parametreler taş seçimi için önemlidir. Yumuşak malzemelerle çalışılırken daha sert ve ince taneli taşlar; sert malzemelerde ise daha büyük taneli taşlar seçilmektedir. Yüzeyden fazla talaş kaldırmak için iri taneli ve yumuşak taşlar seçilmelidir. Ti alaşımları, Ni alaşımları ve yüksek mukavemetli çeliklerin yüzeyleri bu şekilde pürüzlendirilerek, farklı amaçlar için kullanılmaktadır [64].

2.2.2.2. Kuşlama

Titanyum yüzeyini pürüzlendirmek için kullanılan diğer bir yöntem ise yüzeyi sert seramik parçacıklar ile kuşlamadır. Seramik parçacıklar, bir nozul içerisinden basınçlı hava ile yüksek hızla fırlatılırlar. Seramik parçacık boyutuna bağlı olarak farklı yüzey pürüzlülüğünde titanyum implantlar elde edilebilir [20]. Kuşlama, pürüzlülüğü artırmakla beraber, yüzey üzerindeki kirlilikleri de ortadan kaldırarak metalin biyoaktivitesini artırır [42]. Kuşlama maddeleri kimyasal olarak kararlı ve biyoyumlu olmalı, implantın osseointegrasyonuna engel olmamalıdır. Alüminyum oksit, titanyum oksit, kalsiyum fosfat gibi çeşitli seramik parçacıklar kuşlama için kullanılabilir.

2.2.2.3. Zımparalama

Zımparalama, birçok malzeme için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olsa da titanyum için bu durum biraz daha farklıdır. Titanyum çok sert olmamakla birlikte sağlam bir metaldir. Isı iletkenliği azdır ve kimyasal olarak oldukça reaktiftir [65]. Bu yüzden zımparalama işleminde önemli ölçüde verim almak zordur. Diğer yandan, titanyumun sertliği oksijen konsantrasyonuyla orantılı olarak artmaktadır. SiC ile zımparalanmış titanyumda yüzey üzerinde oksit tabakası oluşmuş ve buna bağlı olarak sertlikte de artış gözlenmiştir. Ayrıca bu oksit tabakası sayesinde metalin korozyon özelliği ve biyoyumluluğu artmaktadır [66].

2.2.2.4. Polisaj

Mekanik polisaj, metaller üzerinde çok düz ve pürüzsüz yüzeyler elde etmek amacıyla kullanılan, uzun süreli bir yöntemdir. Metal yüzeyinde gözle görülmeyecek düzeyde tümsek ve çukurlar vardır. Bu yöntemle tümseklikler kazınarak çukur kısımlar içine doldurularak yüzeyde düzgünleştirme sağlanır. Fakat, mekanik polisaj yapılmış yüzeylerde deformasyon meydana gelmektedir [67].

2.2.3. Fiziksel Yöntemler

2.2.3.1. Plazma Püskürtme

Gözenekli bir yüzey oluşturmak için implantın plazma sprej ile kaplanması ilk 1970 yılında Hahn ve Palich tarafından rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, plazma püskürtülmüş titanyum implantların, pürüzsüz titanyum implantlara göre daha yüksek kaldırma torkuna ve yüksek kemik-implant etkileşim oranına sahip olduğu gözlenmiştir [39]. Plazma püskürtme, implant yüzeyini biyoseramik kaplamak amacıyla yaygın olarak kullanılan ticari bir yöntemdir. Son yıllarda ise titanyum implantları HAp ile kaplamak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Fakat, kaplama sonrası oluşan mikro-çatlaklar, kaplamanın substrat yüzeyine zayıf yapışabilirliği, yüksek sıcaklıklarda faz değişimine uğraması, zamanla yapılan çalışmalarda bir dezavantaj olarak görülmüştür [63]. Ayrıca özellikle karmaşık şekilli yüzeylere homojen HAp kaplanması konusunda yetersiz olduğu düşünülmektedir [59]. Bu yöntemde görüş hattı boyunca kaplama yapıldığı için, gözenekli metal malzemelerin gözenek içlerinde tam bir kaplama yapılamamaktadır [68]. Buser ve ark. yüzeyi plazma püskürtme mekanik yöntemlerle modifiye edilmiş titanyumla yaptıkları çalışmada, HAp kaplı implantların kemik-implant arayüzey etkileşim oranının çok yüksek olduğunu gözlemlemiştir. İyileşmenin 6 haftalık süresi içinde HAp kaplamanın kemik çoğalması üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Fakat, kullanılan HAp kaplamanın amorf yapıda kalması nedeniyle biyolojik olarak kararsız yapıda olduğu ve sürekli olarak yıkım belirtisi gösterdiği saptanmıştır [38].

2.2.3.2. İyon Plantasyonu

İyon aşılama olarak da bilinen yöntem, azot ve oksijen gibi yüksek enerjili iyonların titanyum yüzeyine implante edilmesi ile yüzey özelliklerinin değiştirilmesine dayanır. Bu yöntemde, çok düşük yoğunlukta iyonlar ile yüksek sertlikte kaplama elde edilebilir. Fakat, diğer metotlarla karşılaştırıldığında, maksimum indentasyon derinliğinin çok az olduğu görülmektedir [69].

2.3. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk temelde, bir malzemenin ya da kullanılacak herhangi bir cihazın vücutla kimyasal, fiziksel ya da biyolojik olarak etkileşimi halinde zararlı olup olmamasıyla alakalıdır. İnsan vücudu için kullanılacak uygulamalarda aranan temel biyouyumluluk gereksinimleri, toksik, antijenik, mutojenik ve kanserojen olmayan malzemeler kullanımına dayanan cihazlar üretebilmektir. Özellikle yeni bir malzeme ya da kombinasyon oluşturularak üretilecek biyomedikal cihazlarda ilk ve en önemli adım biyouyumluluk testidir. Cihazın işlevselliğini artırması ya da sınırlandırması ve uzun süre sorunsuz kullanılabilmesi bakımından, biyolojik cevaplar medikal cihaz tasarımı için önemli parametrelerdir [1].

Titanyumun biyouyumluluğu daha çok yüzeyine oluşturduğu oksit tabakasına bağlıdır. Birkaç dakika içerisinde, oksijen ile temas eden titanyum yüzeyinde 100 Å kalınlığında oksit tabakası oluşabilmektedir. Bu tabaka, organizmanın sıvı hücumuna karşı direnç oluşturmaktadır. Aynı zamanda, TiO₂ tabakasına proteoglikan ve glikozaminoglikan gibi doku ürünlerinin yapışması ve bu yüzeyin kollajen tabakasıyla kaplanması osseointegrasyonun başlamasını sağlamaktadır [70].

Anodizasyon başta olmak üzere farklı yöntemlerle Ti üzerinde oksit tabakası oluşturmak mümkündür. Li ve ark [71], anotlama işlemi ile yüzeyi oksitlenmiş titanyum implant üzerine hidroksiapatit kaplamışlardır. TiO₂ gözenekli tabakası sayesinde pürüzlü yüzeyde Ca ve P tutunmasının kolaylaştığını ve bu sayede osteoblast hücre yanıtlarında ve osseointegrasyonda artış meydana geldiğini görmüşlerdir [71].

2.4. Biyomalzemeler

Biyomalzeme bilimi, çok eski çağlardan bugüne uzanan, farklı alanlarla sentezi sayesinde günden güne gelişen bir bilim dalıdır. Tarihe bakıldığında, Mısır mumyalarında görülen yapay göz, burun ve dişler; milattan önceki dönemlerden kalma kemik implantları biyomalzeme biliminin aslında çok eski tarihlere dayandığının bir göstergesidir. Günümüzde, biyomalzemeler, özellikle nanoteknolojik gelişmelerle birlikte biyosensör, biyoçip, biyo-ayırma işlemleri, enzim, doku, hücre gibi biyoaktif maddelerin immobilizasyonu, atık su arıtımı gibi farklı alanlarda kullanılmaya başlamıştır. Fakat bu farklı uygulama alanlarının arasında daha çok tıbbi uygulamalar ön plana çıkmaktadır [72]. Genel bir tanım olarak, biyomalzemeler, vücudun herhangi bir doku, organ ya da fonksiyonunu değerlendirmek, tedavi etmek, çoğaltmak ya da değiştirmek amacıyla kullanılan biyolojik olarak uyumlu malzemelerdir [73]. Biyomalzemeler daha çok insan vücudunun sürekli değişen ortamlara sahip bölgelerinde kullanılırlar. Vücutta en çok kullanılan yerlerin başında kemik ve kalça eklemleri gelmektedir. Bu bölgeler günlük aktiviteler sonucunda farklı gerilme, baskı ve ağırlıklara maruz kalır. Kullanılacak biyomalzemenin tüm bu koşullara uyumlu ve dayanıklı olması göz önünde bulundurulacak temel konudur. Biyomalzemeler, özelliklerine göre, metaller, polimerler, seramikler gibi farklı gruplara ayrılabilirler.

Çizelge 2.4. İskelet sistemi implant cihazlarında kullanılan doğal ve sentetik malzemeler [30]

Uygulama Alanı	Kullanılan Malzeme Türü
<ul style="list-style-type: none">Eklemler	Ti / Ti-V-Al alaşımlar, Paslanmaz çelik, Kobalt-krom alaşımlar
<ul style="list-style-type: none">Kırık kemik uçlarını tespit için kullanılan metal levhalarKemik dolgu maddesiKemikte oluşan bozuklukların tamiri	Poli (metilmetakrilat) PMMA, Hidroksiapatit (HAp)
<ul style="list-style-type: none">Yapay tendon ve bağlar	Teflon, Poli (etilen tereftalat)
<ul style="list-style-type: none">Diş İmplantları	Ti, Alumina, CaP

2.4.1. Biyopolimerler

Geçmişte, vücuda implante edilen metalik cihazların hücreler tarafından kabul edilmemesi ya da farklı enfeksiyon durumlarından dolayı ikinci cerrahi işlemler gerektiren, kimi zaman ise uzuv kayıplarına neden olan ciddi rahatsızlıklar oluşturmuştur. Bu da hasta için ekonomik yüklenme getirirken, aynı zamanda iyileşme sürecini de artıran bir dezavantaj olmuştur. Özellikle ikinci bir cerrahi işlemi engellemek ve iyileşme süresini hızlandırmak için, daha düşük maliyetli ve biyobozunur polimerler tercih edilmiştir. Burada önemli olan parametrelerden biri, polimerin bozunma süresinin çok uzun olmamasına dikkat edilmelidir [73].

Biyopolimerler, doğal olarak elde edilen, biyoyumlu malzemelerdir. Genellikle, dolgu maddesi olarak sert doku defektlerini kapatmakta kullanılırlar. Kusurlu bölgedeki fonksiyonlarını tamamladıktan sonra ise biyolojik olarak bozularak vücuttan ayrılırlar ve dokular için zararlı olabilecek kalıntı bırakmazlar [74]. Osseointegrasyon sürecinde, hücre bağlanması, çoğalması ve farklılaşmasını sağlamaya yardımcı olurlar.

2.4.1.1. Aljinat

Aljinat, özellikle kahverengi algler olmak üzere çeşitli deniz yosunlarının hücre duvarlarından elde edilen, asidik bir polisakarittir. Yüksek hidrofilikliğe ve su tutma kapasitesine sahip olması hücrelerin kurummasını engellemektedir. Aljinat varlığı, deniz yosununa esneklik ve mekanik dayanıklılık sağladığı gibi, yosun parçasının hava ile temasında su deposu olarak davranır ve dehidrasyonu önler. Alglerde kalsiyum tuzu olarak bulunan aljinat, hücre zarında iyon değiştirici olarak da görev yapmaktadır. Bu özellikleri aljinat hidrojellerinin daha ileri gelişme ve uygulamalarda biyomimetik olarak kabul edilebilir olduğunu göstermektedir [75]. Bu özelliklerinin dışında, stabilize edici, akışmazlaştırıcı, jelleştirici özelliklerinden dolayı endüstriyel uygulamalarda doğal polimerik malzeme olarak kullanılan aljinat, son derece biyoyumlu, biyobozunur, hidrofilik, nispeten ucuz; yapışkanlık, plastiklik ve hemostatik özelliklerine sahip bir malzemedir [76].

2.4.1.2. Aljinatın Rejeneratif Tıpta Kullanımı

Rejeneratif tıp, doku mühendisliği, kök hücre ve klonlama gibi farklı konuları kapsayan bir alandır. Doku mühendisliği, hücre nakli, malzeme bilimi ve biyolojik yedeklemede restorasyon ve koruma amaçlı gelişmeler sağlayan, yenileyici tıpın en önemli kolu sayılabilir. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler genellikle üç sınıfa ayrılabilir: aselüler doku matrisleri (mesane submukozası ve ince bağırsak submukozası), poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi sentetik polimerler ve doğal olarak elde edilen malzemeler (kollajen, aljinat gibi).

Doğal bir polisakkarit olan aljinatın, katyonlarla jel oluşturma, organik çözücülerle çözünürlüğünü kısıtlama ya da asit formuna dönüştürme gibi yöntemlerle çözünürlüğü azaltılarak jel ya da boncuk şeklinde yapılar oluşturulabilir [77]. Bu yapılar, yara örtüsü, cerrahi ve dental uygulamalar, doku mühendisliği gibi alanlarda da farklı uygulamalar için kullanılabilir [76]. Hearn ve ark. [78], polimetilenkoguanidin kaplı aljinat boncuklara üreaz enzim immobilizasyonu gerçekleştirmiştir. Diğer yandan, kalsiyum gibi iki değerlikli iyonların varlığında, çapraz bağlı çözünmeyen bir aljinat ağ yapısı oluşturarak hafif jelleşme göstermesinden dolayı, enjekte edilebilir hücre dağıtım aracı ve hücre immobilizasyon matrisi olarak kullanılabilir [79].

Yapılan çalışmalarda, kıkırdak matrisi biyobozunur aljinat polimeri ile değiştirilmiş, sonuçta in vitro olarak kolaylıkla uyum sağladığı ve yapılan hayvan çalışmalarında vezikoöretal reflü tedavisinde kullanılabileceği görülmüştür [80]. Ayrıca, deri dokusu tedavilerinde yara örtüsü olarak kitosan ile aljinatın polielektrolit kompleksi, değişik pH'lardaki kararlılıkları ve kontrollü salım membranı olarak kullanılabilirlerinden dolayı önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Son zamanlarda fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, kitosan-aljinat jeller, mezenkimal kök hücre, kemik morfogenetik protein-2 kompozitlerin yeni kemik oluşumunu teşvik ettiği görülmüştür [81].

2.4.1.3. Biyopolimerlerin Elektroforetik Biriktirilmesi

Doğal polimerler, polielektrolittir ve elektroforez yöntemi ile türleri ayırma ve tanıma amacıyla kullanılmaktadır [7]. Elektroforetik polimerizasyon, farklı metal yüzeyler üzerine polimer filmin biriktirilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. İmplant yüzeyi ile bağ dokusu arasındaki arayüzeyde biyokimyasal etkileşimi sağlamak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar, polimer filmler üzerindeki biyoaktif moleküllerin kovalent bağlanmasına ya da adsorpsiyona dayalı yöntemlerdir. Korozyon direnci ve biyoaktif yüzey sağlamanın yanında, metal kemik implantların polimer kaplanması vaskülarizasyonu (damarlanmayı) artırmaktadır. Metal implantlar revaskülarizasyon için çok az ya da hiç destek göstermediğinden, vasküler endotelial büyüme faktörü gibi biyolojik aktif moleküllerin yakalanması ve serbest bırakılmasıyla, yeni kemik dokusunun vaskülarizasyonuna yardımcı olmak için polimer kaplama yapılmaktadır.

Titanyum gibi metal yüzeylerin, fonksiyonelleştirilmiş polimer filmlerle kaplanması, metal korozyonunu geciktirirken, aynı zamanda osseointegrasyonu da artıran bir etki yapmaktadır. Polimerler, implantların fiziksel ve kimyasal özelliklerini değişmesini sağlayan manipulasyon kolaylığına sahiptir. Diğer bir önemli avantajları ise, kemik-teşvik edici faktörler gibi terapötik ajanların yüklenme ve kontrollü salımı için kullanılabilmesidir. Polimerler proteinleri kolaylıkla adsorbe edebilirler ve böylelikle yüzey kimyalarını değiştirebilirler. Fakat sahip oldukları bu özellikleri, bozulmuş ürünler gibi zararlı bileşiklerin çevre dokulara salımına ve aşınma ve yıpranma eğilimli mekanik özelliklere neden olabilir [82].

2.4.2. Biyoseramikler

Metaller ve metal alaşımlar, ortopedik implantların biyomekanik ihtiyaçlarını karşılamasına rağmen, metalik yüzey ile kemik çevresi arasındaki yüzeyde bağlanma zayıftır. Bu durumda, implant–doku arayüzeyinde bu tür cihazların kullanımında başarısızlık getirmektedir. Kötü arayüzey bağlanması, tam yapışmamış, lifli doku tabakası oluşmasına neden olur. Kemik ile implant arasında oluşan küçük boşluklar, implant – doku arayüzeyinde hareketlenmeye neden olur.

Bu durumda, cihaz yetmezliği oluşur ve implantın gevşemesini engellemek için ek cerrahi işlemlere ihtiyaç duyulabilir [68]. İmplant yüzeyinin biyoseramiklerle kaplanması, bu sorunun aşılmasında önemli basamaklardan biridir. Biyoseramikler, üstün sürtünme direncine sahip, alerjik ve kanserojen olmayan, vücut tarafından kabul edilebilen inorganik malzemelerdir [83].

Seramik kaplama ve gövdelerde nanometre düzeyinde parçacıkların elektroforetik biriktirilmesiyle daha sıkı istiflenmiş, sinterlenme yeteneğine sahip, homojen yapılar elde edilebilir [55]. İnce parçacık elektroforezi, kompozitleri sağlamlaştırmak ve gözenekli substratları seramik parçacıklarla doyurmak amacıyla kullanılabilir [84].

Ti yüzeylerde daha biyouyumlu ve biyoaktif kompozit kaplamalar geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. Ca–P biyoseramikler, kemik ile direkt bağlanabilen biyoaktif malzemelerdir ve yaklaşık 20 yıldır tıpta ve diş hekimliğinde kullanılmaktadır [85]. Yapılan çalışmalarda, ortopedik implantların kemik apozisyonunu geliştirdiği, fibröz dokular yerine, mevcut kemiğe ekstra ince epitaksiyal bağlanma tabakası oluşturduğu görülmüştür [68]. Titanyum implant üzerine uygulanan Ca–P kaplamaların, kemik çoğalmasını teşvik ettiği ve biyolojik fiksasyonu geliştirdiği görülmüştür [86]. Substrat üzerine biriktirilebilen farklı kalsiyum-fosfat kaplamalardan bazıları: asidik kalsiyum fosfat çözeltilerinden elde edilen dikalsiyum fosfat dihidrat, trikalsiyum fosfat (TCP), oktakalsiyum fosfat (OCP) ve hidroksiapatittir [87].

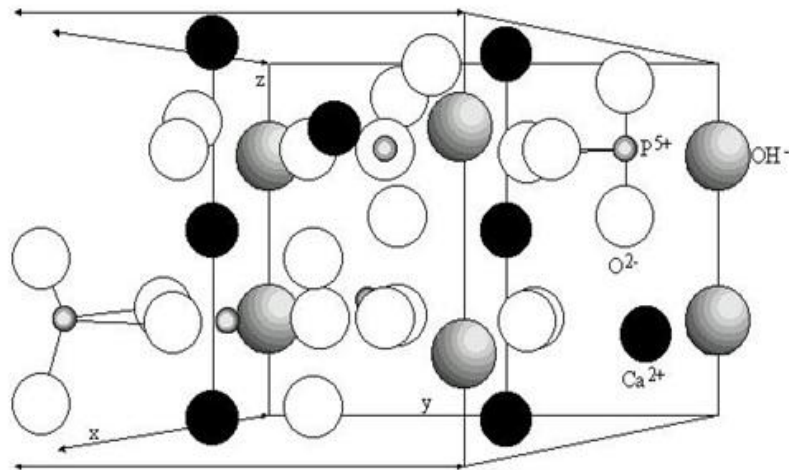
Ca–P seramik sentezinde dikkat edilecek noktalardan birisi, sentezlenen nanoseramikteki Ca/P oranıdır. Ca/P oranı 1.67 den düşük seramik partiküllerde kalsiyum hidroksit, kalsiyum hidrojen fosfat ve HAp gibi farklı fazlar bulunurken Ca/P oranı 1.67 de monofazda HAp nanopartikülleri elde edilmektedir [88]. Hidroksiapatit (HAp), bu oran ile mineralize insan dokusuna en yakın özellik gösteren Ca–P seramiktir [89]. Koster ve ark., seramikteki Ca/P oranı arttıkça, malzemenin rezorbe yeteneğinin arttığını gözlemlemişlerdir.

Çizelge 2.5. Farklı Ca–P seramik fazlarının fiziksel özellikleri [90].

Bileşik	Kimyasal Formülü	Ca/P Oranı	Kristal Yapısı	Yoğunluğu [g.cm ⁻³]	Çözünübilirliği -log(K _s)(25°C)
Dikalsiyum Fosfat Dihidrat	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1	Monoklinik, Ia	2.32	6.59
α - Trikalsiyum Fosfat (α-TCP)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.5	Monoklinik, P2 ₁ /a	2.86	28.9
β - Trikalsiyum Fosfat (β - TCP)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.5	Saf düzgün eşkenar altıgen, R3cH	3.07	25.5
Hidroksiapatit (HAp)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1.67	Düzgün altıgen, P6 ₃ /m ya da monoklinik, P2 ₁ /b	3.16	116.8
Tetrakalsiyum Fosfat	Ca ₄ P ₂ O ₉	2	Monoklinik, P2 ₁	3.05	38 – 44

2.4.2.1. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit, kalsiyum-apatit kristal ailesindedir ([Ca₁₀(PO₄)₆X₂], X=OH, Cl, F ya da Br) ve genel olarak hekzagonal ve monoklinik olmak üzere iki farklı dizilimden oluşur. En sık rastlanan ve kemik oluşumunda da rol alan yapı hekzagonaldır ve bu yapıdaki OH⁻ grupları diğer anyonlarla (F⁻, Cl⁻, CO₃²⁻, HPO₄²⁻) kolaylıkla yer değiştirebilme özelliğine sahiptir. Fakat, termodinamik olarak monoklinik yapı daha karardır [91].



Şekil 2.5. Hekzagonal hidroksiapatit molekül yapısı [83].

