

**OSSEİNTEGRASYONU ARTTIRACAK  
HİDROKSİAPATİT/SİKLODEKSTRİN KOMPOZİT  
TAŞIYICILARIN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF  
HYDROXYAPATITE/CYCLODEXTRIN COMPOSITE  
CARRIERS TO ENHANCE OSSEOINTEGRATION**

**MERYEM SÜMEYYE AKDEMİR**

**Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

**MERYEM SÜMEYYE AKDEMİR**'in hazırladığı '**Osseointegrasyonu arttıracak hidroksiapatit/siklodekstrin kompozit taşıyıcıların geliştirilmesi**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

.....

Başkan

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Danışman

.....

Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canım aileme...*

## ETİK

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere 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 üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

28/09/2015

Meryem Sümeyye AKDEMİR

## ÖZET

# OSSEİNTEGRASYONU ARTTIRACAK HİDROKSİAPATİT/SİKLODEKSTRİN KOMPOZİT TAŞIYICILARIN GELİŞTİRİLMESİ

**Meryem Sümeyye AKDEMİR**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Eylül 2015, 150 sayfa**

Bu çalışma, FHD-2015-7226 kodlu “Hidroksiapatit ile Desteklenmiş Hidroksipropil-beta-siklodekstrin Kompozit Taşıyıcıların Geliştirilmesi ve Osseointegrasyon Etkinliğinin Araştırılması” adlı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi ve 2210-C TÜBİTAK Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı desteği ile hazırlanmıştır. Sunulan tez çalışmasının amacı, sert doku implantı olarak yaygın bir şekilde kullanılan titanyumun (Ti) osseointegrasyonunu arttırmak üzere Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin (HP $\beta$ CD)/Melatonin inklüzyon kompleksinin oluşumuna olanak sağlayacak hidroksiapatit (HA)/HP $\beta$ CD kompozit taşıyıcıların geliştirilmesi ve *in vitro* koşullarda osseointegrasyon üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, HA oluşumunu hızlandırmak ve kaplama kararlılığını arttırmak için yüzeyde titanyum oksit (TiO<sub>2</sub>) tabakası oluşumu hedeflenmiştir. Bu kapsamda %99 saflıktaki titanyum plakalar farklı boyutlara sahip silisyum karbür (SiC) zımpara çeşitleriyle zımparalanarak yüzey alanı artırılmıştır. Yüzeyde mikro boyutta pürüzlülük oluşturulduktan sonra, istenen oksit tabakasının oluşumu için bazik ve anodik ortamda oksidasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bazik oksidasyonla oluşan oksit tabakasının kararlılığının ve biyoyumluluğunun artırılması için bazik oksidasyon sonrası yüzey 600°C’de ısıl işleme maruz bırakılmıştır. Ayrıca anodik oksidasyon yöntemi ile titanyum plakaların yüzeyinde nano boyutta pürüzlülüğün ve oksit tabakasının oluşumu sağlanmıştır. Anodik oksidasyon ile en uygun morfolojiye sahip olan Ti yüzeylerin üretilebilmeleri için optimum koşullar belirlenmiştir. Anodizasyon yönteminde seçilen optimum parametreler ile (20 V gerilim, 1 cm anot/katod arası mesafe, 45 dk işlem süresi) yaklaşık 75 nm çapında nanotübüler yapıya benzer tepelerden oluşan TiO<sub>2</sub> tabakası elde edilmiştir. Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM) analizinden elde edilen verilere göre yüzey

pürüzlülüğünde (Ra) bazik oksidasyon sonrası 1.5 kat, anodik oksidasyon sonrası ise 4 kata varan bir artış sağlanmıştır. Ayrıca her iki oksidasyon yöntemi sonrası gerçekleştirilen su temas açısı tayini ile yüzey ıslatılabilirliğinde artış sağlandığı tespit edilmiştir. Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) analizi ile yüzeyde %100'e varan TiO<sub>2</sub> kaplamanın oluşturulduğu bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında, mekaniksel, kimyasal ve elektrokimyasal işlemler uygulanarak modifiye edilen Ti plakalar 10 kat derişik yapay vücut sıvısı (10xSBF) çözeltisi kullanılarak biyomimetik çöktürme yöntemi ile oda koşullarında HA ile kaplanmıştır. Bu kapsamda oluşturulan HA kaplamanın kimyasal yapısı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve EDX analizleriyle belirlenirken, kalınlığı ve morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi ile, yüzeye tutunma kararlılığı ise mikro çizik analiziyle saptanmıştır. Bazik oksidasyon ile oksitlendirilmiş yüzeylerdeki HA kaplamanın fiziksel olarak daha kararlı olduğu bulunmuştur.

Çalışmanın üçüncü aşamasında HA tabakasının üzerine suda çözünür/çözünmez (çapraz bağlı) HPβCD temelli, kontrollü salıma olanak sağlayacak bir taşıyıcı yüzey oluşturulmuştur. Suda çözünmez HPβCD taşıyıcılar 1,2,3,4-bütantetrakarboxilik asit ile çapraz bağlanarak elde edilmiştir. Elde edilen yapının özellikleri FTIR, SEM ve termogravimetrik analiz (TGA) ile tespit edilmiştir. HA kaplı Ti plakalar üzerinde kararlı bir HPβCD tabakasının elde edilebilmesi için çapraz bağlama basamağında pH değeri optimize edilmiş ve en uygun pH değeri 4 olarak tespit edilmiştir. Suda çözünür özellikteki HPβCD/Melatonin kompleksinin üretimi için grubumuz tarafından optimize edilen mikrodalga yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmanın sonraki aşamasında HPβCD'nin inklüzyon kompleksi yapma özelliğinden faydalanılarak, kemik metabolizması üzerinde etkileri olduğu bilinen melatonin hormonu ile kompleks oluşturması sağlanmıştır. HPβCD/Melatonin inklüzyon kompleksinin oluşumunun tespiti için gerçekleştirilen FTIR analizinde etanol/su karışımı içinde çözülen melatonin ile HPβCD'nin (pH:1 ve 4) kompleks oluşturduğu tespit edilmiştir. HPβCD/Melatonin kompleksinin oluşturulması esnasında pipetleme ve daldırma olmak üzere iki farklı yükleme yöntemi kullanılmıştır. Oluşturulan HA/HPβCD (suda çözünür/çözünmez) kompozit taşıyıcının melatonin salım kinetiğinin belirlenebilmesi için *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve çapraz bağlı HPβCD membranlarda uzatılmış salım, suda çözünür mebranlarda ise ani salım profilleri tespit edilmiştir.

Ti/HA/HPβCD/Melatonin kompozit sistemin osseointegrasyon potansiyeli, preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı ile yürütülen *in vitro* kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Hücre canlılık analizi (MTT) sonuçları, HA katkısının hücre yapışmasını desteklediğini göstermiştir. Bunla birlikte çapraz bağlanmış HPβCD membranların hücre yapışmasını desteklemediği dolayısıyla hücre yapışmasının istenmediği durumlar için kontrollü salıma izin veren oldukça uygun yüzeyler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca HPβCD'nin varlığının hücre tutunması ve çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir. Farnosötik açıdan birçok uygulama alanı olmasına rağmen çapraz bağlanmış HPβCD'nin hücreler üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır Bu nedenle çalışmadan elde edilen bulgular HPβCD'nin yeni uygulamalarının ortaya koyulması açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Osseointegrasyon, Titanyum, Sentetik Vücut Sıvısı, Hidroksiapatit, Hidroksiopril-β-siklodekstrin, Melatonin.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF HYDROXYAPATITE/CYCLODEXTRIN COMPOSITE CARRIERS TO ENHANCE OSSEOINTEGRATION

**Meryem Sümeyye AKDEMİR**

**Master of Science, Bioengineering Division**

**Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**September 2015, 150 pages**

This thesis was prepared with support of FHD-2015-7226 Hacettepe University funding project and TÜBİTAK 2210-C Primary Subject National Scholarship Program for MSc Students. The aim of this thesis was to prepare hydroxyapatite (HA)/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD) composite carriers that will allow the formation of HP $\beta$ CD/Melatonin inclusion complex to improve osseointegration of titanium (Ti) which is commonly used in hard tissue implants, and to investigate the effects of it on osseointegration *in vitro*.

In the first stage of this study, formation of a titanium oxide (TiO<sub>2</sub>) layer on the surface was aimed to improve the speed of HA formation and to enhance the stability of the coating. In this context, Ti of 99% purity was used and the surface area of Ti was increased by grinding with silicone carbide (SiC) sandpapers of different grit sizes. After creating a micro roughness on Ti surface by grinding, alkaline and anodic oxidation treatments were applied to achieve the desired oxide layer. Following alkaline oxidation, the samples were heat treated at 600°C to improve the biocompatibility and stability of the oxide layer. In anodic oxidation method, an oxide layer with nano-sized roughness was generated on the titanium plates. Optimum anodic oxidation conditions were determined to obtain a TiO<sub>2</sub> layer with the most suitable surface morphology. By applying the optimum parameters in anodic oxidation (20 V, 1 cm distance between anode and cathode, 45 min processing time) TiO<sub>2</sub> layers consisting of hills of nanotubules, which are approximately 75 nm in diameter, were formed. According to atomic force microscopy (AFM) results, surface roughness (Ra) was increased by 150% and 400% after alkaline and anodic oxidation treatments, respectively. In addition, contact angle measurements showed that both oxidation methods increased the wettability of the samples. Energy dispersive X-ray (EDX) analysis demonstrated that surface coating was consisting of 100% TiO<sub>2</sub>.

In the second stage of the thesis, the Ti plates that were modified with mechanical, chemical and electrochemical processes were coated with HA in room conditions via biomimetic methods using 10xSynthetic Body Fluid (SBF). While the chemical structure of the HA coating was analysed with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and EDX analyses, its thickness and morphological properties were visualized with Scanning Electron Microscopy (SEM). The binding stability of HA coating on modified Ti surfaces was determined via micro scratching analysis. It was found that HA coating exhibited better physical stability when Ti was modified with alkaline oxidation method.

In the third stage of the thesis, water-soluble or insoluble (crosslinked) HP $\beta$ CD based carrier surfaces that would enable controlled release of melatonin were formed on HA layer. Water insoluble HP $\beta$ CD carrier was obtained via crosslinking with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid (BTCA). While the properties of this structure were obtained via FTIR, SEM and thermogravimetric (TGA) analysis. To obtain stable HP $\beta$ CD layers on HA coated Ti plates, 2 different pH values, pH 1 and pH 4, were adjusted during crosslinking process, and it was seen that pH 4 resulted to the formation of better stability. To prepare water-soluble HP $\beta$ CD/Melatonin complexes, microwave irradiation method, which was developed and optimized by our research group, was used.

In the next stage of the study, HP $\beta$ CD was complexed with melatonin that has effects on bone metabolism, depending on inclusion complex forming property of HP $\beta$ CD. FTIR analysis was conducted to determine the formation of HP $\beta$ CD/Melatonin inclusion complexes and it was found that the melatonin and HP $\beta$ CD, which were solved in an ethanol/water solution (pH 1 and 4), had formed a complex. Two different loading methods were used while forming the HP $\beta$ CD/Melatonin complexes, which were pipetting and immersing. *In vitro* release studies were performed to determine the melatonin release kinetics of the HA/HP $\beta$ CD composite carrier, and it was found that cross-linked HP $\beta$ CD membranes had extended release profiles, while water-soluble membranes had burst release profiles.

Osseointegration potential of Ti/HA/HP $\beta$ CD/Melatonin composite systems was determined with *in vitro* culture studies conducted with preosteoblastic MC3T3-E1 cell line. Cell viability analysis had shown that HA inclusion had supported cell adhesion. Furthermore, it was determined that cross-linked HP $\beta$ CD membranes had not supported cell adhesion, and this had shown that they are suitable surfaces that support controlled release of biosignals when cell adhesion is not desired. It was also found in the studies conducted with water-soluble complexes that the existence of HP $\beta$ CD hinders cell adhesion and suppresses cell proliferation. While HP $\beta$ CD has many pharmaceutical applications, cell surface interactions of crosslinked HP $\beta$ CD have not been investigated in the related literature. For this reason, the findings of this study carry importance to seek new applications of HP $\beta$ CD systems.

**Keywords:** Osseointegration, Titanium, Simulated Body Fluid, Hydroxyapatite, Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, Melatonin.



## TEŞEKKÜR

Kendisiyle tanıştığım ilk günden bu yana hayranlığımın günden güne arttığı, yaklaşımlarında hep anne sıcaklığı hissettiğim, sahip olduğu engin bilgi ve deneyimi ile çalışmalarımın yürütülmesinde yol gösteren ve gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, hem akademik anlamda hem de duruşuyla hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na bana olan desteği, sağladığı imkanlar ve kazandırdığı deneyimler için sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her noktasında izleri bulunan, en kötü anlarımda beni ayağa kaldıran, hayatıma çok şey katan, onunla çalışmaktan mutluluk duyduğum, ufku açık, kalbi açık çok değerli arkadaşım ve ustam **Arş. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş'e** teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu programı kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı**'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama FHD-2015-7226 no.'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**'ne teşekkürlerimi sunarım.

Şekersiz içtiğim kahvelerin şekerleri olan, bana inanılmaz güzel anılar yaşatan, benden desteklerini hiç eksik etmeyen **Kahve Çetesi** üyelerinden sevgili arkadaşlarım **Aysu Arslan'a**, **Bedriye Topal'a**, **Tuğçe Gültan'a**, **İnci Şıxaliyeva'ya**, **Ebru Tamahkar'a**, **Şeyma Bektaş'a** ve **Fatih Koyuncuoğlu'na**, **Elif Sunal'a**, aynı ortamda çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili laboratuvar arkadaşlarım **Dr. Anıl Sera Çakmak'a**, **Dr. Soner Çakmak'a**, **Arş. Gör. Damla Çetin Altındal'a**, **Arş. Gör. Merve Çapkın Yurtsever'e**, **Ekin Özge Tunçay'a**, **Gökçe Kaynak'a**, **Dr. Murat Şimşek'e**, **Ülkü Bozoğlu'na**, **Farzin Sana'ya** ve yardımları için **Cem Bayram'a**,

Hayatıma girdikleri için çok mutlu olduğum, her zaman yanımda olan, desteklerini benden esirgemeyen, tanıdığım en güzel insanlar, can dostum **Zeynep Yazıcı'ya**, değerli **Yusuf Ziya Sağıroğlu** ve **Sefa Sağıroğlu'na**, yerleri bende apayrı olan sevgili arkadaşlarım **Derya Kalelioğlu'na** ve **Gülseren Irmak'a** ve bu mücadelede beni yalnız bırakmayan, kendisine minnettar olduğum **Öğr. Gör. Hasan Ulus'a** bana olan inançlarından ve sevgilerinden dolayı çok teşekkür ediyorum.

Hayatıma güzellik katan, teyzesinin bir tanesi **Göksu Beren Kösen'e**, beni bugüne getiren, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim, çok değerli sevgili aileme: canım annem **Hilmiye Akdemir'e** ve canım babam **Hüseyin Akdemir'e**, gözümün dilini bilen insan, dünyanın en güzel annesi ve en birinci ablası **Sudenur Kösen'e**,

**Sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.**

# İÇİNDEKİLER

## **Sayfa**

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik ve yapısı .....	4
2.2. Kemik doku mühendisliği.....	5
2.3. Osseointegrasyon .....	7
2.4. Metalik biyomalzemeler .....	11
2.4.1. Titanyum ve alaşımları.....	12
2.4.2. Biyomalzeme olarak titanyum kullanımı .....	14
2.4.3. Titanyum ve alaşımlarının yüzey modifikasyonu .....	16
2.4.4. Mekanik modifikasyon uygulamaları .....	18
2.4.5. Kimyasal modifikasyon uygulamaları .....	18
2.4.5.1. Alkali uygulamalar .....	19
2.4.6. Biyokimyasal modifikasyon uygulamaları.....	20
2.4.7. Titanyum yüzeyini kaplama yöntemleri.....	22
2.4.7.1. Titanyum oksit kaplama ve kaplama yöntemleri.....	22
2.4.7.2. Anodizasyon yöntemi ile oksit tabaka oluşumu .....	24
2.4.7.3. Termal muamele yöntemiyle oksit tabaka oluşumu .....	28
2.4.8. Hidroksiapatit kaplama .....	30
2.5. Siklodekstrinler .....	31
2.6. Melatonin .....	38
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	41
3.1. Kullanılan Malzemeler .....	42
3.2. Birinci Bölüm .....	43
3.2.1. Bazik oksidasyon çalışmaları .....	43
3.2.1.1. Bazik oksidasyon işlemi öncesi titanyum plakaların hazırlanması .....	43
3.2.1.2. Titanyum plakaların bazik oksidasyonu .....	44
3.2.2. Anodik oksidasyon çalışmaları .....	44

3.2.2.1. Anodik oksidasyon işlemi öncesi titanyum plakaların hazırlanması .....	44
3.2.2.2. Titanyum plakaların anodizasyon düzeneği ve oksidasyon işlemi.....	45
3.2.3. Bazik ve anodik oksidasyon sonrası titanyum plakaların karakterizasyonu .....	46
3.2.3.1. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi .....	46
3.2.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	46
3.2.3.3. Su temas açısı tayini .....	46
3.2.3.4. Enerji dağılımlı x-ışınları analizi (EDX) .....	46
3.3. İkinci Bölüm .....	46
3.3.1. Bazik ve anodik oksidasyon işlemi sonrası hidroksiapatit üretimi ve titanyum plakaların hidroksiapatit ile kaplanması.....	47
3.3.2. Bazik ve anodik oksidasyon sonrası hidroksiapatit ile kaplı titanyum plakaların karakterizasyonu.....	48
3.3.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi .....	48
3.3.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	48
3.3.2.3. Mikro çizik testi (MST).....	48
3.3.2.4. Enerji dağılımlı x-ışınları analizi (EDX) .....	49
3.3.3. Hidroksiopropil-β-siklodekstrin temelli taşıyıcı sistemlerin oluşturulması .....	49
3.3.4. Hidroksiopropil-β-siklodekstrin temelli taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu ...	51
3.3.4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi .....	51
3.3.4.2. İvert mikroskop ile görüntüleme .....	51
3.3.4.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	51
3.3.4.4. Termogravimetrik-diferensiyal termal analiz (TGA-DTA) .....	52
3.3.5. Hidroksiopropil-β-siklodekstrin/Melatonin inklüzyon kompleksinin oluşturulması .....	52
3.3.6. Hidroksiopropil-β-siklodekstrin/Melatonin inklüzyon kompleksinin karakterizasyonu.....	54
3.3.6.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi .....	54
3.3.6.2. <i>İn vitro</i> salım çalışmaları .....	54
3.4. Üçüncü Bölüm .....	55
3.4.1. Hücre kültür çalışmaları .....	55
3.4.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	57
3.4.1.2. MTT analizi .....	57
3.4.1.3. İstatistiksel analiz .....	57

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	59
4.1. Birinci Bölüm .....	59
4.1.1. Bazik oksidasyon işlemi öncesi titanyum plakaların hazırlanması ve karakterizasyonu.....	59
4.1.1.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi .....	60
4.1.1.2. AFM analizi.....	61
4.1.1.3. Su temas açısı tayini .....	63
4.1.2. Titanyum plakaların bazik oksidasyonu sonrası karakterizasyonu .....	64
4.1.2.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi .....	65
4.1.2.2. AFM analizi.....	67
4.1.2.3. Su temas açısı tayini .....	69
4.1.2.4. Enerji saçılımlı x-ışınları (EDX) analizi.....	71
4.1.3. Anodik oksidasyon işlemi öncesi hazırlanan titanyum plakaların karakterizasyonu.....	73
4.1.3.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi .....	73
4.1.4. Titanyum plakaların anodik oksidasyonu sonrası karakterizasyonu.....	75
4.1.4.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi .....	75
4.1.4.2. AFM analizi.....	79
4.1.4.3. Su temas açısı tayini .....	80
4.1.4.4. Enerji saçılımlı x-ışınları (EDX) analizi.....	81
4.2. İkinci Bölüm .....	82
4.2.1. Bazik ve anodik oksidasyon işlemi sonrası titanyum plakaların HA ile kaplanması ve karakterizasyon çalışmaları .....	82
4.2.1.1. ATR-FTIR analizi.....	82
4.2.1.2. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi.....	83
4.2.1.3. Enerji saçılımlı x-ışınları (EDX) analizi.....	85
4.2.1.4. Mikro çizik analizi.....	87
4.2.2. Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin temelli taşıyıcı sistemlerin oluşturulması ve karakterizasyon çalışmaları .....	89
4.2.2.1. İvert mikroskop ile görüntüleme .....	90
4.2.2.2. ATR-FTIR analizi.....	92
4.2.2.3. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi .....	93
4.2.2.4. Termogravimetrik-differensiyel termal analiz (TGA).....	96
4.2.3. Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin/Melatonin inklüzyon kompleksinin oluşturulması ve karakterizasyonu.....	98

4.2.3.1. ATR-FTIR analizi.....	98
4.2.3.2. İn vitro salım çalışmaları .....	100
4.3. Üçüncü Bölüm .....	104
4.3.1. Ön hücre kültür çalışmaları .....	104
4.3.1.1. Ön hücre kültürü MTT Analizi.....	104
4.3.2. Ana hücre kültür çalışmaları .....	107
4.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi .....	108
4.3.2.2 Ana hücre kültürü MTT Analizi .....	112
5. GENEL SONUÇLAR .....	117
6. KAYNAKLAR.....	121
EK-1 .....	132
ÖZGEÇMİŞ.....	133

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

$\mu$	mikro
n	nano
M	mega
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\gamma$	gama
L	litre
M	Molar
UV	Ultraviöle ışın

### Kısaltmalar

BTCA	1,2,3,4-Bütantetrakarboksilik asit
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum klorür dihidrat
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Borik asit
HCl	Hidroklorik asit
HF	Hidroflorik asit
$\text{HNO}_3$	Nitrik asit
KCl	Potasyum klorür
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum klorür heksadhidrat
NaCl	Sodyum klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat
$\text{NaHCO}_3$	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
ATR- FTIR	Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi

DCM	Diklorometan
ECM	Hücre dışı matris
FBS	Fetal sığır serumu
HA	Hidroksiapatit
HP $\beta$ CD	Hidroksipropil-beta-siklodekstrin
HP $\beta$ CD	pH:4'deki hidroksipropil-beta-siklodekstrin
HMDS	Hekzametildisilazan
MC3T3-E1	Fare osteoblast hücre hattı
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
SBF	Yapay vücut sıvısı
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
Ti	Titanyum
TCPS	Hücre Kültür Kabı
TiO	Titanyum monooksit
TiO <sub>2</sub>	Titanyum oksit
Ti <sub>z</sub>	Zımparalanmış titanium
Ti <sub>z/A</sub>	Zımparalama sonrası anodik olarak oksitlendirilmiş titanium
Ti <sub>z/B</sub>	Zımparalama sonrası bazik olarak oksitlendirilmiş titanium
TG-DTA	Termogravimetrik-diferensiyal termal analiz
$\alpha$ -MEM	Minimum essential medium alpha modification

# 1. GİRİŞ

Biyomalzemeler, canlı dokuda oluşan hastalıklı veya hasar görmüş bölgelerin işlevini geri kazandırmak amacıyla kullanılan doğal ya da yapay malzemelerdir. Metalik biyomalzemeler özellikle kalça, diz, diş, kafatası gibi sert dokuların onarımında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Üstün mekanik özelliklerinin yanı sıra biyouyumluluğunun ve korozyon direncinin yüksek olması titanyum (Ti) ve alaşımlarını biyomedikal uygulamalarda önemli bir mühendislik malzemesi yapmaktadır. Titanyumun toksin olmaması ve manyetik özellik göstermemesinin yanı sıra hafif olması ortopedik uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanılmasını sağlamaktadır [1].

Bir biyomalzemenin başarısı malzemenin yüzey kimyasına, implante edildiği doku ile oluşturacağı ara yüzeyin özelliklerine ve biyomalzemeyi çevreleyecek olan hücrelerin yanıtına bağlıdır [2, 3]. Ancak vücuda cerrahi bir operasyonla yerleştirilen tüm yapay malzemelerde olduğu gibi Ti implantında da başarıyı etkileyecek bazı sorunlar yaşanmaktadır. Bunlardan ilki implant malzemesinin kemik doku ile bütünleşememesi, diğeri ise implant kaynaklı enfeksiyonların ortaya çıkmasıdır. Canlı doku ve implantın statik ve işlevsel olarak birleşmesine, yani canlı doku ile bütünleşmeye "osseointegration" denilmektedir [3]. Osseointegrasyon tanımı kemik hasarı ya da kaybı yaşayan hastalar için materyal ile canlı kemik dokusu arasındaki adaptasyonu ve tamir sürecini ifade etmektedir.

İmplant ile kemik arasındaki bütünleşmeyi geliştirmek için malzemenin yüzey özelliklerinin değiştirilmesinin, iyileşme cevabı üzerinde önemli bir etkisinin olduğu bilinmektedir [4, 5]. Bu amaca yönelik olarak, osseointegrasyonu arttıracak ve kemik dokusu ile implant arasındaki bağı kuvvetlendirecek birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal olmak üzere üç ana sınıfa ayrılmaktadır [6]. Fiziksel yöntemlerden en çok kullanılan zımparalama yöntemiyle yüzeyde düzenli veya dağınık oluklar mekanik olarak açılmakta, bu sayede yüzeyde nano/mikro boyutta pürüzlülük oluşturulmaktadır. Kimyasal yöntemlerden ise asidik oksidasyon, bazik oksidasyon veya elektrokimyasal oksidasyon yüzey modifikasyonunda kullanılan yöntemlerden bazılarıdır. Bu yöntemler ile pürüzlendirilmiş titanyum yüzeyler kullanılarak yürütülen çalışmalarda pürüzlülüğün osseointegrasyonu uyardığı ve hızlandırdığı ileri sürülmektedir [7, 8].



Osseointegrasyonu sağlamak için implant yüzey özelliklerinin geliştirilmesinin yanı sıra kemik doku rejenerasyonun sağlayacak kaplama yöntemleri de araştırılmaktadır. İmplant yüzeyinin, kemik dokunun temel bileşenlerinden biri olan HA ile kaplanması en sık kullanılan yaklaşım olup, implant yüzeyindeki HA'nın, malzemenin kemiğe daha iyi yapışmasında etkin rol oynadığı bilinmektedir. İlgili literatürde titanyum veya alaşımlarının HA ile kaplanması için birçok yöntem geliştirilmiştir. Sprey kaplama gibi yöntemlerde özel ekipmanlara ihtiyaç duyulurken, derişik sentetik vücut sıvısı kullanılarak titanyum yüzeyinde biyomimetik HA kaplama ekonomik ve hızlı bir şekilde elde edilebilmektedir [9].

Osseointegrasyonu iyileştirmek amacıyla çeşitli büyüme faktörlerinin malzemelere uygun yöntemlerle yerleştirilmesi de etkin bir yaklaşım olup, istenilen dozda ve sürede bu faktörlerin salımını sağlayacak ideal taşıyıcı sistemler araştırılmaktadır. Bu kapsamda lipofilik iç boşluk ve hidrofilik dış yüzeye sahip olmaları nedeniyle birçok hidrofobik molekül ile inklüzyon kompleksi oluşturma yeteneğine sahip olan siklodekstrinler dikkat çekici bir aday haline gelmiştir. Siklodekstrin molekülünün içindeki boşluğun başka bir molekül tarafından doldurulmasıyla oluşan komplekse "inklüzyon kompleksi" denilmektedir. Kompleks oluşumu sonrası misafir molekülün bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri değişebilmektedir. Örneğin oksidasyon, hidroliz ve fotokimyasal reaksiyonlara karşı dayanımı artmakta, uçucu maddelerin buharlaşma hızları önemli ölçüde azalmakta ve bunların daha kontrollü ve kademeli olarak serbest bırakılması sağlanabilmektedir. Ayrıca düşük çözünürlüğe sahip maddelerin, kompleks formundayken çözünürlükleri artmaktadır. Sahip oldukları bu özellikler nedeniyle siklodekstrinlerin melatonin gibi suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların kontrollü salım sistemlerindeki önemi giderek artmaktadır [10].

Kemik dokuda hasar meydana geldiğinde yenilenmeyi hızlandıran veya yavaşlatan faktörler mevcuttur. Bu faktörler içinde yer alan melatoninin doz miktarına bağlı olarak osteoblast hücrelerinin üremesini ve matris proteinlerinin üretimini arttırdığı, ayrıca kemik yıkımından sorumlu olan osteoklast hücrelerinin oluşumunu ve aktivasyonunu engelleyerek kemik metabolizması üzerine olumlu etki yaptığı bilinmektedir [11].

Sunulan tez çalışması kapsamında, Ti implantlarda osseointegrasyonu hızlandırmak ve etkinliğini arttırmak amacıyla, HA ve biyosinyal taşıyıcı hidrokispropil-beta-siklodekstrin (HP $\beta$ CD) esaslı, çok katmanlı bir kompozit yapının meydana getirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, ilk aşamada titanyum yüzeyinde mekanik olarak

pürüzlülük oluşturulmuş, ardından titanyumun yüzey kimyasının ve enerjisinin, biyomimetik yöntem ile HA kaplamaya daha uygun hale getirilmesi için ihtiyaç duyulan titanyum oksit (TiO<sub>2</sub>) tabakası, bazik oksidasyon ve anodik oksidasyon yöntemleriyle meydana getirilmiştir. Titanyum oksit tabakasının kemik ile bütünleşmeyi arttırdığı bilinen HA ile kaplanması için, kan plazmasındaki iyon derişimlerinin 10 katına sahip olan derişik sentetik vücut sıvısı (Simulated Body Fluid, 10xSBF) kullanılmış ve oluşturulan kaplamanın tasarlanan kompozit taşıyıcı sistemin amacına uygunluğu değerlendirilmiştir. Çalışmanın bir sonraki aşamasında, son yıllarda farmasötik endüstride kullanımıyla öne çıkan, suda az çözünen maddelerin çözünürlüğünü, çözünme hızını ve biyoyararlanımını artırmak için kullanılan, karbohidrat kökenli siklodekstrin türevi olan HPβCD suda çözünmez (çapraz bağlı) olacak biçimde HA üzerinde taşıyıcı bir polimerik tabaka halinde oluşturulmuştur. HPβCD'nin inklüzyon kompleksi yapma özelliğinden faydalanılarak, kemik metabolizması üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinen melatonin hormonu ile kompleks oluşturması sağlanmıştır. Ayrıca Ti/HA taşıyıcı tabaka üzerine HPβCD/Melatonin inklüzyon kompleksi içeren suda çözünür bir membran tabaka oluşturulmuş ve hazırlanan melatonin yüklü HA/HPβCD kompozit taşıyıcılarla kaplanmış titanyum plakaların osseointegrasyon potansiyeli, preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı ile yürütülen *in vitro* kültür çalışmaları ile incelenmiştir.