Kemik, inorganik hidroksiapatit (HAp) nanokristalleri ve organik kollajen fibrillerin birleştiği ve son derece karmaşık bir mimariye sahip olan doğal inorganik-organik nanokompozit yapıdır [92]. Kimyasal yapısı kemik dokusunun mineral fazı ile benzerlik göstermesi ve yüksek biyouyumluluğu sebebiyle HAp biyomedikal implantlar için önemli bir malzemedir [63] [93]. Diğer kalsiyum-fosfat bileşiklerden farklı olarak biyolojik ortamda termodinamik kararlılığa sahiptir [33]. Kemiklerdeki büyük kavite için dolgu malzemesi olarak kullanılabilir [73]. Gözeneksiz ve ikincil fazları olmayacak biçimde oluşturulmuş HAp seramikler mükemmel yorulma direncine sahiptir. Bunu sağlamak için ise ince ve sinterlenebilir HAp partikülleri üretmek ilk ve en önemli adım sayılabilir [94].

Çizelge 2.6. HAp'nın fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özellikleri [95]

Özellik	Değer
Ca/P oranı	1.67
Young Modülü (GPa)	80 – 110
Elastiklik Modülü (GPa)	114
Baskı Dayanımı (MPa)	400 – 900
Gerilme Dayanımı (MPa)	115 – 200
Kırılma Dayanımı (MPa m ^{1/2})	0.7 – 1.2
Sertlik (HV)	600
Bozunma Sıcaklığı (°C)	>1000
Biyoaktiflik	Yüksek
Biyobozunma	Düşük
Biyouygunluk	Yüksek
Kemik İletkenliği	Yüksek

2.4.2.2. Biyoseramiklerin Elektroforetik Biriktirilmesi

Elektro-kaplama tekniği, hızlı ve etkili bir yöntem olması sebebiyle, metalik malzemeler üzerine apatit biriktirerek, yüzeylerin biyoaktivite ve biyouyumluluğunu artırmak amacıyla kullanılabilir [96]. Zhitomirsky ve Gal-Or [55], çeşitli yüzeyler üzerine EDP yöntemi ile nanoyapılı HAp biriktirmiş ve fiberler üzerinde yaptıkları çalışmalarla, bu metot ile kompleks yapılar üzerine homojen bir kaplama oluşturulabileceğini ortaya atmışlardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise, Wei ve ark. [97], nanopartiküler ikili kaplama yaklaşımıyla metal yüzeyler üzerinde elektroforetik olarak HAp biriktirmiş, Hamagami ve ark. [98], titanyum yüzeyleri makroyapılı apatit ile kaplamıştır.

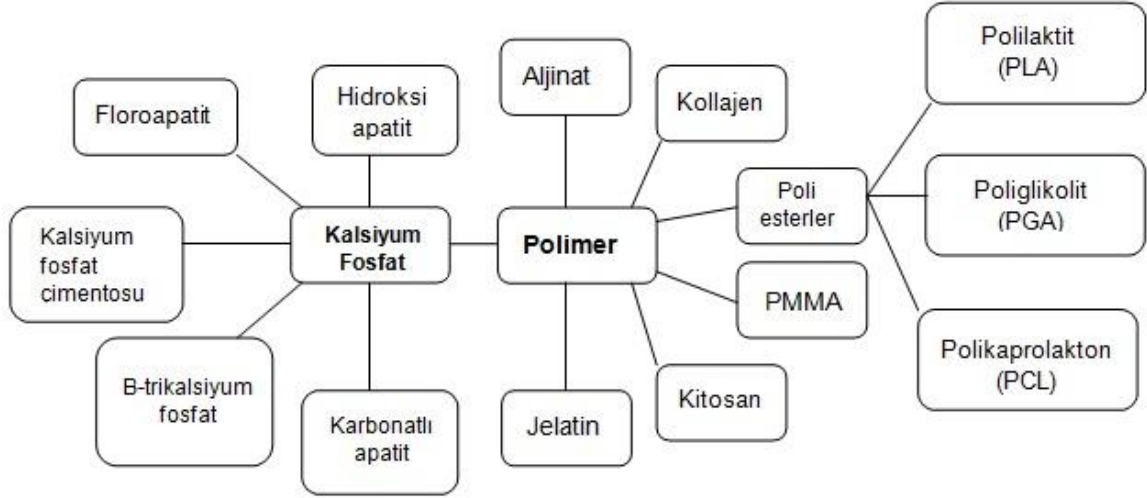
Dulgar ve ark. [99], mikro ve nano boyutlu seramik yüzey topografisinin insan mezenkimal kök hücrelerinin (HMSCs) osteojenik farklılaşmasında önemli bir rol oynadığını görmüşlerdir.

2.4.3. Polimer – Seramik Kompozit Kaplamalar

Son yıllarda, organik-inorganik hibrit nanomalzemeler, ilginç özellikleri sayesinde sensör, kataliz, çevresel temizlik, nano-aygıtlar ve doku mühendisliği gibi farklı alanlarda uygulanabilir olması nedeniyle ilgi çekici hale gelmiştir. Hibrit kompozitler, organik ve inorganik özelliklerinden ödün vermeksizin, malzemeye ayrı ayrı bu bileşiklerin sahip olduğu biyouyumluluk ve mekanik özelliklerden çok daha üstün özellikler kazandırmaktadır [100].

Ortopedik alanda kemik implantları için farklı metalik malzemeler kullanılabilir. Fakat bu malzemeler yüksek elastik modülünden dolayı gerilme-koruma (stress-shielding) problemine neden olabilmektedir. Seramik implantın kemiğe yerleştirilmesi ile kemik problemlerinin bu şekilde aşılmasına rağmen, vücut içerisinde biyolojik olarak bozunmaması, düşük elastikiyeti ve yüksek kırılma dayanımından dolayı sınırlı işlenebilirliği seramik implantlara dezavantaj oluşturmaktadır [101]. Bu sorunu aşmakta ise biyopolimerler üstün özelliğe sahiptir. Biyopolimerler seramik ve metallerin aksine kemik içerisinde rijit yapıdadır. Ayrıca çekme dayanımı ve elastik modülü kompozit kaplamalar için bir avantaj oluşturmaktadır [2].

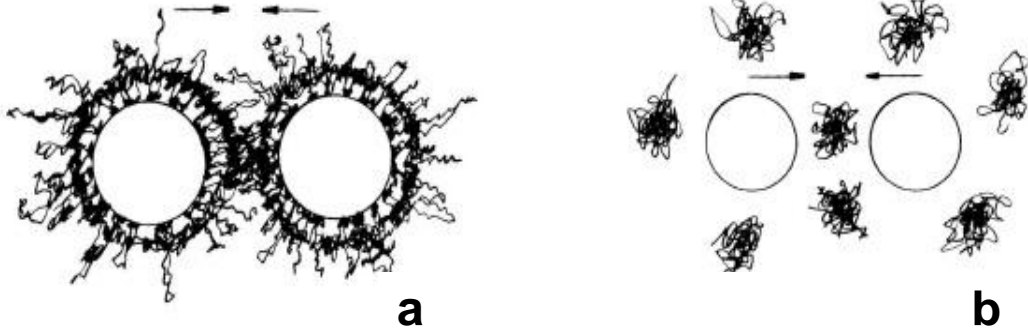
İki farklı fazdaki malzemenin bu şekilde oluşturduğu organik – inorganik kompozitler ortopedik implant uygulamalarında giderek artan kullanım alanına sahip olmuştur. Yapısal esneklik, kolay işlenebilirlik, yüksek mekanik ve termal kararlılık, seramik – polimer kompozitler için benzersiz özelliklerden bazılarıdır. Ayrıca, kemik içine yerleştirilen implantın ıslanabilirliği, çevre hücreler ile uyumlu hale gelmesi açısından önemlidir. Bu sebeple, polimer, su emme kabiliyetini artırmak için, inorganik nanoparçacıklarla doldurularak modifiye edilebilmektedir [102].



Şekil 2.6. Biyomedikal alanda kullanılabilen olası kalsiyum–fosfat ve polimer kombinasyonları [101]

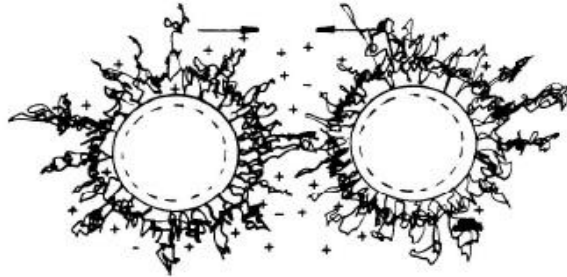
Ca-P biyoseramikler kitosan, lityum iyonu, kollajen gibi farklı biyoaktif malzemelerle kompozit oluşturabilir ve bu şekilde biriktirilen kaplamanın biyoaktivitesi artırılabilir [103]. Poli(alfa-hidroksil asit), polietilen gibi polimerlerle HAp kompozitlerini içeren uygulamalar mevcuttur. Böyle uygulamalarda, HAp partiküllerinin polimer matris içerisine homojen dağılması tercih edilir. Bunu sağlamak için de, kullanılacak toz çok küçük partikül boyutlu ve sınırlı parçacık boyut dağılımına sahip olmalı, ayrıca sert aglomerlar içermemelidir [94]. Fakat HAp nanoparçacıkları ile polimer matrisi arasındaki yetersiz yapışma uygulama açısından başarısızlık getirir. Ayrıca, polimer matris içinde homojen olarak dağılmamış nanoparçacıklar yığılmalara neden olabilir.

Polimer–seramik kompozitlerin elektroforetik biriktirilmesinde, süspansiyon kararlılığı önemli bir parametredir [55]. Bu kararlılık kinetik ve termodinamik olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir. Kinetik kararlılık, sıvı dispersiyon bir ortamda, iyonik grupların, yüklü koloidal yüzeylere adsorbe olmasıyla gerçekleşen elektrostatik stabilizasyon ile sağlanabilir. Elektro-nötraliteyi korumak için, eşit sayıda zıt yükler birbirlerine çekilerek nötr çift katmanlar oluştururlar. Seyreltik sistemlerde etkisini gösteren elektrostatik kuvvetler, genellikle daha güçlüdür ve yüksek etki alanına sahiptir. Termodinamik kararlılık ise, polimerik kararlılık da denilebilen, parçacık yüzeyine makromoleküllerin takılmasıyla elde edilebilen sterik stabilizasyon ya da dispersiyondaki serbest polimerlerin azalma (depletion) kararlılığı ile sağlanabilmektedir.



Şekil 2.7. Kolloidal sistemlerde sağlanan polimerik kararlılık çeşitleri (a) sterik kararlılık, (b) bitme kararlılığı [104]

Bir kolloidal çözeltide elektrosterik stabilizasyon, elektrostatik ve polimerik kararlılığın aynı anda sağlanması sonucu oluşmaktadır [104]



Şekil 2.8. Yüksüz parçacıklara polielektrolit tutturulması ile oluşan elektrosterik stabilizasyon [104]

2.4.3.1. Aljinat – HAp Kompozit Kaplamalar

Literatürde, değişik metotlarla oluşturulmuş Alg/HAp kompozit yapı iskeleleri [105] [106] [107] [108], ve titanyum yüzey üzerine biriktirilmiş kaplamalar [93] [109] mevcuttur. Maruyama ve ark. [106], HAp partikülleri içeren sodyum aljinat çözeltisinin, herhangi bir olumsuz reaksiyon vermeden, implant ile kortikal kemik arasındaki boşlukları kapatan iyi bir osseo-iletken olduğunu gözlemlemişlerdir. Lin ve Yeh [105], osteoblastik hücre tutunmasını artıran, önemli derecede mekanik özelliklere sahip Alg/HAp kompozit malzeme elde etmişlerdir. Sıçan osteosarkom hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda, saf aljinat iskeleye oranla Alg/HAp kompozit iskelelerde çok daha fazla hücre yapışması gözlemlemişlerdir. Cheong ve ark [109], sodyum aljinat çözeltisi içerisine dağıtılmış hidroksiapatit ile elektroforetik biriktirme metodu kullanarak kompozit kaplama yapmışlardır. Doğal kemikte polisakkaritler, organik ve inorganik fazlar arasında bir arayüzey oluşturmaktadır. Ayrıca kullanılan aljinat elektrosterik stabilizasyonu sağlarken aynı zamanda seramik malzemeye yük kazandırmaktadır. Bu sayede elektroforetik olarak hareket ve kaplama gerçekleştirilmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Yapılan çalışmalarda Titanyum metali (%99,7; Strem Chemicals) anot ve Platin tel örgüsü (%99,9; 0,1mm kalınlık; Alfa Aesar) katot olarak kullanılmıştır. Titanyumun işlem öncesi hazırlanma sürecinde, Etanol (C₂H₅OH; Merck), Hidroflorik Asit (HF; %40 saflık, Merck) ve Nitrik asit (HNO₃; Merck) ile çalışılmıştır. Anodizasyon işlemi için; Etilen glikol (EG; Merck), Amonyum florür (NH₄F; Sigma Aldrich) kimyasallarından faydalanılmıştır. Elektroforetik biriktirme işlemi için Sodyum aljinat (Sigma Aldrich) ve Hidroksiapatit (sentezlenmiş) biyomalzemeleri kullanılmıştır.

Hidroksiapatit sentezlemek amacıyla kullanılan bileşikler; Kalsiyum nitrat (Ca(NO₃)₂.4H₂O ; %99, ZAG), Fosforik asit (H₃PO₄; %85; Merck) ve Amonyum hidroksit (NH₄OH; %25; JT Baker)'tir.

Hücre kültürü çalışması için; insan osteosarkoma hücre hattı (Saos-2; Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Sitotoksikite testinde kullanılmak üzere Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle' Medium) besiyeri, Fetal Sığır Serum (FCS) ve Dimetilsülfoksit (DMSO; İsrail) Biological Industries ve Tetrazolium Tuzu (MTT ; ABD) Serva firmalarından temin edilmiştir. Hücre kültür çalışması, kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plakalarda (Corning, ABD) yapılmıştır. Büret metodu ile yapılan toplam protein tayininde kullanılan Bakır sülfat pentahidrat (CuSO₄.5H₂O), Potasyum iyodür (KI), Sodyum hidroksit (NaOH) ve Sodyum potasyum tartarat (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) ile hücre liziz ortamı için kullanılan Triton X-100, Tris ve Magnezyum klorür (MgCl₂) ve ALP reaktifi Sigma Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

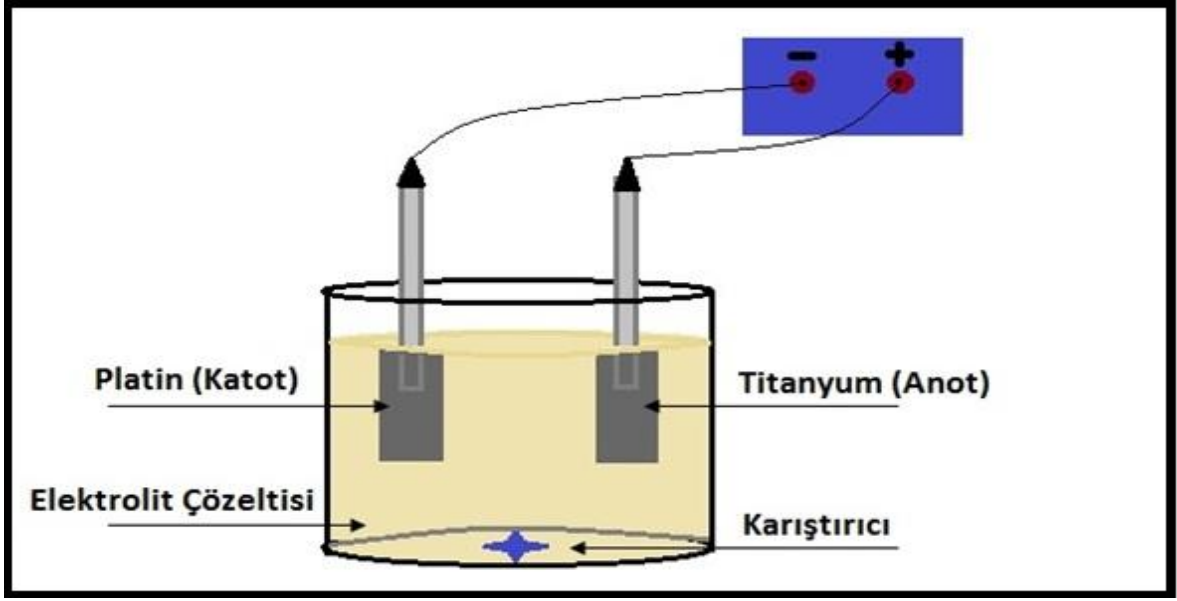
3.2. Titanyum Plakaların Hazırlanması

Ticari olarak alınan saf titanyum metal plakalar, anodizasyon düzeneğine uygun şekilde 2cm x 2cm ebatlarında kesilmiştir. Üzerindeki safsızlıkların giderilmesi amacıyla deterjanlı su içerisinde teflon pens yardımıyla devamlı karıştırılarak 5 dk bekletilmiş ve sonrasında destile su ile sonikatörde 20 dk bekletilerek yıkanmıştır.

Yüzey üzerinde oluşabilecek kirliliğin maksimum oranda ortadan kaldırılması amacıyla titanyum plakalar %70'lik etil alkol çözeltisi içerisinde ve sonikatörde 20 dk bekletildikten sonra tekrar destile su ile yıkanarak kurutulmuştur. Temizleme işleminin ardından, titanyum plakaların üzerindeki kendiliğinden oluşmuş titanyum oksit tabakalarından ve çeşitli kontaminasyonlardan kurtulmak amacıyla yüzey asit çözeltisiyle aşındırılmıştır. Aşındırma işlemi için destile su ile HF–HNO₃ (95:2:3, %v) çözeltisi hazırlanmıştır. Titanyum plakalar bu çözelti içerisinde 2 dk bekletilmiştir. Çözeltiden alınan plakalar, sonikatörde 20 dk destile su ile yıkanmış ve safsızlıklarından tamamen arındırılmıştır. Hazırlanan titanyum plakaların her biri, P180–1200 aralığında zımpara kağıtları ile 20 dk boyunca zımparalanarak yüzeylerinin pürüzlü hale gelmesi sağlanmıştır. Destile su ve etil alkol ile yıkanıp temizlenen zımparalanmış plakalar anodizasyon işlemi için hazır hale getirilmiştir.

3.3. Titanyum Plakaların Anodizasyon İşlemi

Anotlama işlemi için düzeneğin oluşturulması amacıyla, platin, güç kaynağının negatif (-) ucuna ve kesilip temizlenmiş titanyum plakalar pozitif (+) ucuna bağlanmıştır. İşleme başlamadan önce, daha önceki yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulmuş ve elektrolit çözeltisi olarak EG + NH₄F çözeltisi kullanılması uygun görülmüştür. 1.13 g NH₄F, 2 ml su içerisinde çözülerek, etilen glikol çözeltisi ile 200 ml'ye tamamlanmış ve elektrolit çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu iyonik elektrolit çözeltisi içerisine daldırılan platin katot ve titanyum anot sayesinde anodizasyon devresi tamamlanmıştır. Anodizasyon işleminde, 0–100 V aralığında potansiyel ve 0–5 A aralığında akım uygulama kapasitesine sahip güç kaynağı kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda, 10–30 V potansiyel aralığında, 3 A akım ile çalışılmıştır.

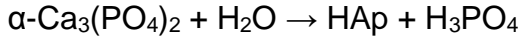


Şekil 3.1. Titanyum plakaların anodizasyon işlemi şematik görünümü

3.4. Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Sentezi

Hidroksiapatit, hayvan kemikleri ya da mercanlar gibi doğal yollardan elde edilebileceği gibi, farklı kimyasal seçimi ve uygun yöntem ile laboratuvar ortamında da sentezlenebilmektedir [2]. Çöktürme, hidrotermal reaksiyonlar, mikroemülsiyon sentezi, mekanokimyasal işlem ve sol-jel gibi farklı yöntemler HAp sentezlemek amacıyla kullanılabilir [110]. Hidroksiapatit sentez reaksiyonlarından bazıları aşağıda verilmiştir:

Hidroliz reaksiyonu;



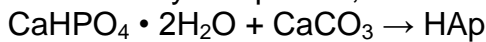
Çöktürme prosesi;



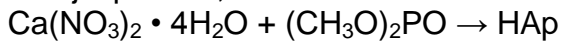
Hidrotermal sentez;



Mekanokimyasal proses;



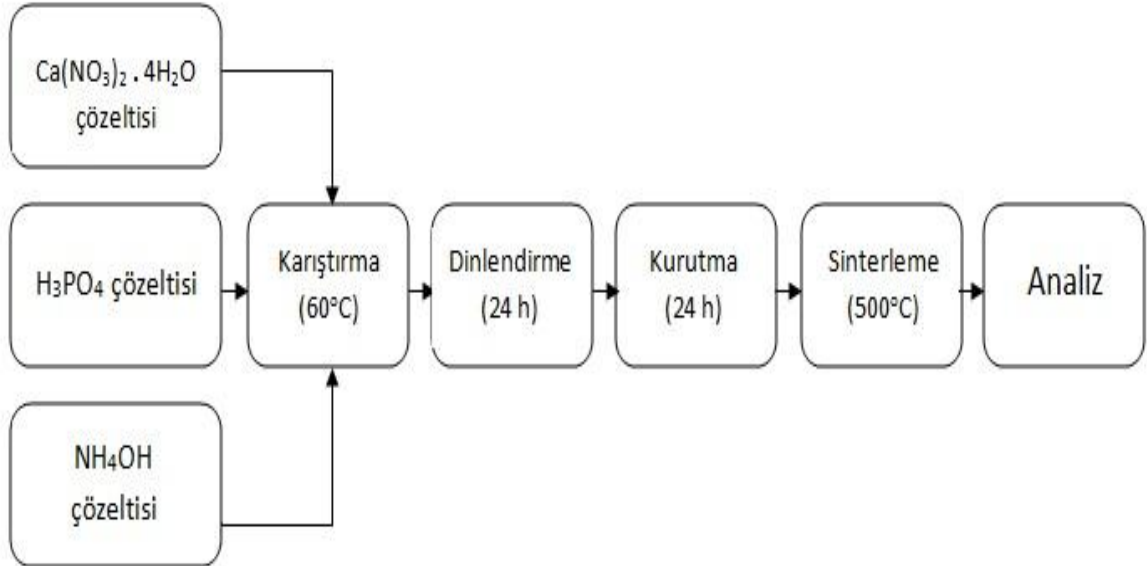
Sol-jel prosesi;



[83]

Bunlar arasında sol–jel metodu kalsiyum ve fosfatlı bileşiklerinin eklenmesi ve sıcaklığın değiştirilmesi ile sentezin moleküler düzeyde kontrol edilebilmesine olanak vermektedir. Ayrıca kimyasal homojeniteyi iyileştirdiği için diğer yöntemlere göre avantajlıdır [111].

Çözelti formundan yola çıkılarak farklı uygulama alanlarında kullanılmak üzere seramik, cam ya da kompozit malzeme üretimini sağlayan sol–jel tekniği ile hidroksiapatit nanokristalleri sentezlenmiştir. Ca/P oranı 1,67 olacak şekilde, sabit sıcaklıkta seyreltik fosforik asit (H_3PO_4) çözeltisi içerisine, kalsiyum nitrat ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) çözeltisi damla damla ilave edilerek ve karıştırılarak nano-boyutta kristaller elde etmek amaçlanmıştır. Aynı zamanda, çözeltiliye amonyum hidroksit (NH_4OH) ilave edilerek pH'ın 10'da sabit tutulması sağlanmıştır. $60^\circ C$ 'de 1 saat karıştırılan çözelti, ağzı kapatılarak 24 saat dinlenmeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda, çözelti etüvde 24 saat kurutularak kristal yapı elde edilmiştir. Safsızlıkların giderilmesi amacıyla, kristaller destile su ve etil alkol çözeltisinde yıkanmıştır. Elde edilen kristaller, $500^\circ C$ 'de sinterlenerek, HAp nanoseramik yapısı oluşturulmuştur.



Şekil 3.2. Sol–jel prosesi ile çöktürülen hidroksiapatit nanokristallerinin hazırlanış şeması

3.5. Sentezlenen HAp Nanopartiküllerinin Analizi

3.5.1. Elemental Analizi

Sentezlenen hidroksiapatit nanopartiküllerinin elemental analizi, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile yapılmıştır. Karakterizasyonda, Apollo X SDD cihazı ile 20 kV enerji düzeyinde çalışılmıştır. Bu yöntem ile, nanokristal yapının içerdiği element oranları analiz edilmiş ve ticari hidroksiapatit molekülü ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.5.2. Boyut Analizi

Nanometre düzeyinde sentezlenmesi amaçlanan hidroksiapatit biyoseramiğinin parçacık boyut dağılımı, MALVERN Zetasizer Nano Series Nano-S ile analiz edilmiştir.

3.5.3. Yapısal Analizi

4000 – 400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında çalışan Fourier dönüşümlü infrared (FTIR; Shimadzu, DR8101, Japonya) spektroskopisi kullanılarak sentezlenen hidroksiapatit nanokristallerinin FTIR analizi yapılmıştır.

3.6. Anotlanmış Titanyum Yüzeylerin Elektroforetik Kaplanması

3.6.1. Titanyum Yüzeylerin Aljinat ile Elektroforetik Kaplanması

Yapılan tez çalışmasında, anotlanmış ve anotlanmamış Ti yüzeyler üzerine aljinatın elektroforetik biriktirilmesi, farklı parametreler değiştirilerek tekrarlanmıştır. Yüzey morfolojileri incelenerek iki yüzeyin karşılaştırılması yapılmıştır. Platin katot ve titanyum anot, üzerinden gerilim geçirmek koşulu ile aljinat elektrolit çözeltisi içerisine daldırılarak elektroforetik biriktirme için düzenek hazırlanmıştır. Anotlanmış titanyum yüzeyler üzerine 3 farklı konsantrasyonda aljinat çözeltisi kullanılarak, 3 farklı gerilimde ve değişen zaman aralığında biriktirme yapılmıştır. Aljinat kaplı titanyum implantların morfolojik görüntülenmesi sonucunda en uygun kaplamanın elde edildiği parametreler kullanılarak işleme devam edilmiştir.

Yapılan deneylerde, 3A sabit akımda, 0–15 dk zaman aralığında biriktirme yapılmış ve en uygun yüzey kalınlığına 1 dk'da ulaşılmıştır. Süre sabit tutulmak koşulu ile, 0,25–0,5–1 gL⁻¹ konsantrasyonlarda aljinat elektrolit çözeltileri ve 10–20–30 V gerilim aralığı kullanılmıştır. Deneyin ikinci kısmında 0,25 gL⁻¹ ve 20V gerilim altında 30–60–90 s zaman aralığında biriktirme tekrar edilmiştir.

3.6.2. Titanyum Yüzeylerin Aljinat/Hidroksiapatit Kompoziti ile Elektroforetik Kaplanması

Anodize titanyum plakaların elektroforetik olarak aljinat / HAp kaplanması amacıyla elektrolitik hücre hazırlanmıştır. Güç kaynağının pozitif kutbuna titanyum metal plakası ve negatif kutbuna platin tel örgüsü temas ettirilerek 3A sabit akım altında ve aljinat / HAp süspansiyon çözeltisi içerisinde titanyum plakalar üzerine elektroforetik kaplama yapılmıştır. Bu çalışma için, sabit derişimli aljinat çözeltisi içerisine farklı miktarlarda hidroksiapatit eklenerek sabit gerilimde farklı zaman aralıklarında kaplamalar yapılmıştır. (0,25–6) gL⁻¹ aralığında hidroksiapatit içeren 0,25 gL⁻¹ aljinat süspansiyonu hazırlanmıştır. Anodize titanyum plakalar üzerine, 30–60–90 s boyunca elektroforetik biriktirme yapılarak, Alg/HAp oranının yüzey morfolojisine ve hücre tutunmasına etkisi incelenmiştir.

3.7. Anotlanmış ve Elektroforetik Biriktirme İşlemi Uygulanmış Titanyum Yüzeylerin İncelenmesi

3.7.1. Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu

Anodize Ti (AnTi), yüzeye aljinat biriktirilmiş anodize titanyum (Alg + AnTi) plakalar ve Alg/HAp kompozit kaplanmış anodize titanyum (Alg/HAp + AnTi) plakaların morfolojik olarak incelenmesi taramalı elektron mikroskobu (SEM; FEI model Quanta 200 FEG) ile yapılmıştır. Çalışma parametreleri, görüntüleme sonucu yüzey morfolojisi incelenerek en uygun şekil esas alınarak seçilmiştir.

3.7.2. Yüzeylerin Elemental Analizi

Anotlanmış ve elektroforetik kaplama yapılmış titanyum implantların elemental analizi, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile yapılmıştır. Apollo X SDD cihazı kullanılarak yapılan analiz ile elde edilen spektrumdaki pikler incelenmiş ve biriken HAp miktarları tayin edilmiştir.

3.7.3. Yüzeylerin Yapısal Analizi

Elde edilen kaplama örneklerinin moleküler bağ karakterizasyonu, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile yapılmıştır. Yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri, fonksiyonel grupları gibi biyokimyasal özellikleri bu yöntemle analiz edilmiştir.

3.7.4. Titanyum Metal Plakaların Yüzey Islanabilirliğinin İncelenmesi

Hazırlanan anodize titanyum plakalar (anTi), elektroforetik olarak aljinat biriktirilmiş anodize titanyum plakalar (anTi+Alg) ve aljinat/hidroksiapatit kaplanmış anodize titanyum plakaların (anTi+Alg/HAp) yüzey hidrofilitelerinin anlaşılabilmesi amacıyla ıslanabilirlikleri incelenmiştir. Bu amaçla, OCA20 (Dataphysics, Almanya) marka cihaz ile su temas açısı (STA) ölçümleri yapılmıştır. Cihazın şırıngasından, örnek titanyum plakalar üzerine damlatılan deiyonize su ile yüzeyin temas ettiği anda cihaz tarafından fotoğrafları çekilip, sıvı-katı buhar arayüz çizgisinde tanjant eğimi hesaplanarak sayısal veriler oluşturulmuştur.

3.8. Hücrelerin Hazırlanması

Yüzeyi anotlanmış, aljinat ve Alg/HAp ile modifiye edilmiş ve yüzeyi modifiye edilmemiş titanyum plakalar üzerinde osteoblast hücreleri kültüre edilmiştir. Bu amaçla, insan osteosarkom hücreleri (Saos-2) kullanılmıştır. Zamana bağlı olarak kültüre edilen hücrelerin titanyum plakalar üzerindeki yapışma ve proliferasyonu incelenmiştir.

Bu amaçla, Çizelge 3.1.'deki koşullar altında hücreler kültüre edilmiştir. İki gün süre ile hücre besiyeri değiştirilmiştir. Tek tabaka halinde bulunan hücreler, hücre kabının zeminini tamamen kapladığında 1/3 oranında pasajlama yapılarak tekrar çoğalmaları için uygun ortam sağlanmıştır. Bu sürede mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her gün mikroskopik inceleme yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Saos-2 hücrelerinin çoğaltılması amacıyla çalışılan kültür ortamı özellikleri

Hücre Türü	Osteosarkom hücreleri (Saos-2)
Kültür Kabı	25cm ³ 'lük polistren hücre kültür flaskı
Kültür Besiyeri	DMEM-F12, %10 Fetal sığır serumu, %1 Penisilin-Streptomisin
Kültür Özelliği	Monolayer
Toplam Hacim	5 ml
pH	7,2 – 7,5
Sıcaklık	37 ± 0,5 °C
İnkübasyon Ortamı	% 5'lik CO ₂ etüvü

3.9. Hücrelerin Çoğalma Oranı Testi

Titanyum implantlar yüzeyleri ile etkileşen osteoblast hücrelerinin çoğalma ve canlılığı, çok yönlü, nicel ve kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi ile ölçülmüştür.

Kolorimetrik testte, renksiz substrat canlı hücre ile temas ettiğinde renkli bir ürün oluşturur fakat ölü hücrelerde ya da doku kültüründe bu renk değişimi gözlenmez. Çeşitli dehidrojenaz enzimlerinin aktivitelerini ölçmekte kullanılmış olan tetrazolyum tuzları, bu amaçla kullanılabilir uygun substratlardır. Tetrazolyum halkası, aktif mitokondride parçalanma reaksiyonu gösterir. Reaksiyon sonucunda oluşan formazan miktarı, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Mosmann ve ark., yaptıkları nitel analiz sonucunda, canlı hücrelerle etkileşen açık sarı renkli tetrazolyum tuzunun renginin koyu maviye döndüğünü görmüşlerdir. Bu değişim, suda çözünmeyen formazan kristallerinin oluşmasından kaynaklanmaktadır. Bu formazan kristalleri, izopropil alkol ve ya farklı organik çözücülerde çözüldükten sonra spektrofotometrik olarak taranmaktadır. Bu amaçla, çok sayıda örneği aynı anda yüksek hassasiyetle ölçebilen ELISA okuyucusu kullanılmaktadır. MTT yönteminde, substrat, ürün ölçümünü etkilemez ayrıca okuma esnasında kaldırma ve yıkama işlemleri olmadığı için daha hızlı okuma sağlanarak örnekler arasındaki farklılıklar minimize edilir [112].

Yapılan tez çalışmasında, modifiye edilmiş ve edilmemiş titanyum plakalar 0,5 cm çapında kesilerek 3 kontrol grubu olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına yerleştirilmiştir. Örnekler, %70'lik etanol çözeltisi ile 1 saat UV ışık altında steril edilmiştir. Taze hazırlanan besiyeri ile birkaç kez yıkanan örneklerin üzerine 2×10^5 hücre/ml konsantrasyonunda 30 µl Saos-2 hücresi ekilmiştir. Hücre ekimi sonrası 1 saat CO₂ etüvünde inkübe edilen örneklerin üzerine 150 µl hücre vasatı eklenmiştir. Çalışma süresince 2 günde bir besiyerleri değiştirilen örnekler 3., 7. ve 14. günlerde MTT testi yapılmıştır. MTT testi öncesi hücre kültür kapları birkaç kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, Ti metal örnekler üzerine 20 µl (5µg/ml) MTT çözeltisi içeren 200 µl taze besiyeri eklenmiştir. 4 saat etüvde inkübe edilen titanyum plakaların üzerine, 200 µl 0,04 M HCl içeren izopropanol eklenmiştir. Çözülen formazan kristalleri 96 kuyucuklu plaklara pipetlenmiş ve 570 nm dalga boyunda ASYS Expert Plus ELISA okuyucu ile absorbans değerleri ölçülerek zamana karşı grafikleri çizilmiştir.

3.10. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Saos-2 hücreleri ile etkileştirilen titanyum örnekler üzerindeki toplam protein miktarı Biüret metodu ile belirlenmiştir. Biüret metodu, alkali koşullar altında peptit bağlarının bakır ile kompleks oluşturması temeline dayanan bir yöntemdir. Protein peptit bağlarında bulunan fonksiyonel gruplar Biüret reaktifi içerisindeki Cu²⁺ ile reaksiyona girerek mavi-mor renkte bir kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin 540 nm'de ölçülen absorbansı ile protein tayini yapılır.

0.75 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.25 g sodyum potasyum tartarat ile 1.25 g potasyum iyodür 100 ml 0,2 M NaOH içerisinde çözüldükten sonra destile su ile 250 ml'ye tamamlanarak Biüret çözeltisi hazırlanmıştır. 250 µl Biuret çözeltisi ile 30 dk etkileştirilen örneklerden alınan 100 µl'lik hacimler ELISA okuyucuda (ASYS, Biochrome Birleşik Krallık) 540 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

3.11. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivite Testi

Alkalen fosfataz (ALP) aktiviteleri hücre proliferasyonlarının da ölçüldüğü günler olan 3., 7., ve 14. 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 MgCl_2) 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.

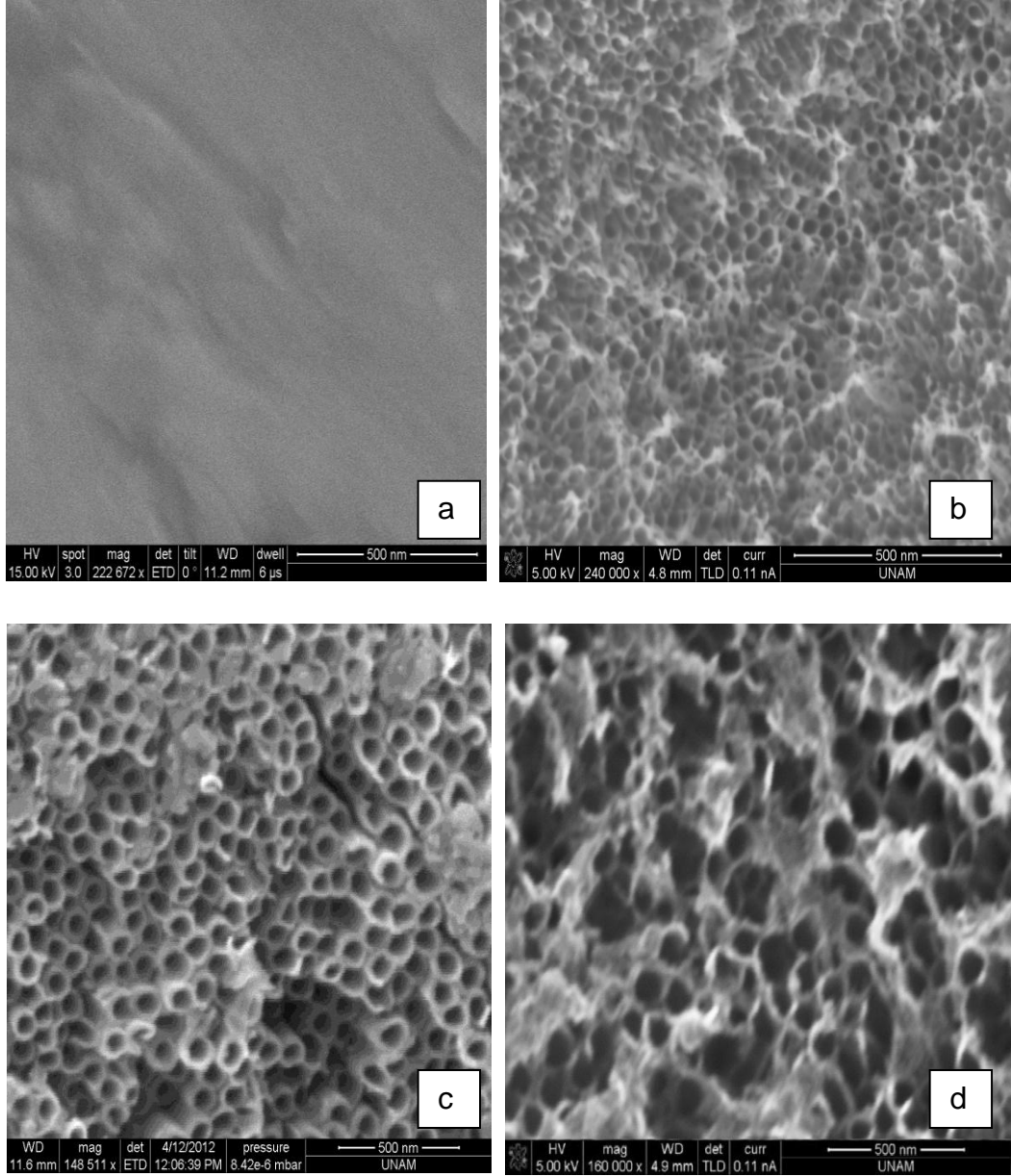
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Titanyum Metal Plakaların Anotlama İşlemi Sonrası Yüzey Karakterizasyonu

4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzeylerin Morfolojik İncelenmesi

Anotlama işleminin titanyum üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, metal plakaların taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri alınmıştır. Literatürde, HF [13], H₃PO₄ [113], HCl [114] ve EG + NH₄F [32] gibi farklı çözeltilerde anodizasyon işlemi yapılabildiği görülmektedir. Bu çalışmalar arasında, daha geniş parametre değişikliklerinde yüzey üzerinde bozulmayan TiO₂ nanotüpleri oluşturulabilen en uygun çözeltinin EG + NH₄F olduğu görülmüştür. Ayrıca, anodizasyon işlemi sırasında kullanılacak çözücünün uygulanan gerilim ile hidroliz olmaması önemlidir. Bu yüzden suya oranla organik çözücülerle çalışılması, hidrolizden kaynaklı gaz çıkışlarını en aza indirerek daha homojen kaplama oluşmasını sağlamaktadır. Bu amaçla, tez kapsamında kullanılmak üzere organik çözücü ile hazırlanmış EG + NH₄F elektrolit çözeltisi seçilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, 20V'dan daha düşük gerilimlerdeki anotlama işleminde yüzey üzerinde amorf yapıda TiO₂ olduğu görülmüştür [115]. Zhitomirsky ve ark. [55], uygulanan gerilim arttıkça yüzey üzerine hızlı bir birikme olduğu ve bunun da yüksek poroziteli kaplamaya neden olduğunu iddia etmişlerdir ve bu yüzden düşük gerilimde çalışmayı uygun görmüşlerdir. Deneysel çalışmada, titanyum metal yüzeyler üzerine 10–20–30 V gerilim altında 20 dk boyunca anodizasyon işlemi uygulanarak gerilimin yüzey morfolojisine etkisi incelenmiştir.

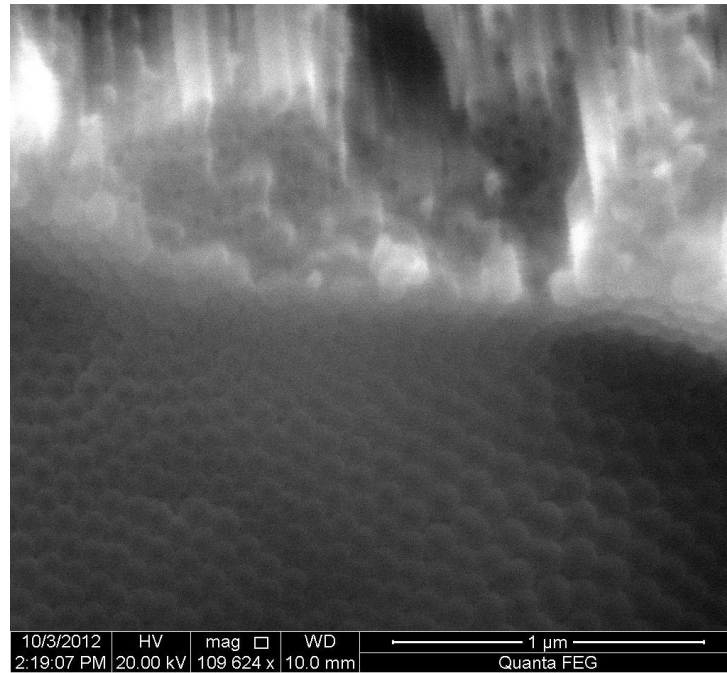


Şekil 4.1. Anotlanmamış Ti (a); 10V (b), 20V (c), 30V (d) gerilim altında anotlanmış Ti metallerinin SEM görüntüleri

Anotlanmamış titanyum yüzeyi ile karşılaştırıldığında, tüm gerilim değerlerinde anotlanan metaller üzerinde, nanoboyutta gözenekler olduğu açıkça görülmektedir. Bu gözenekler, tüm yüzeye yayılmış ve yüzeyden içeri doğru büyüyen tübüler yapılar şeklindedir. Normal şartlarda, titanyum metalin oksijene maruz kalması ile, yüzey üzerinde düz bir oksit tabakası oluşmaktadır. F^- içeren bir elektrolit çözeltisi içerisinde titanyumun oksitlenmesi sırasında, flor iyonları O^{2-} ile yarışmalı hale gelir.

Yüzeyde TiO_2 tabakası oluşurken, diğer taraftan TiF_6^{2-} kompleksi oluşarak yüzey üzerinde çözülme başlar. Düşük iyonik çapa sahip olan flor iyonu, uygulanan gerilim ile TiO_2 tabakası içine kolayca girip ilerleyebilir [116]. Böylelikle titanyum metal yüzey üzerinde içe doğru büyüyen gözenekler meydana gelmektedir.

Sabit süre ile yapılan deneylerde, 10 V gerilim altında, nanotüpler oluşum aşamasında iken, 20 V'da daha düzgün ve sıkı istiflenmiş tübüler yapılar elde edilmiştir. 30 V'da ise, daha dağınık gözeneklere sahip nanotüpler oluşturulmuştur.