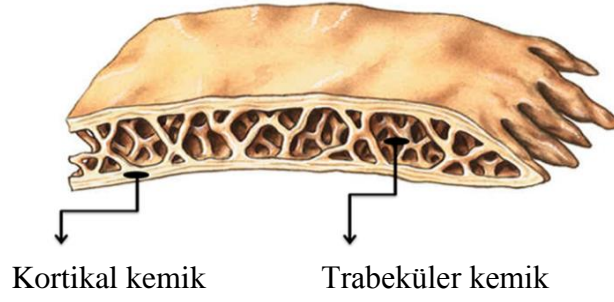
## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde yapılan tez çalışmasının temelini oluşturan konular ile ilgili literatür bilgisi yer almaktadır. İlk olarak vücut içerisinde yerleştirilen implant malzemesi ile kemik dokusu arasındaki osseointegrasyon ilişkisinden bahsedilmektedir. Kemik doku mühendisliğinde klinik uygulamaları devam eden metalik biyomalzemeler ve tez çalışma kapsamında kullanılan titanyum (Ti) implant malzemelerinin özellikleri, titanyumun implant malzemesi olarak kullanımı ve osseointegrasyonu hakkında kısaca bilgi verilmiştir. Ardından metalik biyomalzemelerde sıklıkla karşılaşılan yetersiz osseointegrasyon sorununun aşılması için uygulanan mekanik, kimyasal ve biyokimyasal yüzey modifikasyonlarından bahsedilmiştir. Yüzey modifikasyonlarında anlatılan literatür bilgisi tez çalışmaları kapsamında sınırlandırılmıştır. Ayrıca taşıyıcı sistemler olarak kullanılan siklodekstrinlerin ilgili literatürüne yer verilmiştir. Son olarak ise üzerinde halen yoğun çalışmaların devam etmekte olduğu olan melatonin hormonu ve osseointegrasyon üzerine olan etkisi hakkındaki literatür özetlenmiştir.

### 2.1. Kemik ve yapısı

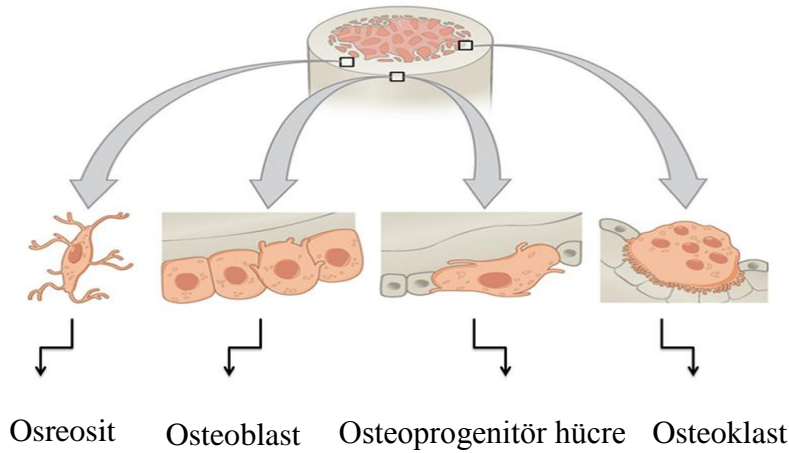
Kemik dokusu, yapısında farklı türde hücreler, lifler ve ara madde bulunduran bir bağ dokusudur. Bu bağ dokusu inorganik tuzların birikmesiyle ileri derecede özelleşerek bir destek doku halini almıştır [12]. İskelet sisteminin en önemli yapı taşı olmasının yanında vücudun diğer dokularında olduğu gibi hiyerarşik bir düzenlenmeye sahiptir. Kemik dokusu, organik ve inorganik iki bileşenden oluşmaktadır. Organik bileşenin büyük bölümü kolajen liflerden (Tip 1), proteinler ve glikozaminoglikanlardan oluşur. Organik maddeler kemik yapısına esneklik kazandırmaktadırlar. İnorganik kısımda ise kalsiyum fosfat ( $\text{CaPO}_4$ ), kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), magnezyum fosfat ( $\text{MgPO}_4$ ), kalsiyum florür ( $\text{CaF}_4$ ), kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}$ ) ve alkali tuzlar bulunur. Kalsiyum ve fosfat, hidroksiapatit kristalleri şeklindedir. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kolajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır [13].

Kemik dokusu kortikal (sıkı, kompakt) kemik olarak adlandırılan yoğun kabuk bölgesi ve trabeküler (süngerimsi) kemik olarak adlandırılan gözenekli çekirdek bölgesi olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.1) [14]. Kortikal kemik yassı kemiklerin iç ve dış yüzeylerini, uzun kemiklerin ise dış yüzeylerini oluşturan oldukça sert bir dokudur. Süngerimsi kemik ise daha yumuşaktır ve içinde kemik iliği mevcuttur.



**Şekil 2.1.** Kemik yapısının şematik gösterimi

Kemiğin yapısında osteoblast, osteosit, osteoklast ve osteoprogenitör hücre olmak üzere 4 farklı hücre tipi bulunur (Şekil 2.2). Osteoprogenitor hücreler kemikte oluşan herhangi bir hasar durumunda mitozla bölünürler ve kemik matrisini oluşturmaktan sorumlu osteoblast hücrelerine dönüşürler. Osteositler ise olgun kemik hücreleri olup, kalsiyumun kemiklerden kana verilmesinde ve hemaostatik mekanizmanın düzenlenmesinde (kalsiyum konsantrasyonunu düzenleme) görev alan kemiğin ana hücreleridir. Osteoklastlar ise kemiğin yıkımından ve rezorbsiyonundan sorumlu olan bir anlamda makrofaj çeşidi hücrelerdir [15].



**Şekil 2.2.** Kemik yapısında bulunan hücre şekilleri ve konumlarının şematik gösterimi

## 2.2. Kemik doku mühendisliği

Kemik dokusu vücuttaki en sert doku olmakla beraber kaslara ve iç organlara bağlanma bölgeleri oluşturur. Yumuşak dokuları desteklemenin yanı sıra organları korumakta, kan hücrelerinin üretiminden sorumlu kemik iliğine yataklık yapmakta, vücut sıvılarındaki kalsiyum, fosfat gibi iyonların kontrollü bir şekilde serbest hale getirilebilmelerini veya depolanabilmelerini sağlamaktadır. İnsan sağlığı için hayati önem taşıyan tüm bu görevlerine ek olarak insanların dik durmasını ve aktif hareket etmesini sağlayan kemik

dokusu, iskelet sisteminin en temel bileşenidir [16]. Travmaya bağlı hasarlar, enfeksiyon, normal olmayan iskelet gelişimi ve tümörler kemik dokuda meydana gelen önemli sağlık problemleridir. Kemik dokuda ortaya çıkan herhangi bir hasar durumunda salınan kimyasal ajanlar sayesinde hasarın tamir edilme süreci derhal başlamakta ve biyolojik mekanizmaların aktif hale gelmesiyle iyileşme süreci kısa sürede, eski halini aratmayacak biçimde tamamlanmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı kemik dokusu yapısal olarak kendini yenileyebilen aktif bir doku olma özelliği taşımaktadır [17]. Bu özelliğine rağmen kemiğin yenilenebilme kapasitesini aşan hasarlarda, kemik onarımı başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Kemik dokunun onarımı için dışarıdan müdahale gerektiren bu gibi durumlarda, hasarlı bölgeye otolog kemik nakli 'altın standart' olarak bilinmektedir [18, 19]. Ancak hem otolog uygulamalarda hem de otolog uygulamalara alternatif olarak kullanılan allogreft ve zenogreft uygulamalarında sıklıkla karşılaşılan enfeksiyon oluşumu, bağışıklık sistemi reddi gibi sıkıntılardan dolayı kemik doku mühendisliği çalışmaları önem kazanmıştır [20].

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında üç amaç üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

- 1) Kemik doku mühendisliği yaklaşımlarının mevcut durumunu sürdürmek,
- 2) Fiziksel ve kimyasal faktörlerin hücre ile biyomalzeme ara yüzeyi arasındaki ilişkisini anlamak,
- 3) Osteojenik genler, proteinler ya da hücreler ile doku iskelelerinin kemik doku rejenerasyonunu güçlendirecek farklı stratejiler geliştirmek [19].

Bahsi geçen üç yaklaşımda da doku rejenerasyonunu sağlama yeteneğine sahip hücreler, hedef dokuyu oluşturacak hücreler için indükleyici etki yapan çeşitli biyosinyaller ve hücreler için ev sahipliği yapacak uygun morfolojiye sahip, iki/üç boyutlu biyomalzemeler tek başına veya hibrit sistemler oluşturularak kullanılmaktadır [21, 22].

Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak hücrelerin dokuya uygun proteinleri ifade edebilmeleri ve istenilen dokuya farklılaşabilme kapasiteleri uygun hücre seçiminde göz önüne alınan en temel kriterlerdendir [23]. Bu nedenle kemik dokusunda sıklıkla osteoblastlar ve mezenkimal kök hücreler tercih edilmektedir. Osteoblastlar kemik dokuya özgü hücrelerdir ve hastadan cerrahi işlem ile alınan doku parçasından elde edilirler. Hastanın kendi hücreleri olmaları nedeniyle otografik uygulamalarda başarı göstermelerinin yanı sıra allografik uygulamalarda da klinikte yaygın olarak

kullanılmaktadır. Dokudan izole edilen osteoblastlar kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra hasta vücuduna nakil edilirler.

Osteoblastlar kemiğe özgü bazı proteinleri ve enzimleri sentezlemeleri sayesinde kemik yenilenmesini sağlarlar [24]. Osteoblastların olgunlaşmış hücreler olmaları nedeniyle sınırlı çoğalma yeteneklerinden ve istenmeyen fenotip oluşturma özelliklerinden dolayı yerlerine mezenkimal kök hücre kullanımı gündemdedir. Mezenkimal kök hücreler sahip oldukları farklılaşma özellikleri nedeniyle vücuttaki her uygulamada kullanım alanı bulurlar. Bunun yanı sıra elde edileceği dokular erişkin embriyonik veya fetal dokular olabilir. Mezenkimal kök hücrelerin, hücre kültür ortamına eklenen çeşitli farklılaşma faktörleri ile istenilen dokuya dönüşümü sağlanabilmektedir [25]. Osteoblastlar, erişkin ve embriyonik kök hücrelerine ek olarak yüksek çoğalma kapasitesine sahip ölümsüz fare preosteoblast hücre hattı (MC3T3-E1), insan osteosarkoma hücre hattı (SAOS-2) ve sıçan osteosarkoma hücre hattı (UMR-106) gibi osteoblast benzeri hücre dizileri de kemik doku mühendisliği çalışmalarında model hücre hattı olarak kullanılmaktadır [26-28].

### **2.3. Osseointegrasyon**

Kemik doku kaybının yaşandığı durumlarda hem fonksiyonel hem de estetik açıdan eksik olan dokunun görevini üstlenmesi için implant malzemelerin kullanımı oldukça uzun bir geçmişe sahiptir. İmplantlar, tedavi amacı ile vücut içerisine ve canlı dokulara yerleştirilen cansız malzemelerdir [29]. İmplant uygulamalarındaki temel amaç implant ile canlı ve sağlıklı doku arasında doğrudan yapısal ve fonksiyonel birleşmenin sağlanabilmesidir. Kemik doku kayıplarında ise bu ölçüt yaşayan kemik doku ile implant malzemesi arasında bütünleşmenin bir diğer deyişle "osseointegrasyonun" gerçekleşmesidir. Canlı doku ve implantın statik ve işlevsel olarak birleşmesine, yani canlı doku ile bütünleşmeye "osseointegration" denilmektedir [3]. Osseointegrasyon tanımı kemik hasarı ya da kaybı yaşayan hastalar için malzeme ile canlı kemik dokusu arasındaki adaptasyonu ifade etmektedir [30].

Osseointegrasyon kavramı, Branemark ve ark. (1985) tarafından “yaşayan kemik dokusu ile titanyum implant arasında gözlenen doğrudan temas” olarak tanımlanmıştır. Albrektsson ve ark. (1985) daha sonra bu olguyu “canlı kemik dokusu ile yükleme altındaki implant yüzeyi arasında doğrudan yapısal ve fonksiyonel bağlantı” olarak geliştirmişlerdir [31].

Osseointegrasyonu, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon terimleri ile birlikte değerlendirmek gerekmektedir. Osteoindüksiyon, osteoblast, osteoklast, osteositler gibi farklılaşmış kemik hücrelerinin yanı sıra çevre dokularda bulunan daha az farklılaşmış veya mezenkimal kök hücreler gibi farklılaşmamış kemik hücrelerinin doğru uyaranlarla preosteoblastlara dönüşmelerinin ve zamanla farklılaşarak, kemik iyileşmesinin ve osseointegrasyonun gerçekleşmesinin sağlanmasıdır. Osteokondüksiyon terimi ise vücut içerisine implante edilen malzemenin, kemik oluşumunu destekleyebilmesi olarak adlandırılabilir [31]. İmplantasyon sonrası kemik ile biyomalzeme arasında birleşmenin sağlanması için bu terimlerden bir veya birkaçının bir arada bulunması gerekmektedir.

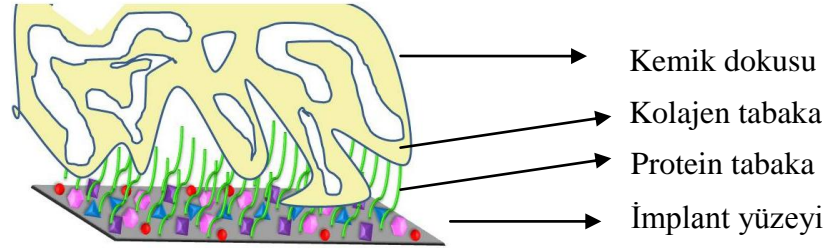
Osseointegrasyonun ölçütü, kemik ile temasta olan implant yüzeyinin yüzdesi olarak hesaplanmaktadır. Bu yüzde, Deporter ve ark. (1988) tarafından kemikle temasa geçerek biyoaktif olarak kemikle bütünleşmiş olan implantın uzunluğu (contact length fraction (CLF)) olarak tanımlanmakta ve aşağıda belirtilen şekilde formülize edilmektedir [32].

$$CLF = \frac{\text{Kemikle bütünleşmiş olan implantın uzunluğu (cm)}}{\text{Toplam implant yüzeyinin olası uzunluğu (cm)}} \times 100 \quad 2. (1)$$

Titanyum implantların etrafındaki kemik rejenerasyonu, yaralanma ya da kırık sonrası gözlenen kemik rejenerasyonuna benzemektedir. İmplant ile kemik arasındaki osseointegrasyonun oluşma mekanizması aşağıda belirtilen şekildedir.

- ✓ Aşama 1: İmplantasyondan hemen sonra hasara uğramış kan damarlarından sızan iyonlar, albümin, fibronejen, fibronektin gibi serum proteinleri ve sitokinler ortama salınarak kanın pıhtılaşması ve hasar gören damarın tamiri sürecini başlatırlar.
- ✓ Aşama 2: Bu aşamada ortama salınan trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), transforming büyüme faktörü alfa (TGF- $\alpha$ ), transforming büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) gibi büyüme faktörleri sayesinde implant yüzeyine doğru hem hücre-hücre etkileşimini hem de implant-hücre iletişimi sağlayacak fibrin ağı oluşumu sağlanır. Bu esnada makrofajlar ve lenfoid hücreler gibi immün sistem hücreleri devreye girerek olası enfeksiyona karşı implant çevresini koruma altına alırlar. Ayrıca yara atıklarının ortadan kaldırılmasını sağlarlar.
- ✓ Aşama 3: Damar geçirgenliğinin artması nedeniyle ortama geçişleri kolaylaşan ve çeşitli biyosinyallerle ortama çağrılan polimorfonükleer lökositler (PML) bakterilerin aktivitesini ortadan kaldıran reaktif oksijen ve kolajenaz gibi molekülleri ortama salarak iyileşme sürecindeki bir sonraki aşamaya geçilmesine yardımcı olur.

- ✓ Aşama 4: Bu esnada ortama makrofajlardan salınan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), PDGF ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörlerinin varlığı fibroblastları ve anjiogenez oluşumunu stimüle eder.
- ✓ Aşama 5: Kemik proteinleri implant yüzeyine tutunduktan sonra hücre ekstrasellüler matriks (ECM) yapısında bulunan kolajenöz bir matriks oluşur ve ortama salınan kemik morfojenetik protein (BMP), TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörlerinin varlığı bu ağ üzerinden osteoblastların implant yüzeyine tutunmasını ve kemik oluşumunu sağlamasına yardımcı olur. İmplant yüzeyinde oluşan osteoblastları içeren bu bağ dokuya kallus adı verilir.
- ✓ Aşama 6: Yüze tutunan osteoblastların kendi organik ve inorganik matrisini oluşturması sonrasında implant çevresinde optik mikroskop altında görülebilen yeni kemik oluşumu sağlanmış olur.
- ✓ Aşama 7: Bu oluşum implant yüzeyinde ince bir protein tabakası, onun üzerinde kolajenden oluşan bir ağı tabaka ve en üstte yeni kemik dokusu sıralamasıyla görülmektedir. Şekil 2.3'te vücut içine yerleştirilen implantın yüzeyinde meydana gelen bu sıralama şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 2.3.** İmplant yüzeyi ile kemik dokusu arasında oluşan biyokimyasal şematik görünümü

- ✓ Aşama 8: Kemik oluşumu 3–4 ay kadar devam eder. Son aşamada oluşan süngerimsi kemik, kompakt kemik ile yer değiştirir [33, 34]. Şekil 2.4'de tüm bu aşamalar gösterilmiştir.





**Şekil 2.4.** Kemik ile implant malzemesi arasında gerçekleşen osseointegrasyon süreci ve implantın etrafındaki kemik rejenerasyonu.

Osseointegrasyon temelde anlatılan gibi gerçekleşse de implant malzemesine karşı verilen biyolojik cevaplar biyotolere, biyo inert ve biyoaktif tip olmak üzere 3 grup altında toplanır.

➤ İmplant çevresinin fibröz doku ile çevrili olduğu, fakat doku reddinin yaşanmadığı durumlar **biyotolere tip**,

➤ İmplant yüzeyine doğrudan osteojenik hücrelerin göçünün yaşandığı ve yeni kemik oluşumunun sağlandığı durumlar **biyo inert tip**,

➤ Yeni kemik oluşumunun implant çevresinde olduğu ve implantın da bu doku ile iyon değişimleri yardımıyla kimyasal bir bağ oluşturduğu durumlar ise **biyoaktif tip** olarak tanımlanmaktadır [35].

İmplantın osseointegrasyondaki başarısızlığının sebebi, başlangıç iyileşme safhasındaki yeni kemik oluşumu yerine fibröz doku oluşumudur. Başarılı bir integrasyonu sağlamak için bazı faktörler mevcuttur. İmplantasyon sırasında kemik bölgesinde yerel sıcaklığın 39°C'den fazla olduğu durumlarda kemiğin canlılığının kaybolmasından dolayı malzeme ile kemik doku arasında istenilen bütünleşme sağlanamamaktadır [36]. Cerrahi işlem sırasında gösterilecek hassasiyet ve klinisyenin tecrübesi bu durumun önüne geçilmesinde ve osseointegrasyonun başarısında önemli bir rol oynamaktadır. İmplantın sterilizasyonu, cerrahi işlem ve sonrası oluşacak enfeksiyon riskinin en aza indirilmesi ve implant yüzeyi üzerinde meydana gelecek yeni kemik doku oluşumu için önemli bir faktördür [37]. Ayrıca yaşa bağlı olarak kemik dokuda sayısı artan ölü osteositlerin, azalmış vaskülaritenin ve

hücreyel içeriğin osseointegrasyonda etkisi olduğu düşünülmektedir. Sigara kullanımına ek olarak [38] osteoporoz, diyabet ve aşırı radyasyona maruziyet [39] gibi durumların implantın kemik ile bütünleşmesini engelleyebilecek etkin roller oynadığı bilinmektedir [40-42]. Ayrıca malzemenin toksisitesi, mekanik dayanımı, biyouyumluluğu, metal ise oksitlenebilme kapasitesi gibi karakteristik özellikleri osseointegrasyonun temel başarı kriterlerindedir. Osseointegrasyonun sağlanmasında cerrahi teknik, implant malzemesi ve implant tasarımının yanı sıra, yüzey kimyası, yüzey pürüzlülüğü, yüzey topografi ve yüzey enerjisi gibi yüzey özelliklerinin de önemli olduğu bilinmektedir [43]. Yüzey özelliğinde yapılacak değişikliklerle yüzey alanının artırılması veya yüzey enerjisinin değiştirilmesi ile malzeme ile kemik arasındaki osseointegrasyon iyileştirebilmektedir [44].

#### **2.4. Metalik biyomalzemeler**

Biyomalzemeler, doğal ya da yapay kaynaklardan elde edilen ve doku hasarı veya kaybının yaşandığı durumlarda insan vücudundaki her noktaya uygulanabilen, kaybedilen dokunun fonksiyonunu kısmen sağlayan ve hasta için belirli bir süre ya da ömür boyu kullanılabilen malzemelerdir. Biyomalzemeler, kullanılacak dokunun fizyolojisine uygun olarak metaller, seramikler, doğal ya da yapay polimerler ve bunların kompozit yapıları olmak üzere 4 gruba ayrılır. Kemik doku uygulamalarında genelde mekanik dayanımın sağlanması açısından metal ve seramik esaslı biyomalzemeler tercih edilse de, polimerik esaslı uygulamalar üzerine olan çalışmalar oldukça yoğundur. Bununla birlikte, metal-polimer veya polimer-metal kompozit biyomalzemeler de tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır [45].

Metalik biyomalzemeler biyouyumluluklarının düşük olması, korozyona uğramaları, dokulara göre çok sert olmaları, yüksek yoğunlukları ve alerjik doku reaksiyonlarına neden olabilecek metal iyonu salımı gibi dezavantajlara sahiptir. Tüm bunlara rağmen, kristal yapıları ve sahip oldukları güçlü metalik bağlar nedeniyle üstün mekanik özellikler taşıyan; Titanyum (Ti) ve titanyum alaşımları, paslanmaz çelikler, altın (Au) ve kobalt (Co) gibi metal ve metal alaşımlarının biyomalzeme alanındaki payı oldukça büyüktür [46].

Biyomalzeme olarak yaygın kullanılan paslanmaz çelik 316L olarak bilinir. “L”, karbon içeriğinin düşük olduğunu belirtmek için eklenmiştir. 316L'nin, %60-65'i demir (Fe) olup, %17-19 krom ve %12-14 nikelten oluşur. Yapısında az miktarda azot (N), mangan (Mn), silisyum (Si), kükürt (S), fosfor (P) ve molibden (Mo) de bulunur. Kobalt-krom (Co-Cr) alaşımları temel olarak Co-Cr-Mo alaşımı ve Co-Ni-Cr-Mo alaşımı olmak üzere iki türdür.

Co-Cr-Mo alaşımı, uzun yıllardan beri dişçilikte ve son zamanlarda yapay eklemlerin üretiminde kullanılmaktadır. Co-Ni-Cr-Mo alaşımı ise daha yeni bir malzeme olup, fazla yük altındaki eklemlerde (diz ve kalça gibi) ve protezlerde kullanılmaktadır. Bu tür alaşımların bileşimleri, temel olarak ağırlıkça %65 Co ve geri kalanı Cr'dan oluşur. Daha iyi tanecik elde etmek için yapıya Mo eklenir. Co içeren alaşımların elastik modülü, paslanmaz çeliğinkinden daha büyüktür. Çizelge 2.1 de sert doku mühendisliğinde, klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılan bazı metalik implantlar ve kemiğin mekanik özellikleri karşılaştırılmıştır.

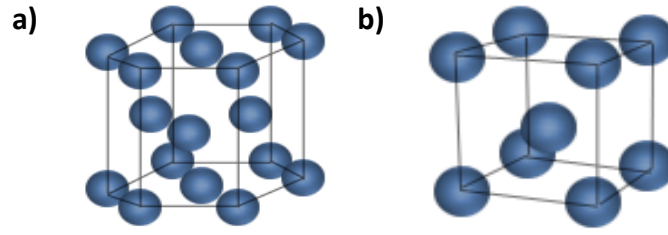
**Çizelge 2.1.** Metalik implantların ve kemiğin mekanik özellikleri [47].

Malzeme	Çekme Dayanımı (MN/m <sup>2</sup> )	Akma Dayanımı (MN/m <sup>2</sup> )	Young Modülü (MN/m <sup>2</sup> )	Yorulma Limiti (MN/m <sup>2</sup> )
<b>316L Paslanmaz Çelik (Tavlanmış)</b>	650	280	211	0.28
<b>Dövme Co-Cr Alaşımları</b>	1540	1050	541	0.49
<b>Dökme Co-Cr Alaşımları</b>	690	490	241	0.30
<b>Titanyum</b>	710	470	121	0.30
<b>Ti-6Al-4V</b>	1000	970	121	-
<b>İnsan Kemiği</b>	137.3	-	30	-

Metalik biyomalzemeler eklem protezi, diş implantında ya da kalp-damar cerrahisinde yapay kalp parçaları, kateter, vana ve kalp kapakçığı olarak kullanılmaktadırlar. Teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan biyomedikal cihazların üretiminde de metalik biyomalzemeler tercih edilmektedir [46]. Fiziksel ve kimyasal açıdan üstün özellikler gösteren titanyum ile ilgili aşağıda daha detaylı bilgi sunulmuştur.

#### **2.4.1. Titanyum ve alaşımları**

Titanyum oda sıcaklığında sıkı dizilmiş hekzagonal kafes yapısına sahip, parlak ve beyaz bir metaldir. Saf Ti oda sıcaklığında  $\alpha$  olarak adlandırılan sıkı paket hekzagonal yapıdadır. Yüksek sıcaklıklarda hacim merkezli kübik yapıya geçer ve  $\beta$  Ti olarak adlandırılır (Şekil 2.5). Bu geçiş sıcaklığı yaklaşık 882.2°C dir [48, 49]. Ti, çelik kadar güçlü ancak %45 daha hafiftir. Çizelge 2.2 de titanyumun kimyasal özellikleri verilmiştir.



**Şekil 2.5.** Titanyumun kafes yapıları: (a) Sıkı paket hegzagonal yapıdaki  $\alpha$  Ti, (b) Hacim merkezli kübik yapıdaki  $\beta$  Ti.

Titanyum alaşımlama işlemleri sonrasında istenilen bileşimde hazırlanabilir. Günümüzde yüzden fazla Ti alaşımı bilinmektedir. Bunların 20–30 kadarı ticari statüdedir. Ticari Ti alaşımlarının kullanımının %50’den fazlasını  $\alpha$ + $\beta$  alaşımı olan Ti-6Al-4V teşkil etmektedir [50]. Havacılık, kimya, otomotiv ve biyomedikal endüstride geniş ölçüde kullanım alanı bulan bu metalin, oksit oluşturabilme kapasitesi onu ön plana çıkaran en önemli özelliğidir.

Titanyumun yüksek korozyon direnci, bulunduğu ortamda oksijen ile tepkimeye girerek milisaniyede yoğun bir doğal oksit tabakası oluşturmasından kaynaklanmaktadır [51]. Bu özellik onu seramiklere benzetilmesine neden olan eşsiz bir özelliğidir.

**Çizelge 2.2.** Titanyumun kimyasal özellikleri.

<b>Yoğunluk</b>	4.5 g/cm <sup>3</sup>
<b>Özgül ısı (15°C' de)</b>	0.52 kJ/kg K
<b>Kaynama noktası</b>	3600°C
<b>Erime ısısı</b>	419 kJ/kg
<b>Dönüşüm ısısı</b>	67 kJ/kg K
<b>Dönüşüm sıcaklığı (<math>\alpha</math> <math>\beta</math>)</b>	882.2°C
<b>Isıl iletkenlik (20°C'de)</b>	17 W/mK
<b>Isıl genleşme katsayısı (20-200°C'de)</b>	9x10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
<b>Özdirenç (20°C'de)</b>	0.5 $\mu\Omega$ m

## Çizelge 2.2'nin devamı Titanyumun kimyasal özellikleri

<b>Elastik modül</b>	100–110 GPa
<b>Manyetik özellik</b>	Paramanyetik

Ticari saflıktaki Ti az miktarda oksijen, demir, karbon, azot ve hidrojen elementlerini içerir. Kimyasal yapıdaki bu küçük farklılıklar malzemenin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde büyük etki yaratmaktadır. Örneğin karbon, demir ve hidrojenin varlığı mekanik ve fizikokimyasal özelliklerde iyileşmeye neden olur.

### 2.4.2. Biyomalzeme olarak titanyum kullanımı

Biyomedikal alanda Ti ve Ti alaşımlarının kullanımı neredeyse yüz yıllık geçmişe sahiptir. Titanyumun kararlılığı, manyetik olmaması, 316 paslanmaz çelik ve kobalt alaşımlarına göre çok daha hafif olması, yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olması, mekanik dayanımı ve korozyon direnci gibi avantajları sayesinde biyomedikal uygulamalarda kullanım oranı oldukça yüksektir [48]. Vidalar, diz eklemleri, stentler gibi ortopedik alanda ve dişçilik uygulamalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Ticari saflıktaki Ti (commercial pure, cpTi) ve Ti-6Al-4V en çok kullanılan Ti çeşitleridir [52].