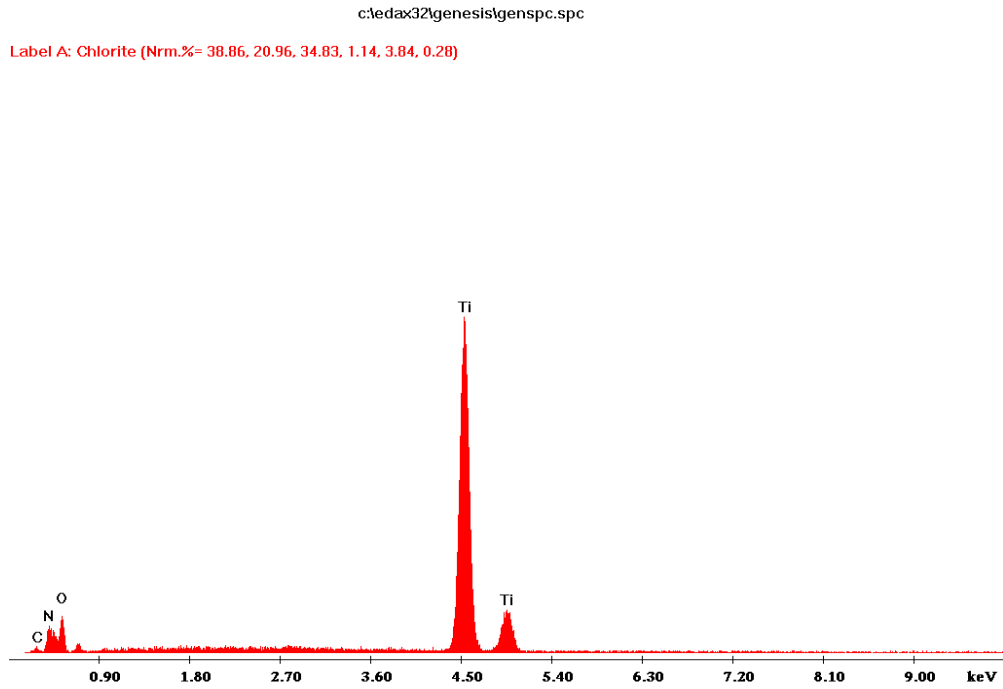
Şekil 4.2. Anotlanmış titanyum metali üzerinde oluşan TiO_2 nanotüplerinin alttan çekilmiş SEM görüntüsü

Anodizasyon işlemi boyunca uygulanan gerilim ile oluşan gözeneklerin uçları ve dipleri arasında iyonik fark meydana gelir, böylelikle gözeneklerin alt kısımları daha kalın ve tübüler şekiller alır. Belirli bir polarizasyon süresinin ardından, oluşan oksit tabakası ile çözünme eşit dereceye ulaşır ve oluşan tüplerin boyu bu süreden sonra sabit kalır. Gong ve ark. [50], yaptıkları çalışmada 20 dk ve 6 saat anotlanan titanyum metalinin aynı kalınlıkta tübüler yapılar oluşturduğunu görmüştür. Bu gözlemler sonucunda, tezin diğer aşamalarında, 20 V gerilim altında 20 dk anotlanmış titanyum metaller ile çalışılmıştır.

4.1.2. Enerji Dağılımlı X-ışınları Spektroskopisi (EDX) ile Titanyum Yüzeyin Elemental Karakterizasyonu

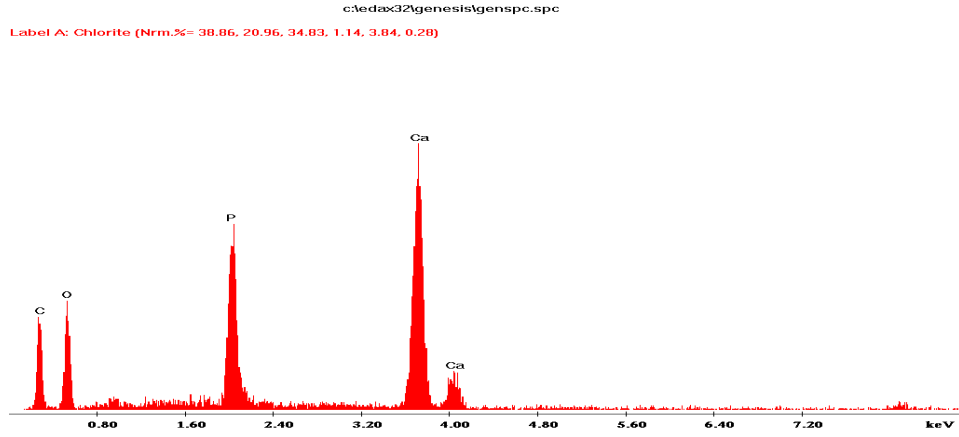
Birincil elektron demetleri aynı zamanda X-ışını emisyonu da yapmaktadır. Bu ışınlar, enerji dağılımı X-ışınları analizi (EDXA) ile, elementleri tanımlamak amacıyla kullanılabilir [117].

Etilen glikol + NH_4F elektrolit çözeltisi içerisinde anotlanmış titanyum metalinin EDX spektroskopisi ile yüzey üzerindeki elementlerin dağılımı şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Analiz sonunda yüzeyde titanyum dışında, oksijen ve azot elementlerinin de bulunduğu görülmüştür. Ayrıca yüzey üzerinde karbon elementine de rastlanmıştır. Bunların, titanyum metalin tam olarak temizlenememesinden kaynaklı organik kirlilikler olduğu düşünülmektedir.

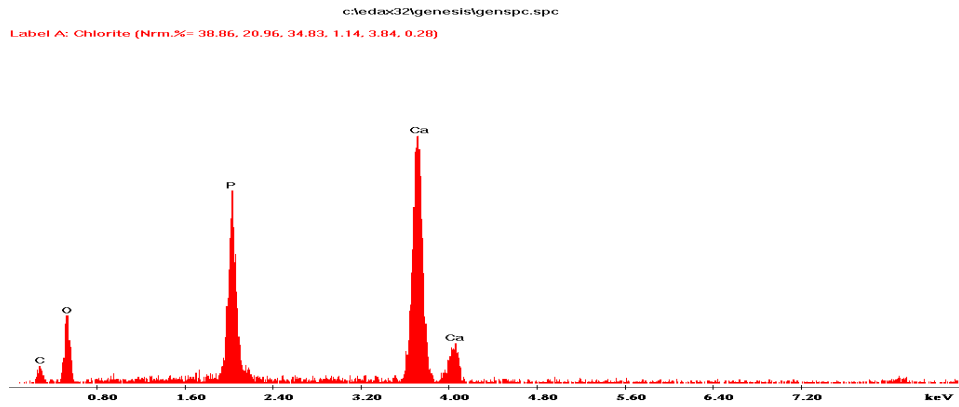


Şekil 4.3. Anotlanmış Ti metalinin EDX spektrumu

4.2. Sentezlenen Hidroksiapatit Nanokristallerinin Elemental Analizi



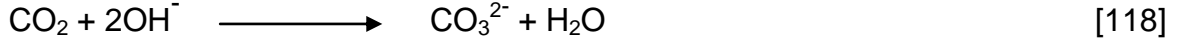
Şekil 4.4. Ticari hidroksiapatit kristallerinin EDX spektrumu



Şekil 4.5. Sentezlenen hidroksiapatit nanokristallerinin EDX spektrumu

Ticari hidroksiapatit kristallerinin tipik EDX spektrumu Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Şekil 4.5.'te verilen EDX spektrumu ise titanyum metal yüzeylerde kullanılmak üzere laboratuvar ortamında sentezlenen hidroksiapatit nanokristallerine aittir. Hidroksiapatitin ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) genel molekül formülünden de bilinen, Ca, P ve O elementlerinin her iki spektrumda da pik verdiği gözlenmiştir. Ticari hidroksiapatit spektrumunda 3.7 ve 4.0 keV'de Ca, 2.0 keV'de P ve 0.8 keV'den daha önce gözlenen O pikleri, sentezlenen HAp partiküllerinde de aynı enerji düzeylerinde pik vermiştir.

Ayrıca, EDX spektrumunda küçük karbon (C) pikleri görülmektedir. Bu piklerin, sentez sırasında meydana gelen karbon kontaminasyonundan ya da hidroksiapatit örgü yapısına giren karbonat iyonlarından gelebileceği düşünülmektedir. Atmosferik CO₂, kristal örgüdeki OH⁻ ile reaksiyona girerek karbonat kirliliğine neden olabilmektedir.



Çizelge 4.1. Ticari hidroksiapatitin EDX spektrumu ile elemental analizi

Elem	Wt%	At%	K-R	Z	A	F
C K	36.62	50.24	0.1011	1.0284	0.2683	1.0004
O K	36.41	37.49	0.0485	1.0112	0.1317	1.0001
P K	9.79	5.21	0.0726	0.9324	0.7915	1.0042
Ca K	17.18	7.06	0.1602	0.9400	0.9919	1.0000
Toplam	100.00	100.00				

Çizelge 4.2. Sentezlenen hidroksiapatit nanokristallerinin EDX spektrumu ile elemental analizi

Elem	Wt%	At%	K-R	Z	A	F
C K	13.28	22.24	0.0273	1.044	0.1972	1.0006
O K	42.00	52.93	0.0538	1.0278	0.1246	1.0001
P K	9.79	5.21	0.0726	0.9494	0.7337	1.0061
Ca K	15.64	10.18	0.1096	0.9494	0.9384	1.0000
Toplam	100.00	100.00				

Yapılan EDX analizi sonucunda elementlerin ağırlık yüzdeleri hesaplanmış ve yaklaşık 1.86 Ca/P oranına sahip hidroksiapatit nanokristalleri sentezlendiği görülmüştür.

4.3. Sentezlenen Hidroksiapatit Nanokristallerinin Boyut Analizi

Sentezlenen hidroksiapatit kristalleri, parçacık boyutunun incelenmesi amacıyla öncelikle etil alkol içerisinde dağıtılmıştır. Zeta-sizer ile alınan ölçümler sonucunda, grafik üzerinde boyut dağılımı oluşturulmuştur. Bu dağılım ile, ortalama 357 nm boyutuna sahip hidroksiapatit parçacıklar elde edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda, nano-boyutta hidroksiapatit sentezlendiği görülmüştür.

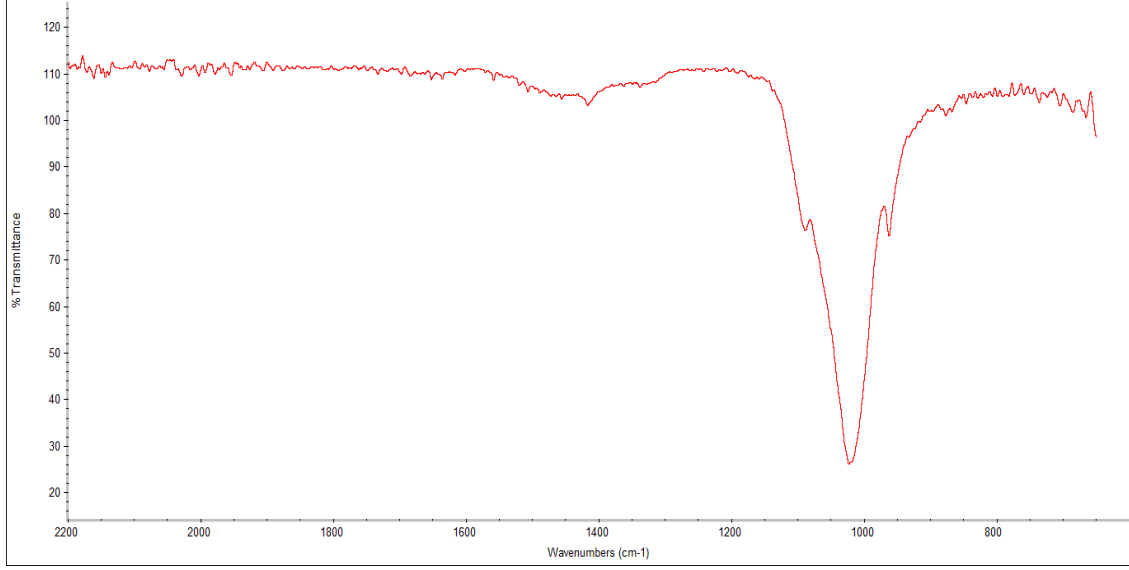
4.4. Sentezlenen Hidroksiapatit Nanokristallerinin FTIR Spektroskopisi İle Yapısal Analizi

Sentezlenen hidroksiapatit tozunun FTIR spektrumu, Çizelge 4.3.'te belirtilen önceki çalışmalar referans alınarak yorumlanmıştır.

Çizelge 4.3. Hidroksiapatit FTIR spektrumu sonucu elde edilen bağ gerilmeleri

	Referanslar	PO ₄ ³⁻ (cm ⁻¹)	CO ₃ ²⁻ (cm ⁻¹)	O-H (cm ⁻¹)
Geetha [119]	Saf	1040	—	3570
	hidroksiapatit	600		632
Rehman [120]	Ticari	1190	1650	
	hidroksiapatit	970	1300	3570
Slosarczyk [121]	Ticari	1036	1400	
	hidroksiapatit	600	870	3570

Spektrumda P–O (gerilme ve eğilme) bandı belirgin biçimde gözlenmiştir. 1100 – 1020 – 950 cm⁻¹ aralığında gözlenen pikler PO₄³⁻ gruplarına ait P–O bağlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca 1410 cm⁻¹ 'da gözlenen dağınık pikler ise CO₃²⁻ gruplarının titreşimleri ile oluşmaktadır. Bu piklerin yapıya giren karbonat iyonlarının kontaminasyonundan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.6. Sol-jel yöntemi ile sentezlenen hidroksiapatit nanokristallerinin FTIR spektrumu

4.5. Elektroforetik Biriktirme Metodu İle Titanyum Plakalar Üzerine Aljinat Kaplanması Sonucu Oluşan Yüzeylerin Karakterizasyonu

Aljinatin biyomedikal implantlar üzerine elektroforetik biriktirilmesi, implant biyouyumluluğu için önemli modifikasyon yöntemlerinden biridir. Bu çalışmada, sodyum aljinatın (Na-Alg) suda çözülmesiyle elde edilen elektrolit çözeltisindeki serbest Alg^- iyonlarının, uygulanan gerilim ile titanyum anot (+) üzerine kaplanabilirliği incelenmiştir. Bu amaçla, 1g/L^{-1} aljinat elektrolit çözeltisi hazırlanmıştır. Anotlanmamış titanyum yüzeyler üzerine 20 V gerilim ve 3 A akım altında, farklı sürelerde biriktirme yapılarak, zaman ile depozisyon arasındaki ilişki incelenmiştir.

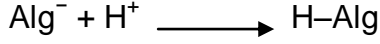
Sodyum aljinat (Na-Alg), sulu çözelti içerisinde çözünerek anyonik Alg^- bölgeleri oluşturur:



Suyun elektrokimyasal ayrışması ile, anot yüzeyinde pH düşüş gösterir:



Aljinat iyonlarındaki COO⁻ iyonlaşma düzeyi pH düştükçe azalma eğilimi gösterir ve asidik ortamda (pH < 3) Alg⁻ iyonlarında jelleşme görülür. Bu sebepten, anot çevresindeki Alg⁻ bölgeleri, titanyum yüzey üzerinde aljinik asit (Alg-H) oluşturmaya başlar ve bu sayede aljinatın elektroforetik olarak yüzeye kaplanması sağlanır.

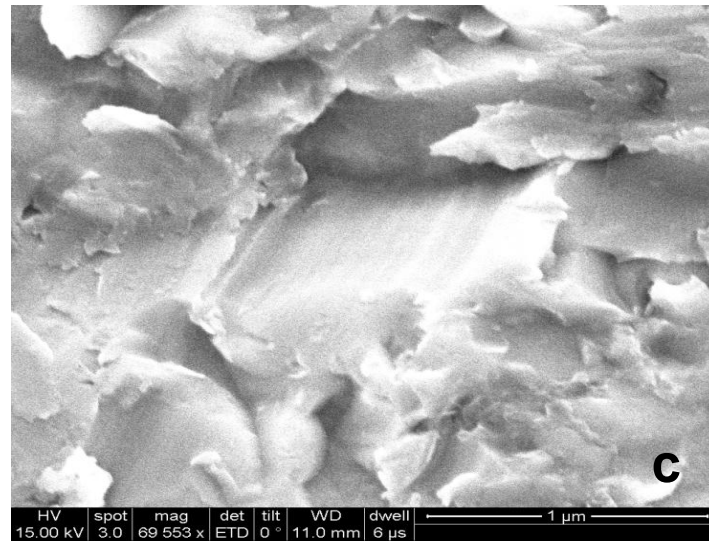
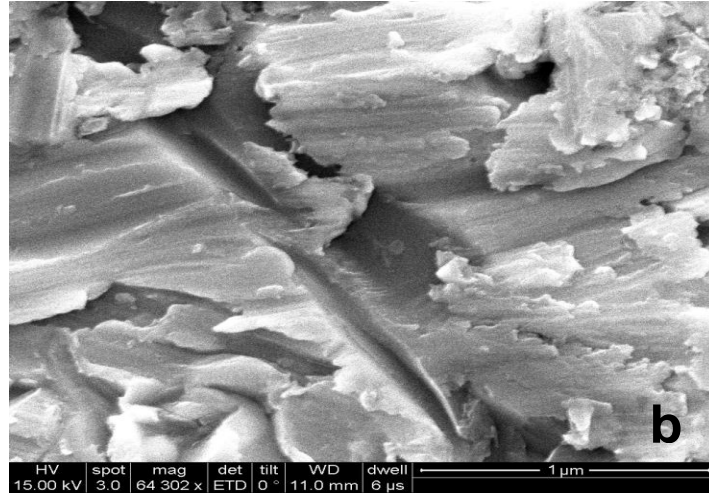
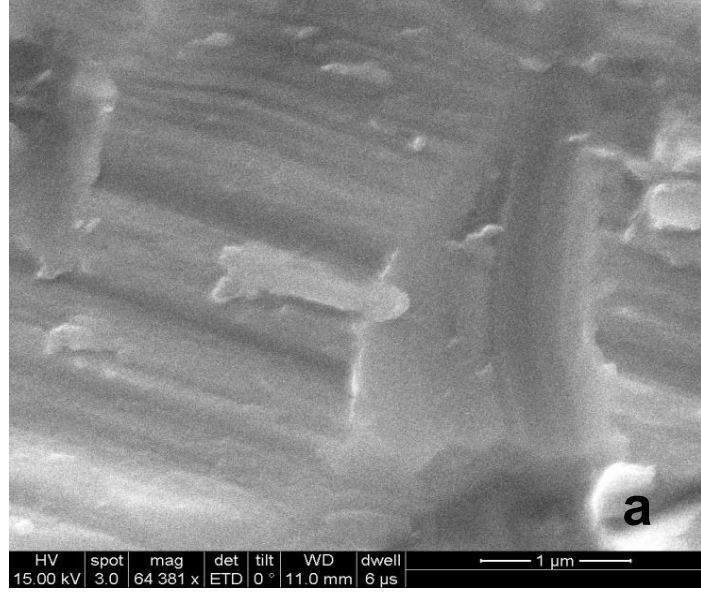


[122]

Elektroforetik biriktirme sonucunda çekilen SEM görüntülerine göre, sabit gerilim altında anotlanmamış Ti metal yüzey üzerine aljinat elektroforetik olarak biriktirilmiştir. Uygulanan anodizasyon işleminin süresi arttıkça, titanyum yüzey üzerindeki aljinat kaplama yoğunluğunun arttığı görülmüştür.

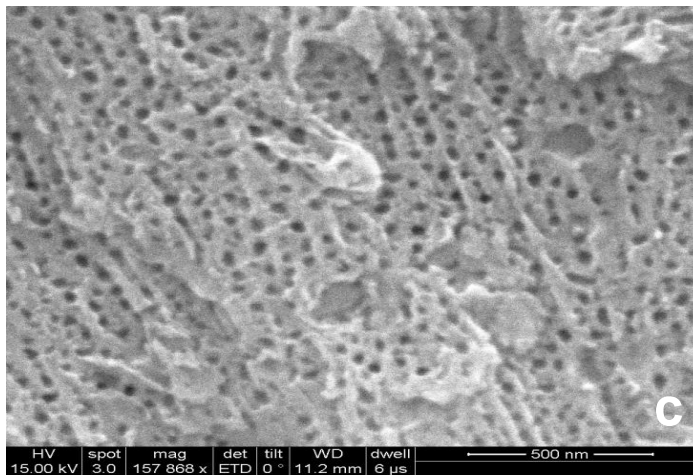
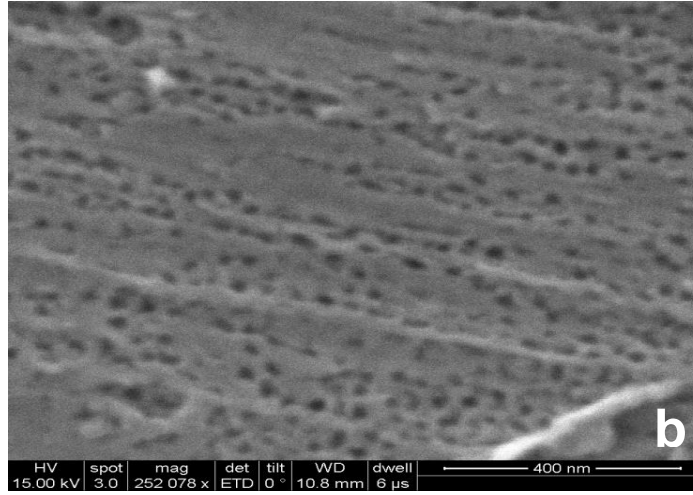
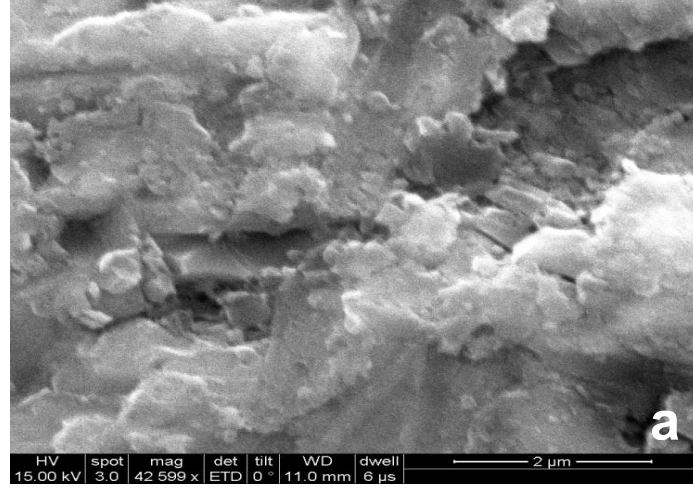
Anotlanmış titanyum ile 0–15 dk aralığında yapılan çalışmalar sonucunda, özellikle 2 dk'dan sonra, yüzeyin tamamen kaplandığı ve alttaki nanotübüler yapıların kaybolduğu görülmüştür. Yüzey morfolojisinin bozulmaması amacı ile kısa süreli biriktirme işlemi yapılması uygun görülmüştür.