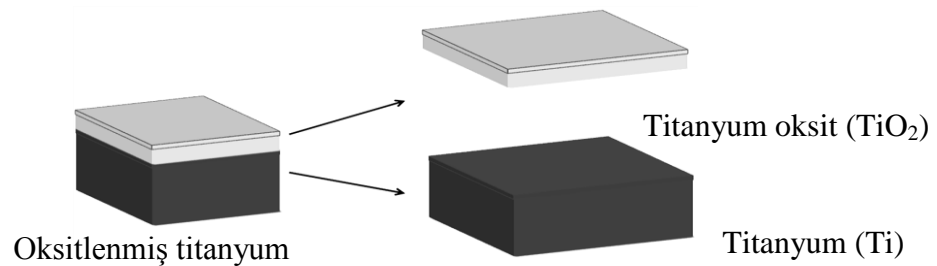
Bir malzeme istenilen biyolojik özellikleri taşıması durumunda, fiziksel ve kimyasal açıdan mükemmel olsa dahi biyomedikal anlamda kullanımı mümkün değildir. Bu noktada *in vitro* sitotoksikite testleri, kanla etkileşim testleri, genotoksikite, biyobozunurluk ve iritasyon testleri ve hayvan çalışmaları ile malzemenin biyolojik anlamda uyumluluğu, bir başka deyişle biyoyumluluğu tespit edilir [2]. Biyoyumluluk, implant malzemesinin hem yapısal hem de yüzeysel anlamda fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan optimum uyumu göstermesidir [49].

Saf Ti'un vücut implant malzemesi olarak kullanımı biyoyumluluktan kaynaklanan sorunlar nedeniyle sınırlıdır [53]. Bununla birlikte medikal alanda en çok kullanılan Ti-6Al-4V gibi Ti alaşımları özellikle mekanik açıdan istenilen özellikleri sağlamaktadır. Fakat ilgili literatür incelendiğinde vücut içerisindeki aşırı korozif koşullara maruz kalan Ti alaşımlarında belirli bir süreden sonra malzemedeki çevre dokuya vanadyum gibi iyonların geçişinin gerçekleştiği, bunun da toksik etki yarattığı, ayrıca sistemik dolaşıma katılan bu metallerin Alzheimer gibi sinir hastalıklarının yanı sıra kemik yumuşaması gibi sağlık problemlerine neden olduğu belirtilmiştir [54]. Cremasco ve ark. (2011) molibden ( $Mo^{+6}$ ), alüminyum ( $Al^{+3}$ ), bakır ( $Cu^{+2}$ ) ve kalay ( $Sn^{+2}$ ) gibi metaller içeren ticari olarak

satılan Ti alaşımlarıyla yaptıkları çalışmalarda sadece  $\text{Cu}^{+2}$  içeren Ti alaşımlarında çevre dokuya iyon geçişinin oldukça yoğun olduğunu ve bu durumun hücre üremesini azalttığını, diğer elementlerin varlığının ise toksik etki göstermediğini belirtmiştir [55]. Fakat Geurtsen (2002), vanadyum ( $\text{V}^{+5}$ ) iyonu içeren Ti implantlarının kısa dönemde bir etki göstermemesine rağmen uzun dönemde toksik etki gösterdiğini ileri sürmüştür [56]. Bu nedenle toksik etki yapmayan Ti alaşımlarının medikal açıdan kullanım potansiyeli üzerine araştırmalar devam etmektedir.

Titanyum ve Ti alaşımları oldukça reaktif metallerdir ve buda onlarda istenilen birçok özelliğin oluşmasına neden olmaktadır. Titanyum oksijence zengin bir ortama maruz kaldığı anda oldukça dirençli ve kararlı bir oksit katmanı ( $\text{TiO}_2$ ) oluşur [57]. Şekil 2.6'da Ti ve  $\text{TiO}_2$  tabakasının şematik gösterimi sunulmuştur.

Vücut içerisine yerleştirilen metalik implantların korozif şartlardan dolayı aşınması sonrası çevre dokuya saldıkları metal iyonları nedeniyle toksik etki yaratması sorunu, yüzeyde oluşan  $\text{TiO}_2$  katmanının sayesinde ortadan kaldırılmaktadır. Bu durum oksit katmanının bariyer görevi görmesi sayesinde metal iyonlarının çevre dokuya geçişini engellemesi ile meydana gelir. Ayrıca bu özellik Ti ve Ti alaşımlarını korozyona karşı dirençli malzemeler haline getirerek vücut içerisinde aşınmasını engellemektedir. Üstelik bu oksit katmanı hücre-implant etkileşiminde hidrofilik özelliği arttırdığından dolayı hücre büyümesine ve farklılaşmasına izin verir. Majeed ve ark. (2015), yüzeyi oksitlendirilmiş ve hiç işlem görmemiş Ti örnekleri karşılaştırdıkları çalışmalarında, yüzeyde sentetik olarak oluşturulan  $\text{TiO}_2$  katmanından dolayı artan hidrofilitenin hücre tutunması, yayılması ve üremesi üzerinde etkisi olduğunu vurgulamışlardır [58]. Ayrıca bu oksit tabakası hücrelerin malzeme yüzeyine yapışmasını desteklemekle kalmayıp, malzemenin biyouyumluluğunu arttırmada kullanılan apatit kaplamada, yüzeyinde bulunan  $\text{OH}^-$  ve  $\text{O}^{2-}$  grupları sayesinde çekirdeklenmeyi hızlandırmakta ve polimer tutunmasını desteklemektedir. Yüzey enerjisini arttırdığı bilinen bu tabaka osseointegrasyonda önemli rol oynamaktadır [43, 59, 60].

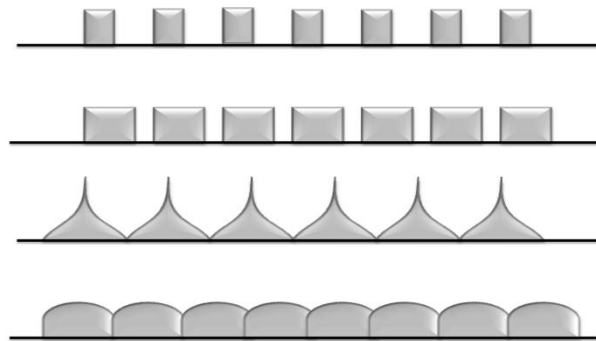


**Şekil 2.6.** Titanyum ve oksitlenmiş titanyumun şematik gösterimi

### 2.4.3. Titanyum ve alaşımlarının yüzey modifikasyonu

İmplant edilen malzemenin yüzey özellikleri biyolojik yanıtta son derece önemli bir rol oynar. Malzemenin yüzey özelliğinin hücre yapışmasında, çoğalmasında ve farklılaşmasında etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda yüzey özellikleri çeşitli değişikliklere uğratılmış Ti implantların, pürüzsüz Ti yüzeylere oranla çok daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir [61]. Bu nedenle Ti implantın yüzeyinde yapılacak modifikasyonlar ile biyoyumluluğun ve osseoindüksiyon ile osseokondüksiyon kapasitesinin artırılması amaçlanmaktadır [5].

Ticari olarak üretilen Ti yüzeyinde homojen yapıda olmayan, sıkıştırılmış ve plastik deformasyona uğramış kirlili bir oksit tabakası bulunmaktadır. Bu tür doğal oksit yüzeyler sahip oldukları düşük yüzey enerjisi nedeniyle kemik dokusu ile sıkı bağlantılar kuramazlar ve biyomedikal uygulamalar için uygun değildirler. Bu nedenle Ti yüzeylerde modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Uygun yüzey modifikasyon teknikleri ile Ti'a daha büyük yüzey alanı, nispeten daha düşük Young modülü, daha uzun yorulma ömrü, şekil alabilirlik ve işlenebilirlik gibi özellikler kazandırılabilir [52]. Modifikasyon yöntemleri, mekanik, kimyasal, fiziksel ve biyokimyasal yöntemler olmak üzere dörde ayrılır [6]. Bu modifikasyon yöntemleri tek başlarına kullanılabildikleri gibi birkaç yöntemin bir arada bulunduğu kombinasyonlar halinde de uygulanabilir. Bu yöntemler ve kullanım amaçları Çizelge 2.3'de açıklanmıştır. Şekil 2.7'de implant yüzeylerinde oluşturulan bazı motifler gösterilmiştir. Mekanik ve fiziksel yöntemler, fiziksel güçler yardımıyla yüzeyin şekillendirildiği metotlardır. Titanyumun kimyasal yapısında özellikle de yüzey tabakasında modifikasyonlar yapmak için ise kimyasal ve biyokimyasal yöntemler uygulanır.



**Şekil 2.7.** Kimyasal, fiziksel veya mekanik yöntemlerle yüzeyde oluşturulan bazı yüzey motifleri.

**Çizelge 2.3.** Yüzey modifikasyon yöntemleri ve modifikasyon amacı.

Yüzey modifikasyon yöntemleri	Modifiye edilen katman ve hedef
<b>Mekanik modifikasyon yöntemleri</b>	
Tornalama	Aşındırma ile temiz ve pürüzlü bir yüzey eldesi
Zımparalama ve parlatma	
Kumlama	
<b>Kimyasal modifikasyon yöntemleri</b>	
Asidik işlem	Yüzeyde 10 nm'den küçük oksit pullarının ve kirliliklerinin giderilmesi ve pürüzlü yüzey eldesi
Alkali işlem	~1 µm kalınlığında sodyum titanat jel elde ederek biyouyumluluğu artırma
Hidrojen peroksitli işlem	~5 nm kalınlığında yoğun inert oksit ve poröz dış katman elde ederek biyouyumluluğu artırma
Sol jel	~10 µm kalınlığında kalsiyum fosfat gibi ince film veya TiO <sub>2</sub> tabakası oluşturarak biyouyumluluğu artırma
Anodik oksidasyon	~10 nm ile 40 µm arası kalınlıkta TiO <sub>2</sub> tabakası üreterek özgün yüzey topografisi oluşturma ve biyouyumluluğu
Kimyasal Buhar Biriktirme(CVD)	~1 µm kalınlığında titanyum nitrit (TiN), titanyum karbonitrit (TiCN), elmas ve elmas benzeri karbon film ile aşınma direncini, korozyon dayanımını ve kanla uyumluluğunu arttırmak
<b>Fiziksel modifikasyon yöntemleri</b>	
Termal püskürtme	~30 ile ~200 µm arası kalınlıkta titanyum, hidroksiapatit (HA), kalsiyum silikat, alüminyum oksit (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), zirkonyum dioksit (ZrO <sub>2</sub> ), TiO <sub>2</sub> kaplama sayesinde aşınma direncini, korozyon dayanımını ve biyolojik özellikleri artırma
Alev püskürtme	
Plazma püskürtme	
Buharlama	Elmas ve elmas benzeri karbon kaplama aracılığıyla dayanımını ve kan uyumluluğunu arttırmak
İyon kaplama	
Sıçratma	
<b>Biyokimyasal modifikasyon yöntemleri</b>	Spesifik hücreleri yüzeye yapışmaya sevk etmek



#### **2.4.4. Mekanik modifikasyon uygulamaları**

Mekanik yüzey modifikasyonları, malzemenin kesici ve aşındırıcı yapıda olan bir başka katı ile uygulanan fiziksel kuvvetler sonucu madde kaybına uğratılması veya şekillendirilmesi işlemleridir [6].

Tornalama, paslanmaz çelikten bir kesme aparatı ile metal yüzeyinde morfolojik değişiklikler yapmayı sağlayan bir yöntemdir. Kumlama da ise, malzeme yüzeyine kum olarak tabir edilen ve mikron boyutlarında olan partiküller basınçlı hava ile püskürtülür ve yüzeyde mikron mertebesinde izler oluşması sağlanır. Metal yüzeylere uygulandığında çeşitli tepeler ve vadiler oluşturan bu kum tanecikleri çözücüler yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılabilir [62]. Pratik bir yöntem olmasına rağmen kumlama işlemi uygulanmış Ti yüzeylerde oksit tabakasının kalınlığı ve bileşimi hakkında net bir bilgiye ulaşılamamıştır.

Zımparalama ve parlatma işlemleri ise temelde aşındırıcı bir aparat ile yüzeyden madde kaldırılması esasına dayanan, prensipte birbirine benzer işlemlerdir. Zımparalama işleminde kaba boyutta tanecikler içeren plakalar kullanılarak daha hızlı madde kaybı ve daha pürüzlü topografiler elde edilir. Parlatma işleminde ise gittikçe incelen aşındırıcı tanecikler içeren plakalar seri biçimde uygulanır. Eğer, zımparalama işlemi tek yönde uygulanırsa belli bir yöne sahip topografi oluşturacağından hücre-implant etkileşiminde hücrenin tek bir yöne yönelmesine neden olur. Kullanılan aşındırıcı tanecikler genellikle silisyum karbür (SiC), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve elmas esaslıdır. En ince boyutta aşındırıcı tanecikler kullanıldığında ayna parlaklığında yüzeyler elde edilebilmektedir.

Mekanik işlemler sırasında açığa çıkan ısı ve kullanılan çeşitli kimyasallar nedeniyle yüzeyin kimyasal bileşimi ve oksit tabakanın içeriği değişebilmektedir. Fakat bu işlemler genellikle elektro-kimyasal veya diğer metotlardan önceki ara basamağı oluşturduğundan, bu durumlarda uygulanan son yüzey işlemi yüzeyin kimyasal özelliklerini belirlemektedir.

#### **2.4.5. Kimyasal modifikasyon uygulamaları**

Kimyasal yöntemlerdeki temel amaç malzemeye biyoaktif yüzey özelliği kazandırarak biyouyumluluğun artırılması, korozyon direncinin sağlanması ve olası kirliliklerin uzaklaştırılmasıdır [63]. En yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntemler, asit ve alkali aşındırıcıdır. Fakat gelişen tekniklerle doğru orantılı olarak anodizasyon yöntemi son zamanlarda sıklıkla kullanılan yöntemler arasında yerini almıştır.

Asidik koşullarda yapılan yüzey modifikasyonlarında hidroklorik asit (HCl), sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) ve hidroflorik asit (HF) gibi güçlü asitler kullanılmaktadır.

Asitleme ile implant yüzeyinde oluşturulan mikron mertebesindeki pürüzlülüğün osseointegrasyon hızında önemli etkisinin olduğu bilinmektedir. Deneysel çalışmalarda, asitleme ile pürüzlendirmenin, düz yüzeylere oranla daha fazla kemik-implant teması sağladığı ve kemik rezorpsiyonunu azalttığı görülmüştür [64]. Asitle aşındırma işlemi sonunda genellikle 10 nm'den düşük kalınlıklarda ince oksit tabakası oluşumu görülmektedir. Oksit bileşiği çoğunlukla TiO<sub>2</sub>'den oluşur. Khan ve ark. (2012), mezenkimal kök hücreler ile yaptıkları çalışmalarda, asit ile muamele ettikleri Ti yüzeylerde, zımparalanan ve hiç işlem görmemiş yüzeylere oranla hücre mineralizasyonunun, farklılaşmasının ve üremesinin daha iyi sonuçlar verdiğini tespit etmişler ve yüzeydeki mikron mertebesindeki pürüzlülüğün hidrofilitiyi ve yüzey enerjisini değiştirmesinden dolayı hücre davranışını etkilediğini vurgulamışlardır [65].

#### 2.4.5.1. Alkali uygulamalar

Alkali çözeltilerle yapılan yüzey modifikasyonlarında sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH) gibi kuvvetli bazlar yardımıyla ısı verilerek yüzeyde oksit tabakası oluşturulur hem morfolojik hem de kimyasal modifikasyon gerçekleştirilir. Titanyum oksit tabakası Ti üzerine kaplanan polimerlerin daha iyi yapışmasına veya plazma püskürtme veya çekirdek apatit ile kaplama yöntemlerinde HA oluşumuna katkıda bulunmaktadır [52]. Kim ve ark. (1997), NaOH ile yüzeyde oluşturulan TiO<sub>2</sub> tabakasının apatitik çekirdeklenmeyi hızlandırdığı ve kaplama kararlılığını arttırdığını tespit etmiştir [66].

Alkali muamele sırasında, yüzey üzerinde bulunan ve farklı içeriğe sahip doğal koruyucu oksit tabakası kısmen alkali çözelti içerisinde çözünmektedir (2.2). Alkali titanat hidrojel tabakasını oluşturmak üzere negatif yüklenmiş HTiO<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O ve alkali çözeltinin iyonları bir araya gelirler. Bu esnada uygulanan ısı sayesinde hidrojel formunda olan tabaka dehidratasyona uğrayarak amorf veya kristalin formda kararlı alkali titanat tabakası oluşur. Aşağıda bu titanat tabakasının reaksiyon basamakları gösterilmektedir (2.3, 2.4, 2.5 ve 2.6). Bu sayede daha kontrollü, içeriği homojen ve istenilen kalınlıkta titanyum oksit tabası elde etmek mümkün olmaktadır [52, 67].



Bu reaksiyonun titanyumun hidrasyonu ile aynı anda olduğu ileri sürülmektedir.

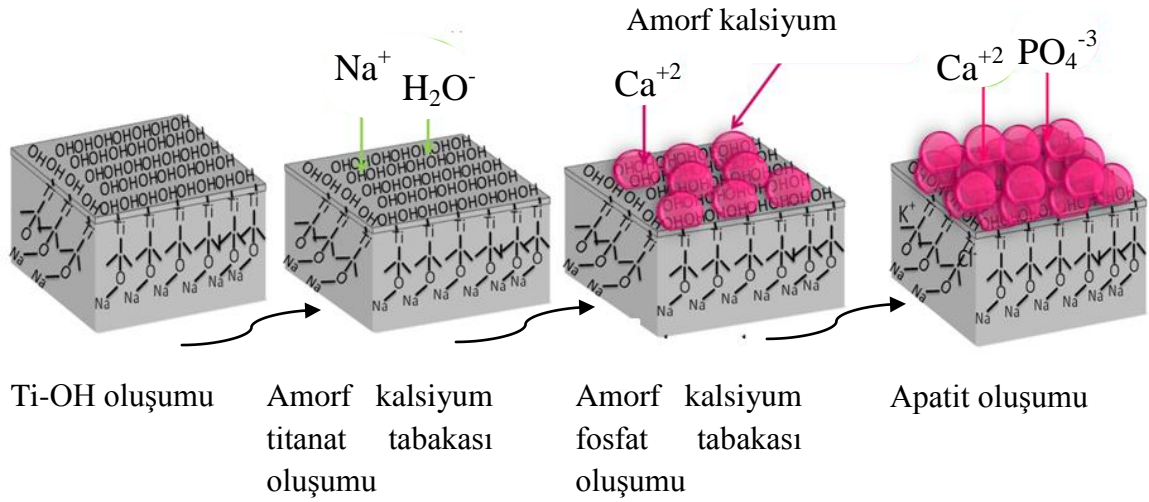




Hidratlanmış  $\text{TiO}_2$ 'e hidroksil grubu ataklarının sürmesi üzerine subsrat yüzeyinde negatif yüklü hidrat oluşur.



Titanat tabakasının biyoaktif kemik benzeri apatit tabakası oluşumunda önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Apatit oluşumu, çözelti içerisindeki iyonlar ve fonksiyonel gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimler ile oluşan karmaşık bir süreçtir. Alkali çözelti ile muamele sonrasında oluşan titanat tabakası yapay vücut sıvısı ile etkileştirildiğinde yüzeyde negatif yüklü Ti-OH oluşur. Oluşan bu yapı çözelti içerisinde bulunan  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarıyla birleşerek yüzeyi pozitif yüklü hale getirir. Yüzeyde oluşan pozitif yüklü tabaka çözelti içerisinde bulunan negatif yüklü fosfat iyonlarıyla bir araya gelerek amorf kalsiyum fosfat tabakasını oluştururlar. Oluşan bu tabaka yapay vücut sıvısı içerisinde daha kararlı yapıda bulunan apatit formuna dönüşür (Şekil 2.8). Oluşan bu apatit tabakasının hücre tutunmasında, büyümesinde ve farklılaşmasında önemli rolü bulunmaktadır [52, 68, 69].



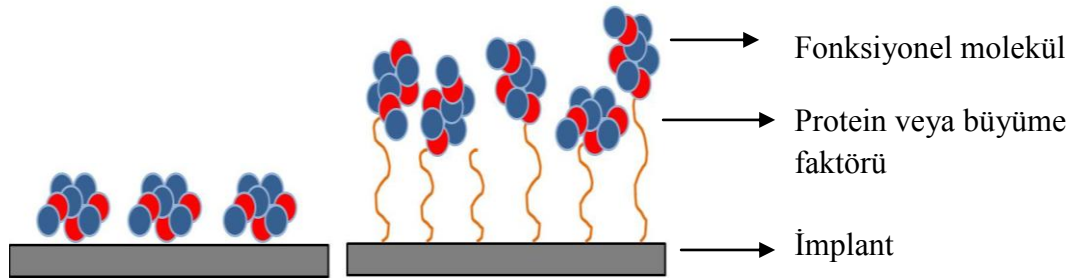
#### 2.4.6. Biyokimyasal modifikasyon uygulamaları

Sitokinler, büyüme faktörleri ve integrinler kemik hücreleri ile doğrudan etkileşime geçmekte ve hücrelerin göçünü, büyümesini, ayrıca tutunma ve farklılaşma davranışlarını etkileyebilmektedir. İmplantasyon sonrası implantın çevresi iyonlar, proteinler, biyomoleküller, kan hücreleri gibi birçok farklı yapı tarafından sarılmaktadır. Bu yapılar hedef hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere bağlanarak etkinliklerini

göstermektedirler. Bu nedenle doku ile implant malzemesi arasında oluşacak ilişki malzeme üzerine yapışan proteinlerin içeriğiyle doğrudan etkilenmektedir. İmplant malzemesi üzerine peptitlerin, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), TGF- $\beta$ , BMPs ve PDGF gibi çeşitli büyüme faktörlerinin immobilizasyonu ile yapılan biyokimyasal modifikasyonlar sayesinde hücrenin vereceği yanıtı olumlu yönde etkileyen sistemler geliştirilmektedir [70, 71].

İmplant yüzeyinden moleküllerin kontrollü salımı için fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlanma ve taşıyıcı sistemler olmak üzere üç sistem üzerinde çalışılmaktadır [6]. Fiziksel adsorpsiyon elektrostatik etkileşimler ve van der Waals güçleriyle spontan olarak gerçekleşir ve implantın yüzey özelliklerine bağlı olarak moleküllerin yüzeye tutunması olarak tanımlanmaktadır.

Bu sistemin en büyük sorunu kontrollü bir adsorpsiyon ve salıma izin vermemesidir. Bu tip sistemler "burst release" olarak adlandırılan ani salıma neden olduğundan klinik uygulamalarda uygulanabilirliği çok yaygın değildir. Biyomalzemelere proteinlerin ve büyüme faktörleri gibi moleküllerin fiziksel adsorpsiyonu, yüksek alan/hacim oranı sağlamak ve yüzeydeki bu değişim doğrudan yüzey enerjisini de etkilemektedir (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9.** Biyokimyasal olarak modifiye edilen implant yüzeyinin şematik görünümü.

Yüzeyi hücreler için çekici hale getirmenin diğer bir yolu ise kolajen, osteopontin, fibronektin ve Arg-Gly-Asp (RGD) gibi hücre yapışma proteinlerinin ve peptit sekanslarının yüzeye kovalent olarak bağlanmasıdır. Bu tür yapılar yüzeye hidroksil ( $\text{OH}^{-1}$ ) ya da amin ( $=\text{NH}^{+2}$ ) grupları üzerinden bağlanmaktadır [72, 73].

Biyoişlevlendirmede kullanılan bir diğer yaklaşım ise hidrojeller, polilaktid, poliglitolik asit, polipirol ve kalsiyum fosfat/HA kaplama ve siklodekstrinler gibi yapılarla istenilen biyosinyal molekülün salımını sağlayacak taşıyıcı sistemlerin oluşturulmasıdır. Diğer sistemlerin aksine yavaş ve kontrollü salımın gerçekleştiği bu sistemler fizyolojik

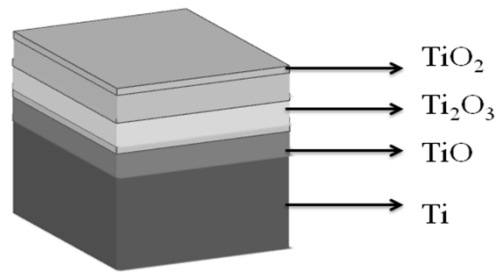
koşullarda davranış değişikliği yapacak biçimde akıllı sistemler olarak da tasarlanabilmektedirler [74].

#### 2.4.7. Titanyum yüzeyini kaplama yöntemleri

Bir malzemenin davranışını belirleyen kriter aslında onun yüzeyinin nasıl davrandığıdır. Bu nedenle yüzeyinde yapılacak iyileşmeler malzemenin genel profilinin değiştirilmesine yardımcı olur. Titanyum yüzeyinde yapılacak değişiklikler genellikle iki sorunun çözümüyle ilgilidir. Bunlardan bir tanesi malzemenin kemik-implant ara yüzeyinde yeni kemik yapımını arttırmaya ve titanyuma osteokondüktif özellik kazandırmaya yönelik çalışmalardır. Diğeri ise tüm metalik implantlarda görülen enfeksiyon oluşumu sorunudur. Yaşayan bir kemik dokusu ile bağ yapacak olan bir malzemenin yüzeyindeki bu engellerin ortadan kaldırılması için biyouyumluluğu destekleyecek titanyum oksit veya kalsiyum fosfat tabakalarının varlığı yada biyokimyasal olarak modifiye edilmiş ve kontrollü salıma olanak vererek hücrenin tutunmasını ve çoğalmasını destekleyecek bir polimer kaplaması uygulanabilmektedir.

##### 2.4.7.1. Titanyum oksit kaplama ve kaplama yöntemleri

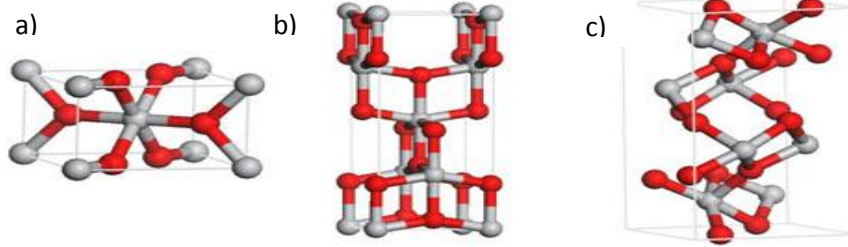
Titanyumun oda şartlarında oksijenle reaksiyona girmesi sonucu çok kısa sürede amorf yapıda pasif oksit tabakası oluşur. Normalde bu oksit tabakası titanyum monoksit (TiO), dititanyum trioksit (Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ve titanyum oksit (TiO<sub>2</sub>) olmak üzere üç farklı tabakadan meydana gelmektedir. Titanyum oksit yüzey kimyasını güçlü kılan şey kovalent ve iyonik bağların bir arada bulunmasıdır (Şekil 2.10) [67].



**Şekil 2.10.** Ti yüzeyinde oluşan doğal oksit tabakasının kimyasal içeriği

TiO<sub>2</sub> üç farklı kristalin yapıda bulunur. Bunlar; rutil, anataz ve brokittir. Şekil 2.11'de bu yapılar gösterilmiştir. Anataz tip TiO<sub>2</sub> tetragonal kristalin yapıdadır ( $\alpha_0= 3.78 \text{ \AA}$  ve  $c_0= 9.50 \text{ \AA}$ ), rutil tipi de tetragonal yapıdadır fakat kafes parametreleri farklıdır ( $\alpha_0= 4.58 \text{ \AA}$  ve  $c_0= 2.98 \text{ \AA}$ ). Üçüncü tip brokittir ve ortorombik kristalin yapıdadır ( $\alpha_0= 9.17 \text{ \AA}$ ,  $b_0=5.43 \text{ \AA}$  ve  $c_0= 5.13 \text{ \AA}$ ). Bu oksitler içerisinde oluşum entalpisi değerlerine göre; rutil en kararlı

faz olup sırasıyla onu brokit ve anataz fazları takip etmektedir [75]. Yapılan çalışmalarda  $TiO_2$  kararlılığının boyutlara bağımlı olduğu belirtilmiştir. Buna göre küresel  $TiO_2$  parçacıklarının yaklaşık olarak 204 nm'den büyük olması durumunda, rutil çok kararlı bir yapı halini alırken 38 nm'nin altında ise, anataz fazı çok kararlıdır. 38 ile 204 nm aralığında ise  $TiO_2$  parçacıkları genellikle brokit fazındadır [76].



**Şekil 2.11.**  $TiO_2$  'in kristalin yapıları: (a) rutil fazı, (b) anataz fazı, (c) brokit fazı

Titanyum ve Ti alaşımları yüzeylerinde yapılan değişiklikler sonucunda oluşan oksit tabakadan dolayı biyoinert olarak kabul edilir [49].  $TiO_2$  tabakası; implantın yüzey morfolojisini değiştirerek, biyomalzeme olarak kullanılmasını sağlamasının yanı sıra implantın yüzey enerjisini de değiştirerek osseointegrasyonda önemli olan hücre yapışmasını desteklemektedir. Tüm modifikasyon uygulamaları sonucunda oluşan morfolojik değişiklik kadar yüzey enerjisinde yapılan değişikliğin de kemik oluşumuna etkisi olduğu yapılan çalışmalar sonucunda açıkça ortaya konulmuştur [77, 78]. Raines ve ark. (2010), insan osteosarkom MG-63 hücre hattı kullanarak yaptıkları çalışmalarında Ti'un yüzey enerjisindeki artışa bağlı olarak artan VEGF sentezinin anjiyogenezi tetiklediğini ve hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını hızlandırdığını, buna bağlı olarak da implantın osseointegrasyon yeteneğinin arttığını belirtmiştir [79]. Dolayısıyla, implantın dokuya bağlanma kapasitesini tespit ederken sadece yüzey pürüzlülüğü değil yüzey enerjisi de dikkate alınmalıdır.