Farklı aljinat konsantrasyonlarında yapılan çalışmalar sonucunda tezin diğer aşamalarında düşük konsantrasyona sahip (0.25 gL⁻¹) Alg çözeltisi ile devam edilmiştir. Yüksek yoğunlukta viskoz bir yapıya sahip olan aljinatın elektroforetik hareketinin yavaş olması ve çökmeye eğilim göstermesi plakalar üzerinde homojen olmayan kaplama eğilimi göstermiştir. Ayrıca, düşük yoğunluklu aljinat kaplaması ile, titanyum yüzeyindeki pürüzlülüğün korunmasına yardımcı olunmuştur.



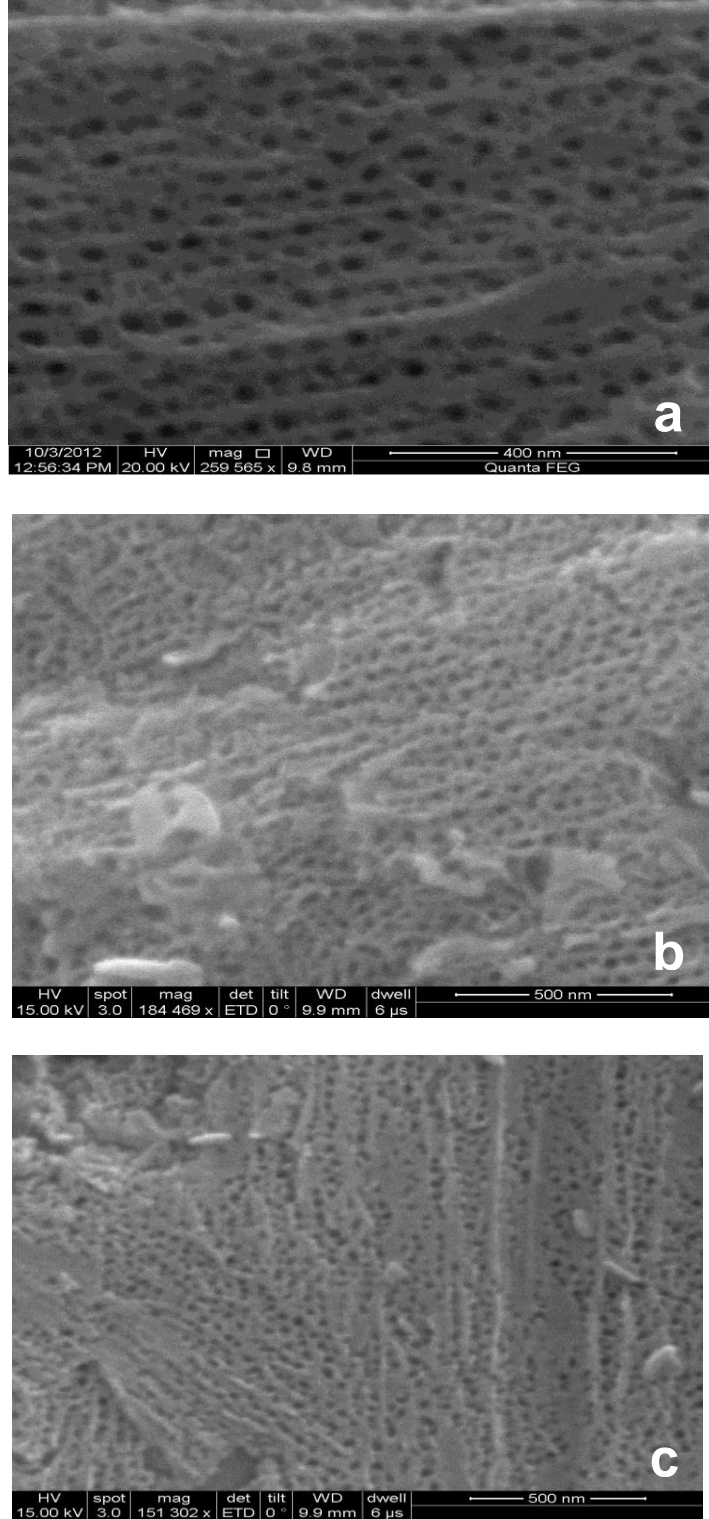
Şekil 4.7. Anotlanmamış Ti metal yüzeylerine aljinatın elektroforetik biriktirilmesi SEM görüntüsü, (a) 30s, (b) 60s, (c) 90s

Uygulanan gerilimin kaplama üzerindeki etkisini incelemek amacıyla sabit süre değerinde farklı gerilimlerde elektroforetik biriktirme yapılmıştır.



Şekil 4.8. Anotlanmış Ti metal yüzeyler üzerine, farklı gerilimlerde 30 s boyunca aljinatın elektroforetik biriktirilmesi ile elde edilen SEM görüntüsü, (a) 10V, (b) 20V, (c) 30V

20 V'luk gerilim altında farklı zaman aralıklarında deneyler tekrarlanarak, zaman ile yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

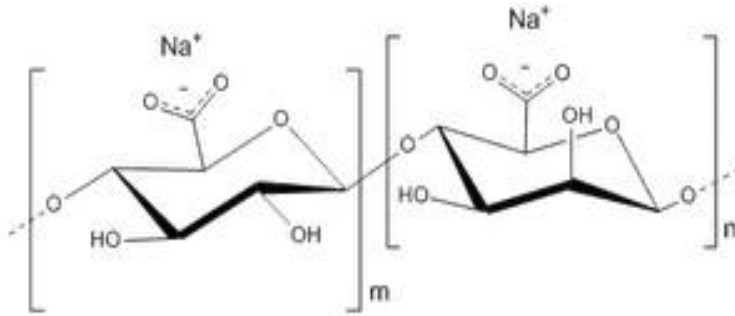


Şekil 4.9. Anotlanmış Ti metal yüzeyler üzerine gerilim 20 V'da sabit tutulmak koşulu ile, farklı sürelerde aljinatin elektroforetik biriktirilmesi, (a) 30s, (b) 60s, (c) 90s

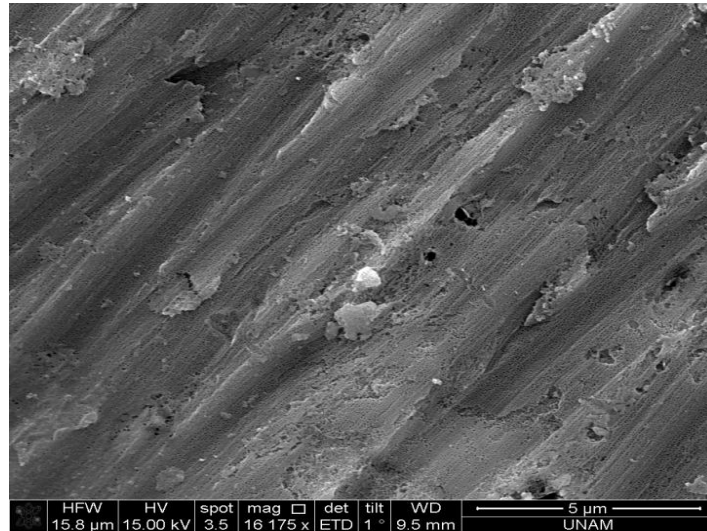
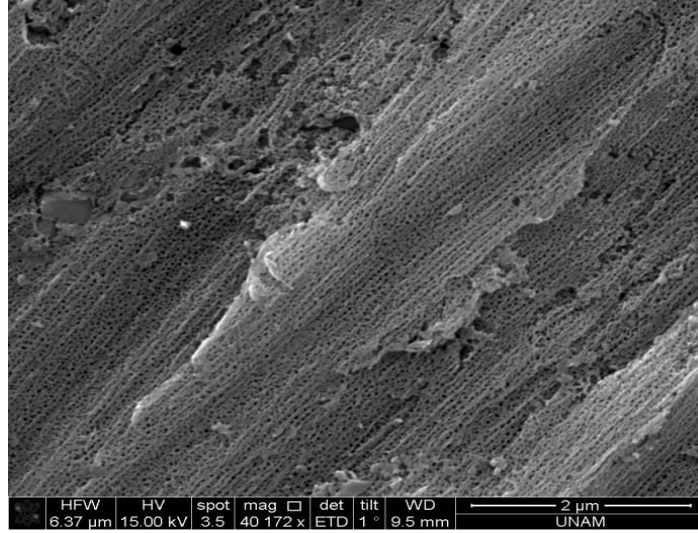
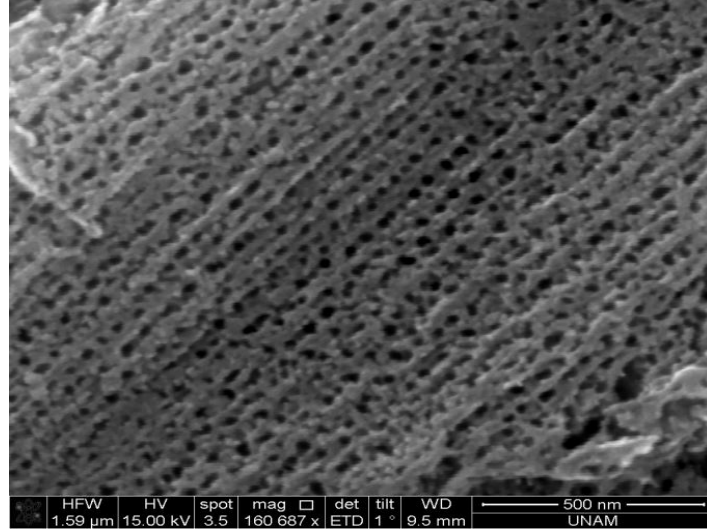
4.6. Aljinat / Hidroksiapatit Kompozit Kaplaması İle Oluşan Titanyum Metal Yüzeylerinin Değerlendirilmesi

Yüksüz ve çözünmeyen bir bileşik olması, hidroksiapatitin elektroforetik olarak taşınmasını zorlaştırmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda varılan ortak görüş, aljinat çözeltisi içinde dağıtılan HAp granüllerinin konvansiyonel mekanik karışımıyla, Ca^{2+} iyonlarının aljinatın karboksil grupları ile çapraz bağ oluşturabileceği yönünde olmuştur [76]. Cheong ve ark. [109], sodyum aljinat çözeltisi içine dağılmış HAp parçacıklarının 1–2 gün çökmeyen, iyi dağılmış süspansiyon oluşturduğunu görmüşlerdir. Bunu, parçacıkların yüzeyindeki Alg^- adsorpsiyonu ile oluşan elektrosterik stabilizasyon olarak açıklamışlardır. Polimer yüzeyindeki karboksil, hidroksil, amin ve ester grupları gibi fonksiyonel gruplar inorganik parçacıkların yüzeyine adsorbe olarak elektrostatik stabilizasyonu sağlamaktadır. Özellikle parçacık yüzeyine adsorplanan karboksil grupları, ana bölgelerle güçlü şekilde etkileşime girebilen sterik stabilizatörlerdir.

Elektroforetik kaplama için kullanılan sodyum aljinat, suda çözünerek aljinat iyonu (Alg^-) oluşturur. Karboksil (COO^-) uç grupları içeren ve bu sebepten anyonik bir polimer olan aljinat, hidroksiapatit parçacıkları ile elektrosterik etkileşime girer ve böylelikle kinetik ve termodinamik kararlılığa sahip bir dispersiyon elde edilebilir. Uygulanan gerilim ile dispersiyonda oluşan Alg/HAp kompozit yapıları, üzerindeki negatif yük yoğunluğu ile anota doğru hareket ederek titanyum yüzey üzerinde birikme sağlanır.



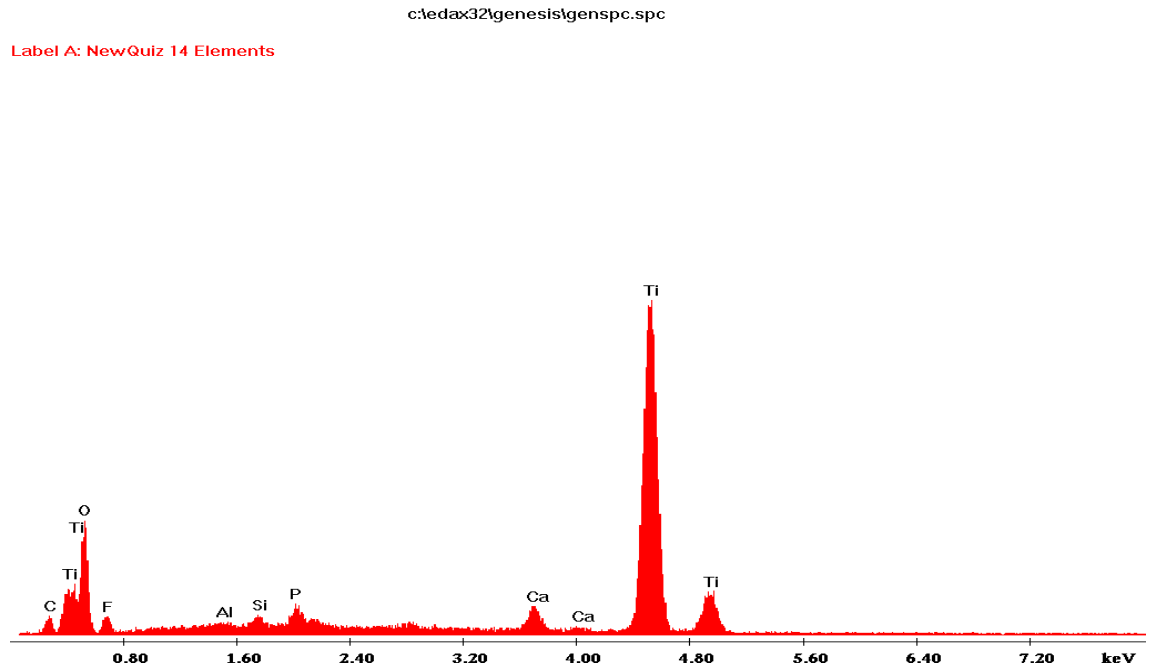
Şekil 4.10. Sodyum aljinatın molekül yapısı



Şekil 4.11. Anotlanmış titanyuma yüzeye Alg/HAp nanokompozitinin biriktirilmesi ile elde edilen yüzeylerin farklı boyutlarda SEM görüntüsü

Cheong ve ark., yaptıkları çalışmalarda çözelti içerisine eklenen HAp derişimi arttıkça, yüzey üzerinde biriken HAp miktarında da artma gözlemişlerdir [109]. Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde de bunu destekleyen sonuçlar elde edilmiştir.

Yüzey üzerine kaplanan Alg/HAp kompoziti EDX ile analiz edilmiştir. Şekil 4.9.'daki spektrumda gözlenen Ca ve P pikleri hidroksiapatit yapısında bulunan kalsiyum ve fosfattan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.12. Yüzeye Alg/HAp kaplanmış titanyum metalinin EDX spektrumu

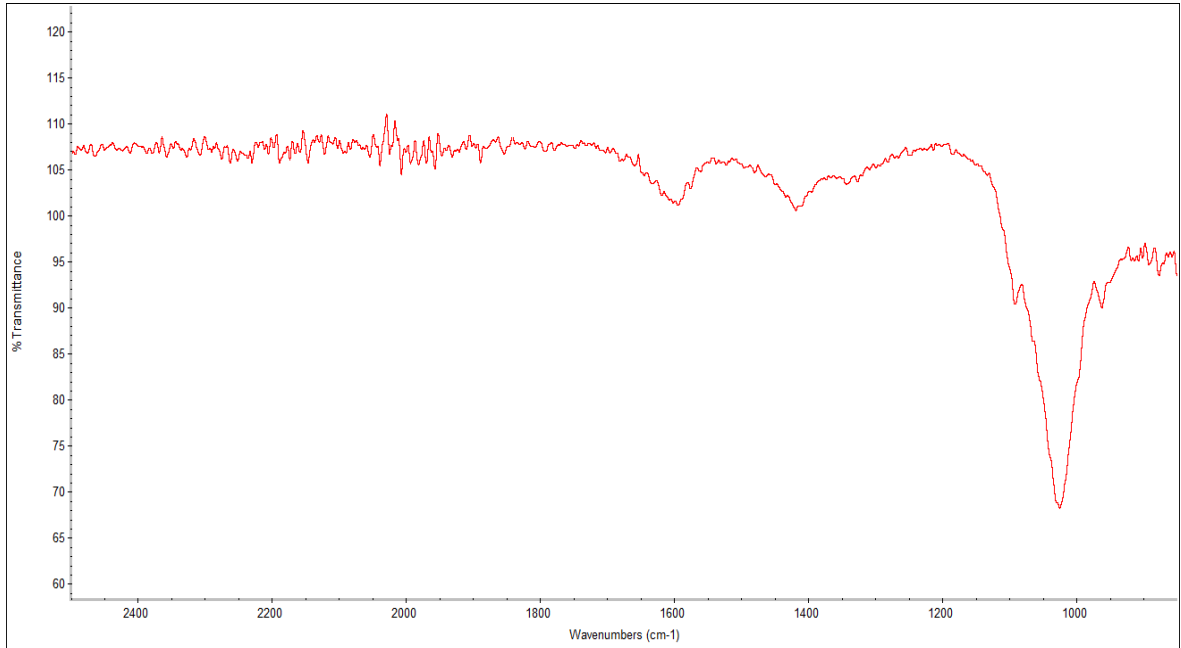
4.7. Elektroforetik Biriktirme Sonrası Yüzeylerin FTIR Spektrumları İle Yapısal Karakterizasyonu

Alg/HAp nanokompozitinin elektroforetik biriktirilmesi ile elde edilen ince film kaplamasının FTIR spektrumu ile yüzey üzerinde biriken kompozitin bağ karakterizasyonu yapılmıştır.

Çizelge 4.4. Saf aljinatın karakteristik bantlarına karşılık gelen dalga sayıları [123]

Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Bağlanma
1712	$\nu(\text{HOCO})$
1593	$\nu(\text{COO})_{\text{asim}}$
1406	$\nu(\text{COO})_{\text{sim}}$
1367 - 1296	$\delta(\text{COH}) + \delta(\text{OCH})$
1169	$\nu(\text{CC}) + \nu(\text{CO})$
1124	$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{COC})$
1082	$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{CCC})$

Saf aljinatın bağ gerilme bantları ve Şekil 4.3.'te belirtilen hidroksiapatite ait FTIR spektrumu referans alınarak elde edilen kompozit kaplamanın FTIR spektrumu yorumlanmıştır.



Şekil 4.13. Alg/HAp kaplanmış titanyum yüzeyinin FTIR spektrumu

Aljinat polisakaritindeki COO⁻ uç gruplarının titreşimine ait simetrik gerilmeler 1420 cm⁻¹, asimetrik gerilmeler ise 1600cm⁻¹ bölgelerinde gözlenmiştir. C–O–H bağlarına ait esnemeler 1350 cm⁻¹ dalga sayısında pik vermiştir. 950–1025–1100 cm⁻¹ aralığında gözlenen gerilmeler hidroksiapatit yapısındaki fosfata (PO₄³⁻) ait karakteristik bandı ifade etmektedir.

4.8. Modifiye Edilmiş Titanyum Metal Plakalarda Su Temas Açısı Ölçümleri ile Yüzey Hidrofilitesinin İncelenmesi

Hücre yapışması ve yayılması, implant mühendisliği için önemli parametrelerdir. Biyomalzeme ve doku arasındaki verimli entegrasyon, implant yüzeyine hücrelerin yapışmasını artıracaktır. Yüzeyin ıslanabilir olması hücresel cevapları etkilemektedir. Ruardy ve ark. [124], insan fibroblast hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda, hidrofobik yüzey özelliklerinin hidrofilik olarak değiştirilmesiyle, hücre yapışma ve yayılmasının arttığını gözlemlemişlerdir. Georgi ve ark. [125], yüzey ıslanabilirliği ile hücre çoğalmasının arttığını görmüşlerdir [126].

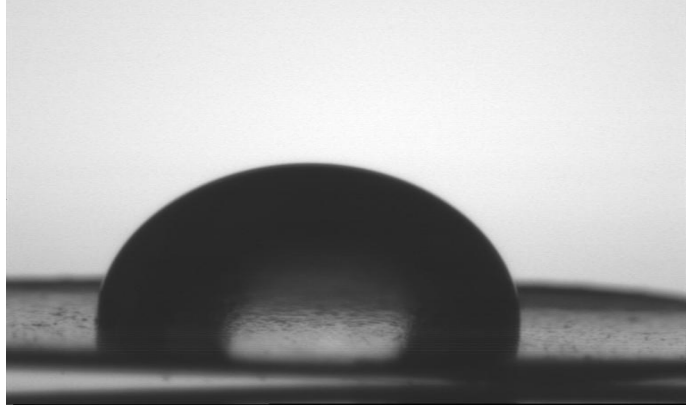
Osteoblast hücreleri ile yapılan diğer çalışmada ise, yüzey hidrofilikliğinin fibronektin gibi Arg–Gly–Asp (RGD) dizileri içeren proteinlerin adsorplanmasını artırdığını ve dolayısıyla osteoblast öncüllerinin implant yüzeyine yapışıp yayılmasını sağladığı gözlenmiştir. Ayrıca ıslanabilir Ti yüzeylerde kalsiyum–fosfat çökürdeklmesi hızla gerçekleşmiştir [127].

Ti implantlar üzerine yapılan farklı modifikasyonların ıslanabilirliğe etkisini incelemek amacıyla su temas açıları ölçülmüştür.

Çizelge 4.5. Modifiye edilmiş titanyum metallerin su temas açısı ölçümleri

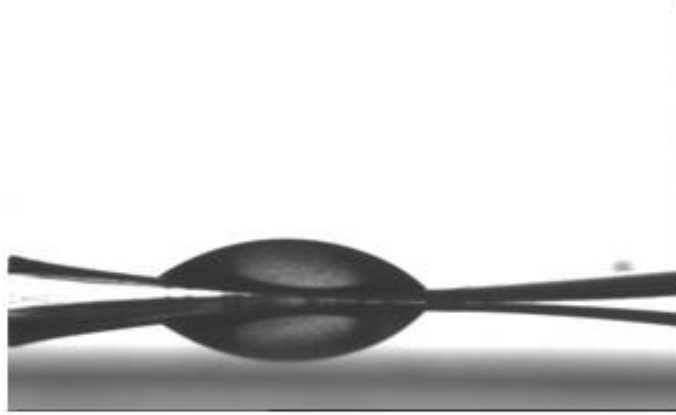
Su Temas Açısı	Anotlanmamış Ti	Anotlanmış Ti (10V)	Anotlanmış Ti (20V)	Anotlanmış Ti (30V)
	88.4 °	58.1 °	50.3 °	45.2 °
Alg-EPD (30s)	39.7 °	<10 °	<10 °	<10 °
Alg-EPD (60s)	38.1 °	<10 °	<10 °	<10 °
Alg-EPD (90s)	21.3 °	<10 °	<10 °	<10 °
Alg/HAp EPD	<10 °	<10 °	<10 °	<10 °

Çizelge 4.5. de görüldüğü gibi, ıslanabilirlik testleri sonucunda, yüzeyi modifiye edilmemiş Ti metalinin su temas açısı ölçümlerinde hidrofobik bir yüzeye sahip olduğu açıkça görülmektedir ($\theta \approx 90^\circ$).



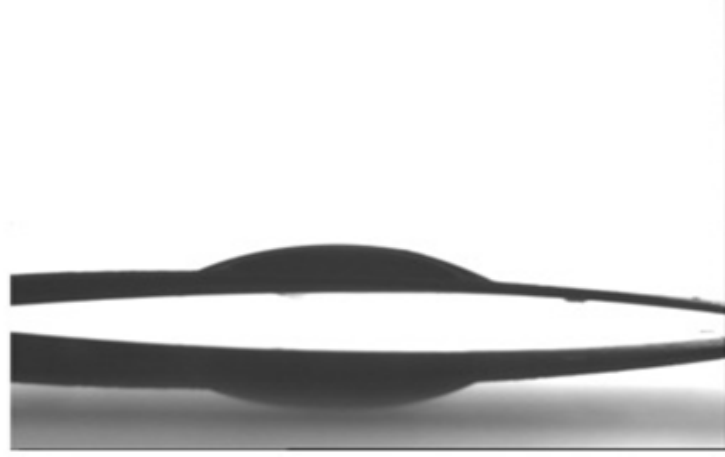
Şekil 4.14. Anotlanmamış Ti metali su temas açısı ölçümlerindeki hidrofobik yüzey görünümü

Titanyum metal yüzeyinin anodik oksidasyonu ile yüzey hidrofilitesi arasında bir ilişki olduğu görülmektedir. İşlem süresi sabit tutulmak suretiyle yapılan testlerde, uygulanan gerilim arttıkça, yüzey ıslanabilirliği artış göstermiştir ($\theta = \sim 45^\circ - 60^\circ$).



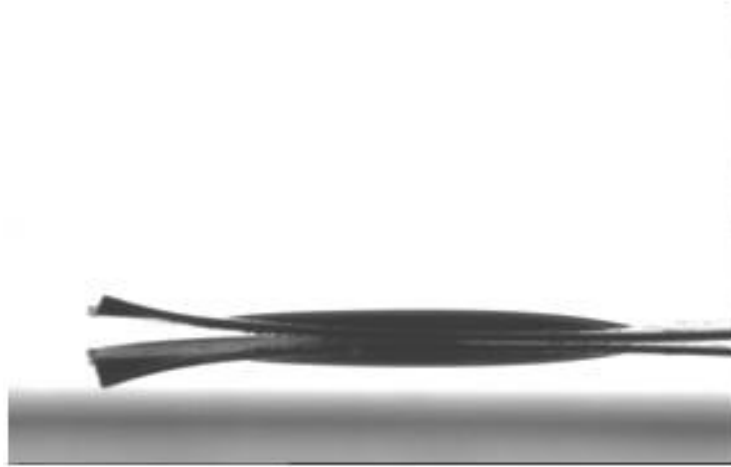
Şekil 4.15. Anotlanmış Ti metali su temas açısı ölçümlerindeki kısmen hidrofobik yüzey görünümü

Anotlanmamış yüzeylerdeki aljinat biyopolimerinin deposyonu yüzey ıslanabilirliğini değiştirmiştir. Yüzeyin hidrofilitesi, elektroforetik deposyon süresi ile doğru orantılıdır. Deposyon süresi arttıkça, yüzeyde biriken aljinat yoğunluğu artmakta ve ıslanabilirlik de paralel olarak ciddi bir artış göstermektedir ($\theta \approx 20^\circ - 40^\circ$).



Şekil 4.16. Anotlanmamış Ti metali üzerine biriktirilen aljinat su temas açısı ölçümlerindeki hidrofilik yüzey görünümü

Anotlanmamış Ti plakalara Alg/HAp kaplanması sonucu yüzey üzerindeki hidrofilité büyük oranda artmıştır. Aynı şekilde, anotlanmış Ti plakalarda da elektroforetik olarak Alg ve Alg/HAp nanokompozitinin birikmesi ile yüzey tamamen hidrofilik duruma gelmiştir ($\theta < 10^\circ$).



Şekil 4.17. Anotlanmış Ti metali üzerine biriktirilen aljinat ve Alg/HAp su temas açısı ölçümlerindeki tamamen ıslanabilir yüzey görünümü

Bu sonuçlara bakılarak, titanyum metali üzerine uygulanan modifikasyon yöntemleri, yüzeyin ıslanabilirliğini artıran bir etki yapmaktadır. Çoklu modifikasyon yöntemleriyle ise yüzeyi tamamen hidrofilik hale getirmek mümkündür.

4.9. *In vitro* Hücre Kültür Test Sonuçları

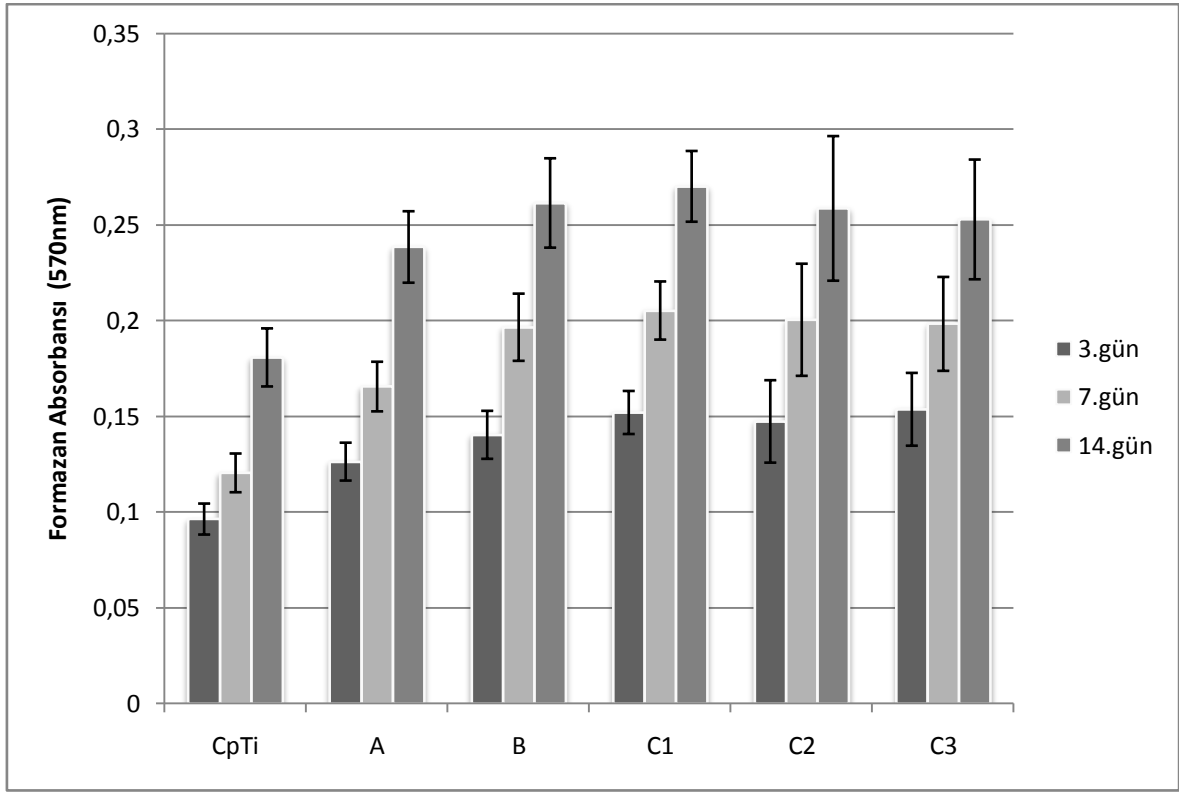
4.9.1. Hücre Canlılığı (MTT testi) Testi

Titanyum implantlar üzerine kültüre edilen hücrelerin yapışma ve çoğalmasının incelenmesi amacıyla CpTi kontrol grubu olmak üzere, Çizelge 4.4.'te gösterildiği gibi A, B ve C (C1, C2, C3) şeklinde örnekler 6 gruba ayrılmıştır. Bu örnek gruplarına MTT testi yapılarak 3., 7., ve 14. günlerde hücre proliferasyonu incelenmiştir.

Çizelge 4.6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan metal implant grupları ve uygulanan işlemler

Grup İsmi	Uygulanan İşlem
CpTi	Titanyum Kontrol Grubu
A	Anodize Ti
B	Alg + An Ti
C1	Alg/HAp + An Ti (2 g/L HAp)
C2	Alg/HAp + An Ti (4 g/L HAp)
C3	Alg/HAp + An Ti (6 g/L HAp)

Hücre ekiminin 3., 7. ve 14. günlerinde uygulanan MTT testi sonunda formazan absorbansı ölçülmüş ve şekil 4.14'te gösterildiği gibi zamana karşı grafiği çizilmiştir.



Şekil 4.18. Titanyum plakalar üzerine kültüre edilen Saos-2 hücrelerinin 3., 7. ve 14. gün MTT testi sonucu 570 nm’de okunan absorbans değerleri

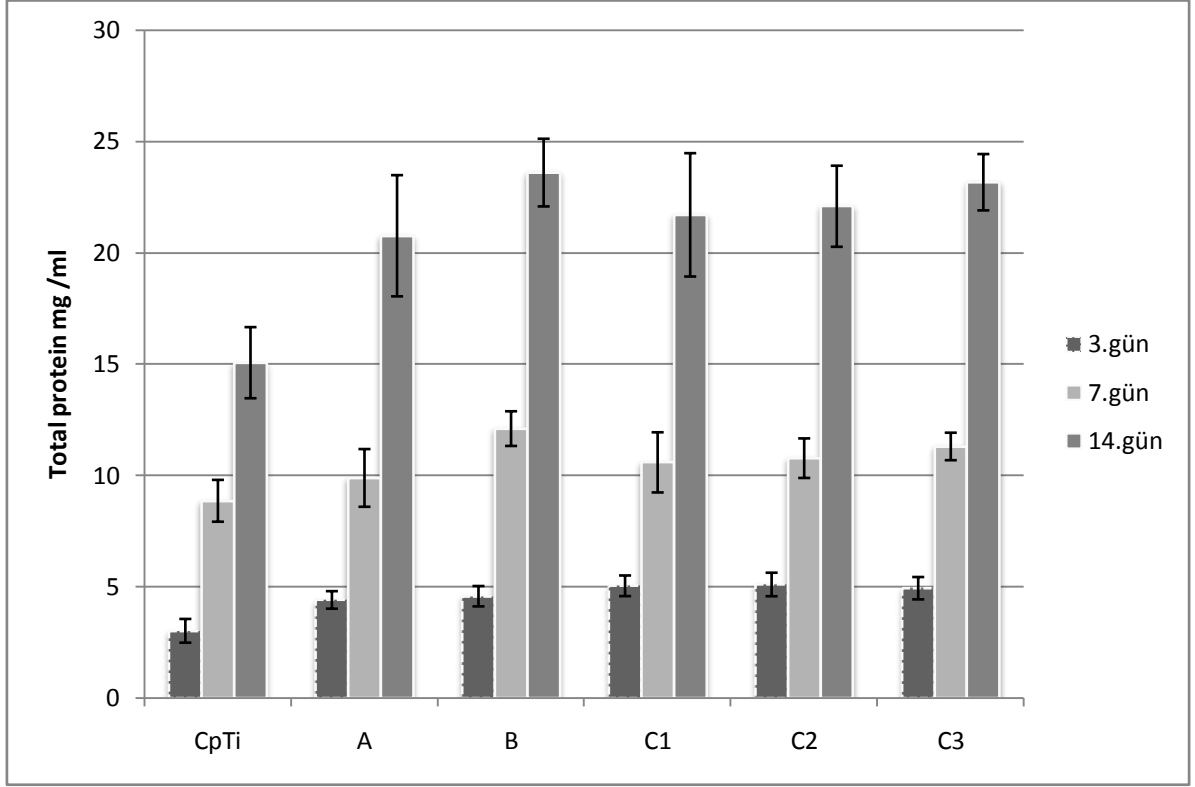
MTT testleri sonucunda kontrol grubuna göre tüm işlem görmüş yüzeylerde başlangıç hücre yapışması ve ilerleyen günlerdeki canlı hücre sayıları daha fazla bulunmuştur. Yüzeyde oluşturulan nanotübüler tabaka ile kontrol grubuna göre canlı hücre sayısında bir artış gözlemlenmiş ve yüzeydeki nanotübüler boşlukların korunmasıyla yapılan elektrodepozisyon kaplaması ile birlikte bu sayının daha da arttığı gözlemlenmiştir. Bango ve ark. [128], PLLA, PDLA ve sodyum aljinat hidrojel kapladıkları titanyum implantlarda, kaplama sonrası yüzey pürüzlülüğünün daha fazla korunduğu, yüksek yoğunluklu ve iyi organize olmuş hücrelerin sodyum aljinat kaplı yüzeylerde gerçekleştiğini görmüşlerdir. Zhao ve ark. [129], elektrokimyasal biriktirme metodu ile HAp biriktirdikleri titanyum nanotellerde özellikle hücre ekiminin 7. gününde hücre sayısında önemli artış olduğunu gözlemlenmişlerdir. Yüzeye HAp kaplanmamış nanotellerle karşılaştırıldığında osteoblast proliferasyonundaki artış anlamlı bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında hazırlanan aljinat ve HAp kaplı yüzeylerdeki hücre proliferasyonu bunu desteklemektedir.

Farklı oranlarda HAp içeren kompozit kaplamalarla hazırlanmış C örnek grubuna bakıldığında, diğer gruplara oranla hücre tutunmasındaki artış belirgindir. Buna rağmen, 3. ve 7. günlerde hücre çoğalma oranı yaklaşık aynı değerlerde iken, 14. günde kompozit malzemedeki HAp oranı arttıkça hücre çoğalmasında düşüş gözlenmiştir.

Çalışmada yüzeylerin hidrofilitikleri ya da başka bir deyişle ıslanabilirlikleri de yapılan işlemler sonucu artmıştır ve hayvan hücreleri ile yapılan benzer konulu çalışmalarda artan ıslanabilirliğin başlangıç hücre tutunmasını pozitif yönde etkilediği rapor edilmiştir [130]. ıslanabilirliğin artmasıyla serumun malzeme tarafından daha çok adsorbe edilmesiyle hücrelerin etkileşeceği proteinlerin yüzeyde daha çok tutunabildiği de bilinmektedir [131]. Tez çalışmasında yapılan ıslanabilirlik testinde anotlanmış titanyum plakaların su temas açısının CpTi plakalara göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu da implantta yapılan modifikasyonunun yüzey ıslanabilirliğini artırdığını göstermektedir. Modifikasyonun ilerleyen basamaklarında yüzeye elektroforetik biriktirme ile aljinat ve HAp kaplanması yüzeyin tamamen ıslanabilir olmasını sağlamıştır. MTT testi sonucunda, yüzey hidrofilitiği ile hücre yapışmasının arttığı görülmüştür. Kim ve ark. [132], anotlanmış Ti yüzeylerin, işlenmiş yüzeylerden daha hidrofilitik olduğunu ve bu yüzeylere Ca-P biriktirdiklerinde anotlanmış yüzeylerdeki hücre tutunmasının daha fazla arttığını gözlemlemişlerdir. Bu da, tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonucu destekler niteliktedir.

4.9.2. Toplam Hücre İçi Protein Miktarı

Hücreler dinamik birer yapıtaşdır ve örnek yüzeylerine tutunup çoğaldıktan sonra yaşamsal faaliyetlerine sağlıklı bir şekilde devam etmelerinin önemli bir ölçütü sentezledikleri proteinlerin miktarıdır [133].



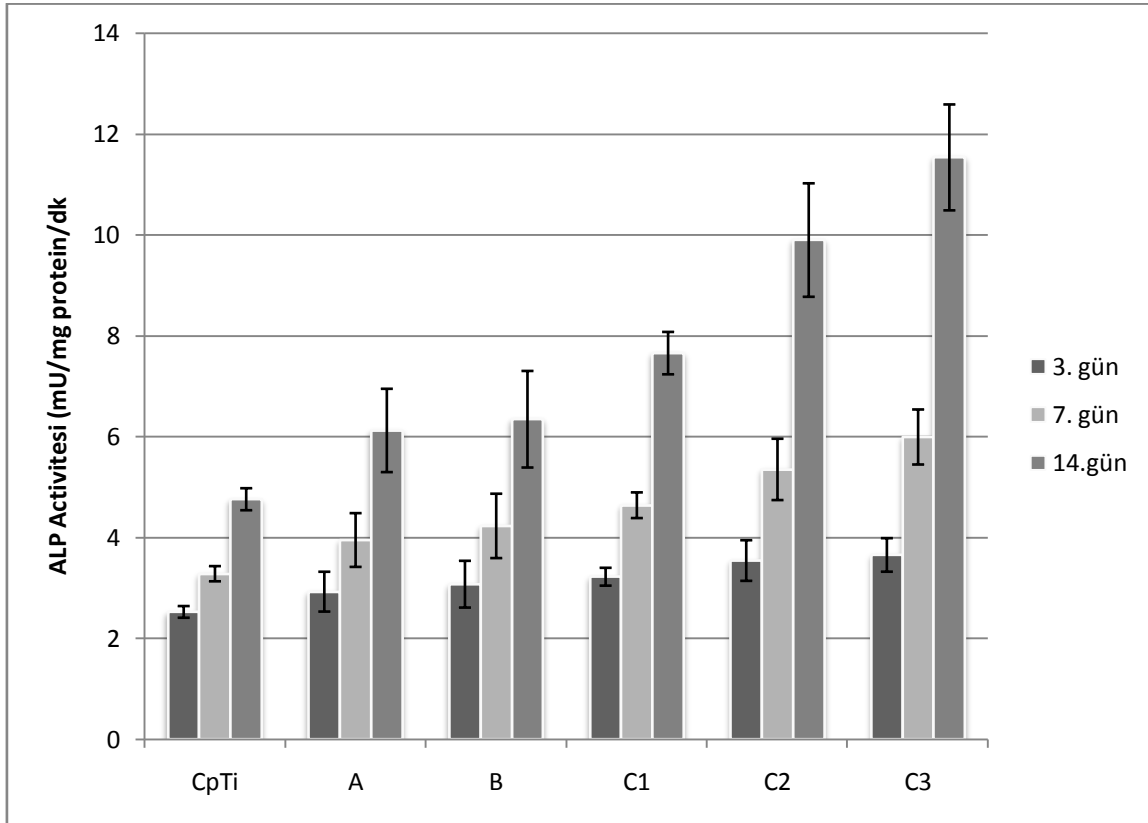
Şekil 4.19. Saos-2 hücreleri ile kültüre edilen titanyum plakalarda 3., 7. ve 14. günlerde ölçülen toplam hücre içi protein miktarı

İşlem görmüş yüzeylerde artan protein sekresyonu da hücrelerin metabolik aktivitelerine artan hücre sayısına paralel olarak devam ettiklerini göstermektedir. Hücre içi toplam protein miktarı başlangıçta örnek grupları arasında belirgin bir fark göstermemektedir; ancak 7. günde işlem görmemiş titanyum grubuna göre belirgin farklar görülmeye başlanmıştır ve 14. günde de bu farklar açılmıştır. Buna göre işlem gören yüzeylerde kültür edilen hücrelerin CpTi grubuna göre metabolik faaliyetlerine daha sağlıklı devam ettikleri sonucuna varabiliriz.

4.10. ALP Aktivitesinin Ölçümü

Hücrelerin sentezledikleri proteinler arasında bulunan alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi osteoblast fonksiyonlarını belirleyici bir parametre olarak kabul görmektedir. Alkalin fosfataz kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta tarafından oluşturulan bir enzimdir. Kemik ALP izoenzimleri osteoblastlar tarafından üretilir. Dolayısıyla kemikteki iskeletsel ALP aktivitesi kemik oluşum hızı ile ilişkilendirilebilir [134].

Alkalin fosfataz enzimleri, fosforik asit monoesterlerinin hidrolizini ve yüksek yoğunlukta alıcısı varlığında transfosforilasyon reaksiyonunu katalizler. Kemik matrisinde bulunan ve spesifik olmayan doku alkalin fosfataz hidroksiapatit kristalizasyonu için gerekli olan inorganik fosfatın üretilmesini sağlar [135].