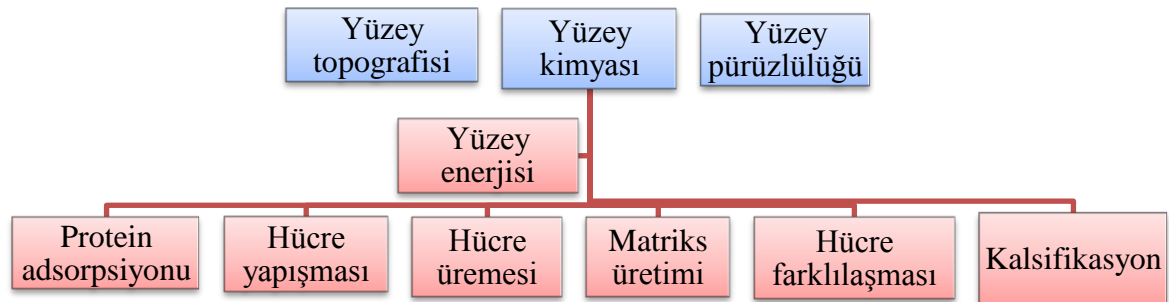
Yüzey özellikleri ve yüzey enerjisi sıvıların yüzeyle yapmış oldukları temas açısı ve ıslatılabilirlik kapasitesi olarak tanımlanır. Su temas açısı değerleri yüzeyin hidrofilitesi ve hidrofobitesini hakkında bilgi vermektedir [77].

Titanyum implantlarda yüzeye hidrofilik bir özellik kazandırmanın osseointegrasyon başarısını arttığını gösteren bilimsel çalışmalar giderek yaygınlaşmıştır. Bir anlamda suyu seven hidrofilik yüzeyler oluşturularak implant ile hücre arasındaki etkileşim hızlandırılmaktadır. Geleneksel olarak hazırlanan Ti yüzeylerle hidrofilik hale getirilen

yüzeyler karşılaştırıldığında su temas açısının yaklaşık olarak 139 dereeden 0 dereceye kadar indiği dikkat çekmektedir [80, 81].

Yüzey enerjisi ve ıslatılabilirliği, yüzey üzerindeki proteinlerle hücrelerin malzeme yüzeyine tutunmasında önemli bir rol oynar. Hidrofilik yüzeye sahip Ti implantların hücre tutunması, büyümesi ve farklılaşması üzerine olan pozitif etkileri artan alkalen fosfataz (ALP), osteokalsin, TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 sentezi gibi ilgili faktörlerin varlığı ile karakterize edilir [82]. Bu özelliklere sahip yüzeyler yüzey morfolojisini değiştirerek elde edilebileceği gibi, hidrofilik özellik sergileyen yüzey kaplamaları ile de elde edilebilmektedir.

Yüzey pürüzlülüğü ne kadar fazla ise yüzey enerjisi o derece artmaktadır. Hidrofilisitenin yani yüzey ıslatılabilirliğinin değiştirilmesi ile daha iyi hücre aktivitesi elde edilmesi mümkün olmaktadır. Le Guenhenec ve ark. (2008), MC3T3-E1 hücre hattı kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada farklı pürüzlülüğe ve enerjiye sahip titanyum ve alüminyum yüzeylerde hücre tutunmasının ve üremesinin 0.8–1  $\mu$ m boyutlarına sahip pürüzlülükte en iyi sonuçlar gösterdiğini belirtmiştir. Aynı zamanda hidrofobik özellik gösteren örneklerden hidrofilik özellik gösterenlere geçildikçe aynı davranışın sergilendiği vurgulanmıştır [83]. Kimyasal olarak pürüzlendirilmiş yüzeylerdeki hücrelerin osteokalsin ve ALP oranının mekanik olarak pürüzlendirilmiş yüzeylere oranla daha fazla olması aslında yüzey pürüzlülüğündeki ve enerjisindeki artışın hücre aktivitesini arttırdığını göstermektedir. Yüzey modifikasyonu ile ortaya çıkan değişiklikler ve birbirleri arasındaki ilişki Şekil 2.12'de kısaca özetlenmiştir.



**Şekil 2.12.** Yüzey modifikasyonları sonrası değişen yüzey enerjisinin ve etkilerinin şematik gösterimi

#### 2.4.7.2. Anodizasyon yöntemi ile oksit tabaka oluşumu

Osseointegrasyonu hızlandıracak etkenlerden biri mikro ve nano boyuttaki morfolojidir. Mikron ve nano boyuttaki topografi, protein adsorpsiyonu ve osteoblast fonksiyonunu arttırarak, osseointegrasyonun daha hızlı gerçekleşmesini sağlamaktadır. Gittens ve ark.

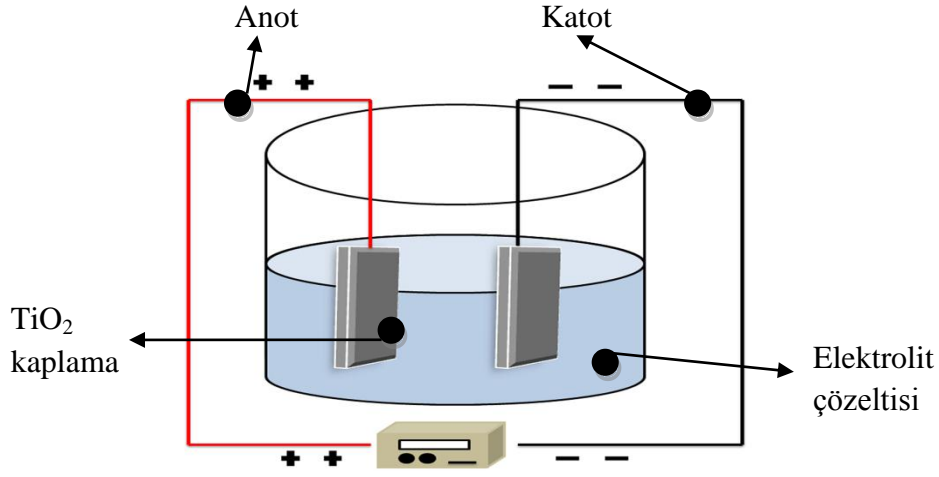
(2011), zımparalanmış Ti, kumlanmış Ti ve kumlandıktan sonra asit ile muamele edilmiş Ti numuneleri hazırlayarak MC3T3-E1 hücre hattıyla yaptıkları çalışmalarında, kumlandıktan sonra asit ile muamele edilmiş olan grubun, hücre tutunmasını ve üremesini en iyi şekilde desteklediğini göstermiştir. Bundan dolayı hücre için en uygun yüzeyin nano ve mikron boyuta pürüzlülüğün bir arada bulunduğu yüzeyler olduğunu belirtmişlerdir [84].

İmplantlarda en fazla kullanılan materyal olan saf Ti biyouyumluluğunun mükemmel olmasını sağlayan oksit tabakası 5 nm civarında bir kalınlığa sahiptir. Bu oksit tabakasının kalınlaştırılmasının kemik cevabını olumlu yönde etkilediği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Kalınlaşan ve gözenekli yapıya sahip olan oksit tabakasının proteinlerin tutunmasında ve kararlılığının korunmasında etkisi olduğu düşünülmektedir [62, 85].

İmplant yüzeyinde kendiliğinden oluşan kararsız ve içerisinde birden fazla faz bulunduran titanyum oksit tabakası yerine, çeşitli yöntemlerle yapay olarak, biyolojik açıdan uygun bir oksit tabakası üretmek mümkündür. Bu amaçla kullanılan en yaygın yöntemlerden biri anodizasyon işlemidir. Anodizasyon işlemiyle üretilen titanyum oksit tabakasının 600–1000 nm kalınlığında olduğu bilinmektedir [62, 81, 86].

Anodizasyon yöntemi, implantın hem yüzey kimyası hem de mikro yapısında değişikliklerin meydana geldiği, elektrokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği bir işlemdir [87]. Fosforik asit ( $H_3PO_4$ ), sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) asetik asit ( $CH_3COOH$ ) ve diğerleri gibi farklı asitler, nötr tuzlar, ve alkali çözeltiler titanyumun anodizasyonunda yaygın olarak kullanılan elektrolitlerdir [88]. Bu elektrolitlerin içerisine daldırılan anot ve katot hücreleri üzerine çeşitli yoğunlukta ( $5-200 A/m^2$ ) veya farklı potansiyelde (0–100 V) elektrik uygulanarak mikro veya nano poröz yüzeyler elde edilebilmektedir [81, 89]. Şekil 2.13'te bir anodizasyon düzeneğinde bulunan bileşenlerin şematik gösterimi sergilenmektedir.





**Şekil 2.13.** Tipik bir anodizasyon sisteminin şematik gösterimi

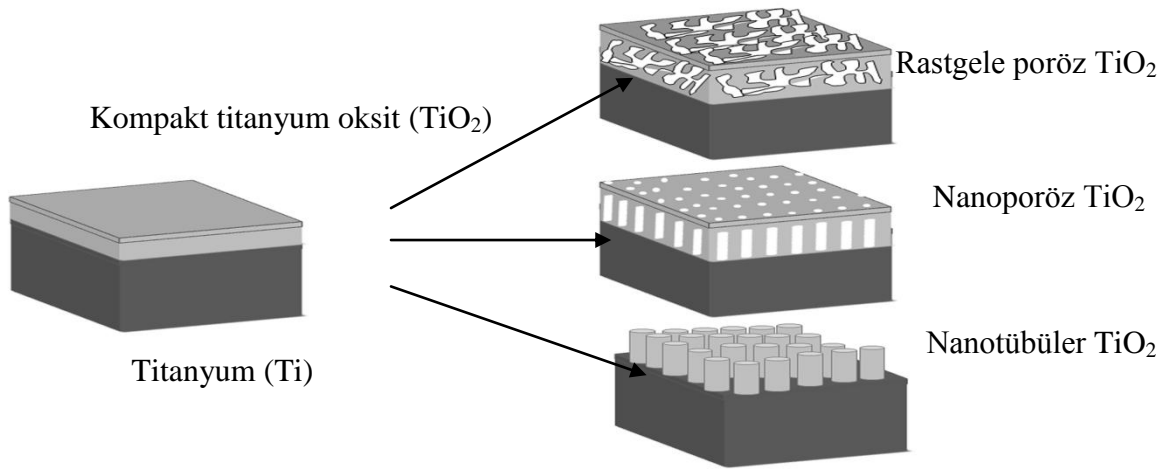
Tipik bir anodizasyon işlemi alkalın temizleme, asit aktivasyonu ve elektrolit anotlama gibi basamakları içerir. Yüzey kontaminantları ve doğal titanyum oksit tabakasının uzaklaştırılması için nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ) ve hidroflorik asit ( $\text{HF}$ ) karışımı uygulanır.

Anodik oksidasyon metal ve oksijen iyonlarının elektriksel alan etkisiyle difüzyona uğratarak yüzeyde oksit tabakası oluşturma tekniği olarak açıklanabilir. Anot ve katot arasında sabit gerilim veya akım uygulandığı zaman yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları meydana gelerek anot yüzeyinde oksit tabakası oluşumuna yol açar. Anodizasyon sonrası elde edilen oksit tabakasının pürüzlülüğü, morfolojisi ve kimyası, sıcaklık, pH, elektrolit karışımı, akım yoğunluğu ve uygulanan gerilim (voltaj) gibi farklı metot parametrelerine göre geniş bir aralıkta değişir [90]. Parametrelerde yapılan değişiklikler sayesinde yüzeyde eş dağılımlı yapıda oksit tabakasının oluşumu veya nano boyutta baca oluşumu sağlanabilmektedir. Diamanti ve ark. (2007) düşük voltaj ve akım değerlerinde 3–100 nm kalınlığında pürüzsüz, homojen, amorf bir  $\text{TiO}_2$  tabakası elde edilebilirken, yüksek voltaj ve gerilimde 100–600 nm kalınlığında düzenlenmiş yapıda nanotüplerin eldesinin mümkün olduğundan bahsetmektedir [86].

Kullanım amacına göre istenilen morfolojide  $\text{TiO}_2$  tabakası elde etmek mümkündür. Elektrolit çeşidi, potansiyel geriliminin şiddeti, elektrotlar arasındaki uzaklık ve zaman parametreleri değiştirildikçe titanyum yüzeyinde genellikle tübüler olmakla beraber nano boyutta bir morfoloji elde edilmektedir. Şekil 2.14'te anodizasyon işlemi sonrası oluşan bu yapıların genel gösterimi verilmiştir. Bu parametrelerdeki artışla doğru oranlı olarak tüplerin çapında, derinliğinde ve düzenlenmesinde de artış gözlenir. Bu nanotüpler yapıdaki morfoloji osteoblast cevabını çok daha hızlı bir hale getirdiğinden genellikle Ti-hücre etkileşimin doğrudan gerçekleştiği çalışmalarda sıklıkla kullanılır. Oh ve ark. (2006)

MC3T3-E1 hücre hattı kullanarak yaptıkları çalışmada anodizasyon yöntemiyle oluşturulan yüzeylerde hücre tutunmasının 3-4 kat daha fazla olduğundan ve hücrenin dikey büyüme ve yatay yayılma hızının işlem görmemiş yüzeye oranla daha hızlı gerçekleştiğinden bahsetmektedir [91].

Bunun yanı sıra elde edilen baca morfolojisi rezervuar görevi gören bu yapıların içerisine yüklenen çeşitli biyomoleküllerin salımına olanak sağlamaktadır. Çalışkan ve ark. (2014) Ti yüzeyinde oluşturdukları nano tüplere antibakteriyel bir ajan olan gentamisin yükleyerek polimer olmaksızın uzatılmış bir salım profili elde etmişler ve yaptıkları hücre kültür çalışmaları ile sistemin etkinliğini kanıtlamışlardır [92].



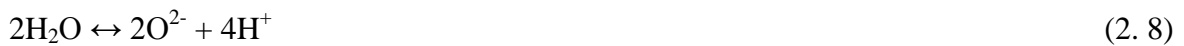
**Şekil 2.14.** Anodizasyon yöntemi ile yüzeyde oluşturulan TiO<sub>2</sub> tabakası ve çeşitli morfolojileri

Anodizasyon işleminde metal yüzeyinin tamamını kaplayana kadar oksit tabakası oluşumu devam eder. Zamanla artan oksit tabakası ile ters orantılı olarak azalan iletkenlik ve elektriksel dirençten dolayı akımda üstel bir düşüş meydana gelir ve bu da sınırlı kalınlıktaki kompakt bir oksit tabakasının büyümesi ile sonuçlanır [93, 94]. Aşağıda Ti'un anodizasyonu esnasında meydana gelen olası reaksiyonlar verilmiştir.

Titanyum ve Ti oksit yüzeyinde:



Ti oksit ve elektrolit ara yüzeyinde



Her iki ara yüzeyde



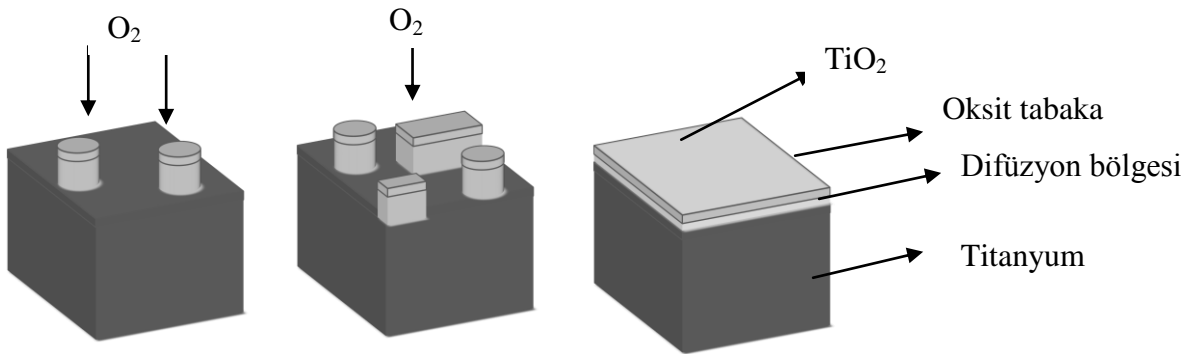
reaksiyonları gerçekleşir.

Anodik oksidasyon yöntemi; parametre kontrolünün kolaylık sağlanabildiği, basit bir tekniktir. Titanyum yüzeylerin anodik olarak oksitlenmesinin en önemli avantajı, oluşan oksidin metal yüzeyine kuvvetli bir şekilde bağlanıyor olmasıdır. Yüzeyde oluşan kararlı ve eş dağılımlı yapıdaki titanyum oksit tabakası sayesinde kemik hücrelerinin nano boyuttaki pürüzlülüğün olduğu yüzeylere daha iyi tutunması, yüksek çoğalma hızına ve osteojenik farklılaşmaya sahip olması sağlanmaktadır. Ayrıca kemik benzeri apatit oluşumunu hızlandırarak, yüzey üzerindeki tutunma mukavemetini arttırmaktadır [95].

### 2.4.7.3. Termal muamele yöntemiyle oksit tabaka oluşumu

Titanyum yüzeyinde oluşturulan  $\text{TiO}_2$  tabakasının kararlılığının tespiti için yapılan çalışmalar sonucu  $\text{TiO}_2$  tabakasının sanıldığı kadar inert olmadığı, vücut içerisine konulduktan sonra da yapısında bazı değişikliklerin gerçekleştiği, yapısına Ca, P, S gibi inorganik ve organik yapıların katıldığı bulunmuştur [76]. Bu nedenle daha kararlı titanyum oksit fazının elde edilmesi için bazı yöntemler geliştirilmiştir. Termal muamele ile yüzeyde oksit tabakası oluşturulması bu yöntemlerden biridir.

Oksijenin Ti'a olan büyük ilgisinden dolayı, Ti ortamdaki ve çözültideki oksijen ile etkileşime girer ve yüzeyinde bir oksit tabakası oluşturur. Hava ile temas eden yüzeyde oksijenin adsorbsiyonundan hemen sonra oksijenin çekirdeklenmesi ve yanal büyümesi sonrasında oksijen difüzyon bölgesi (ODB) olarak adlandırılan kompakt oksijen tabakasının oluşumu sağlanır [96]. Şekil 2.15'de termal muamele esnasında oluşan oksit tabakasının oluşum mekanizması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Isıl işlem uygulanmış Ti yüzeyindeki oksit tabakasının oluşum basamakları

TiO<sub>2</sub> en yaygın olarak rutil ve anataz yapıda bulunur. TiO<sub>2</sub> kaplı yüzeylerin biyoaktif olarak kabul edilmesinin esas nedeni yapısal olarak seramiklere benzer ve kararlı formda bulunan rutil fazından kaynaklanmaktadır. Anatazdan rutile tersinmez faz değişimi 600-800°C'de gerçekleşir [97]. Titanyum yüzeyinde oksit tabakası oluşturma yöntemleri arasında kolay ve yüksek veriminden dolayı termal oksidasyon yöntemi dikkat çekmektedir. Bu yöntem ile yüzeyde 5 µm kalınlığındaki doğal oksit tabakası yerine yaklaşık 20–30 µm kalınlığında kasıtlı olarak oluşturulmuş bariyer oksit tabakası meydana gelmektedir. Gülyüz ve ark., sıcaklıkla doğru orantılı olarak artan oksit tabakası yüzeyinde, anataz fazından rutil faza geçişin zamanla arttığını ve artan oksidasyonla birlikte pürüzlülüğün de yükseldiğini belirtmişlerdir [98]. Fakat araştırma sonuçları oksit kalınlığı arttıkça titanyum üzerinde tutunma dayanımının azaldığını göstermiştir. Bunun sebebi sıcaklık nedeniyle artan oksit tabakasının termal genleşme katsayısıyla titanyumun termal genleşme katsayıları arasındaki farktan kaynaklanır. Bu nedenle Ti yüzeyinde termal işlem ile oksit oluşturma sıcaklığı yaklaşık olarak 800°C ile sınırlanmaktadır [97, 99]. İkiyüz derecenin üzerinde bir sıcaklık değerine çıkıldığında oksit tabakasının kalınlığında ciddi artış meydana gelmektedir. Oksijenle temas eden Ti yüzeyinde 400°C üzerindeki sıcaklıklarda oksijenin difüzyonu sonucu sert ve kırılğan yapıda olan ODB oluşur. Bu bölgenin kalınlığının, sıcaklık artışıyla doğru orantılı olarak arttığı bilinmektedir. Diğer oksidasyon yöntemlerinde oluşmayan bu tabakanın en büyük avantajı yüzeyde oluşan sert oksit tabakasının altında bir destek görevi görerek noktasal basınçlar sırasında oluşacak hasarların önüne geçebilme kapasitesidir. Altıyüz derece üzerinde ise daha kalın oksit tabakası oluşurken, 800°C ve üzeri sıcaklıklarda oksit tabakasında ayrılmalar gözlenmektedir [96, 97].

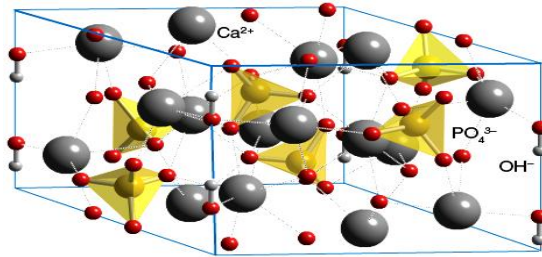
Alkali ve ısıtılma maruz bırakılmış Ti yüzeyinin, sadece alkali işlem gören Ti ile karşılaştırıldığında ısıtılma işlem gören yüzeylerdeki osteoblastik hücre aktivitesinin çok daha fazla olduğu ve Ti'un kemik hücrelerine doğrudan bağlandığı görülmüştür. Bunun nedeni ısıtılmanın titanyumun biyoaktif özelliğini arttırmasından kaynaklanmaktadır [100]. Nishiguchi ve ark., Ti implantı üzerine uygulanan sıcaklık ve alkali muamele kombinasyonuna, kemiğin verdiği tepkiyi histolojik çalışmalarla incelemişlerdir. Çalışmalarında kontrol grubu olarak saf titanyum kullanmış, ayrıca sadece NaOH ile işlem gören gruba ek olarak NaOH ve 600°C ısıtılma işlemi bir arada uygulandığı Ti implantları tavşan kemiğine implante etmişlerdir. Onaltı hafta sonra, implante edilen Ti örnekler üzerinde yapılan analizlerde sadece NaOH ve ısıtılma işlemi bir arada bulunduğu yüzeylerde

kemik oluşumunun gerçekleştiği gözlemlenmiş, diğer gruplarda ise implant çevresinde fibröz dokuya rastlanmıştır [101].

Oluşan bu oksit tabakası Ti'un yüzeyini biyoaktif hale getirmesine rağmen, Ti'un osteokondüktif kapasitesi kalsiyum fosfat materyallere göre daha düşüktür.

#### 2.4.8. Hidroksiapatit kaplama

Hidroksiapatitler (HA'ler) implant ile canlı doku arasında kemik benzeri bir ara yüzey oluşmasını sağlayan kalsiyum fosfat içerikli mükemmel biyouyumluluğa sahip biyoseramiklerdir. Şekil 2.16'da HA'in kristal yapısı gösterilmiştir. Hidroksiapatit seramiklerin ilgi çekme nedenlerinden biri fizyolojik pH değerlerinde (7.2–7.6) diğer CaP bileşiklerinden daha kararlı olmasıdır [102]. Sitokiyometrik hidroksiapatit  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  formülüne sahipken, biyolojik apatit  $Ca_{10-x}[(PO_4)_{6-2x}(CO_3)_{2x}]F_2$ ,  $Ca_{10-x}[(PO_4)_{6-2x}(CO_3)_{2x}](OH)_2$ ,  $Ca_{10-x}[(PO_4)_{6-x}(CO_3)_{2x}]CO_3$  ve  $Ca_{10-x}[(PO_4)_{6-x}(HPO_4)_x](OH)_{2-x}$  formüllerine sahip olabilmektedir [103]. Hidroksiapatit kaplamanın osteokondüktif etkisi sayesinde kemik oluşumunu arttırdığı bilinmektedir. Bu özelliği sayesinde yüzeyine kaplandığı implantların kemiğe sıkı yapışmasına olanak sağlar. Ayrıca HA'nın lokal büyüme faktörlerine, özellikle kemik proteinlerine karşı kuvvetli kimyasal bağlanma eğilimi olduğu saptanmıştır [69]. Bu avantajlardan dolayı biyouyumluluk açısından fakir olan metal ve alaşımlarının yüzeyinin HA ile kaplanarak biyouyumluluklarını ve osseointegrasyon kapasitelerini artırma çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir.



Şekil 2.16. Hidroksiapatitin kristal yapısı

Hidroksiapatit sentezi için sol-jel yaklaşımı, sulu çözeltilerden çöktürme yöntemi, hidrotermal yöntem, mikrodalga-hidrotermal yöntem, çoklu emülsiyon yöntemi, elektrokristalizasyon yöntemi ve biyomimetik çöktürme yöntemi gibi birçok yöntem bulunmaktadır [104]. Bunların arasında biyomimetik yöntemle HA kaplama gelecek vaat eden tekniklerden birisidir.

Biyomimetik çöktürme yönteminin diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında, kolay ve hızlı olması, özel ekipmanlara ya da yüksek işleme sıcaklıklarına ihtiyaç duyulmaması gibi

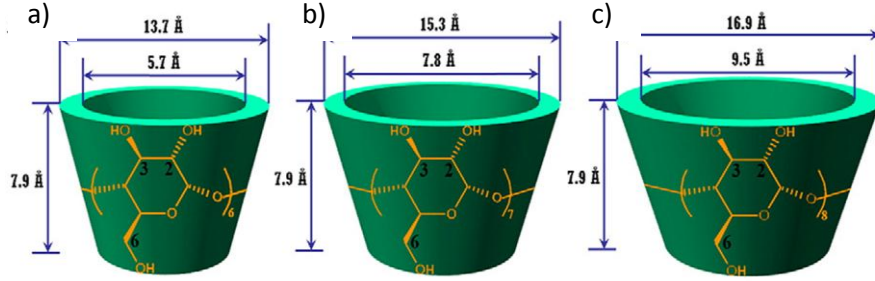
avantajlar sunduğu görülmektedir [105]. Titanyum implantların yüzeyi genellikle plazma püskürtme yöntemiyle HA ile kaplanmaktadır. Ancak bu yöntem oldukça yüksek proses sıcaklığı gerektirmektedir. Biyomimetik yöntem, implant materyallerinin HA ile kaplanması açısından yüksek sıcaklık gerektirmediğinden son derece uygun bir yöntemdir. Ayrıca biyomimetik çöktürme yöntemiyle üretilen, mükemmel HA sitokiyometrisinde olmayan, çözünebilir formda bulunan kalsiyum açısından fakir HA (CDHA), amorf kalsiyum fosfat (ACP) ve oktakalsiyum fosfat (OCP) gibi kalsiyum fosfat fazların varlığının hücre farklılaşmasını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir [106].

Biyomimetik yöntemde yapay vücut sıvısı (Simulated Body Fluid, SBF), olarak adlandırılan ve insan kan plazmasındaki inorganik tuz bileşimine sahip bir çözeltiden nano/mikro boyutlu kemik benzeri HA partiküllerinin oluşumu sağlanır. Farklı birçok malzemenin yüzeyinde kalsiyum fosfat kaplaması oluşturmak için Kokubo ve ark. (2006) tarafından geliştirilen SBF çözeltileri kullanılmaktadır [71, 107]. Ancak, SBF'nin düşük doygunluk seviyesi nedeniyle çökeltme kimi zaman 3 haftaya kadar uzamaktadır. Bu nedenle, iyon konsantrasyonu kan plazmasının n=1.5, 2, 5, 10 katı kadar fazla olan çeşitli SBF çözeltileri geliştirilerek, aynı özelliklere sahip HA üretim süresi saat mertebesine indirilmiştir [106]. Bu yöntemde polimer veya metalik esaslı biyomalzemelerin duygun SBF içerisine daldırılarak yüzeyin hidroksiapatit ile kaplanması sağlanmaktadır. Kumar (2002) ve Kodama (2009), yaptıkları çalışmalarda Ti yüzeyinde oluşturdukları TiO<sub>2</sub> üzerine HA ile kaplayarak yüzey enerjisindeki değişimi incelemişler ve artan yüzey enerjisiyle birlikte biyoyumluluğun geliştiğini belirtmişlerdir [108, 109]. Bu sayede biyoaktif olmayan implant malzemelerinin biyoyumlulukları özelliklerinde iyileştirmeler yapılmaktadır.

## 2.5. Siklodekstrinler

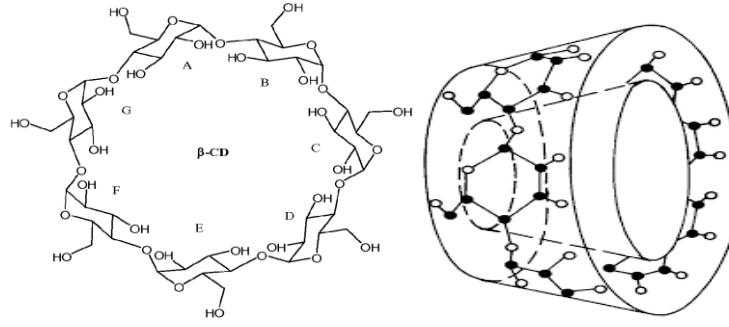
Siklodekstrinler (CD'ler), nişastanın *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans* ve *Alkalophylic bacillus* gibi çeşitli bakteri türleri tarafından transglikozilaz glikoziltransferaz (CGTase) enzimi yardımıyla parçalanması sonucu elde edilen makromoleküllerdir, Birbirlerine ( $\alpha$ -1,4) bağı ile bağlanmış, 6, 7, 8 veya daha fazla glikopiranoz yapı taşlarından oluşan ve halka yapıda, konik şekle sahiptirler. Sikloamiloz, siklomaltoz, sikloglukan ve Scharinger dekstrinleri olarak da bilinen sikloekstrinlerin altı adet glikopiranoz ünitesi içerenleri alfa ( $\alpha$ ), yedi adet içerenleri beta ( $\beta$ ) ve sekiz adet içerenleri gama ( $\gamma$ ) CD olarak adlandırılmaktadırlar (Şekil 2.17). Teorik olarak sekizden fazla glukopiranoz ünitesine sahip CD'ler üretmek mümkün olmasına rağmen moleküler

kararlılıklarının oldukça düşük olması ve suda çözünürlüklerinin çok yüksek olması gibi dezavantajlarından dolayı çok fazla üretim ve kullanım alanı bulunmamaktadır [110].



**Şekil 2.17.** Siklodekstrin çeşitleri: (a)  $\alpha$  siklodekstrin, (b)  $\beta$  siklodekstrin, (c)  $\gamma$  siklodekstrin.

Moleküldeki glikoz halkalarının sayısına bağlı olarak CD'ler, farklı iç çaplara sahiptir. Yapılan çalışmalar sonucu en çok dikkat çeken CD çeşidi, sahip olduğu üstün özelliklerinden dolayı  $\beta$  siklodekstrinlerdir ( $\beta$ CD). Beta-CD'nin yapısına bakıldığında primer hidroksil grupları koninin dar tarafında (C6 atomlarında), sekonder hidroksil grupları ise halkanın geniş tarafında (C2 ve C3 atomlarında) yer almaktadır. Tüm bu hidroksil grupları yapısal modifikasyonların başlangıç noktaları olmaları açısından uygundur [111]. Halkalı yapıda olan siklodekstrinlerin iç kısmında bulunan ve yeri değiştirilemeyen hidrojen atomları ve oksijen atomları tarafından sağlanan elektronca zengin ortamdan dolayı iç kabuk hidrofobik özelliğindedir. Dış çepherde bolca bulunan hidroksil grupları nedeniyle dış kabuk ise hidrofilik özellik göstermektedir. Şekil 2.18'de  $\beta$ CD molekülünün kimyasal ve fiziksel yapısı gösterilmektedir. Bu özellikleri sayesinde sıvı veya katı halde bulunan ve halkalı yapının içine girebilecek çapta hidrofobik yahut amfifilik yapıdaki moleküllerle konuk-konak kompleksi oluşturabilmektedir. Sahip olduğu bu yeteneği sayesinde konuk moleküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin değişmesini, istenmeyen yan etkilerinin giderilip, yeni önemli özelliklerinin oluşmasını sağlamaktadır. Bu nedenle  $\beta$ CD'ler ilaç, gıda, kozmetik, tarım ve kimya endüstrilerinde yaygın biçimde kullanılmaktadır [112].



**Şekil 2.18.** Beta siklodekstrinin (βCD) kimyasal ve fiziksel yapısı.

Siklodekstrinler, beyaz, kokusuz, tatlı, nem çekmeyen, kristal toz yapısında maddelerdir. Nişasta veya şeker kadar kararlı olan siklodekstrinler bozulmadan yıllarca muhafaza edilebilirler. Aşağıda bazı siklodekstrin türlerine ait fiziksel ve kimyasal özellikler verilmiştir [110].

**Çizelge 2.4.** Siklodekstrin çeşitlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

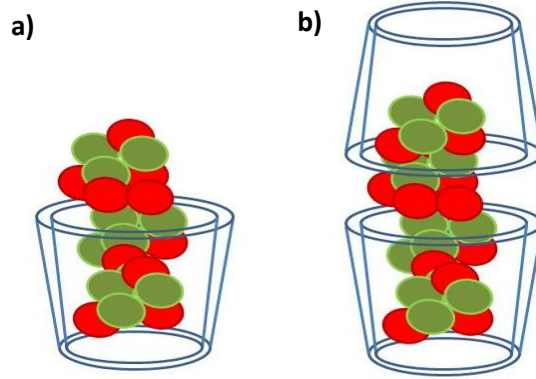
Siklodekstrinler	α-CD	β-CD	γ-CD
<b>Glukoz sayısı</b>	6	7	8
<b>Boşluk çapı (Å°)</b>	5.7	7.8	9.5
<b>Yükseklik (Å°)</b>	7.9	7.9	7.9
<b>Çap (Å°)</b>	13.7	15.3	16.9
<b>Molekül ağırlığı (g/mol)</b>	973	1135	1297
<b>Sudaki çözünürlük (mg/10mL)</b>	14.5	1.85	23.2
<b>Erime noktası (°C)</b>	275	280	275

Siklodekstrinler çok çeşitli katı, sıvı ve gaz molekülleri ile "inklüzyon kompleksi" olarak adlandırılan konuk-konak türü kompleks oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bu kompleksler "içerik kompleksleri" olarak da adlandırılır. İçerik kompleksinin oluşabilmesi için siklodekstrinlerin iç çapına uygun boyutlara sahip olan konuk moleküllerin ortamda bulunması gerekir. Inklüzyon kompleksinin gerçekleşmesi esnasında CD'nin iç boşluğunda bulunan su ile konuk molekül yer değiştirir. Çünkü CD'lerin apolar içyapısında bulunan polar su molekülü iç yüzey tarafından itilmekte ve yapıyı enerji açısından kararsız bir duruma sokmaktadır. Konuk molekülün apolar CD boşluğuna girmesiyle birlikte enerji açısından kararlı bir inklüzyon kompleksi oluşumu sağlanmaktadır. Bu yer değiştirme



işlemi sırasında hidrojen köprüleri, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşim gibi kovalent olmayan fiziksel etkileşimler meydana gelmekte bu nedenle kompleks oluşumu, su, kimyasal madde ve CD konsantrasyonuna bağlı olarak ayrışma-birleşme dengesi şeklinde oluşmaktadır [113].

Siklodekstrinler ile inklüzyon kompleksi yapacak molekülün kimyasal yapısından çok geometrik yapısı daha belirleyicidir. Bu kompleksin oluşabilmesi esnasında konuk yapının CD'nin hidrofobik iç yapısına ya tamamen ya da kısmen girmiş olması gerekmektedir. İç çaptan daha küçük olan moleküller CD ile kompleks oluşturacak geçici bağlar oluşturamadıklarından dolayı iç boşluktan geçerler. Ayrıca çok büyük boyutlu moleküllerde, yapının tamamının CD içerisine girememesine bağlı olarak ya kenar zincirleri ya da hidrofobik yapıdaki fonksiyonel grupları yardımıyla kompleks oluşturabilirler. Konuk molekül bir tane CD boşluğuna sığamayacak kadar büyükse, 2:1 molar oranlı CD/konuk molekül kompleksi oluşabilir (Şekil 2.19). Ayrıca kendiliğinden düzenlenme davranışları sayesinde çift heliks DNA, mikrotüp ve mikrofilament gibi değişik geometrilere sahip supromoleküler yapılar oluşturabilme yetenekleri CD'lerin kullanım alanlarını genişletmekte ve farklı uygulamalarda araştırma konusu olmalarına neden olmaktadır [114].



**Şekil 2.19.** Siklodekstrinlerin inklüzyon kompleksi oluşturma türleri: (a) 1:1, (b) 1:2.

Kompleks oluşumunda, stereokimyasal uyumun yanında polaritede de önem taşır. Polaritesi büyük olan yapıların CD'nin iç yapısına olan ilgisi de bir o kadar fazladır. Siklodekstrinlere olan ilginin temel nedeni işte bu kompleks yapabilme kapasitesidir. Bu özellikleri sayesinde CD'ler suda çözünmeyen ya da az çözünen bileşiklerin çözünürlüğünü arttırmaları, uçucu moleküller ile kompleks oluşturarak uçuculuğu azaltırlar, ışık veya oksijene duyarlı molekülleri kararlı hale getirirler. Ayrıca kötü koku ve tatların maskelenmesinin sağlanmasına ek olarak bazı bileşiklerin mikroorganizmalar tarafından

bozulmasına engel olurlar ve sıvı bileşiklerin fiziksel özelliklerini değiştirerek toz haline getirilmesini sağlarlar.

Siklodekstrinler öğütme, bulamaç halde kompleks oluşturma, birlikte çöktürme, katı içerisinde dağıtma, liyofilizasyon, ekstrüzyon, eriterek kompleks oluşturma ve mikrodalga teknikleriyle hem sulu çözelti içerisinde hem de katı haldeyken kompleks oluşturabilir. Öğütme tekniğinde katı halde bulunan CD ve konuk molekül havanda dövülerek inklüzyon kompleksi oluşumu sağlanır. Bulamaç halinde kompleks oluşturma tekniğinde ise siklodekstrin az miktarda su ile karıştırılarak bulamaç haline getirilir ve konuk molekül içerisinde karıştırılarak kompleks oluşumu sağlanmaktadır. Her iki yöntemde de kompleks veriminin oldukça düşük olması en büyük dezavantajdır. Uygun bir çözücü içerisinde çözdürülmüş ve ısıtılmış olan CD çözeltisi içerisinde konuk molekül eklenmesi ve soğutulması basamaklarını içeren inklüzyon kompleksi oluşturma tekniği ise "birlikte çöktürme yöntemi" olarak adlandırılmaktadır. CD'lerin kompleks oluşumu için en uygun sıcaklık 50–60°C iken daha yüksek sıcaklıklarda bozunmaya başlar [110]. Katı içerisinde dağıtma yönteminde CD ve konuk molekülün ayrı ayrı çözeltisi hazırlandıktan sonra mekanik olarak karıştırılarak inklüzyon kompleksi oluşumu sağlanır. Tüm bu tekniklerin en büyük dezavantajı işlem süresinin uzun olması ve düşük kompleks oluşumdur. Fakat mikrodalga yönteminde uygun çözücüde çözdürülen konuk molekülü ile CD çözeltisi mikrodalga yardımı ile saniye mertebesi gibi kısa bir sürede inklüzyon kompleksi oluşumunu sağlamaktadır. Ayrıca oluşturulan inklüzyon kompleksinin verimi oldukça yüksektir [115].

Siklodekstrinler suda az çözünen maddelerin çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının artırılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca molekülleri enkapsüle ederek kararlılıklarını korumalarına yardımcı olmaları veya kontrollü salımlarına olanak vermeleri nedeniyle dermal, nazal ve göz uygulamalarında kullanımları gün geçtikçe artmaktadır [116]. Örneğin Başbağ ve ark., immünosupresif bir ajan olan siklosporin A (CsA) yüklü, 2-hidroksipropil- $\beta$ -CD (HP $\beta$ CD)/poli(2-hidroksietilmetakrilat (poli(HEMA)) hidrojel taşıyıcı sistemler oluşturmuş ve salım çalışmalarında HP $\beta$ CD içermeyen poli(HEMA) hidrojellerden ani salım etkisi görülürken, HP $\beta$ CD içeren poli(HEMA) hidrojellerde ise iki ay süren geciktirilmiş bir salımın gerçekleştiğini belirtmişleridir. Bu çalışmada salım hızının yapıdaki HP $\beta$ CD miktarı ile ilgili olduğu ve üretilen HP $\beta$ CD/poli (HEMA) hidrojellerin subkonjunktival uygulamalarda kullanılabilir bir sistem olduğu vurgulanmıştır [117].

Siklodekstrinlerin katı ve çözülmüş haldeki konformasyonlarının hemen hemen aynı olması onları eşsiz kılan özelliklerinden biridir. Alfa-CD ve  $\gamma$ CD'nin sudaki çözünürlüğü  $\beta$ CD'ninkinden sırasıyla, 7 ve 14 kat daha fazladır. Buna rağmen  $\beta$ CD'i diğerlerinden önemli kılan en büyük özelliği kimyasal konfigürasyonundan kaynaklanmaktadır. Beta-CD molekülünde molekül içi oluşan hidrojen bağları CD molekülünün monosiklik yapısını  $\gamma$ CD'e oranı daha kararlı kılmakta ve CD molekülünün sabit bir yapı almasına neden olmaktadır.

Alfa-CD deki kararlılık moleküller arası sterik etkileşimden dolayı  $\beta$ CD'den daha fazla olmasına rağmen daha küçük iç çapı nedeniyle daha az molekülle inklüzyon kompleksi oluşturmaktadır. Ayrıca konak-konuk etkileşimi kurduğu bu yapılarla olan güçlü etkileşimi gerektiğinde molekülün salımını engellemektedir. Bu açıdan  $\beta$ CD'ler fizikokimyasal özelliklerinin değiştirmesi, kompleks oluşum kapasitelerinin artırılması ve yeni farklı özellikler kazandırılması amacıyla kimyasal olarak modifiye edilebilirler ve bu sayede çok daha iyi özelliklere sahip olabilirler. Çizelge 2.5'de başlıca  $\beta$ CD türevleri verilmiştir. Yapılarında çokça bulunan hidroksil gruplarından dolayı CD'lerin üzerinde çok farklı kimyasal modifikasyon yapılabilmektedir [116].

**Çizelge 2.5.** Beta-siklodekstrin türevleri

Siklodekstrin türevleri	Sübstitüent konumu	Sübstitüent
<b>Hidrofilik türevler</b>		
Metillenmiş $\beta$ -CD	2,6- ; 2, 3, 6-	-O-CH <sub>3</sub>
Hidroksialkillenmiş $\beta$ -CD	Rastgele	-O-CH <sub>2</sub> -CH(OH)CH <sub>3</sub>
Dallanmış $\beta$ -CD	6-	-Glukozil, -Maltozil
<b>Hidrofobik türevler</b>		
Etilenmiş $\beta$ -CD	2,6- ; 2, 3, 6-	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
Parasetillenmiş $\beta$ -CD	2, 3, 6-	-O-CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -CH <sub>3</sub>
<b>İyonize olabilen türevler</b>		
Karboksialkil $\beta$ -CD	Rastgele	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -COONa
Karboksimetil, etil $\beta$ -CD	2,6-; 3-	-O-CH <sub>2</sub> COONa; -O-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Sülfonatlanmış $\beta$ -CD	Rastgele	-O-SO <sub>3</sub> Na
Alkil sülfonatlar $\beta$ -CD	Rastgele	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -SO <sub>3</sub> Na

Siklodekstrinlerin modifikasyonları ile suda çözünebilirlik kapasiteleri artırılarak suda çözünmeyen konuk yapıların suda çözünürlükleri geliştirmekte, kendiliğinden düzenlenme özelliği kazandırılmakta ve kompleks oluşturma kapasitesi artırılmaktadır. Ayrıca siklodekstrinlerin en büyük dezavantajı olan hemoliz ve toksik etki ortadan kaldırılabilmektedir [118].

Siklodekstrinlerin türevlendirilmesi genellikle mono-6-deoksi-6-tosil- $\beta$ -siklodekstrin (TsCD) den oluşan bir ara basamak üzerinden gerçekleşir. Ardından türevi olarak eklenecek nükleofilik grup siklodekstrindeki tosil gruplarıyla yer değiştirerek istenilen formülasyondaki CD elde edilmesini sağlar [112].

Siklodekstrinlerin farmasötik uygulamalarında suda çözünürlüğü az olan yapıların suda çözünürlüğünün artırılması amaçlanmaktadır ve sıklıkla hidrofilik türevleri olan metillenmiş, hidroksialkillenmiş, açillenmiş, karboksimetillenmiş, sülfonatlanmış ve amfifilik özellik kazandırılmış siklodekstrinler tercih edilmektedir. Metillenmiş türevi, siklodekstrinin C2 sekonder veya C6 primer hidroksil gruplarından (dimetil siklodekstrin) veya C2, C3 ve C6 (trimetil siklodekstrin) hidroksil gruplarının metilasyonu ile elde edilmektedir. Siklodekstrinlerin bu türevi birçok avantaja sahip olmasına rağmen sıcaklık artışıyla çözünürlüğün azalması, hemolitik etkisinin bulunması ve ilaçların bu yapıya güçlü bağlanması gibi büyük dezavantajlara sahiptir.

Hidroksialkillenmiş siklodekstrinler ise alkali ortamda  $\beta$ CD'in propilen oksit ile kondenzasyonu sonucu  $\beta$ CD'in bir veya birkaç hidroksil grubuna 2-hidroksipropil grubunun bağlanmasıyla oluşan  $\beta$ -CD'lerdir. 2-hidroksipropil- $\beta$ -CD (HP $\beta$ CD) ve hidroksietil- $\beta$ -CD (HE $\beta$ CD) bu gruba örnek olarak verilebilir. Hidroksialkillenmiş CD'lerin sudaki çözünürlükleri doğal siklodekstrinlerden çok daha yüksektir. Bu iki CD arasında ise HP $\beta$ CD'nin aşağıda listelenen özelliklerinden dolayı ön plana çıkmaktadır [119].  $\beta$ CD türevleri arasında suda çözünürlüğü en yüksek türevdir.

- ✓  $\alpha$ CD,  $\gamma$ CD,  $\beta$ CD ve diğer  $\beta$ CD türevlerine oranla daha az iritasyona neden olur.
- ✓ Birçok farklı molekül ile geniş inklüzyon kompleksi yapabilme kabiliyetine sahiptir.
- ✓ İlaç salımı, UV ışınlarından koruma gibi amaçlar için rezervuar olarak kullanılabilirler.
- ✓ Pratikte tüm siklodekstrinler toksik etki göstermese de klinik uygulamalarda gastrointestinal yoldan emilmedikleri için HP $\beta$ CD oldukça güvenilirdir.

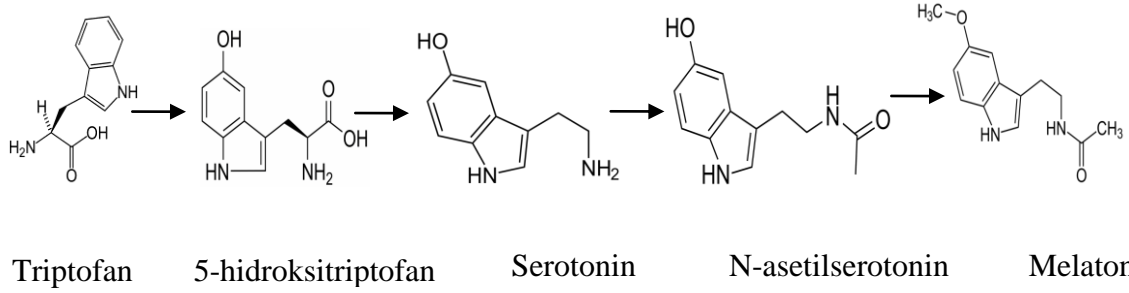
- ✓ Oral ve paranteral uygulamalar için HPβCD'in biyolojik olarak tolere edilebilirliği daha fazladır.
- ✓ Genellikle bakteriler tarafından parçalanan HPβCD'in enzimatik bozunurluğunun oldukça düşük olması daha yavaş bozunma davranışı sergilemesine neden olur.
- ✓ İlaçların yan etkilerini azaltır.
- ✓ HPβCD' nin inklüzyon kompleksi yaptığı moleküle bağlı olarak hem ani salım hem de uzun süreli salım profili sergilemeleri uygulama alanlarını genişletmektedir [113, 120].

Aleem ve ark. (2008), antimikrobiyal bir ajan olan cefdinir (CEF) ile βCD ve HPβCD nin kompleks yapmasını sağlamıştır ve çalışmalar sonucunda CEF'in sudaki çözünürlüğünün HPβCD ile kompleks yaptığı grupta çok daha yüksek olduğunu, buna bağlı olarak antimikrobiyal aktivitedeki artışın βCD ile kompleks yapan gruba göre çok daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir [121].

Alkali ortamda CD ile polipropilenin reaksiyonuyla elde edilen HPβCD sentezlenmesi kolay olmasına rağmen saflaştırılması oldukça zordur.

## 2.6. Melatonin

Kimyasal adı N-[2-(5-metoksi-1H-indol-3-yl)etil] olan melatonin, ilk olarak Aaron Lerner tarafından 1958'de tanımlanan bir hormondur. Molekül ağırlığı 232.3 g/mol olan melatoninin erime noktası 116–120° C aralığındadır. Kan serumundaki yarılanma ömrünün gün içerisinde 15 ile 60 dakika arasında değiştiği çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir. Şekil 2.20'de görüldüğü gibi, indol türevi olan melatoninin vücuttaki sentezi öncelikle triptofan aminoasidinin dolaşımdan hücre içine alınması ve ardından triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana (5HTP) dönüştürülmesi ile başlamaktadır. 5HTP ise aromatik amino asid dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) aracılığıyla serotonine (5-hidroksitriptamin, 5HT) dönüştürülmektedir. Serotonin, serotonin N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilserotonine ve son olarak N-asetilserotonin hidroksiindol-0-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine dönüştürülür. Bu dönüşüm insan vücudunda gece geç saatlerde karanlık ortamda gerçekleşir [122].



**Şekil 2.20.** Melatoninin sentez basamakları.

Bazı ülkelerde market raflarında bile satılan ve 'büyülü ilaç' olarak adlandırılan melatoninin kanser, astım, katarakt, sinirsel bozukluklar, kalp hastalıkları, diyabet gibi birçok hastalığa iyi geldiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda melatonin sentezinin ve salımının ışık ile doğrudan bir ilişki göstermesinden dolayı melatonin hormonunun sirkadiyan ritmin belirlenmesinde ve organizasyonun sağlanması, uyku siklusunun kayması, kış uykusu ve senkronizasyonu, mevsimsel affektif bozukluklarla ilgili olduğu bilinmektedir. Ayrıca hamilelik, menapoz, yaşlanma, strese cevap ve genel adaptasyon, otonom fonksiyonların düzenlenmesi, susama ve elektrolit dengesi, vücut ağırlığının regülasyonu, normal kan basıncının sağlanması, immün mekanizmaları, hücre çoğalması, antioksidan etki gibi bir çok görevi de bulunmaktadır.

Melatonin, miktara bağlı olarak hücreler üzerinde üremeyi arttırıcı veya azaltıcı ikili etkiye sahiptir. Liu ve ark. (2013), insan osteosarkoma MG-63 hücre hattı kullanarak, melatoninin artan konsantrasyon miktarına bağlı olarak hücre üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Yaptıkları hücre kültür çalışmalarında 1 nM'den 2 mM'a kadar melatoninin hücre üremesini engelleyecek herhangi bir etki yaratmadığını fakat 4 mM ile 10 mM aralığındaki melatonin konsantrasyonlarında hücreler üzerinde üremeyi durdurucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca melatoninin 1nM ile 10µM arasında kullanıldığında hücre büyümesi üzerine kayda değer bir etki göstermediği belirtilmiştir [123].

Serumdaki melatonin konsantrasyonu, yaşa göre de anlamlı olarak değişir. Yapılan araştırmalar 60 yaşın üzerindeki insanların çok düşük gündüz ve gece melatonin seviyelerine sahip olduğunu göstererek, fizyolojik melatonin konsantrasyonu ve yaşlanma arasındaki ilişkiye dikkat çekmiştir.

Deneysel ve klinik çalışmalar melatonin hormonunun kemiğin gelişimi ve korunması üzerine rol oynadığını göstermektedir. Kemik oluşumunun gece saatlerinde maksimum değere ulaşması ve bu durumun vücut içi melatonin konsantrasyonunun en fazla olduğu saatlere denk gelmesi, melatoninin kemik metabolizması ile olan ilgisinin belirtisidir.

Melatoninin kemik iliğinde bol miktarda bulunması, kemik hücrelerine olan etkilerinin muhtemelen otokoid etkiler aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir. Conti ve ark. (2000), uzun süreli kültüre edilen kemik iliği kök hücrelerinde çok yüksek seviyede melatonin varlığından söz etmektedirler [124]. Melatoninin doza bağlı olarak osteoblastların tip I kolajen fibril sentezini uyardığı, serum kalsiyum konsantrasyonunu ve kemik matriks proteinlerini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca melatonin kemik sialoprotein (BSP) sentezini, preosteoblastlarda osteokalsin (OC) ve osteopontin (OP), alkalın fosfataz (ALP) ve kemiğe ait diğer protein belirteçlerini arttırdığı, osteoklast farklılaşmasını azalttığı belirlenmiştir. Bu durum melatoninin kemik formasyonunu ve osteoblast farklılaşmasını artırdığının kanıtıdır. Roth ve ark., melatoninin pre-osteoblast MC3T3-E1 hücre hattı ve osteoblast benzeri insan osteosarkom MG-63 hücre hattı üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında 50nM melatonin varlığında hücrelerin erken farklılaşmaya uğradıklarını, her iki hücre hattının da nanomolar mertebedeki konsantrasyonlarda BSP, ALP, OC, OP ve gen ifadelerin arttığını belirtmişlerdir [125]

Melatonin, serbest radikallerin indirgeyen doğal bir antioksidandır. Yapısında bulunan indol halkası sayesinde hidroksil radikallerini ( $\bullet\text{OH}$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), azot oksit ( $\text{NO}\bullet$ ) ve peroksinitrik asit ( $\text{ONOO}\bullet$ ) gibi serbest radikalleri indirgemektedir. Ayrıca melatonin serbest radikal oluşumunun gerçekleştiği kemik rezorpsiyonunda görevli olan osteoklastlar üzerinde önemli etkilere sahiptir. Melatonin, doz miktarına bağlı olarak, osteoklastların oluşturduğu rezorpsiyon alanını ve sayısını azaltmaktadır. Yani bir anlamda melatonin kemik miktarını artırırken, kemik rezorpsiyonunu inhibe ederek kemiği korumaktadır.

Günümüzde yaygın olarak postmenapozal dönemde osteoporozla karşı kullanılan bifosfonatlara ilave olarak melatonin uygulamasının, gerek doğrudan kemik üzerine olumlu etkileri, gerekse bu ilaçlara bağlı yan etkileri azaltarak kemik koruyucu etkiyi güçlendirebileceği düşünülmektedir [126].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan deneysel çalışmalarda, ilgili literatürde biyouyumluluğu ispatlanan ve sert doku implantı olarak kullanılan titanyumun osseointegrasyonunu arttırmak üzere HPβCD/Melatonin inklüzyon kompleksinin oluşumuna olanak sağlayacak HA/HPβCD kompozit taşıyıcıların geliştirilmesi ve *in vitro* koşullarda osseointegrasyon üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda,

- ✓ Titanyum yüzeyinde mekanik aşındırma işlemleri gerçekleştirilerek pürüzlülüğün ve yüzey alanının artırılması,
- ✓ Kimyasal ve elektrokimyasal uygulamalarla Ti yüzeyinde TiO<sub>2</sub> tabakasının oluşturulması ve bu tabakanın biyomimetik yöntem ile gerçekleştirilecek olan HA tabakası oluşumunu hızlandırması,
- ✓ Oksitlenmiş yüzey üzerine kaplanan HA tabakası sayesinde biyolojik olarak aktif bir yüzey oluşturulması ve bu yüzeyin hücre tutunmasını, farklılaşmasını ve çoğalmasını olumlu yönde etkilemesi,
- ✓ HA ile kaplı Ti plakalar üzerinde oluşturulacak HPβCD esaslı taşıyıcı sistemin melatonin ile yapacağı inklüzyon kompleksi sayesinde melatoninin kemik rejenerasyonu üzerine olan olumlu etkisinin kontrollü bir şekilde sağlanması,
- ✓ Kemik hücrelerinin Ti ile olan etkileşim süresinin kısaltılması ve
- ✓ Osteointegrasyonun artması beklenmektedir.

Bu kapsamda gerçekleştirilen deneysel çalışmalar üç ana kısımdan oluşmaktadır.

1. **Birinci bölümde;** zımparalama ve asidik muamele gibi ön uygulamalarla yüzeyleri aşındırılarak pürüzlü hale getirilen Ti levhaların bazik oksidasyon ve anodik oksidasyon yöntemleriyle yüzeyinde TiO<sub>2</sub> tabakası oluşumu sağlanmıştır. Tez kapsamında bu işlemlerin tümü ön muamele uygulamaları olarak nitelendirilmiş ve elde edilen yüzeylerin karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

2. **İkinci bölümde;** ön uygulamalar sonrasında hedeflenen amaca uygun olduğu saptanan yüzeylerin biyoaktif hale getirilmesi için HA ile kaplanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından HA kaplı yüzeyler üzerine HPβCD/Melatonin taşıyıcı sistemler oluşturulmuş ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3. **Üçüncü bölümde;** yukarıda bahsedilen bölümlerde elde edilen veriler doğrultusunda optimum yüzey özelliklerine sahip Ti/HA/HPβCD/Melatonin kompozit



sistemlerin *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### 3.1. Kullanılan Malzemeler

Tez kapsamında; %99.98 saflıkta ve 0.24mm kalınlığında plaka halindeki Ti plakalar BAĞ-SAN (İstanbul, Türkiye) firmasından satın alınmıştır. Titanyum plakaların yüzey pürüzlendirilmesinde kullanılan nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) ve hidroklorik asit (HCl) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Bazik oksidasyon işlemleri sırasında yüzeyde oksit tabakası elde edilmesi için kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) Merck (Almanya) firmasından, anodik oksidasyon işlemlerinde oksit tabakası elde edilmesi için kullanılan hidroflorik asit (HF, %48, v/v) ise Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Yıkama işlemlerinde kullanılan etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, %96, v/v), Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından temin edilmiştir. Melatonini siklodekstrin membranlara yükleme sırasında kullanılan absolute etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, ≥99,8%, v/v) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. 2-Hidroksipropil-β-siklodekstrin (HPβCD, Mw:~1460) Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Çapraz bağlamada kullanılan 1,2,3,4-Bütantetrakarboksilik asit ([CH(CO<sub>2</sub>H)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H]<sub>2</sub>, BTCA) Aldrich (ABD) firmasından, çapraz bağlama sürecinde katalizör olarak kullanılan sodyum hipofosfit (NaPH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Yapay vücut sıvısı üretiminde kullanılan bileşenlerden sodyum klorür (NaCl), Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür heksahidrat (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), kalsiyum klorür dihidrat (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) ve sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Melatonin (C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ≥98%) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Melatonin taşıyıcı kompozit sistemin salım çalışmalarında kullanılan fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) tabletleri, Sigma (Almanya) tarafından temin edilmiştir. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı Riken hücre bankasından (Tsukaba, Japonya) satın alınmıştır. Minimum Essential Medium-Alfa Modifikasyonu (α-MEM), Biochrom (ABD) firmasından temin edilmiştir. Kültür ortamına eklenen L-glutamin, penisilin-streptomisin çözeltileri ve fetal sığır serumu (FBS) Biowest (Fransa) firmasından sağlanmıştır. Hücrelerin fiksasyonunda kullanılan gluteraldehit (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>CHO)<sub>2</sub>) ve heksametildisilazan ([CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si]<sub>2</sub>NH, HMDS), Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin yüzeyden kaldırılmasında kullanılan Tripsin-EDTA çözeltisi ve osteojenik ortamın hazırlanmasında kullanılan askorbik asit (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), deksametazon

(C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>) ve β-gliserol fosfat, Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre canlılığı takibinde kullanılan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür, MTT ) ve izopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

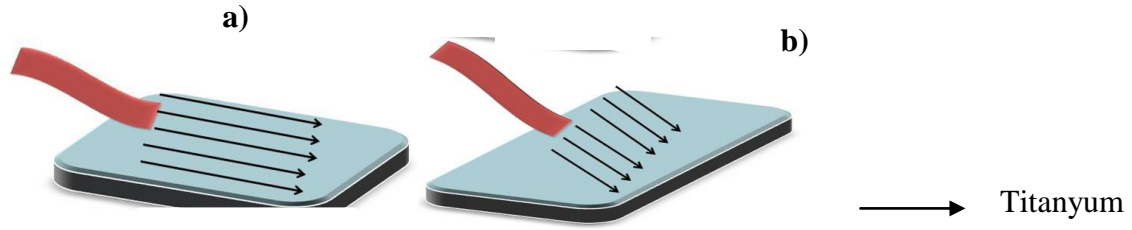
### **3.2. Birinci Bölüm**

Bu bölümde ilk olarak Ti levhaların yüzey özelliklerinin geliştirilmesi için yapılan fiziksel ve kimyasal modifikasyon işlemlerinden bahsedilmektedir. Fiziksel yöntem olarak zımparalama tekniği ile yüzeyde düzenli veya dağınık oluklar açılmış, bu sayede yüzeyde nano/mikro boyutta pürüzlülük oluşturulmuştur. Ayrıca asidik muamele ile yüzey pürüzlülüğünün artırılması sağlanmıştır. Yüzeyde oluşturulması hedeflenen TiO<sub>2</sub> tabakasının bazik oksidasyon veya anodik oksidasyon yöntemleriyle elde edilmesi ve ardından gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları detaylıca anlatılmıştır.