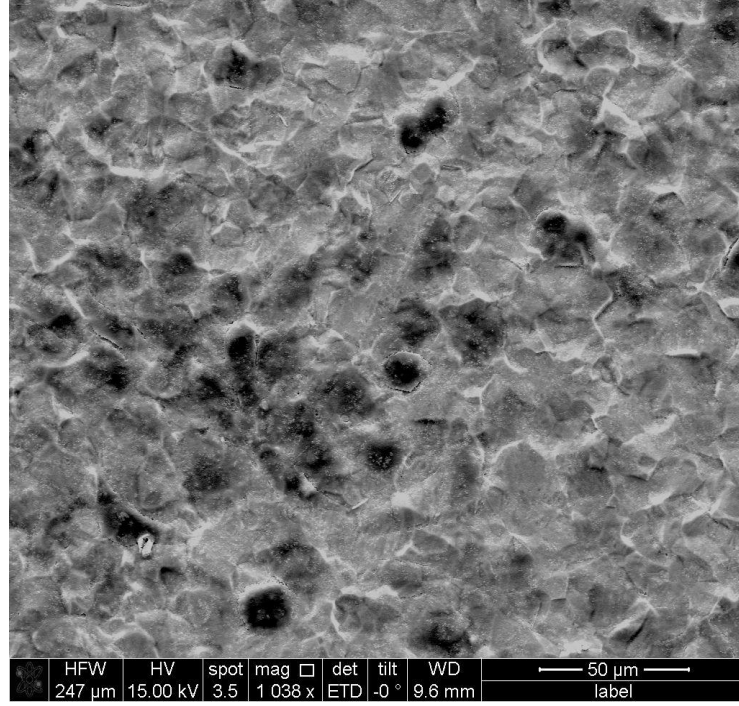


Şekil 4.20. Titanyum plakalar üzerine kültüre edilen Saos–2 hücrelerinin 3., 7. ve 14. gün ALP testi sonucu elde edilen alkalin fosfataz aktivitesi

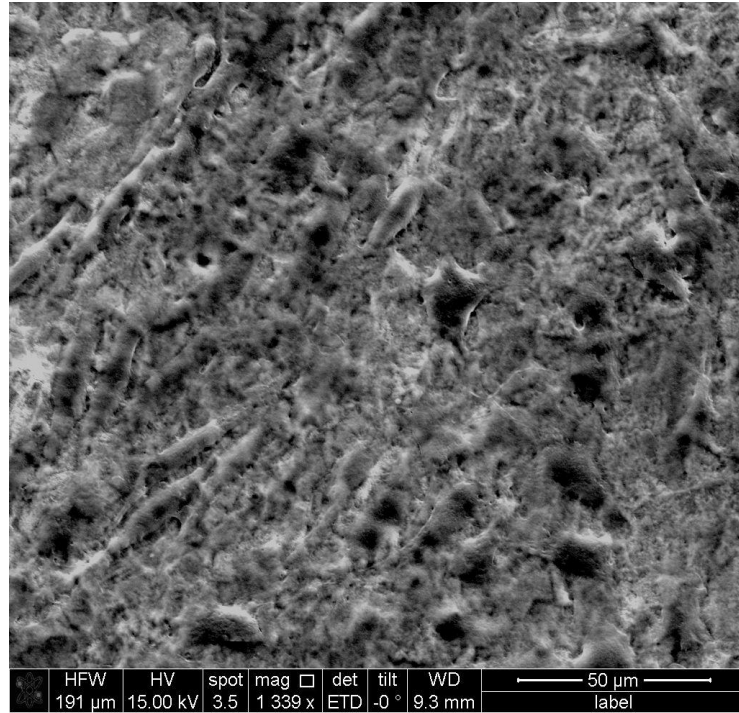
Nanokompozit malzemede önemli olan noktalardan biri, HAp oranının artması ile biyoaktivitesinin paralellik göstermesidir [109]. Bu amaçla, 2, 4 ve 6 gL⁻¹ HAp yoğunluğuna sahip kompozit kaplamalarla hazırlanmış C örnek grubuna bakıldığında, diğer gruplara oranla hücre aktivitesinde daha fazla artış gözlenmiştir. İlk analiz günü olan 3. günden itibaren hidroksiapatit katkılı aljinat depozit edilmiş yüzeylerde diğer yüzeylere göre bir fark oluşmaya başlamış ve bu fark 7. günde Alg/HAp kompozitinde artan hidroksiapatit oranı ile artmaya devam etmiştir. 14. günde hidroksiapatit katkılı aljinatlardaki dramatik artışın artan hidroksiapatit oranı ile paralel oluşu ALP aktivitesinin ortamdaki hidroksiapatit tarafından indüklendiğinin bir kanıtıdır ve bu fark ile birlikte bu örnekler üzerinde kültüre olan hücrelerin osteojenik farklılaşmaya diğer örnek gruplarına göre daha önce girdikleri düşünülmektedir [136] [137]. Turco ve ark. [4], MG63 ve Saos-2 insan osteosarkoma hücreleri ile yaptıkları çalışmada Ag/HAp kompozit iskeleler üzerindeki ALP aktivitesini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda, ALP aktivitesi ilk günden itibaren 21. güne kadar Saos-2 hücrelerinde daha fazla artış göstermiştir. Li ve ark. [71], mikroark ile anotlanmış ve üzerine HAp kaplanmış titanyum implantların işlem görmemiş titanyuma göre ALP aktivitesinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Artan hidroksiapatit konsantrasyonu ile aktivitenin artış gösterdiği rapor edilen sonuçlar arasındadır.

4.11. Hücre İle Etkileştirilen Ti İmplantların Morfolojik Karakterizasyonu

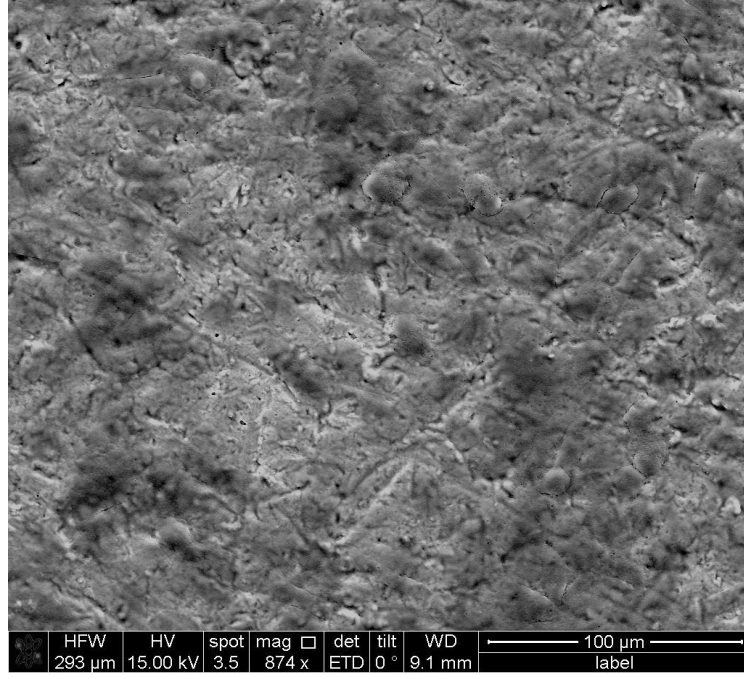
Yüzeyi modifiye titanyum implantların Saos – 2 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen hücre yapışma ve yayılma eğilimlerinin morfolojik görüntülenmesi SEM ile sağlanmıştır. Bu amaçla, kültüre edilen örnekler 4% paraformaldehit ile fikse edilerek SEM analiz için hazırlanmıştır. Alınan görüntüler sonucunda tüm yüzeylerde hücre tutunması açıkça gözlenmiştir. Anotlanmış yüzeylerde, anotlanmamış yüzeylere göre hücreler daha fazla yayılmıştır. Alg/HAp kaplanmış implantlarda, hücrelerin tüm yüzey boyunca yayılması, yapılan yüzey modifikasyonlarının hücre yapışma ve büyümesine etki ettiğini açıkça göstermektedir.



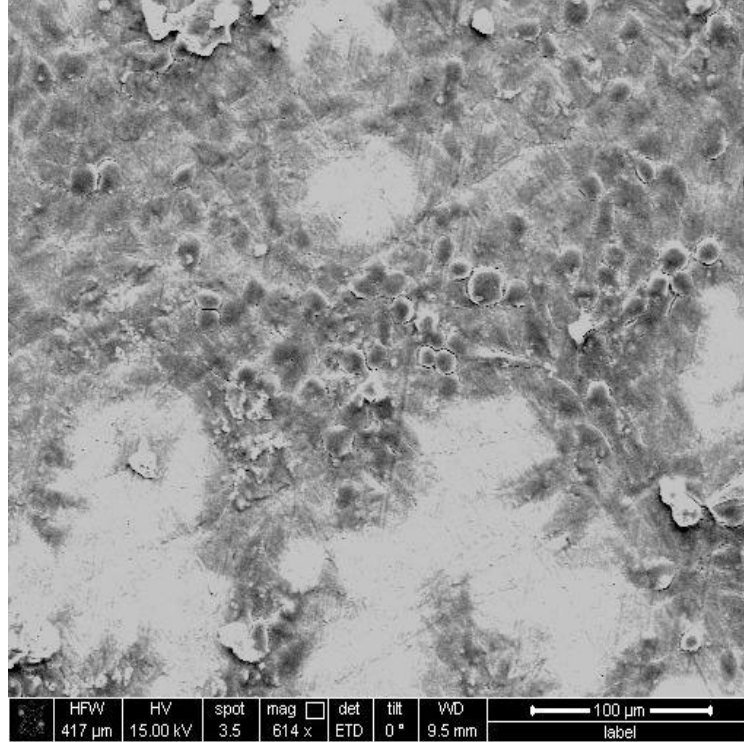
Şekil 4.21. Saos-2 hücreleri ile etkileşen anotlanmamış implantların SEM görüntüsü



Şekil 4.22. Saos-2 hücreleri ile etkileşen anotlanmış implantların SEM görüntüsü

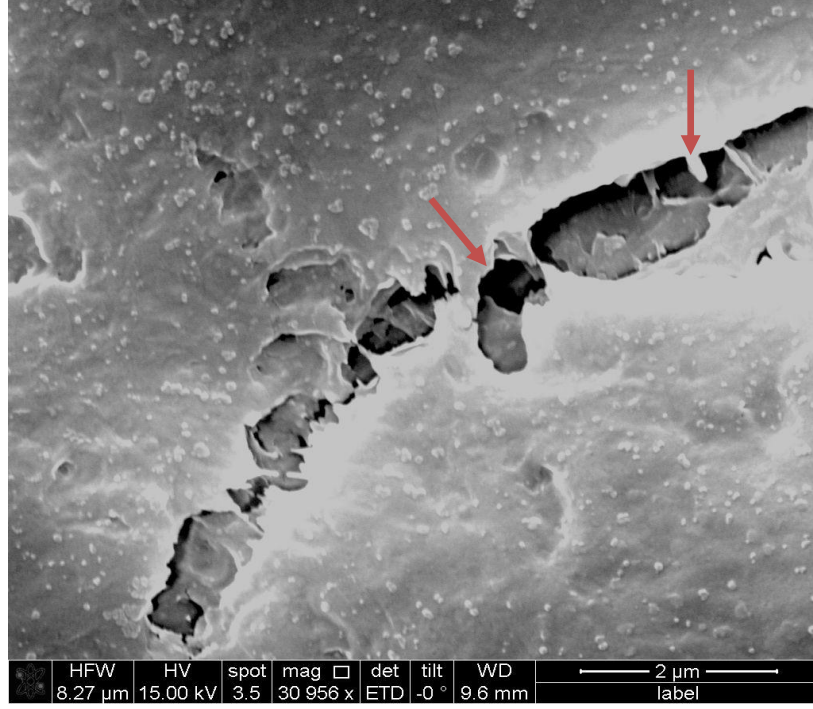


Şekil 4.23. Saos-2 hücreleri ile etkileştirilen aljinat kaplı implantların SEM görüntüsü



Şekil 4.24. Saos-2 hücreleri ile etkileştirilen Alg/HAp kaplı implantların SEM görüntüsü

Alg/HAp kaplı implantların yüksek büyütmede SEM görüntüsü ile yüzey üzerine yapışan hücreler daha yakından incelenmiştir. Hücre uzantılarının tübüler yapılar üzerine tutunması osseointegrasyonun başlangıcı olarak değerlendirilmektedir.



4.25. Saos – 2 hücreleri ile etkileşen Alg/HAp kaplı implantların yüksek büyütmede SEM görüntüsü

5. SONUÇLAR

- Ortopedik implantlarda yaygın olarak kullanılan bir biyomalzeme olan titanyum metali üzerinde osteoblast hücre yapışmasını sağlamak ve geliştirmek amacıyla çeşitli yöntemlerle yüzeyin modifiye edilmesi kapsamında tez çalışması yapılmıştır.
- Titanyum metal plakalar, yüzey safsızlıklarının giderilmesi amacıyla öncelikle asit ile muamele edilip temizlenmiş; sonra ise zımparalanarak yüzey pürüzlülüğü sağlanmıştır.
- Etilen glikol + NH_4F elektrolit çözeltisi kullanılarak, titanyum metal plakalar farklı süre ve gerilimlerde anodizasyon işlemine tabi tutularak yüzey üzerinin nano-boyutta modifikasyonu sağlanmıştır. SEM görüntülerinde, parametre değişikliklerinin, oluşan nanotüplerin çap ve uzunluğunda farklılıklar oluşturduğu görülmüştür. TiO_2 kimyasal çözülmesinin en az düzeyde olduğu kararlı nanotübüler yapıları, 20 V ve 20 dk'da elde edilmiştir.
- Titanyum implant üzerinde yapılan farklı modifikasyonlar, kemik ile metal arayüzeyin direk temasını sağlayarak hücre yapışmasının artmasına yardımcı olmaktadır. Bu amaçla, kimyasal modifikasyon yöntemi olan elektroforetik biriktirme ile anotlanan titanyum implantlar üzerine ince film kaplanmıştır.
- Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan aljinat çözeltileri ile kaplanan AnTi metalinin SEM görüntüleri incelendiğinde, tüm yüzeylerde aljinat biriktiği gözlenmiştir. Uygulanan biriktirme işleminin süresi arttıkça, titanyum yüzey üzerindeki aljinat kaplama yoğunluğu da artış göstermiştir. Ti yüzey üzerinde aljinat yoğunluğunun az olması ve anotlanmış yüzey morfolojisinin bozulmaması açısından düşük konsantrasyonda Alg ile ve düşük zaman aralığında çalışılmıştır.

- Kemik kusurlarını en aza indirmek, doku–implant arayüzeyinde ilk hücre tutunmasını sağlamak ve kemik oluşumunu teşvik etmek amacıyla kullanılan hidroksiapatit biyoseramik nanopartikülleri ile aljinat kompozit malzemesi oluşturulmuştur. Bu amaçla hidroksiapatit nanopartikülleri sentezlenmiştir.
- Farklı hidroksiapatit oranlarında oluşturulan biyouyumlu Alg/HAp malzeme ile anotlanmış titanyum yüzeyler elektroforetik kaplanmıştır. Konsantrasyon, zaman ve gerilim gibi parametreler değiştirilerek daha önce yapılan yüzey modifikasyonları bozulmayacak biçimde biriktirme yapılmıştır. EDX ve FTIR ile implantların kimyasal analizleri yapılarak yüzey üzerinde meydana gelen değişimler açıkça gözlenmiştir.
- Su temas açısı ölçümleri ile yüzeylerin ıslanabilirlikleri incelenmiştir. İmplant yüzeyinin ıslanabilir olması hücrenin biyolojik ortamı ile uyum sağlayarak implant – hücre etkileşimini artırmaktadır. İşlenmemiş titanyum ile karşılaştırıldığında, modifiye edilmiş tüm yüzeylerde ıslanabilirlik artmıştır. Anotlanmış yüzeyler üzerine aljinat biriktirilmesi ile ıslanabilirlik büyük oranda artış gösterirken, hidroksiapatit kaplanmasıyla tamamen hidrofilik yüzeyler elde edilmiştir.
- Saos–2 hücreleri ile etkileştirilen yüzeyi modifiye titanyum implantlarda hücre proliferasyonunun işlem görmemiş yüzeylere oranla daha fazla olduğu, toplam protein ve ALP aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Alg/HAp kompozit kaplı yüzeylerde artan hidroksiapatit miktarı ile ALP aktivitesi de artış göstermiştir. İmplant yüzeyinin hidroksiapatit ile kaplanmasının hücre tutunması ve çoğalmasını artırdığı, yeni kemik oluşumu için uygun bir arayüzey oluşturduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Gültepe, E., Nagesha, D., Sridhar, S., Amiji, M., Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, p. 11, **2009**.
- [2] Pielichowska, K., Blazewicz, S., *Bioactive Polymer/Hydroxyapatite (Nano)composites for Bone Tissue Regeneration*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, p. 97–207, **2010**.
- [3] Cheng, X., Lei, D., Mao, T., Yang, S., Chen, F., Wu, W., Repair of critical bone defects with injectable platelet rich plasma/bone marrow-derived stromal cells composite: experimental study in rabbits, *Ulus Travma Acil Cerrahi Dergi*, cilt 14, no. 2, p. 87–95, **2008**.
- [4] Turco, G., Marsich, E., Bellomo, F., Semeraro, S., Donati, I., Brun, F., Grandolfo, M., Accardo, A., Paoletti, S., Alginate/Hydroxyapatite Biocomposite For Bone Ingrowth: A Trabecular Structure With High And Isotropic Connectivity, *Biomacromolecules*, no. 10, p. 1575–1583, **2009**.
- [5] Evis, Z., Çeşitli İyonlar Eklenmiş Nano-Hidroksiapatitler: Üretim Yöntemleri, İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönlerinden İncelenmesi, *International Journal of Research and Development*, cilt 3, no. 1, p. 55–61, **2011**.
- [6] Thamaraiselvi, T.V., Rajeswari, S., Biological Evaluation of Bioceramic Materials–A Review, *Trends Biomaterials of Artificial Organs*, cilt 18, no. 1, p. 9–17, **2004**.
- [7] Maniglio, D., Bonani, W., Bortoluzzi, G., Servoli, E., Motta, A. ve Migliaresi, C, Electrodeposition of Silk Fibroin on Metal Substrates, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, no. 25, p. 441–454, **2010**.
- [8] Lütjering, G, Williams, J.C., *Titanium*, second ed., Berlin Heidelberg: Springer–Verlag, **2007**.
- [9] Oshida, Y., *Bioscience and bioengineering of titanium materials*, Oxford: Elsevier, **2007**.
- [10] Leyens ,C. ve Peters, M., *Titanium and titanium alloys*, Köln, Germany: Wiley-VCH, **2003**.

- [11] 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*, p. 157–166, **2007**.
- [12] Habeshi, F., *Handbook of extractive metallurgy*, 2, Germany, p. 1130–1179, **1989**.
- [13] Burns, K., Yao, C., Webster, T.J., Increased chondrocyte adhesion on nanotubular anodized titanium, *Journal of Biomedical Materials Research*, cilt A, p. 561–568, **2007**.
- [14] Li, Y., Zou, S., Wang, D., Feng, G., Bao, C., Hu, J., The effect of hydrofluoric acid treatment on titanium implant osseointegration in ovariectomized rats, *Biomaterials*, no. 31, p. 3266–3273, **2010**.
- [15] Boyer, R., Welsch, G., Collings, E.W. , *Materials properties handbook: titanium alloys*, USA, ASM Internationals, p. 125–260, **1994**.
- [16] Hille, G.H., Titanium for surgical implants., *Journal of Materials, Defense Technical Information Center*, no. 1, p. 373–381, **1966**.
- [17] Albrektsson, T., Brånemark, P.I., Hansson, A. ve Lindstrom, J., Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, p. 155–170, 52 1981.
- [18] Sıcakyüz, Ö., *Titanyum ve titanyum alaşımlarının anodik oksidasyon davranışı ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, **2007**.
- [19] Laing, P.G., Ferguson, A.B. ve Hodge, E.S. , Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants., *Journal of Biomededical Materials Research*, no. 1, p. 135–149, **1967**.
- [20] Guehennec, L.L., Soueidan, A., Layrolle, P. , Amouriq, Y. , Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dental Materials*, no. 23, p. 844–854, **2007**.
- [21] Schierholz, J.M. ve Beuth, J., Implant infections: a haven for opportunistic bacteria, *Journal of Hospital Infection*, no. 49, p. 87–93, **2001**.
- [22] Hetrick, E.M., Schoenfisch, M.H., Reducing implant-related infections: active release strategies., *Chemical Society Reviews*, no. 35, p. 780–789, **2006**.

- [23] Chua, P.H., Neoh, K.G., Kang, E.T., Wang, W., Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, *Biomaterials*, no. 29, p. 1412–1421, **2008**.
- [24] Liu, X., Chu, P.K., Ding, C., Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering R*, no. 47, p. 49–121, **2004**.
- [25] Kasemo, B., Lausmaa, J., Surface science aspects on inorganic biomaterials, *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 2, 335–380, **1986**.
- [26] Branemark, P.I., Hansson, B.O., Adell R., Breine, U., Lindström, J., Hallen, O., Ohman, A., Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period, *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 2, 16, 1–132, **1977**.
- [27] Jacobs, H.G., Formgestaltung und Materialfrage bei enossealen Implantaten zur Aufnahme von Zahnersatz. Dtsch., *Zahnärztl.*, no. 36, pp. 63-69, **1977**.
- [28] Jacobs, H.G., *Implantologie und Zahnersatz*, München/Wien, Carl Hanser Verlag, **1976**.
- [29] Muster, D. ve Champy, M., Le Probleme d'interface os-biomateriaux., *Actualities Odonto-Stomat*, no. 121, p. 109–124, **1978**.
- [30] Gümüşderelioğlu, M. , Biyomalzemeler, *Bilim ve Teknik Dergisi, Temmuz Sayısı, TÜBİTAK*, p. 23, **2002**.
- [31] Stoeckel ,D., Pelton, A., Duerig, T., Self-expanding nitinol stents: material and design considerations, *European Radiology*, 14, 2, p. 292–301, **2004**.
- [32] Vasilev, K., Poh, Z., Kant, K., Chan, J., Michelmore, A., Losic, D., Tailoring the surface functionalities of titania nanotube arrays, *Biomaterials*, no. 31, p. 532–540, **2010**.
- [33] Ajami, E., Aguey–Zinsou, K.F., Calcium Phosphate Growth at Electropolished Titanium Surfaces, *Journal of Functional Biomaterials*, p. 327–348, 3 **2012**.
- [34] Cooper, L.F., Zhou, Y., Takebe, J., Guo, J., Abron, A., Holmen, A., Ellingsen, J.E. , Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit–blasted c.p. titanium endosseous implants, *Biomaterials*, no. 27, p. 926–936, **2006**.