#### **3.2.1. Bazik oksidasyon çalışmaları**

##### **3.2.1.1. Bazik oksidasyon işlemi öncesi titanyum plakaların hazırlanması**

Ticari olarak satın alınan Ti plaka zımparalama öncesi seyreltilmiş sıvı deterjan kullanılarak yıkanmıştır. Distile su ile 10 dk arındırılma işlemi gerçekleştirilen plakalar %70 (v/v)'lik etil alkol çözeltisi içerisinde ultrasonik su banyosunda 20 dk süreyle temizlenmiştir. Ardından Ti plakalar deiyonize su ile yıkanarak etil alkolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu işlemler ile plakaların yüzeyinde bulunan organik kirlilikler giderilmiştir. Oda koşullarında (~25°C, 1 atm) kurutulan Ti plakalar öncelikle P280 numaralı silisyum karbür (SiC) zımpara kâğıdı ile 5'er dk boyunca yatay ve dikey yönlerde zımparalanmıştır. Bu sayede plakaların yüzeyinde makro boyutta pürüzlülük oluşturulmuştur. Hemen ardından P400 numaralı SiC zımpara kâğıdı ile 5'er dk yatay ve dikey yönlerde zımparalama gerçekleştirilerek plakalara parlatma işlemi uygulanmıştır (Şekil 3.2). Zımparalanmış numuneler %96 (v/v)'lik etanol çözeltisi içerisinde ultrasonikatör ile yıkanarak yüzeyindeki olası kirlilikler uzaklaştırılmıştır. 1x1cm boyutlarında kesilen Ti plakalar kimyasal aşındırmada işlemi için %96'lık etanol ile hazırlanan %4 (v/v)'lük HNO<sub>3</sub> çözeltisi içerisinde 1 dk boyunca HNO<sub>3</sub> işleminin ardından distile su ile yıkanmıştır. Oda koşullarında kurutulan numuneler bazik oksidasyon işlemi için kullanıma hazır hale getirilmiştir [127].



**Şekil 3.1.** Bazik oksidasyon öncesi titanyum plakaların zımparalama yönleri: (a) yatay yön, (b) dikey yön.

### 3.2.1.2. Titanyum plakaların bazik oksidasyonu

Bazik oksidasyon işlemi öncesi uygulamaya hazır hale getirilen Ti plakalar 10 N NaOH çözeltisi içerisinde 60°C'de 24 sa boyunca bekletilmiştir. Yüksek konsantrasyon ve sıcaklık nedeniyle yüzeyde sodyum titanat/titanyum oksit tabakasının oluşumu sağlanmıştır. Çözelti içerisinde çıkarılan numuneler distile su ile yıkanarak oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan numuneler tez kapsamında araştırılması planlanan NaOH sonrası HCl ile muamelenin oksit tabakasına olan etkisinin belirlenmesi için iki gruba ayrılmıştır.

- ✓ Birinci grup NaOH muamelesinden sonra doğrudan kurumaya bırakılırken,
- ✓ İkinci grup 1N HCl çözeltisi içerisinde 1 sa bekletilmiştir [127].

HCl çözeltisi içerisinde çıkarılan numuneler distile su ile yıkanarak, kurumaya bırakılmıştır. Termal muamelenin yüzeydeki titanyum oksit tabakasının kalınlığını artırdığı ve oluşan TiO<sub>2</sub> tabakanın anataz fazından rutil faza dönüşümü sağlayarak tabakanın kararlılığını yükselttiği bilinmektedir [97]. Bu nedenle her iki grup da, literatürden edilen bilgiler ışığında, 40°C/dk artan fırın içerisinde (Protherm, Türkiye) 600°C'de 2 sa boyunca ısı işleme maruz bırakılmıştır [66, 128]. Örnekler işlem sonrası 5°C'da hızındaki fırın içerisinde soğumaya bırakılarak kontrollü bir şekilde soğuması sağlanmıştır. Bu sayede ani sıcaklık farkından kaynaklanacak olası çatlakların oluşumu engellenmiştir. Örnekler nemden uzak olacak biçimde kapalı kaplar içinde saklanarak yüzey kaplamaları için hazır hale getirilmiştir.

### 3.2.2. Anodik oksidasyon çalışmaları

#### 3.2.2.1. Anodik oksidasyon işlemi öncesi titanyum plakaların hazırlanması

Bölüm 3.2.1.1 de, bahsedilen yüzey temizleme yöntemleri uygulanarak Ti plakaların yüzeyinde bulunan olası organik kirliliklerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Temizleme işlemleri sonrası anodizasyonun etkinliğini arttırması amacıyla yüzeyde bulunan doğal oksit tabakasının temizlenmesi büyük önem taşımaktadır. Aksi takdirde oldukça kararsız ve inaktif olan bu doğal oksit tabakası anodizasyon işlemi sonucu oluşacak olan oksit yapının

morfolojisini etkilemektedir. Bu nedenle, oda koşullarında kurutulmuş Ti plakalara sırasıyla P120, P280, P400 ve P600 numaralı SiC zımpara kâğıtları ile her biri 5'er dk süreyle, rastgele olacak biçimde zımparalama işlemi uygulanmıştır. Zımparalanmış numuneler %96 (v/v)'lık etanol çözeltisi içerisinde ultrasonikatörde yıkanarak yüzeyindeki kirlilikler uzaklaştırılmıştır. Kuruyan Ti plakalar kimyasal aşındırma işlemi için hazırlanan %1(v/v) HF; %1,5 (v/v) HNO<sub>3</sub> karışım içerisinde 5 dk boyunca, her iki yüzey de temas edecek biçimde bekletilmiştir. Aşındırılan titanyum plakalar plastik pens yardımıyla çözüldükten alınarak, önceden hazırlanmış olan deiyonize su ile yıkanmış ve 70°C'deki fırın içerisinde 30 dk boyunca kurutulmuş Ti plakalar makas yardımıyla 2 x 2cm boyutlarında kesilmiştir [129].

### 3.2.2.2. Titanyum plakaların anodizasyon düzeneği ve oksidasyon işlemi

Anodizasyon düzeneği 0–30 volt (V) potansiyel farkına sahip, 0–5 akım (A) aralığında doğru akım sağlayan anot ve katot kutuplarına sahip güç kaynağından oluşmaktadır. %1 (v/v) HF çözeltisi hazırlanarak güç kaynağının pozitif (+) ucunda bulunan titanyum plaka ve negatif (-) ucuna tutturulan saf platin plaka eklenerek düzenek tamamlanmıştır. Anodizasyon işlemi öncesi uygulanacak gerilim ve zaman seçimi literatürde bildirilen çalışmalar göz önünde bulundurularak yapılmıştır [92]. Bu amaçla hazırlanan düzenekte işlem süresi ve potansiyel farkında değişiklikler yapılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimum koşulların belirlenmesi için çalışılan parametreler, Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Anodizasyon tekniği ile TiO<sub>2</sub> üretiminde incelenen sistem parametreleri

HNO <sub>3</sub> / HF ile ön muamele süresi (dk)	Karıştırma hızı (rpm)	Soğutma sıcaklığı (°C)	Anot-Katot arası mesafe (cm)	Uygulanan voltaj (V)	Anodizasyon süresi (dk)
5	600	0	3	40	30
			2		30
			3	30	30
			2		30
			3	20	30
			2		30
			3		20
			2		20
			1		45

### **3.2.3. Bazik ve anodik oksidasyon sonrası titanyum plakaların karakterizasyonu**

#### **3.2.3.1. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi**

Titanyum yüzeyine uygulanan zımparalama işlemi sonrası elde edilen morfolojinin tespit edilmesi ve zımparalanmış yüzeylere uygulanan kimyasal ve elektrokimyasal aşındırma işlemleri sonrası Ti yüzeylerin topografilerinin belirlenmesi amacıyla, atomik kuvvet mikroskobu (AFM, Vecoo Multi Mode V-AS-12) ile yüzeylerin iki ve üç boyutlu görüntüleri elde edilmiştir. Tıklatma modu (tapping mode) ile yapılan analizler sonucu, 5x5 µm, 20x20 µm ve 50x50 µm boyutlardaki karesel alanlar taranarak yüzeylerin morfolojisi belirlenmiş ve pürüzlülük değerleri hesaplanmıştır.

#### **3.2.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

Titanyum yüzeylerin üretiminde en uygun koşulların belirlenmesi ve yüzey morfolojilerinin görüntülenmesi amacıyla SEM analizleri (Zeiss Evo 50, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Her işlem sonrası yüzeydeki değişimi incelenecek Ti plakalar SEM ile görüntülenmeden önce altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır.

#### **3.2.3.3. Su temas açısı tayini**

Uygulanan yüzey modifikasyonlarının yüzey ıslatılabilirliğine olan etkisinin anlaşılması için örnek yüzeylerinin su temas açısı değerleri, asılı damla yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, distile su damlacıkları örnek yüzeylerine 5 µL hacminde damlatılmış ve su temas açısı ölçüm düzeneği (Krüss, DSA 100, Almanya) yardımıyla damlacıkların fotoğrafları çekilmiştir. Her yüzey için en az 5 noktadan ölçüm alınarak ortalama su temas açısı değeri hesaplanmıştır. Temas açısı değerleri ölçüm düzeneğine ait yazılım kullanılarak hesaplanmış ve derece cinsinden ifade edilmiştir.

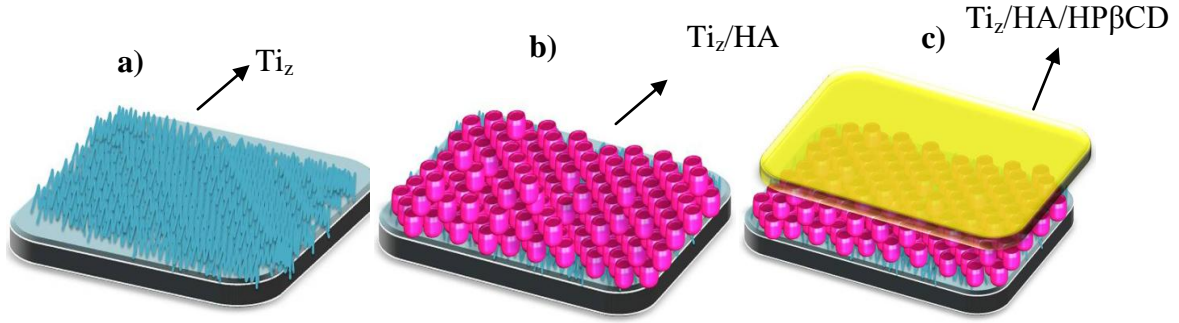
#### **3.2.3.4. Enerji dağılımlı x-ışınları analizi (EDX)**

Üretilen Ti plakaların üzeri altın-paladyum karışımıyla kaplandıktan sonra noktasal olarak elementel bileşeni tanımlamak için XFlash 3001 SDD-EDS dedektörü kullanılarak EDX analizi gerçekleştirilmiştir. Numuneler üzerindeki elementel içeriğin tespiti sayesinde en uygun koşullarının seçimi sağlanmıştır.

### **3.3. İkinci Bölüm**

Bu bölümde ilk olarak, birinci bölümde gerçekleştirilen ön uygulamalar sonrasında, istenilen yüzey özelliklerine sahip olduğu tespit edilen Ti plakaların biyoaktif hale getirilmesi amacıyla HA ile yapılan kaplama işlemlerinden bahsedilmektedir. Ardından

melatonin hormonunun kontrollü salımına izin verecek HP $\beta$ CD temelli taşıyıcı sistemlerin HA kaplı Ti yüzeylere entegrasyonu anlatılmaktadır. Son olarak HA/HP $\beta$ CD temelli taşıyıcı sistemlere melatoninin yüklenmesi ve kompozit taşıyıcı sistemin oluşturulması sonrası gerçekleştirilen karakterizasyon işlemleri anlatılmıştır. Şekil 3.3'de tez çalışmalarının bu bölümde yapılması planlanan işlem basamakları şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 3.2.** Oksitlendirilmiş Ti yüzeyine oluşturulan HA/HP $\beta$ CD/Melatonin kompozit taşıyıcının şematik gösterimi: (a) zımparalanmış ve oksitlendirilmiş Ti yüzeyi (Ti<sub>z</sub>) (b) HA kaplı Ti yüzeyi (Ti<sub>z</sub>/HA), (c) HP $\beta$ CD kaplı Ti<sub>z</sub>/HA yüzeyi (Ti<sub>z</sub>/HA/HP $\beta$ CD).

### 3.3.1. Bazik ve anodik oksidasyon işlemi sonrası hidroksiapatit üretimi ve titanyum plakaların hidroksiapatit ile kaplanması

Osseointegrasyona olan katkısı birçok çalışmada doğrulanmış HA'in eldesi biyomimetik çöktürme yöntemi ile sağlanmıştır. Biyomimetik yöntemle hidroksiapatit (HA) üretilmesi amacıyla Maviş ve ark. [106] tarafından hazırlanan 10xSBF kullanılmıştır. 10xSBF insan kan plazmasındaki kalsiyum ve fosfat iyon derişiminden 10 kat yüksek iyon derişimine sahip bir çözeltilidir ve bu nedenle Ca/P çekirdeklenmesi daha hızlı gerçekleşmektedir. Çizelge 3.2.'de çalışma kapsamında hazırlanan 10xSBF çözeltilisine ait reçete verilmiştir. Sırasıyla ilk beş tuz 800 mL ultra saf su içinde çözülmüş ve daha sonra distile su ile son hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Çöktürme işlemi doğrudan bazik ve anodik oksidasyon uygulanmış titanyum (Ti<sub>z</sub>) plakaların üzerinde olacak biçimde gerçekleştirilmiştir. Çöktürme işlemi başlatılmadan önce hazırlanan 10xSBF çözeltilisi içerisine NaHCO<sub>3</sub> ilave edilmiş, Ti plakalar bu çözelti karışımı içerisine batırılmış ve 18 sa boyunca bekletilmiştir. Bu işlem üç döngü olarak tekrarlanmıştır. Her döngü arasında plakaların yüzeylerinde oluşan kararsız ara fazları uzaklaştırmak için 2 sa durgun ortamda distile su ile yıkama işlemi yapılmıştır. Yüzeye çöken HA'in amorf halden kristal hale geçmesi ve dolayısıyla içeriğindeki suyu

uzaklaştırarak daha kararlı bir yapı halini alması için 5°C/dk hızında artacak biçimde ayarlanmış fırın (Protherm, Türkiye) içerisinde sıcaklık 150°C'ye ulaştıktan sonra 1 sa boyunca ısı işleme maruz bırakılmıştır.

**Çizelge 3.2.** 1L'lik 10xSBF çözeltisi için kullanılan reçete

Bileşenler	Ekleme	Miktar (g)	Derişim (mM)
NaCl	1	58.443	1000.00
KCl	2	0.373	5.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3	3.675	25.00
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4	1.016	5.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5	0.250	3.62
* NaHCO <sub>3</sub>	6	0.084	10.00

\* 100 mL SBF için

### 3.3.2. Bazik ve anodik oksidasyon sonrası hidroksiapatit ile kaplı titanyum plakaların karakterizasyonu

#### 3.3.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

Titanyum yüzeyine kaplanan HA'nin içeriğinin tespiti için plaka yüzeyindeki HA tabakası kazınmıştır. Ayrıca yüzey üzerine çöken HA ile kaptta bulunan HA arasında olası farklılığın kontrolü için çöktürme yapılan kaptan da örnek alınarak bu örneklere ait OH<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> ve PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> fonksiyonel grupların varlıkları 400–4000 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında ATR-FTIR (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) ile araştırılmıştır.

#### 3.3.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Titanyum yüzeylerinin HA ile kaplanması sonrası yüzey morfolojisinin görüntülenmesi amacıyla SEM analizleri (Zeiss Evo 50, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Hidroksiapatit ile kaplı Ti plakalar SEM ile görüntülenmeden önce altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır.

#### 3.3.2.3. Mikro çizik testi (MST)

Hidroksiapatit kaplamanın Ti yüzeyi üzerine olan yapışma dayanımını belirlemek için mikro çizik cihazı (CSM instruments, Nano/mikro combi tester, İsviçre) kullanarak mikro çizik analizi gerçekleştirilmiştir. Örnek yüzeyine dik olacak şekilde belirlenen bir maksimum değere kadar yük uygulanmış ve bu maksimum yük değerine ulaştıktan sonra tekrar dereceli olarak geri yükleme yapılmıştır. Yükleme ve geri yükleme sonucunda elde

edilen yük(N)-derinlik (nm) eğrileri analiz edilerek örneğin mekanik özellikleri belirlenmiştir.

#### 3.3.2.4. Enerji dağılımlı x-ışınları analizi (EDX)

Hidroksiapatit kaplamanın elementel bileşiminin tespiti için daha önceden altın-paladyum kaplı örneklerin EDX analizi Bölüm 3.2.3.3 bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

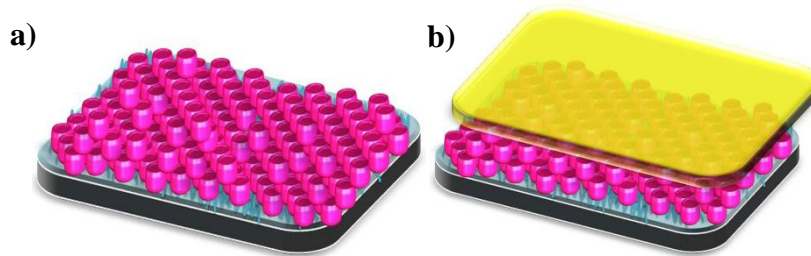
#### 3.3.3. Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin temelli taşıyıcı sistemlerin oluşturulması

Hidroksipropil- $\beta$ -CD temelli melatonin taşıyıcı sistemler dört aşamada üretilmiştir.

1) HA ile polimer çözeltisi arasındaki ilişkinin incelenmesi için çapraz bağlayıcısı olan BTCA ile karıştırılmış farklı pH değerlerine sahip HP $\beta$ CD çözeltisinin içerisine, ticari olarak temin edilen HA partikülleri eşit miktarda olacak biçimde konularak farklı pH'larda bulunan çözelti içerisindeki davranışı incelenmiştir. Bu basamakta pH değişimleri 10M NaOH ile sağlanmıştır.

2) Karakterizasyon çalışmalarını daha rahat gerçekleştirmek amacıyla bir önceki basamakta kullanılmasına karar verilen farklı pH değerlerindeki polimer çözeltilerinin Teflon kaplara dökülerek polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İç yüzeyden toplanan çapraz bağlı HP $\beta$ CD polimeri yüzeyden bağımsız bir şekilde elde edilmiştir. Bu işlemler sırasında ayrıca polimer çözeltileri içerisine toz halindeki HA eklenerek HA/HP $\beta$ CD (çapraz bağlı) arasındaki ilişkinin anlaşılması amaçlanmıştır.

3) Oksidasyon işlemleri sonrası üzeri HA ile kaplanmış yüzeylere HP $\beta$ CD/BTCA karışımı damlatılarak *in situ* polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu sayede oluşturulan suda çözünmeyen membran tabakanın HA katmanı üzerine tutunması sağlanmıştır (Şekil 3.4).

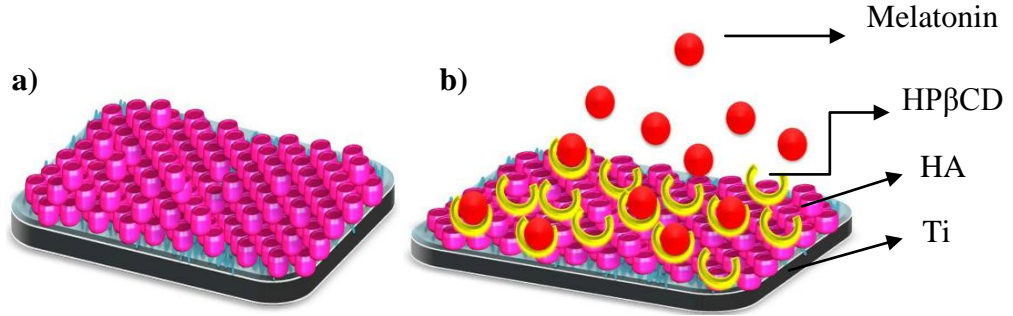


Şekil 3.3. a) Hidroksiapatit kaplı oksitlendirilmiş Ti yüzeyi, b) Ti/HA taşıyıcı sistem üzerinde membran halinde oluşturulan HP $\beta$ CD'nin şematik gösterimi.

4) Herhangi bir çapraz bağlanma ajanı kullanılmadan suda çözülmüş, serbest halde bulunan HP $\beta$ CD ile melatoninin mikrodalga enerjisi yardımıyla inklüzyon kompleksi



oluşturulmuş ve Ti/HA kaplı yüzeylere damlatılarak yüzeyi bir tabaka halinde kaplaması sağlanmıştır (Şekil 3.5).



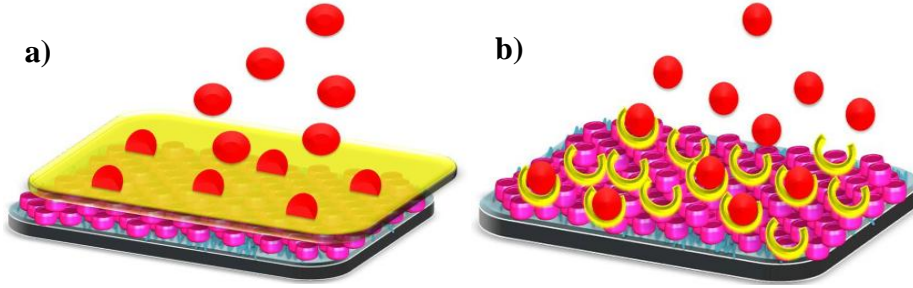
**Şekil 3.4. a)** Hidroksiapatit kaplı oksitlendirilmiş Ti yüzeyi, **b)** Titanyum/HA taşıyıcı sistem üzerine melatonin ile inklüzyon kompleksi yapmış serbest halde bulunan HPβCD'nin kaplanmasının şematik gösterimi.

Siklodekstrin temelli biyosinyal taşıyıcı membran sistem oluşturulurken tüm çalışmalar kişisel güvenlik kapsamında çeker ocak içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Çapraz bağlanma işleminin gerçekleştirileceği çözelti hazırlanırken 1 g HPβCD ile 1 g BTCA karışımı 10 mL distile suda karıştırılmıştır. Katalizör olarak 0.3 g sodyum hipofosfit ilave edilerek manyetik karıştırıcıda (IKA RO5, Almanya) 15 dk boyunca 600 rpm'de çözeltinin homojen bir hal alana kadar çözünmesi sağlanmıştır [130]. Çözeltinin pH'ı pH kâğıdı ölçümleriyle 1 olarak tespit edilmiştir. Aynı içeriğe sahip olan bir başka polimer çözeltisi daha hazırlanarak 10M NaOH yardımıyla pH:4'e ayarlanmıştır. Bu sayede farklı pH değerlerine sahip membran sistemler oluşturularak pH'ın membran kararlılığı üzerine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Boyutları 1 x 1cm lik HA ile kaplı Ti plakalara 10 µL HPβCD çözeltisi plakaların merkezine ve tüm yüzeyi kaplayacak biçimde mikro pipet yardımıyla damlatılmıştır. Bu sayede her bir Ti<sub>z</sub>/HA üzerine  $6.85 \times 10^{-7}$  mol HPβCD polimerinin kaplanması sağlanmıştır. Polimerizasyon işlemi ısı muamele ile gerçekleştirilmiştir. Polimerleştirme işleminin ilk basamağında 70°C'deki vakumlu fırına yerleştirilen numuneler, vakum altında 15 dk bekletildikten sonra fırından çıkarılarak desikatör içerisinde soğutulmaya bırakılmıştır. Bu sayede çözelti içerisinde bulunan hava kabarcıkları uzaklaştırılarak, polimerizasyon işlemi esnasında köpürme eğilimde olan çözeltinin yüzeyden kalkması sorununun önüne geçilmiştir. Ardından 150°C'ye ayarlanan fırına yerleştirilen örnekler 2 sa boyunca ısı işleme maruz bırakılmıştır. Bu işlemlerin tümü farklı pH değerine sahip deney grupları için de uygulanmıştır.

Titanyum bazlı HA/HP $\beta$ CD taşıyıcı üzerine mikrodalga ile inklüzyon kompleksi yaptırılmış HP $\beta$ CD/Melatonin karışımı yüzeylere 20mM olacak biçimde pipetleme yöntemi kullanılarak emdirilmiştir. Bu sistem yüzeye çapraz bağlanarak oluşturulmuş HP $\beta$ CD membran sistemine alternatif olarak hazırlanmıştır. Bu sayede yüzeyde serbest olarak bulunan HP $\beta$ CD ile yüzeye sabitlenmiş HP $\beta$ CD membranlar arasındaki farklılıklar Şekil 3.5'de, bahsedilen bu iki sistem arasındaki farkın anlaşılması için şematik gösterimleri verilmiştir.



**Şekil 3.5 a)** HA kaplı Ti yüzeyinin üzerinde melatonin ile inklüzyon kompleksi yapmış membran halinde bulunan HP $\beta$ CD'nin, **b)** Ti/HA taşıyıcı sistem üzerine melatonin ile inklüzyon kompleksi yapmış serbest halde bulunan HP $\beta$ CD'nin şematik gösterimi.

### 3.3.4. Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin temelli taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu

#### 3.3.4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

Karakterizasyon çalışmaları için teflon kaplara dökülen ve yüzeyden bağımsız bir şekilde toplanan pH:1 ve pH:4 polimer çözeltilerinin 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında ATR-FTIR (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) analizi ile fonksiyonel grupları tespit edilmiştir. Bu sayede BTCA ile çapraz bağlanan HP $\beta$ CD çözeltisinin yapısal özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir.

#### 3.3.4.2. İvert mikroskop ile görüntüleme

Oluşturulan çapraz bağlı HP $\beta$ CD ile HA arasındaki ilişkinin tespitinde optik mikroskop (Olympus, ABD) görüntülerinden faydalanılmıştır. Ayrıca farklı pH'lardaki HP $\beta$ CD'nin HA üzerine olan etkisinin tespitinde optik mikroskop kullanılmıştır.

#### 3.3.4.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Titanyum/HA kaplı yüzeye membran halinde oluşturulan HP $\beta$ CD'nin morfolojisinin görüntülenmesi amacıyla SEM analizi (Zeiss Evo 50, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

Hidroksipropil- $\beta$ CD kaplı Ti/HA plakalar SEM ile görüntülenmeden önce altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır.

#### **3.3.4.4. Termogravimetrik-diferensiyal termal analiz (TGA-DTA)**

Farklı pH değerlerinde üretilen (pH:1 ve pH:4) çapraz bağlı HP $\beta$ CD polimerlerin fiziksel ve kimyasal değişimlerinin gerçekleştiği sıcaklığı belirlemek ve aralarındaki farkı saptamak amacı ile SII exstar 6000 (Perkin Elmer, ABD) cihazı yardımıyla 40°-450°C sıcaklık aralığında ve 10°C/dk ısıtma hızında analiz gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.5. Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin/Melatonin inklüzyon kompleksinin oluşturulması**

Hidroksiapatit kaplı Ti plakalar üzerine kaplanan HP $\beta$ CD temelli taşıyıcı sistemler ile osseointegrasyonda olumlu etkileri olduğu bilinen melatonin hormonunun aşağıda anlatılan yöntemler kullanılarak inklüzyon kompleksi oluşturulması sağlanmıştır.

Tez kapsamında ilk olarak çapraz bağlanarak oluşturulmuş suda çözünmez HP $\beta$ CD membran ile melatoninin inklüzyon kompleksi oluşumu gerçekleştirilmiştir. Siklodekstrinin hidrofobik kavitesine girerek 1:1 (mol:mol) oranla inklüzyon kompleksi oluşturabildiği bilinen melatoninin hem suda hem de etanolde çözüldüğü bilinmektedir. Bu nedenle 1cm<sup>2</sup>'lik yüzeye kaplanan HP $\beta$ CD'nin mol sayısı melatonin miktarının belirleyicisi olarak alınmış ve melatoninin aşırı doygun çözeltisi ( $6.85 \times 10^{-5}$  mol) olacak biçimde iki farklı yöntem ile melatonin çözeltileri hazırlanmıştır. Bunlar;

1) 1000  $\mu$ L su içerisine 0.16 g melatonin eklenerek vorteks (Heidolph Reax, Almanya) yardımıyla homojen olana kadar çözünmesi sağlanmıştır.

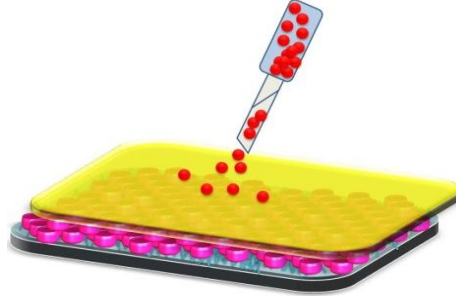
2) 500  $\mu$ L su ve 500  $\mu$ L etanol karışımı içerisine 0.16 g melatonin eklenerek vortekslenmiş ve tam anlamıyla çözünmesi sağlanmıştır.

Bu sayede etanolde daha iyi çözüldüğü bilinen melatoninin su ve su-etanol olarak hazırlanan iki farklı çözeltisinin inklüzyon kompleksi oluşturma kapasitesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Katı haldeki HP $\beta$ CD ile melatonin arasında inklüzyon kompleksi oluşturmada iki ayrı yükleme metodu uygulanmıştır. Bunlar;

1) Ti/HA plakalar üzerinde çapraz bağlanarak oluşturulmuş HP $\beta$ CD yüzeyler üzerine suda ve su/etanol (50:50) karışımı içerisinde çözdürülmüş melatonin çözeltisi her yarım saatte 10  $\mu$ L olmak üzere, toplamda 0.1 mL olacak biçimde damlatılmıştır. Bu işlem 50°C'ye

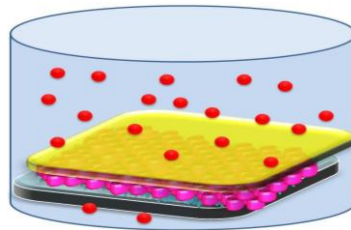
ayarlanmış etüv (Nüve ES 500, Almanya) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu uygulama tez kapsamında "pipetleme (P)" yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Bu yüklemenin 1 mL'lik hücre kültür ortamında salacağı melatonin konsantrasyonunun mM seviyesinde olacağı düşünülmektedir. Şekil 3.6 da pipetleme yönteminin şematik gösterimi verilmiştir.



**Şekil 3.6.** HA kaplı Ti yüzeyi üzerinde oluşturulan membran halindeki bulunan HP $\beta$ CD'nin melatonin ile kompleks oluşturmasında kullanılan pipetleme tekniğinin şematik gösterimi

2) Su ve su/etanol içerisinde çözülmüş 1mL'lik melatonin çözeltileri bulunan TCPS gözlere tek tek yerleştirilen HP $\beta$ CD kaplı Ti numuneler 50°C'ye ayarlanmış sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosunda (Memmert, Almanya) içerisinde 400 rpm çalkalama hızında 3 gün inkübe edilmiştir. Bu uygulama tez kapsamında "daldırma (D)" yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Şekil 3.6'da daldırma yönteminin şematik gösterimi verilmiştir.

Pipetleme ve daldırma teknikleriyle oluşturulan Ti/HA/HP $\beta$ CD/Melatonin kompozit sisteme ait plakalar +4°C' de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Tüm bu işlemler sırasında melatonin yapısal bütünlüğünün korunması amacıyla 50°C üzeri sıcaklıklara çıkılmamaya dikkat edilmiştir. Ayrıca UV ışınlarıyla bozulduğu bilinen melatonin ile çalışırken olabildiğince karanlık ortam koşulları sağlanmıştır. Bu sayede Ti/HA/HP $\beta$ CD (çapraz bağlı) kompozit taşıyıcı sistemin melatonin ile inklüzyon kompleksi oluşturması sağlanarak istenilen sistemin üretimi gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.7.** HA kaplı Ti yüzeyi üzerinde oluşturulan membran halindeki bulunan HP $\beta$ CD'nin melatonin ile kompleks oluşturması için kullanılan daldırma tekniğinin şematik gösterimi.

Ayrıca çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD ile melatonin arasında gerçekleşmesi beklenen inklüzyon kompleks oluşumunun tespiti için Ti yüzeyinden bağımsız olarak hazırlanan farklı pH değerlerindeki (pH:1 ve pH:4) HP $\beta$ CD polimer çözeltilerine daldırma yöntemleriyle melatonin yüklenmiş ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Ti<sub>z/oks</sub>/HA yüzeylerden melatoninin salımını sağlayacak HP $\beta$ CD taşıyıcı sisteme alternatif bir yöntem olarak mikrodalga tekniği kullanılmış ve HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksi oluşumu sağlanmıştır. Bu yöntemde grubumuzca yapılan bir tez çalışmasında belirlenen optimum mikrodalga koşulları uygulanmıştır [131]. 1.25 mL su, 1.25 mL etanol içinde çözdürülen 0.025 g melatonin ile 0.157 g HP $\beta$ CD karışımı 900 watt'ta 90 sn boyunca mikrodalga ışınlarına maruz bırakılmıştır. Mikrodalga işlemi uygulandıktan sonra elde edilen HP $\beta$ CD/Melatonin çözeltisi 0.45  $\mu$ m membran filtrelerinden geçirilerek çözelti içerisindeki olası kirlilikler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen stok çözeltinin derişimi 43 mM olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan Ti<sub>z</sub>/HA 50°C'ye ayarlanmış sıcaklık kontrollü etüv içerisine yerleştirilmiştir. Her 30 dakikada bir 10  $\mu$ L olmak üzere toplamda 20mM olacak biçimde HPBCD/Melatonin kompleks karışımı plakalar üzerine kaplanmıştır.

### **3.3.6. Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin/Melatonin inklüzyon kompleksinin karakterizasyonu**

#### **3.3.6.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi**

Çapraz bağlayıcı BTCA kullanılarak hazırlanan HP $\beta$ CD polimerinin karakterizasyon çalışmaları için yüzeyden bağımsız olarak elde edilen (yani polimerizasyon işlemi Teflon kaplarda gerçekleştirilmiş) farklı pH değerlerinde (pH:1 ve pH:4) üretilen polimer membranlara melatonin yüklenmiş ve oluşturulan inklüzyon kompleksinin kimyasal içeriğinin belirlenmesi amacıyla Thermo Scientific FTIR- SMART ITR Diamond ATR (ABD) cihazı kullanılarak FTIR analizi yapılmıştır.

#### **3.3.6.2. *In vitro* salım çalışmaları**

Ti<sub>z</sub>/HA kompozit sistem üzerine oluşturulan HP $\beta$ CD membranlara yüklenen melatonin ve serbest halde emdirilen HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksinin salım kinetiğinin belirlenebilmesi için *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmaları 300 rpm hızda ve 37°C sabit sıcaklıkta çalışan inkübatörde (GFL 3032, Almanya) yürütülmüştür. Bir buçuk mL PBS (pH:7.4) ortamına konulan melatoninin absorbans değerleri ölçülerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve 1cm x 1cm boyutlarındaki Ti<sub>z</sub>/HA/HP $\beta$ CD/Melatonin kompozit sistemden salınan melatonin miktarı UV

spektrofotometrede (Thermo Scientific Nanodrop 2000C, ABD) 279 nm dalga boyundaki absorbanları ölçülerek kümülatif salım değerleri hesaplanmıştır.

### 3.4. Üçüncü Bölüm

Bu bölümde daha önce bahsi geçen bölümlerde gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve analizler sonrası istenilen amaca uygun  $Ti_z/HA/HP\beta CD/Melatonin$  kompozit taşıyıcı sistemin uygunluğuna yönelik *in vitro* bulgular elde etmek amacıyla hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### 3.4.1. Hücre kültür çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında  $Ti_z/HA/HP\beta CD/Melatonin$  kompozit taşıyıcı sistemler üzerine uygulanacak hücre kültür koşullarının tespiti için ön hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ön hücre kültür çalışmalarında zımparalanmış  $Ti$  plaka ( $Ti_z$ ) kontrol grubu olarak seçilmiş ve 4 grup ile çalışılmıştır.

Bunlar,

- 1) Bazik oksidasyon sonrası HA ile kaplanmış  $Ti$  plakalar ( $Ti_z/B/HA$ )
- 2) Bazik oksidasyon sonrası membran halinde oluşturulmuş  $HP\beta CD$  (pH:4) ile kaplı  $Ti/HA$  plakalar ( $Ti_z/B/HA/HP\beta CD_4$ ),
- 3) Sadece etanol ile sterillenmiş melatonin yüklü  $Ti_z/B/HA/HP\beta CD_4$  plakalar ( $Ti_z/B/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$ ),
- 4) Etanol/UV ile sterillenmiş melatonin yüklü  $Ti_z/B/HA/HP\beta CD_4$  plakalardır ( $Ti_z/B/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$ ).

Ön hücre kültür çalışmalarında kültür kapları %5  $CO_2$  ve %95 nemlendirilmiş hava karışımı sağlayan inkübatör (Heraus Instruments, Almanya) içerisinde 8 günlük hücre kültür çalışması için beklemeye bırakılmıştır.

Çalışmalarda 8. pasajdaki MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı kullanılmıştır. Laminer akışlı kabinde (Bioair, Tip II Laminer Akışlı Kabin, İtalya) gerçekleştirilen çalışmalarda her bir örnek yüzeyine, %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren  $\alpha$ -MEM ortamında hazırlanan  $1 \times 10^4$  hücre.  $cm^2$  derişimdeki hücre süspansiyonu eklenmiştir. Yapılan analizler sonrası ekilen hücre sayısının yeterli olduğu saptanmıştır. Ön hücre kültür çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ışığında ana hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Ana hücre kültür çalışmalarında TCPS kontrol grubu olarak seçilmiş ve altı farklı grup ile ana hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bunlar,

- 1) HA kaplı plakaların kontrol grubu olarak zımparalanmış Ti plakalar ( $Ti_z$ ),
- 2) Bazik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar ( $Ti_{z/B}/HA$ ),
- 3) Bazik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar üzerine çapraz bağlayıcı bir ajan kullanmadan membran halinde oluşturulan ve melatonin ile inklüzyon kompleksi yapmış HP $\beta$ CD kaplı plakalar ( $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD/Melatonin$ )
- 4) Bazik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar üzerine çapraz bağlanmış membran halinde oluşturulan ve melatoninle inklüzyon kompleksi yapmış HP $\beta$ CD (pH:4) ile kaplı plakalar ( $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$ ),
- 5) Anodik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar ( $Ti_{z/A}/HA$ )
- 6) Anodik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar üzerine çapraz bağlayıcı bir ajan kullanmadan membran halinde oluşturulan ve melatonin ile inklüzyon kompleksi yapmış HP $\beta$ CD kaplı plakalardır ( $Ti_{z/A}/HA/HP\beta CD/Melatonin$ ).

Ayrıca serbest halde ve HP $\beta$ CD ile kompleks yapmış melatoninin, hücreler üzerine olan etkisinin incelenmesi amacıyla,

- 1) Kontrol grubu olarak TCPS,
  - 2) TCPS kaplara 20 mM derişimde serbest halde bulunan melatonin,
  - 3) TCPS kaplara 2 mM derişimde serbest halde bulunan melatonin,
  - 4) TCPS kaplara 20 mM derişimde HP $\beta$ CD ile kompleks yapmış melatonin,
  - 5) TCPS kaplara 2 mM derişimde HP $\beta$ CD ile kompleks yapmış melatonin,
- boş TCPS kaplara ekilerek üzerine 15. pasajda bulunan  $1 \times 10^4$  hücre.mL<sup>-1</sup> derişimdeki hücre süspansiyonu eklenmiştir. TCPS yüzeylere ekilen hücreler üzerine melatonin ilavesi kültürün 1. günü gerçekleştirilmiş ve her ortam değişimi sonrası tazelenmiştir. Tüm hücre kültür çalışmaları üç paralel örnekle yürütülmüştür.

Ana hücre kültür çalışmalarına başlamadan önce, 1cm x 1cm boyutlarında kesilen kompozit sistemin sterilizasyonu etilen oksit ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin çoğalması için ekilen kültür kaplarından kaldırılması işlemi tripsin enzimi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek yüzeyine ön hücre kültür çalışmalarında tespit edilen, %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren  $\alpha$ -MEM ortamında hazırlanan  $1 \times 10^4$  hücre. mL<sup>-1</sup> derişimdeki hücre süspansiyonu eklenmiştir. Çalışmalar laminer

kabinde gerçekleştirilmiş ve kültür kapları %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemlendirilmiş hava karışımı sağlayan inkübatör içerisinde 21 günlük hücre kültür çalışması için beklemeye bırakılmıştır.

#### **3.4.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

Hücrelerin çok katmanlı kompozit sistemin yüzeyine tutunmaları, yayılmaları ve çoğalmaları, SEM analizi ile morfolojik olarak incelenmiştir. SEM analizi için örnekler, üzerinden kültür ortamı uzaklaştırılıp 2 kez DPBS ile yıkandıktan sonra fiksasyon işlemi için 30 dk boyunca %2.5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi içerisinde bekletilmiş ve analize kadar 1'er mL PBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. Analize gitmeden önce, örnekler %30, %50, %70, %90 ve %100'lük etanol serisi içerisinde 2'şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve HMDS içerisinde 5'er dk bekletilmiştir. Bir gece boyunca kurutulan örnekler, SEM analizi öncesinde altın ile kaplanmıştır. SEM analizi, hücre kültür çalışmasının 7., 14. ve 21. gününde yapılmıştır.

#### **3.4.1.2. MTT analizi**

Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları sonunda çoğalan canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesinde 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi kullanılmıştır. Bu analizde suda çözünür tetrazolyum tuzları hücre içerisinde metabolize edilerek suda çözünmez formazan kristallerine dönüşmektedir. Elde edilen formazan kristalleri izopropanolde çözüldüğünde mor renkli bir çözelti oluşmaktadır. Ortaya çıkan mor renkli bu çözelti spektrofotometrik olarak absorbans değeri verir ve bu değer çoğalan canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. Kültürün 1., 7., 14. ve 21. günlerde hücreler üzerine 600 µL serumsuz taze besi ortamı ile 60 µL MTT eklenerek 37°C'de 3 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından 400 µL izopropanol çözeltisi gözlere eklenerek oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen bu çözelti 96-gözlü kaba aktarılmış (200 µL/göz) ve mikrolaka okuyucu yardımıyla 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

#### **3.4.1.3. İstatistiksel analiz**

Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama ± standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Tek Yönlü ANOVA yöntemi Tukey-Kramer post hoc testiyle birlikte kullanılmış ve p-



değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş ve ortaya çıkan bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. Öncelikle, Ti levhaların fiziksel yöntemlerle yüzeylerinin pürüzlendirilmesi sonrası bazik oksidasyon ve anodik oksidasyon yöntemleriyle yüzeylerinin modifiye edilmesi ve modifiye edilen yüzeylerin karakterizasyonu ile ilgili sonuçlar verilmiştir. Ardından, yüzeylerin biyoaktif hale getirilmesi amacıyla HA ile kaplanması ve HA kaplı yüzeylerde HP $\beta$ CD/Melatonin taşıyıcı sistemin oluşturulması işlemi ve bunların karakterizasyonlarının sonuçları sunulmuştur. Son olarak çalışma kapsamında en uygun koşullara sahip Ti/HA/HP $\beta$ CD/Melatonin kompozit sistem tespit edilmiş, bu sistemin *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalardan elde edilen sonuçlardan bahsedilmiştir. Tüm sonuçlar ilgili literatür temel alınarak karşılaştırılmış ve tartışılmıştır.

### 4.1. Birinci Bölüm

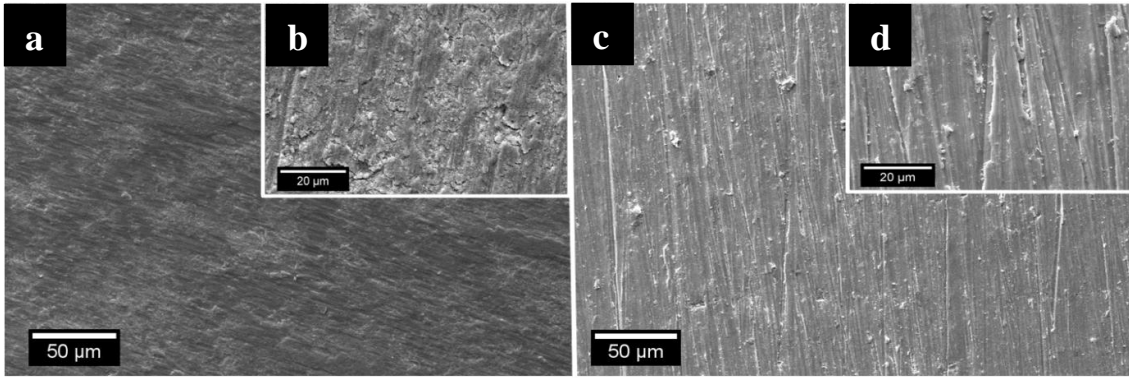
Bu bölümde zımparalama ve asidik muamele gibi ön uygulamalarla yüzeyleri aşındırılarak pürüzlü hale getirilen Ti levhaların bazik oksidasyon ve anodik oksidasyon yöntemleriyle yüzeyinde TiO<sub>2</sub> tabakası oluşumu sağlandıktan sonra elde edilen yüzeylerde yürütülen karakterizasyon çalışmalarının sonuçları verilmiştir.

#### 4.1.1. Bazik oksidasyon işlemi öncesi titanyum plakaların hazırlanması ve karakterizasyonu

Osseointegrasyonun doğru bir şekilde oluşmasını destekleyen ve implant başarısını sağlayan doğru yüzey kimyası, yüzey topografisi ve fiziksel yapı oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda yüzey pürüzlülüğün belirli bir oranda artırılmasının biyouyumluluk açısından olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür. Birçok çalışmada mikron seviyede oluşturulan yüzey pürüzlülüğünün sonrasında uygulanacak kaplama için gerekli yüzey alanı ve mekanik dayanımı sağlaması açısından önemli olduğu vurgulanmıştır. Bu nedenle tez kapsamında zımparalama yöntemiyle hem yüzeyin temizlenmesi hem de pürüzlülük yaratılması amaçlanmıştır. Uygulama sonrası gerçekleştirilen analizlerden alınan sonuçlar aşağıda detaylıca anlatılmıştır.

#### 4.1.1.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

Titanyumun osseointegrasyonun artırılmasının hedeflendiği tez çalışmasında bazik oksidasyon ile yüzeyde oluşturulacak modifikasyon işlemi öncesi, ilk olarak 5'er dk yatay ve dikey olacak biçimde P280 numaralı SiC zımpara kâğıdıyla zımparalanan Ti plakalar daha sonra 5'er dk yatay ve dikey olacak biçimde P400 numaralı SiC zımpara kâğıdı ile zımparalanmıştır. Daha detaylı bilgiler Bölüm 3.2.1.1.'de verilmiştir. P280/P400 numaralı zımpara kâğıtlarıyla zımparalanmış yüzeyler üzerinde gözle görünür biçimde zımparalama yönünde çiziklerin varlığı dikkat çekmektedir. Yüzey hakkında daha detaylı bilgi edinmek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Zımparalanmamış Ti yüzeyi ve P280/P400 numaralı zımpara kâğıtlarıyla zımparalanmış Ti örneklere ait SEM görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



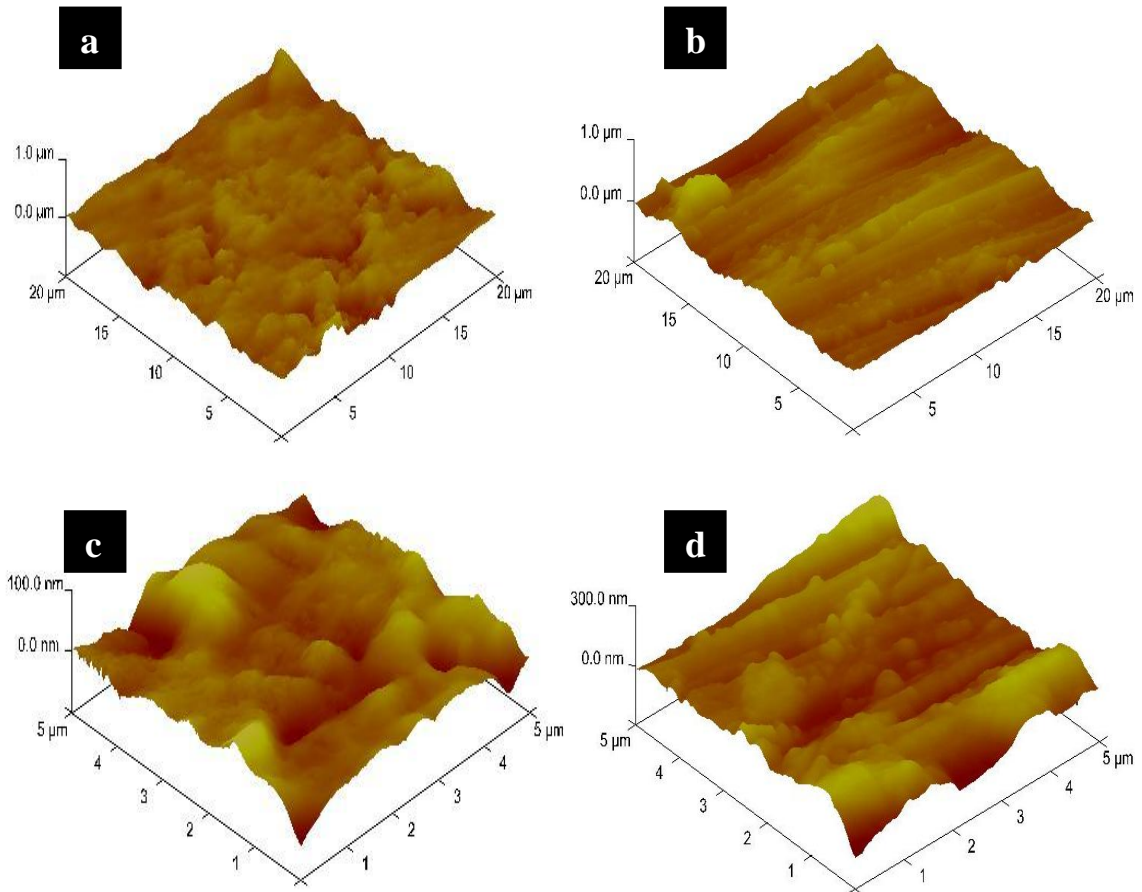
**Şekil 4.1.** Zımparalanmamış Ti yüzeyine (a) x1.00 K, (b) x5.00 K; P280/P400 numaralı zımpara kâğıtlarıyla zımparalanmış Ti yüzeyine (c) x1.00 K, (d) x5.00 K ait SEM görüntüleri.

Şekil 4.1.a ve Şekil 4.1.b'de görüldüğü gibi zımparalanmamış Ti yüzeyinde kirli doğal oksit tabakasının varlığına rastlanmaktadır. Ayrıca Ti yüzeyinde oluşmuş olan doğal oksit tabakasının sahip olduğu morfolojiye ait bir pürüzlük gözlenmektedir. Şekil 4.1.c ve Şekil 4.1.d'de verilen SEM görüntülerinde ise zımparalanmış Ti yüzeydeki doğal oksit tabakasının uzaklaştırıldığı görülmektedir. Ayrıca homojen yapıda olan bu yüzeyde ortalama 3.7 µm (n=100) aralıklarla birbirine paralel oluklar oluşturulduğu hesaplanmıştır. Bilindiği üzere yüzey pürüzlülüğündeki artış yüzey alanını da artırır. Çalışmamızda yüzeyde oluşturulan bu pürüzlülük sayesinde yüzey alanının artışı sağlanmıştır. Literatürdeki zımparala yöntemiyle yüzey pürüzlülüğü sağlanan çalışmalar incelendiğinde

tez kapsamında gerçekleştirilen zımparala işlemleri sonrasında elde edilen morfoloje benzediği görülmüştür [132, 133].

#### 4.1.1.2. AFM analizi

Malzeme yüzeyinde fiziksel ve kimyasal aşınmalar ile oluşturulan yüzeyin özelliklerinin tespitinde kullanılan bir diğer yöntem ise AFM analizidir. Sistem temel olarak birkaç atomdan oluşan bir iğnenin piezoelektrik kontrol elemanları aracılığıyla yüzey üzerinde 3 boyutlu hareket ettirilmesine dayanır. Bu analizde yüzeyin fiziksel özellikleri ve topografisinin yüksek çözünürlükte ve üç boyutlu görüntülenmesi sağlanır. Ön hazırlığa gerek kalmadan doğrudan yüzey görüntüsünün alınabildiği bu analizde yüzey pürüzlülüğü rakamsal olarak da verilir. Şekil 4.2.a, 4.2.b'de oksidasyon işlemi öncesi Ti plakaların zımparalanmamış ve Şekil 4.2.c ve 4.2.d'de ise zımparalanmış hallerine ait  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  ve  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  yüzey alanı ölçümlerinden alınan üç boyutlu AFM görüntüleri verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Zımparalanmamış Ti yüzeyine (a)  $20\mu\text{m}^2$ , (c)  $5\mu\text{m}^2$ ; P280/P400 numaralı zımpara kâğıtlarıyla zımparalanmış Ti yüzeyine (b)  $20\mu\text{m}^2$ , (d)  $5\mu\text{m}^2$  ait AFM görüntüleri.

Şekil 4.2.a ve Şekil 4.2.c'de görüldüğü gibi zımparalanmamış Ti yüzeyinde doğal oksit tabakasının varlığından kaynaklanan yuvarlak hatlı, dağınık bir pürüzlülüğe rastlanmaktadır. Bu üç boyutlu AFM görüntüsü SEM görüntüleriyle paralellik göstermektedir. Şekil 4.2.b ve 4.2.d'de ise zımparalanan yüzeyden doğal oksit tabakasının uzaklaştırıldığı ve SEM görüntülerinde rastlanan zımparalama ile elde edilen olukların ve vadilerin varlığı AFM analiziyle üç boyutlu olarak görüntülenmiştir. Ayrıca yüzeye uygulanan aşındırma sonucu ortaya çıkan olukların düzenli yapıda olduğu da görülmektedir. Kalelioğlu'nun Ti'un osseointegrasyon ve antibakteriyel özelliklerinin geliştirilmesi için uygun bir yüzey kaplama yaklaşımında bulunduğu çalışmada, tez kapsamında uygulanan yüzey pürüzlendirme işlemi gerçekleştirilmiş ve AFM görüntülerinin benzerlik gösterdiği görülmüştür [134].

İmplant araştırmalarında genellikle pürüzlülüğü tanımlayan parametreler kullanılmaktadır. Ra en çok kullanılan yüzey pürüzlülük parametresidir. Ra, ortalama yüzey pürüzlülüğü veya incelenen kısmın yüzeyine paralel bir düzleme olan tüm noktaların ortalama sapmasıdır. Ayrıca yüzey pürüzlülüğünün bir diğer ifadesi ise aritmetik ortalama sapmaların karekökü (Rq) değeridir. Rmax olarak adlandırılan tüm ölçüm uzunluğu için maksimum yükseklik ile maksimum derinliğin toplamı da yüzey pürüzlülük özelliklerinde bahsederken belirtilen bir başka değerdir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen yüzey pürüzlendirme işlemlerinin AFM analiziyle elde edilen yüzey pürüzlülük değerleri Çizelge 4.1 'de verilmektedir.

**Çizelge 4.1.** Zımparalanmamış ve zımparalanmış Ti yüzeyine ait  $50 \mu\text{m}^2$ 'lik alandan alınan ortalama pürüzlülük değerleri.

Yüzey özelliği	Ra (nm)	Rq (nm)	Rmax (nm)
Ti	116	168	441
Ti <sub>z</sub>	258	176	600

Yüzey pürüzlülük değerlerine bakıldığında zımparalanan Ti yüzeylerde zımparalanmamış yüzeylere oranla pürüzlülüğün daha fazla olduğu görülmüştür. Yüzey pürüzlülüğündeki bu artış yaklaşık 100 ile 200 nm aralığında değişmektedir.

Deligianni ve ark. yüzey pürüzlülüğünün erken ve geç dönemlerdeki hücre tutunması, yapışması ve yayılmasını inceledikleri çalışmalarında P180, P600 ve P1200 numaralı zımpara kağıtları kullanmışlar ve yüzeyde pürüzlülük sağlamışlardır. Çalışmadan elde

ettikleri AFM verilerine göre zımparalama yöntemi kullanılarak yüzeydeki pürüzlülüğün artırıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca zımpara tanecik büyüklüğü arttıkça pürüzlülüğün arttığını vurgulamışlardır. Bu verilerden yola çıkıldığında zımparalama işlemi sonrası pürüzlülük değerindeki artışın literatürle benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Yüzeyde meydana getirilen bu pürüzlülüğün sadece yüzey alanının arttırmakla kalmayıp ıslatılabilirliği ve yüzey enerjisini de arttırdığı düşünülmektedir [132].

#### 4.1.1.3. Su temas açısı tayini

Yüzey yükü, yüzey hidrofilitesi veya hidrofobitesi ve yüzey enerjisi hakkında fikir veren bir diğer yöntem de su temas açısı analizidir. Temas açısı bir katı malzemenin yatay eksenine ile bu malzemenin temas halinde olduğu sıvı veya buhar ara yüzünün üst kısmı arasında kalan açıdır. Temas açısı iç açı ve dış açı olarak ölçülebilmektedir. Bir sıvının katı yüzey üzerinde yayılmasına ve yüzeyi belli oranda kaplamasına "ıslatma", katı yüzeyin herhangi bir sıvı tarafından belli oranda kaplanmasına "ıslanma", bu olayın gerçekleşme derecesine ise "ıslatılabilirlik" veya "ıslanabilirlik" denir [135].