- [35] Sundfeldt, M., Persson, J., Swanpalmer, J., Wennerberg, A., Karrholm, J., Johansson, C.B., Carlsson, L.V., Does Sodium Flouride In Bone Cement Affect Implant Fixation. Part II: Evulation Of The Effect Of Sodium Flouride Addition To Acrylic Bone Cement And The Fixation Of Titanium Implants In Ovairectomized Rabbits, *Journal Of Materials Science: Materials in Medicine*, no. 13, p. 1045–1050, **2002**.
- [36] Wang, J., Cao, Y., Sun, Y.Y., Wang, K., Cao, C., Yang, L., Zhang, Y.D., Zheng, Z., Li, D., Wang, J.Y., Han, Y.L., Is there an optimal topographical surface in nanoscale affecting protein adsorption and cell behaviors, *Journal of Nanoparticle Research*, no. 13, p. 4201–4210, **2011**.
- [37] Larsson, C., Thomsen, P., Aronsson, B.O. , Rodahl, M. , Lausmaa, J. , Kasemo, B. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses, *Biomaterials*, 17, 605–616, **1996**.
- [38] Buser, D., Brogini, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface., *Journal of Dental Research*, no. 83, p. 529–533, **2004**.
- [39] Strunz, V., Gross, U., ve Nickel, S, Morphometrische Untersuchungen über den Knochenkontakt an titanplasmabeschichteten Implantaten, *Fortschr. Kiefer Gesichtskir*, no. 28, p. 47–49, **1983**.
- [40] Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H., Stich, H., Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs, *Journal of Biomedical Materials Research*, no. 25, p. 889–902, **1991**.
- [41] Baumhammers, A., Baumhammers, I., Conway, J. C., Scanning electron microscopy of bladevent implants, *Oral Implantoloji*, 2, p. 25–35, **1971**.
- [42] Wennerberg, A., Albrektsson, T., Johansson, T. ve Andersson, B., Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography, *Biomaterials*, no. 17, p. 15–22, **1996**.
- [43] Brett, P.M., Harle, J., Salih, V., Mihoc, R., Olsen, I., Jones, F.H., Tonetti, M., Roughness response genes in osteoblasts, *Bone*, 35, 124–133, **2004**.
- [44] Ercan, B., Taylor, E., Alpaslan, E., Webster, T.J., Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy, *Nanotechnology*, 22, 295102, **2011**.

- [45] Guo, J., Padilla, R.J., Ambrose, W., Kok De, I.J., Cooper, L.F., The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO₂ grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo, *Biomaterials*, no. 28, p. 5418–5425, **2007**.
- [46] Yu, J.C., Yu, J., Zhao, J., Enhanced photocatalytic activity of mesoporous and ordinary TiO₂ thin films by sulfuric acid treatment, *Applied Catalysis B: Environmental*, no. 36, p. 31–43, **2002**.
- [47] Mathur, S., Kuhn, P., CVD of titanium oxide coatings: Comparative evaluation of thermal and plasma assisted processes, *Surface & Coatings Technology*, no. 201, p. 807–814, **2006**.
- [48] Kamada, K., Mukai, M., Matsumoto, Y., Electrodeposition of titanium (IV) oxide film from sacrificial titanium anode in I₂-added acetone bath, *Electrochimica Acta*, no. 47, p. 3309–3313, **2002**.
- [49] Macak, J.M., Tsuchiya, H., Schmuki, P., High–Aspect–Ratio TiO₂ Nanotubes by Anodization of Titanium, *Angewandte Chemie International Edition*, no. 44, p. 2100–2102, **2005**.
- [50] 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 Material Research*, 16, no. 12, p. 3331–3334, **2001**.
- [51] Paulose, M., Prakasam, H.E., Varghese, O.K., Peng, L., Popat, K.C., Mor, G.K., Desai, T. A. ve Grimes, C. A., A new benchmark for TiO₂ nanotube array growth by anodization, *Journal of Physics Chemistry C*, no. 111, p. 14992, **2007**.
- [52] Tao, J., Zhao, J., Tang, C., Kang, Y., Li, Y., Mechanism study of self organized TiO₂ nanotube arrays by anodization, *New Journals of Chemistry*, no. 32, p. 2164– 2168, **2008**.
- [53] Brunette, D.M., Tengvall, P., *Mechanical, thermal, chemical and electrochemical surface treatment of titanium, Titanium in medicine*, New York, Thomsen P(ed.), p. 232, **2001**.
- [54] Abbott A.P. ve McKenzie K.J., Application of ionic liquids to the electrodeposition of metals, *Physical Chemistry Chemical Physics*, no. 8, p. 4265–4279, **2006**.
- [55] Zhitomirsky, I., Gal-Or, L., Electrophoretic deposition of hydroxyapatite, *Journal Of Materials Science: Materials in medicine*, no. 8, p. 213–219, **1997**.

- [56] Sarkar, P., Nicholson, P.S., Electrophoretic Deposition (EPD): Mechanisms, Kinetics, and Application to Ceramics, *Journal of the American Ceramic Society*, cilt 79, no. 8, p. 1987–2002, **1996**.
- [57] Dickerson, J.H., Boccaccini, A.R., *Electrophoretic deposition of nanomaterials*, Springer, p. 388, **2011**.
- [58] Substech, (Substances and Technologies), <http://www.substech.com/dokuwiki/doku.php?id=anodizing>, (Ocak, 2013).
- [59] Zhang, Y., Tao, J., Pang, Y., Wang, W., Wang, T., Electrochemical deposition of hydroxyapatite coatings on titanium, *The Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, no. 16, p. 633–637, **2006**.
- [60] Zhitomirsky, I., Gal-Or, L., Kohn, A., Hennicke, H.W., Electrodeposition Of Ceramic Film From Non-Aqueous And Mixed Solutions, *Journal Of Materials Science*, no. 30, p. 5307–5312, **1995**.
- [61] Boccaccini, A.R., Keim, S., Ma, R., Li Y., Zhitomirsky, I., Electrophoretic deposition of biomaterials, *Journal Royal Society Interface*, cilt 7, no. 5, p. 581–613, **2010**.
- [62] Şahin, T., *Elektrodepozisyon Tekniğiyle Üretilen Co ve CoFe Filmlerin, Yapısal ve Manyetodirenç Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek lisans tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2006**.
- [63] Kar, A., Raja, K.S., Misra, M., Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO₂ for implant applications, *Surface & Coatings Technology*, no. 201, p. 3723–3731, **2006**.
- [64] Gülmez, S., Aykut, Ş, Demetgül, M., Titanyum Alaşımılı Ti6Al4V Malzemenin Düzlem Yüzey Taşlanması Değişken Taşlama Parametrelerin Yüzey Pürüzlülüğüne Etkilerinin Deneysel İncelenmesi, *5. Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumu*, Karabük, **2009**.
- [65] Ezugwu, E.O., Wang, Z.M., Titanium alloys and their machinability—a review, *Journal Of Materials Processing Technology*, cilt 68, no. 3, p. 262–274, **1997**.
- [66] Miyakawa, O., Okawa, S., ve Kobayashi, M., Abrading Increases Oxygen and Hardness of Titanium Surface, *Dental Materials Journal*, cilt 25, no. 1, p. 13–19, **2006**.
- [67] Ejder, B., Metaller için elektro polisaj, <http://www.bilesim.com.tr/yazdir.php?t=3&id=2543&sn=0> (Aralık, 2012).

- [68] Campbell, A. A., Bioceramics for implant coatings, *Materialstoday*, 10, p. 26–30, **2003**.
- [69] Gökdemir, Y., *Saf Titanyum ve Ti6Al4V Alaşımının Yüksek Sıcaklıkta Oksidasyon Davranışı*, İstanbul, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, **2005**.
- [70] Hakkı, S.S., Ertuğrul, S.A., Dental İmplantların Yüzey Özellikleri ve Osseointegrasyondaki Önemi, *SÜ, Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, no. 18, p. 336–341, **1999**.
- [71] Li, L.H., Kim, H.W., Lee, S.H., Kong, Y.M., Kim H.E. , Biocompatibility of titanium implants modified by microarc oxidation and hydroxyapatite coating, *Journal of Biomedical Matererials Research*, 73, 1, 48–54, **2005**.
- [72] Cengiz, B., *Hidroksiapatit Nanoparçacıklarının Sentezi*, Yüksek lisans tezi, Ankara, A.Ü. Fen bilimleri enstitüsü, p. 68, **2007**.
- [73] Merolli A., Joyce, T.J., *Biomaterials in Hand Surgery*, Italia, Springer Verlag, p. 143, **2009**.
- [74] Lin, S., Ueng, S.W.N., Liu, S.C., Chan, E.C., Chao, E.K., Tsai, C.H., Chen, K.T., Wei, F.C. ve Shih, H, Development of a biodegradable antibiotic delivery system, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, pp. 240-362, **1999**.
- [75] Mittal, V., *Nanocomposites with Biodegradable Polymers (synthesis, properties and future perspectives)*, USA, Oxford University Press, p. 400, **2011**.
- [76] Wang, L., Li, Y., Li, C., In situ processing and properties of nanostructured hydroxyapatite/alginate composite, *Journal of Nanoparticle Research*, no. 11, p. 691–699, **2009**.
- [77] Teke, B.A., *Farklı Yöntemlerle Üreaz/ Alanindehidrogenaz Enzim Çiftinin İmmobilizasyonu ve Sistemin Kan Üre Düzeyini Düşürebilme Olanaklarının Araştırılması*, Doktora Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, **2008**.
- [78] Hearn, E., Neufeld, R.J., Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease, *Process Biochemistry*, no. 35, p. 1253–1260, **2000**.
- [79] Atala, A., Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Concepts for Clinical Application, *Rejuvenation Research*, cilt 7, no. 1, p. 15–31, **2004**.

- [80] Atala, A., Kim, W., Paige, K.T., Vacanti, C.A., Retik, A.B., Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension, *Journal of Urology*, p. 641–643, 152 **1994**.
- [81] Shi, Z., Neoh, K.G., Kang, E.T., Poh, C.K. ve Wang, W., Surface Functionalization of Titanium with Carboxymethyl Chitosan and Immobilized Bone Morphogenetic Protein–2 for Enhanced Osseointegration, *Biomacromolecules*, no. 10, p. 1603–1611, **2009**.
- [82] Subramani, K. ve Ahmed, W., Emerging Nanotechnologies in Dentistry Professes, Materials and Applications, *William Andrew*, p. 412, **2012**.
- [83] Evcin, A., Kepekçi, D.B., Barut İ., Hidroksiapatit Tozlarının Plazma Sprey Yöntemiyle Paslanmaz Çelik Üzerine Kaplanması, *5. Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumu (IATS'09)*, Karabük, **2009**.
- [84] Gal-Or, L., Haber, S., Liubovich, S., Electrophoretic and Electrolytic Deposition of Ceramic Particles on Porous Substrates, *Israel Institute of Metals*, p. 286, **1993**.
- [85] Lu, X., Wang, Y., Liu, Y., Wang, J., Qu, S., Feng, B., Weng, J., Preparation of HA/chitosan composite coatings on alkali treated titanium surfaces through sol–gel techniques, *Materials Letters*, 61, 3970–3973, **2007**.
- [86] Lopez-Heredia, M.A., Sohier, J., Gaillard, C., Quillard, S., Dorget, M., Layrolle, P., Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering, *Biomaterials*, no. 29, p. 2608–2615, **2008**.
- [87] Wang, J., Apeldoorn, A., Groot, K., Electrolytic deposition of calcium phosphate/chitosan coating on titanium alloy: Growth kinetics and influence of current density, acetic acid, and chitosan, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 1, cilt 76, no. 3, pp. 503-11, **2005**.
- [88] Han ,J.K., Song, H.Y., Saito, F., ve Lee, B.T., Synthesis of high purity nano sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method, *Materials Chemistry Physics*, cilt 99, no. 2–3, p. 235–239, **2006**.
- [89] Santos, J.D., Silva, P.L., Knowles, J.C., Talal, S., ve Monteiro, F.J., Reinforcement of hydroxyapatite by adding P₂O₅–CaO glasses with Na₂O, K₂O and MgO., *Journal of Material Science*, 7, 3, 187–189, **1996**.
- [90] Dorozhkin, S.V., Bioceramics of calcium orthophosphates, *Biomaterials*, 31, no. 7, p. 1465–1485, **2010 a**.

- [91] Corno, M., Busco, C., Civalleri, B. and Ugliengo, P., Periodic ab initio study of structural and vibrational features of hexagonal hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8, p. 2464–2472, **2006**.
- [92] He, C., Zhang, F., Cao, L., Feng, W., Qiu, K., Zhang, Y., Wang, H., Mo, X. ve Wang, J., Rapid mineralization of porous gelatin scaffolds by electrodeposition for bone tissue engineering, *Journal of Material Chemistry*, no. 22, p. 2111–2119, **2012**.
- [93] Zhitomirsky, D., Roether, J.A., Boccaccini, A.R., Zhitomirsky, I, Electrophoretic deposition of bioactive glass/polymer composite coatings with and without HA nanoparticle inclusions for biomedical applications, *Journal of materials processing technology*, no. 209, p. 1853–1860, **2009**.
- [94] Xiao, F., Ye, J., Wang, Y., Rao, P., Deagglomeration of HA during the precipitation synthesis, *Journal of Materials Science*, 40, 5439–5442, **2005**.
- [95] Murugan, R., Ramakrishna, S., Development of nanocomposites for bone grafting., *Composites Science and Technology*, 65, 2385–2406, **2005**.
- [96] He, C., Xiao, G., Jin, X., Sun, C., ve Ma, P.X., Electrodeposition on Nanofibrous Polymer Scaffolds: Rapid Mineralization, Tunable Calcium Phosphate Composition and Topography, *Advanced Functionl Materials*, no. 20, p. 3568–3576, **2010**.
- [97] Wei, M., Ruys, A.J., Milthorpe, B.K., Sorrell, C.C., Evans, J.H., Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coatings on metal substrates: a nanoparticulate dual-coating approach., *Journal Sol–Gel Science Technology*, no. 21, p. 39–48, **2001**.
- [98] Hamagami, J., Ato, Y., Kanamura, K., Fabrication of highly ordered macroporous apatite coatings onto titanium by electrophoretic deposition method., *Solid State Ionics*, no. 172, p. 331–334, **2004**.
- [99] Dulgar-Tulloch, A.J., Bizios, R., Siegel, R.W., Differentiation of human mesenchymal stem cells on nano- and micro-grain size titania, *Materials Science and Engineering*, C, no. 31, p. 357–362, **2011**.
- [100] Zhang, W., Liu, T., Hu, X., Gong, J., Novel nanofibrous composite of chitosan CaCO_3 fabricated by electrolytic biomineralization and its cell biocompatibility, *RSC Advances*, no. 2, p. 514–519, **2012**.
- [101] Neumann M., Composites of Calcium Phosphate and Polymers as Bone Substitution Materials, *European Journal of Trauma*, 32, 125–131, **2006**.

- [102] Convertino, A., Tamborra, M., Striccoli, M., Leo, G., Agostiano, A., Curri, M.L. , Poly(methyl methacrylate) nanocomposites based on TiO₂ nanocrystals: Tailoring material properties towards sensing, *Thin Solid Films*, no. 519, p. 3931–3938, **2011**.
- [103] Chai, Y.C., Truscello, S., Bael, S., Luyten, F.P., Vleugels, J., Schrooten, J. , Perfusion electrodeposition of calcium phosphate on additive manufactured titanium scaffolds for bone engineerin, *Acta Biomaterialia*, no. 7, p. 2310–2319, **2011**.
- [104] Shi, J., Steric Stabilization, Center for Industrial Sensors and Measurements Department Materials Science & Engineering Group Inorganic Materials, *Science Literature Review*, p. 1–10, **2002**.
- [105] Lin, H., Yeh, Y., Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies, *Trans Tech Publications in Materials Science Forum*, no. Vols 426-432, p. 3043–3048, **2003**.
- [106] Maruyama, M., Hydroxyapatite clay used to fill the gap between implant and bone, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 277-B, no. 2, p. 213–218, **1995**.
- [107] Sivakumar, M., Rao, K.P. , Preparation, characterization, and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-alginate composite microspheres, *Journal of Biomedical Material Research*, no. 65, p. 222–228, **2003**.
- [108] Ribeiro, C.C., Barrias, C.C., Barbosa, M.A., Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices, *Biomaterials*, no. 25, p. 4363–4373, **2004**.
- [109] Cheong, M., Zhitomirsky, I., Electrodeposition of alginic acid and composite films, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* , no. 328, p. 73–78, **2008**.
- [110] Dorozhkin, S.V., Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates, *Acta Biomater.* , cilt 6, no. 3, p. 715–734., **2010 (b)**.
- [111] Pang X., Zhitomirsky I., Niewczas M., Cathodic electrolytic deposition of zirconia films., *Surface & Coatings Technology*, 195, p. 138– 146, **2005**.
- [112] Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, no. 65, p. 55–63, **1983**.

- [113] Yun, Y.S., Bak, H., Jin, H.J., Porous carbon nanotube electrodes supported by natural polymeric membranes for PEMFC, *Synthetic Metals*, no. 160, p. 561–5 , **2010**.
- [114] Hassan, F.M.B., Nanjo, H., Venkatachalam, S., Kanakubo, M., Ebina, T., Effect of the solvent on growth of titania nanotubes prepared by anodization of Ti in HCl, *Electrochimica Acta*, 55, p. 3130–3137, **2010**.
- [115] Schultze, J.W., Lohrengel, M.M., Ross, D., Nucleation and growth of anodic oxide films, *Electrochim Acta*, cilt 28, no. 87, p. 973–984, **1983**.
- [116] Çolak, Z. , *Anodik Oksidasyon Yöntemi İle Üretilen Titanyum Oksit Nanotüplerin Hidrojen Algılama Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze, T.C. Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, p. 126, **2008**.
- [117] Ratner, R., Hoffman, A., Schoen, F.J., Lemos, J.E., *Biomaterial Science: En Introduction to Materials in Medicine*, China, 2nd Edition, p. 879, **2004**.
- [118] Borum–Nicholas, L., Wilson Jr., O.C., Surface modification of hydroxyapatite. P- I. Dodecyl alcohol, *Biomaterials*, 24, 3671–3679, **2003**.
- [119] Geetta, V., Buvanewari, G., Ammonium hydrogen difluoride induced fluorination of hydroxyapatite, *Materials Res. Bulletin*, 45, 1866-4, **2010**.
- [120] Rehman I., Bondfield, W., Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy, *Journal of Material Sciene: Materials in Medicine*, no. 8, p. 1–4, **1997**.
- [121] Slosarczyka, A., Paszkiewicz, Z., Paluszkiwicz, C., FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods, *Journal of Molecular Structure*, no. 744–747, p. 657–661, **2005**.
- [122] Ma, R., Zhitomirsky, I., Electrophoretic deposition of chitosan-albumin and alginate-albumin films, *Surface Engineering*, Vol 27, 1, p. 51–56, **2011**.
- [123] Jovanovic, Z., Stojkovska, J., Obradovic, B., Miskovic-Stankovi, V., , Alginate hydrogel microbeads incorporated with Ag nanoparticles obtained by electrochemical method, *Materials Chemistry and Physics*, no. 133, p. 182–189, **2012**.
- [124] Ruardy, T.G., Schakenraad, J.M., Van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surfaces, *Journal of Biomedical Material Research*, no. 29, p. 1415–1423, **1995**.

- [125] Georgi, A., Grinnel, F., Groth, T. , Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganisation of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability, *Journal of Biomedical Material Research*, no. 30, p. 385–391, **1996**.
- [126] Ponsonneta, L., Reybiera, K., Jaffrezica, N., Comteb, V., Lagneaub, C., Lissacb, M., Martelea, C., Relationship between surface properties (roughness,wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour, *Materials Science and Engineering*, no. C, 23, p. 551–560, **2003**.
- [127] Park, J.W., Jang, J.H., Lee, C.S., Hanawa, T., Osteoconductivity of hydrophilic microstructured titanium implants with phosphate ion chemistry, *Acta Biomaterialia*, no. 5, p. 2311–2321, **2009**.
- [128] Bagno, A., Genovese, M., Luchini, A., Dettin, M., Coccini, M.T., Menti, A.M. Parnigotto, P.P., ve Bello, C.D., Contact profilometry and correspondence analysis to correlate surface properties and cell adhesion in vitro of uncoated and coated Ti and Ti and Ti6Al4V disks, *Biomaterials*, no. 25, p. 2437–2445, **2004**.
- [129] Zhao, H., Dong, W., Zheng., Y., Liu, A., Yao, J., Li, C., Tang, W., Chen, B., Wang, G., Shi, Z., The structural and biological properties of hydroxyapatite-modified titanate nanowire scaffolds, *Biomaterials* , no. 32, p. 5837–5846, **2011**.
- [130] Vogler, E.A., Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces, *Adv. Colloid Interface Science*, no. 74, p. 69–117, **1998**.
- [131] Soumya, S., Sreerekha, P.R., Menon, D., Nair, S.V., Chennazhi, K.P., Generation of a biomimetic 3D microporous nano-fibrous scaffold on titanium surfaces for better osteointegration of orthopedic implants, *Journal of Materials Chemistry*, no. 22, p. 1904, **2012**.
- [132] Kim, M.H., Lee, S.Y., Kim, M.J., Kim, S.K., Heo, S.J., ve Koak, J.Y., Effect of Biomimetic Deposition on Anodized Titanium Surfaces, *Journal of Dentistry Research*, 90, no. 6, p. 711–716, **2011**.
- [133] Craig, S.W., ve Johnson, R.P., Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents, *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 74–85, **1996**.
- [134] Farley, J.R., Kyeyune-Nyombi, E., Tarbaux, M.N., Hall, S.L., Strong, D.D., Alkaline Phasphatase Activity from Human Osteosarcoma Cell Line Saos-2: an isoenzyme Standard for Quantifying Skeletal Alkaline Phasphatase Activity in Serum, *Clinic Chemistry*, no. 35/2, p. 223–229, **1989**.

- [135] Millan, J.L., Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes, *Purinergic Signalling*, no. 2, p. 335–341, **2006**.
- [136] 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*, no. 78 A, p. 97–103, **2006**.
- [137] Bayram, C., Demirbilek, M., Caliskan, N., Demirbilek, M.E., Denkbas, E.B., Osteoblast Activity on Anodized Titania Nanotubes: Effect of SBF Soaking Time, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, no. 8, p. 482–490, **2012**.
- [138] Stabilization Mechanisms,
http://materialrulz.weebly.com/uploads/7/9/5/1/795167/lecture_notes__2_nanomaterials.doc. (Şubat, 2013).

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Kübra KICIR

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 1986

Medeni Hali : Bekar

E-Posta : kicirkubra@gmail.com

Adresi : Kemalpaşa Mh. Petrol İş Sitesi E Blok No: 11 Elmadağ

Eğitim

Lise : Elmadağ Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (2000 - 2004)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi–Kimya Bölümü (2004 - 2010)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce – İyi

Tezden Üretilmiş Tebliğ veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Electrophoretic Deposition of Alginate onto Anodized Titanium Implants (8th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Hacettepe Üniversitesi, Ankara – Türkiye, Haziran – 2012)