Tez çalışması kapsamında yüzeyin zımparalama işlemi sonrası hidrofilitesindeki ve yüzey enerjisindeki olası değişimini saptanması amacıyla su temas açısı analizleri gerçekleştirilmiştir. Oksidasyon işlemleri öncesi zımparalanmamış Ti yüzeyi ve zımparalanmış Ti yüzeylerin su temas açısı değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Zımparalanmamış (Ti) ve zımparalanmış (Ti<sub>z</sub>) Ti yüzeyine ait su temas açısı değerleri (n=3).

Yüzey özelliği	Su temas açısı ( $\theta_{su}$ [°])
Ti	86.3±5.00
Ti <sub>z</sub>	75.2±5.00

Su temasına yatkınlığı olan ve su ile yaptığı temas açısı 90°'den küçük olan materyallere "hidrofilik", su temasına yatkınlığı olmayan ve su ile yaptığı temas açısı 90°'den büyük olan materyallere ise "hidrofobik" malzeme denir.

Titanyumun hidrofilitisini arttırmak osseointegrasyonda olumlu sonuçlar yaratmaktadır. Gerçekleştirilen su temas açısı ölçümlerinden tüm yüzeylerin hidrofilik yapıda olduğu görülmektedir. Fakat zımparalama işleminden sonra artan yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak su temas açısında düşüş görülmüştür. Su temas açısının düşmesi, polar bir sıvı olan

suyun yayılmasının kolaylaştığını göstermektedir. Bu durum zımparalama arttıkça yüzey hidrofilitesinin arttığının göstergesidir.

Düşük temas açısı değerine sahip olan yüzeyler aynı zamanda yüksek serbest enerjili yüzeyler olarak kabul edilirler. Su damlacıkları düşük enerjili yüzeylerden ayrılmaya çalışırken yüksek enerjili yüzeylere yayılarak kaplama özelliği gösterir. Bu durum düşük enerjili yüzeylerde temas açısını artırırken düşük enerjili yüzeylerde temas açısında düşüşe neden olur. Pegueroles ve ark., Ti plakalar üzerinde yaptıkları pürüzlendirme çalışmaları sonrası su temas açısındaki düşüşle birlikte yüzey serbest enerjisinde artış tespit etmişlerdir. Aynı zamanda yüzey pürüzlülüğü arttıkça su temas açısının azaldığını da belirtmişlerdir [136].

#### **4.1.2. Titanyum plakaların bazik oksidasyonu sonrası karakterizasyonu**

Hem Ti hem de Ti-6Al-4V, korozyon direnci yüksek materyallerdir. Titanyumun yüksek korozyon direnci, yüzeyde oluşan kararlı pasif oksit tabakasına ( $TiO_2$ ) bağlıdır. Bu oksit tabakası, titanyumu asit ataklarına, kimyasal ve ısıl etkilere karşı korumaktadır. Mevcut oksit tabakası herhangi bir şekilde zarar görse bile hava ve su varlığında yeniden oluşabilmektedir. Biyolojik ortamda yapılan korozyon çalışmaları, titanyumun mükemmel korozyon direncinin varlığını doğrulamıştır. Ti yüzeyinde oluşturulan  $TiO_2$  tabakası sayesinde yüzeyde bir pürüzlük meydana getirilir. Artan yüzey pürüzlülüğü, yüzey üzerine yapılacak bir başka kaplama için mikro tutuculuğu, rotasyon ve çekme direncini artırır. Ayrıca  $TiO_2$  kaplandıktan sonra yapay vücut sıvısı içerisinde bekletilen Ti yüzeylerinde daha fazla homojen ve yoğun kalsiyum ve fosfor açısından zengin bileşik oluşumu görülmüştür. Bu kapsamda; osseointegrasyona olumlu etkisi olduğu bilinen ve tez çalışmalarının sonraki basamaklarında uygulanacak olan yüzeyin HA ile kaplanması işlemi öncesi Ti plakaların çeşitli yöntemlerle oksitlendirilerek yüzeyde  $TiO_2$  tabakası oluşturulması hedeflenmiştir.

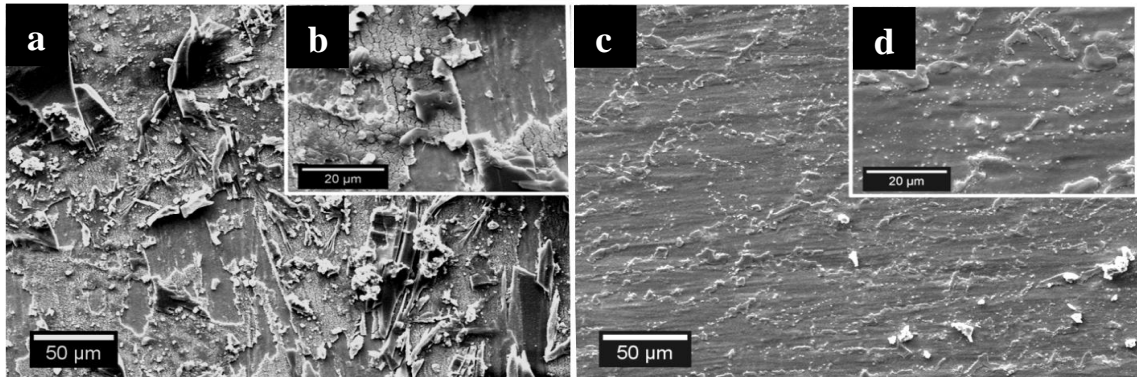
Tez kapsamında Ti plakaların bazik oksidasyon işlemi 10N NaOH içeren çözelti içerisinde  $60^\circ C$ 'de 24 sa boyunca bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Bu esnada NaOH çözeltisinin yüksek normalitesi ve uygulanan yüksek sıcaklık nedeniyle plaka yüzeylerinde sodyum titanat/ $TiO_2$  tabakasının oluşumu sağlanmıştır. Çözelti içerisinden çıkartılan ve oda koşullarında kurumaya bırakılan numuneler iki gruba ayrılarak bir grup NaOH muamelesinden sonra hemen kurumaya bırakılırken, diğer grup 1N HCl çözeltisi içerisinde

1 sa bekletilmiştir. HCl çözeltisinden çıkarılan numuneler distile su ile yıkanarak, kurumaya bırakılmıştır.

Yüzeyi NaOH ile muamele edilmiş ve NaOH uygulaması sonrası HCl uygulanmış olan her iki grubun örneklerin yarısı sıcaklığı 40°C/dk hızında artan fırın içerisinde 600°C'de 2 sa boyunca ısı işleme maruz bırakılmıştır. Bu sayede ısı işleme uygulanmış ve uygulanmamış örnekler arasındaki farklılıklardan yola çıkılarak, ısı işlemin yüzey kimyasında yapacağı değişimlerin anlaşılması amaçlanmıştır. İşlem sonrası fırın içerisinde soğumaya bırakılan örnekler, oda koşullarına bir anda çıkarılmayarak sıcaklık farkından kaynaklanacak olası çatlakların oluşumu engellenmiştir. Oda koşullarına gelen örneklerin karakterizasyon çalışmaları aşağıda detaylıca anlatılmaktadır.

#### 4.1.2.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

Bazik oksidasyon işlemi sonrasında elde edilen yüzey hakkında daha detaylı bilgi edinmek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3'de NaOH ile muamele edilen yüzey ile NaOH sonrası HCl uygulanan yüzeyin SEM görüntüleri verilmiştir.

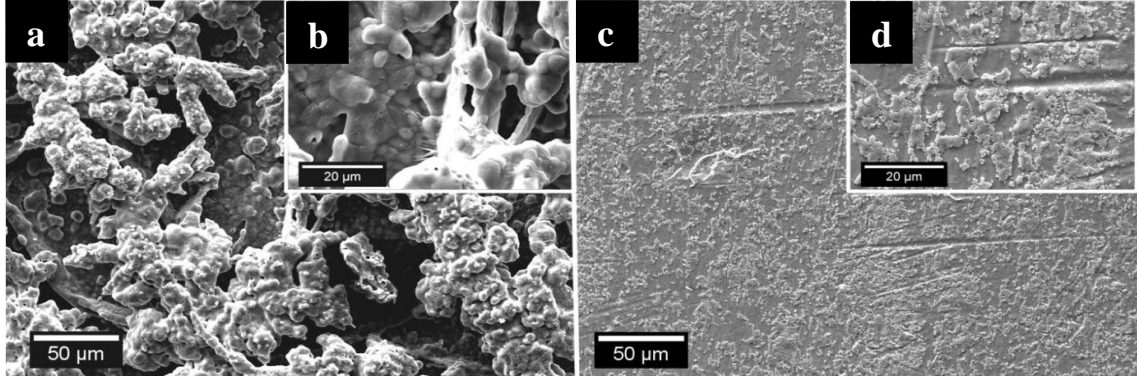


**Şekil 4.3.** Zımparalama işlemi sonrası NaOH ile bazik oksidasyona uğratılmış Ti yüzeyine (a) x1.00 K, (b) 5.00 K; NaOH ile muamele sonrası HCl uygulanmış Ti yüzeyine (c) x1.00 K, (d) x5.00 K ait SEM görüntüleri.

Şekil 4.3.a ve 4.3.b'de NaOH uygulaması sonrası elde edilen yüzeylerde sodyum tuzları ve alkali titanat tabakası açıkça görülmektedir. Yıkamalara rağmen uzaklaşmayan alkali titanat tabakasının HCl uygulaması sonrasında ortadan kalktığı ve yüzeyde sadece TiO<sub>2</sub> tabakasının kaldığı Şekil 4.3.c ve 4.3.d'de görülmüştür. HCl ile muamelenin bu yapıyı uzaklaştırması, nano boyuttaki pürüzlülüğü artırılmasına rağmen mikron boyuttaki pürüzlülüğü azaltmaktadır.



Yüzeyde meydana gelen alkali titanat tabakasını amorf veya kristalin yapıda kararlı bir hale getirmek ve alkali muamele sonrası yüzeyde oluşan anataz fazındaki  $TiO_2$  tabakasını daha kararlı yapıdaki rutil faza dönüştürmek amacıyla  $600^\circ C$ 'de ısıtım işlemi uygulanmıştır. Uygulama sonrası elde edilen yüzeye ait SEM görüntüleri Şekil 4.4 verilmiştir.



**Şekil 4.4.** NaOH ile muamele edildikten sonra  $600^\circ C$ 'de ısıtım işlemi uygulanmış Ti yüzeyine (a) x1.00 K, (b) x5.00 K; NaOH/HCl ile muamele edildikten sonra ısıtım işlemi uygulanmış Ti yüzeyine (c) x1.00 K, (d) x5.00 K ait SEM görüntüleri.

Zımparalama sonrası NaOH ile muamele edilen Ti yüzeyinde sodyum titanat tabakası oluşturulmuş ve ısıtım işlemi uygulanmış plakaların SEM görüntülerinde, kümelenmiş yapıda olan sodyum titanat tabakasının çekirdeklenerek büyüdüğü ve tüm yüzeyi kapladığı görülmektedir. Üst kısımlarında bulunan sodyum titanatın hatları yuvarlaşarak kümelenmeye doğru gittiği görülmüştür. Ti plakanın derinliklerine oluşan  $TiO_2$  tabakasının da tüm Ti yüzeyi kapladığı açıkça ortadadır.

Zımparalama sonrası NaOH'a maruz bırakılmış, ardından HCl ile yıkanmış ve ısıtım işlemi uygulanmış plakaların Şekil 4.4.c ve 4.4.d'de görülen SEM görüntülerinde ise yüzeyde ısıtım işlemi uygulanmamış yüzeye oranla (Şekil 4.3.a, b, c ve d) daha kalın yapıda olan  $TiO_2$  tabakasına rastlanmaktadır. Nano boyutta pürüzlülüğe sahip olan bu yapının alt kısımlarından zımparalama ile oluşturulan mikron boyuttaki olukların varlığına rastlanmaktadır.

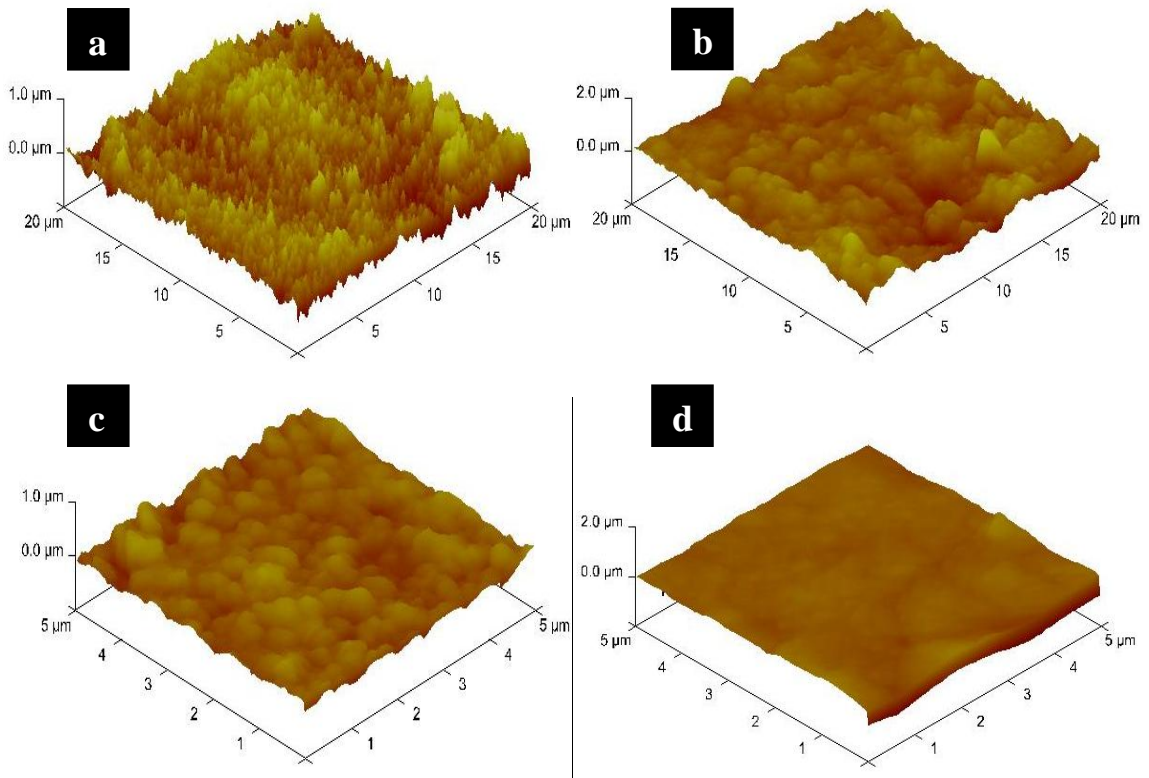
İlgili literatür incelendiğine NaOH ve HCl kullanarak yüzeyde bir oksit tabakasının oluşturulduğu çalışmalara sıkça rastlanmaktadır [137]. Takemoto ve ark., Ti yüzeyine NaOH uygulamasından sonra su ve seyreltik HCl uyguladıkları yüzeylerin apatitik çekirdeklenme üzerine olan etkisini inceledikleri çalışmada, HCl uygulanmış yüzeylerin HA oluşumunu daha iyi desteklediğini belirtmişlerdir. Fujibayashi ark. gerçekleştirdikleri histoloji çalışmalarında sodyumun uzaklaştırıldığı Ti yüzeylerin apatit oluşumunu

desteklediğini belirtmişlerdir. Fakat Ti substratı üzerinde oluşan bu biyoaktif tabakanın erken dönemde çevre doku ile sıkı bağlar yapmasına rağmen 8–10 hafta sonunda Ti substratı ile biyoaktif yüzey arasında, aşırı bağlanma nedeniyle kırılmaların gerçekleştiğini vurgulamışlardır. Oysa bu soruna yüzeyinde sodyum bulunduran Ti yüzeyinde rastlanmamıştır [138].

Yapılan deneysel çalışmalarda HA çekirdeklenmesini destekleyecek ve tutunmasını sağlayacak Ti yüzeylerin elde edilmesi amaçlanmıştır. HCl uygulanmış yüzeylerin çekirdeklenmeyi daha iyi desteklemesine rağmen HA'nın tutunması için yeterli yüzey pürüzlülüğünü sağlamadığı görülmüştür. Elde edilen değerler ve literatürdeki bilgiler ışığında tez çalışmasının bundan sonraki basamaklarında NaOH muamelesinden sonra HCl uygulanmasından vazgeçilmiştir.

#### 4.1.2.2. AFM analizi

NaOH ile oksitlendirilmiş Ti plakaların termal uygulama sonrası yüzeyinde meydana gelen değişikliklerin tespiti için AFM analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5'de bu gruplara ait  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  ve  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  ölçülerindeki üç boyutlu AFM görüntüleri verilmiştir.



**Şekil 4.5.** NaOH ile muamele edildikten sonra ısıtılmış Ti yüzeyine (a)  $20\mu\text{m}^2$ , (c)  $5\mu\text{m}^2$ ; NaOH/HCl ile muamele edildikten sonra ısıtılmış Ti yüzeyine (b)  $20\mu\text{m}^2$ , (d)  $5\mu\text{m}^2$  ait AFM görüntüleri.

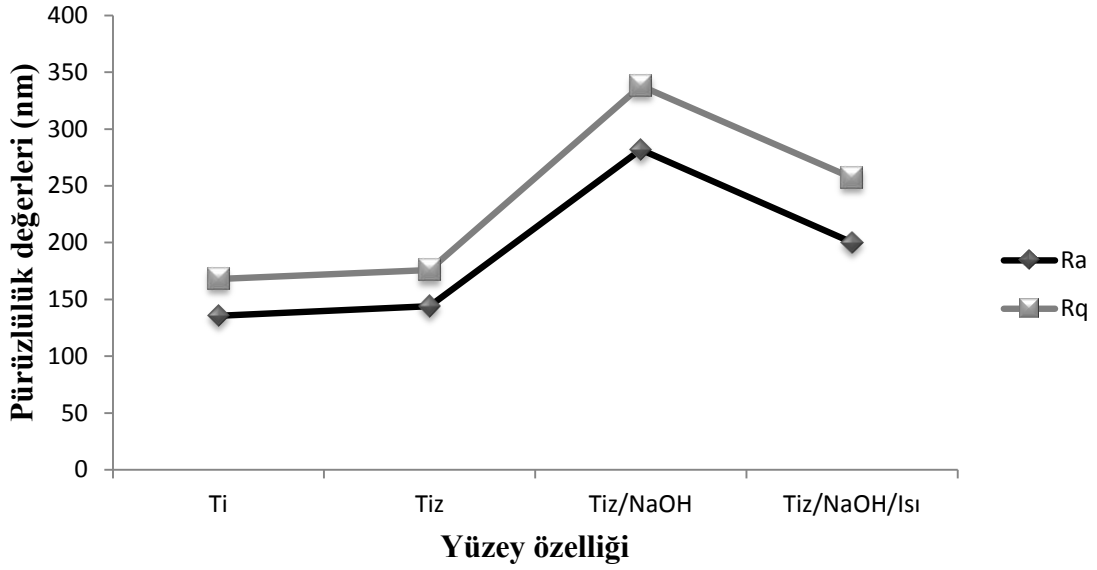
Şekil 4.5.a ve 4.5.c'de NaOH ile muamele edilmiş Ti yüzeyindeki pürüzlülüğün Şekil 4.5.b ve 4.5.d'de verilmiş olan zımparalanmış yüzeylere oranla daha yoğun olduğu görülmektedir. NaOH ile muamele edilen yüzeyde sivri tepeliklerin oluşumu gözlemlenmektedir. Termal uygulama sonrası bu sivri yapıların yuvarlaklaştığı ve ortadan kaybolduğu görülmektedir. Ayrıca NaOH sonrası elde edilen pürüzlülüğün ısıtma işlemi sonrası azaldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu veriler SEM görüntüleri ile paralellik göstermektedir. Ghosh ve ark. ZnO yüzeyini zımparaladıktan sonra ısıtma işlemi uygulamışlar ve ısıtma işlemi sonrası elde ettikleri yüzeyin pürüzlülüğünün azaldığını göstermişlerdir. Çalışmanın AFM görüntüleri incelendiğinde tez çalışmasında elde edilen AFM görüntüleriyle benzerlik göstermektedir [139].

Zımparalama işlemleriyle yüzey alanı arttırılan ve yüzeyinde sodyum titanat/TiO<sub>2</sub> tabakası oluşturulan Ti plakların pürüzlülük değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Ayrıca zımparalanmamış yüzey, zımparalanmış yüzey, NaOH ile muamele edilmiş yüzey ve NaOH muamelesinden sonra termal işlem uygulanmış yüzeyin pürüzlülük değerleri Şekil 4.6'daki grafikte karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.3.** Zımparalama sonrası NaOH ile bazik oksidasyona uğratılmış (Ti<sub>z/B</sub>) ve NaOH ile oksitlendirildikten sonra ısıtma işlemi uygulanmış (Ti<sub>z/B/Isı</sub>) Ti yüzeyine ait ortalama pürüzlülük değerleri.

Yüzey özelliği	Ra (nm)	Rq (nm)	Rmax (nm)
Ti <sub>z/B</sub>	457	338	1859
Ti <sub>z/B/Isı</sub>	260	257	1000

Yüzey pürüzlülük değerlerine bakıldığında NaOH muamelesi ardından uygulanan ısıtma işlemi sonrası Ra ve Rq değerlerinde azalma görülmektedir. Ayrıca Rmax değerindeki ani düşüş AFM ve SEM görüntülerinde görülen sivri tepeliklerin termal işlem sonrası yumuşak hatlı yapılara dönüşmesiyle paralellik göstermektedir.



**Şekil 4.6.** Zımparalanmamış yüzeyin, zımparalanmış yüzeyin, NaOH ile muamele edilerek bazik oksidasyona uğratılmış yüzeyin ve bazik oksidasyon sonrası ısıtılmış yüzeyin pürüzlülük değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.6 incelendiğinde hiçbir yüzey modifikasyonu yapılmamış Ti'a oranla zımparalanmış Ti yüzeyinde pürüzlülüğün arttığı görülmektedir. Bazik oksidasyon işlemi sonrası yüzeyde meydana getirilen pürüzlülükte önemli bir artış tespit edilmiştir. Yer yer mikron boyutlarına varan bu pürüzlülük ısıtılmış yüzeyde belirgin bir biçimde düşmektedir.

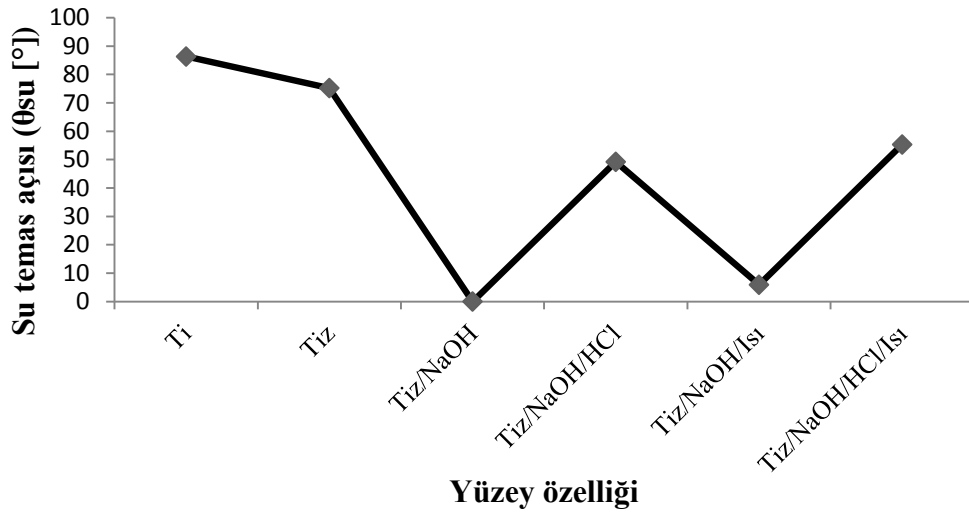
#### 4.1.2.3. Su temas açısı tayini

Tez çalışmaları kapsamında yukarıda bahsi geçen yüzey modifikasyonları sonrasındaki Ti'un yüzey yükü, yüzey hidrofilisitesi veya hidrofobisitesi ve yüzey enerjisi hakkında bilgiler edinmek amacıyla su temas açısı analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ısıtılmış Ti yüzeylerin su temas açısı değerleri Çizelge 4.4'de verilmiştir. Ek olarak deneysel çalışmalar boyunca Ti yüzeyine uygulanan tüm yüzey modifikasyonları sonucu elde edilen su temas açısı değerleri Şekil 4.7 de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** Zımparalama sonrası NaOH ile bazik oksidasyona uğratılmış ( $Ti_{z/B}$ ), NaOH den sonra HCl uygulanmış ( $Ti_{z/B}/HCl$ ), NaOH ile oksitlendirildikten sonra ısıtılmış ( $Ti_{z/B}/Isı$ ) ve HCl uygulandıktan sonra ısıtılmış ( $Ti_{z/B}/HCl/Isı$ ) Ti yüzeyine ait su temas açısı değerleri (n=3).

Yüzey özelliği	Su temas açısı ( $\theta_{su}$ [°])
$Ti_{z/B}$	$0.0 \pm 0,0$
$Ti_{z/B}/HCl$	$49.2 \pm 4.0$
$Ti_{z/B}/Isı$	$5.9 \pm 0.0$
$Ti_{z/B}/HCl/Isı$	$55.3 \pm 3.0$

Çizelge 4.4'de belirtilen su temas açısı verilerinden de anlaşılacağı üzere tüm işlemler sonrası yüzey hidrofilitik yapıdaki özelliğini korumaktadır. NaOH muamelesinden sonra yüzeyin tamamen hidrofilitik özellik kazandığı görülmektedir. Bu durumun yüzeyin morfolojik özelliğinden de kaynaklandığı söylenebilir. HCl uygulanmış yüzeylerde ise azalan yüzey pürüzlülüğü ve uzaklaşan sodyum tuzları ve sodyum titanat tabakasından dolayı su temas açısının yükseldiği görülmektedir. Isıtılmış sonrası su temas açılarının her iki grup için de arttığı gözlemlenmiş ve hidrofilitide azalma olmasına rağmen anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.



**Şekil 4.7.** Yüzeye uygulanan tüm modifikasyon işlemleri sonrası elde edilen su temas açısı değerleri karşılaştırılması.

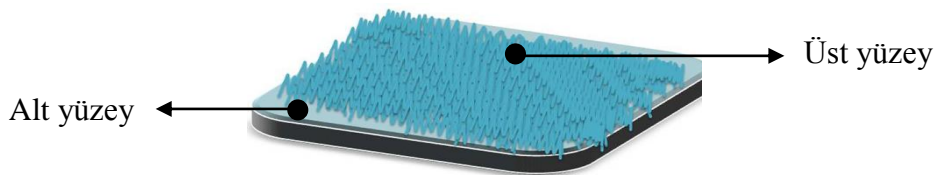
Şekil 4.7'de belirtilmiş yüzeye uygulanan tüm modifikasyon işlemleri sonrası elde edilen su temas açısı verilerine bakıldığında Ti'un NaOH ile oksidasyonu sonrası su temas açısı

değerlerinde şiddetli bir düşüş görülmektedir. Bu durum yüzey üzerinde bolca bulunan sodyum tuzları ve sodyum titanat/TiO<sub>2</sub> tabakasından kaynaklanmaktadır. Azalan su temas açısı değeri yüzeyin hidrofilisitesindeki artışa işaret etmektedir. Ravichandran ve ark. NaOH ile oksitlendirdikleri Ti plakaların yüzeylerindeki su temas açılarının belirgin bir biçimde azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca yüzeyde oluşan TiO<sub>2</sub> tabakası nedeniyle serbest yüzey enerjisinin artmasıyla birlikte yüzeyin hidrofilik özellik kazandığı sonucuna varmışlardır [127]. Şekil 4.7'deki verilere bakıldığında bazik oksidasyon ve ısıl işlem sonrası yüzey enerjisinin de arttığı söylenebilir. Yüzey enerjisindeki bu artışın, tez kapsamında bir sonraki aşamada uygulanacak olan yüzeyin HA ile kaplamasında olumlu etkileri olacağı düşünülmektedir.

#### 4.1.2.4. Enerji saçılımlı x-ışınları (EDX) analizi

Enerji saçılımlı x-ışınları mikro analizi, elektron mikroskobu içerisinde bulunan karakteristik x-ışınlarının enerji değerlerinin ölçülmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu analizde numune üzerine düşürülen taramalı bir elektron demeti numune içindeki elektronlar ile çarpışarak elektronların bir üst seviyedeki orbitale çıkmalarını sağlar. Kararsız yapıda olan bu elektronlar kendi orbitallerine geçerken bir enerji açığa çıkarır. Yayılan bu x-ışınları analiz edilerek, numunenin elementel bileşimi tespit edilebilir.

Tez çalışmaları kapsamında EDX analizi, bazik oksidasyon sonrası yüzeyin elementel içeriği hakkında bilgi edinmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yukarıda bahsi geçen analizler sonucu hedeflenen amaca en uygun gruplar olarak belirlenen NaOH uygulaması ve NaOH uygulamasından sonra ısıl işleme maruz bırakılmış Ti yüzeylerin EDX analizi yapılmıştır. Çizelge 4.5'de EDX analizinin ağırlıkça atom yüzdeleri ve Çizelge 4.6'da yüzeyde bulunan ağırlıkça oksitlenmiş atom yüzdeleri verilmiştir. Taramalı elektron mikroskobuyla gerçekleştirilen bu analizde örneklerin ekrandaki görüntüsüne bakılarak bir alt kısma bir de üst kısma denk gelecek biçimde analiz gerçekleştirilmiştir. Daha net anlaşılması için bu durum Şekil 4.8'de şematize edilmiştir.



Şekil 4.8. EDX analizinin yapıldığı alt ve üst yüzeyin şematik gösterimi

**Çizelge 4.5.** Zımparalama sonrası NaOH ile bazik oksidasyona uğratılmış ( $Ti_{z/B}$ ) ve NaOH ile oksitlendirildikten sonra ısıtıl işlem uygulanmış ( $Ti_{z/B/Isı}$ ) Ti yüzeyine ait kütlece atom yüzdeleri.

Yüzey özelliği	Atom yüzdeleri (ağırlıkça %)				
	Oksijen (O)	Sodyum (Na)	Titanyum (Ti)	Klor (Cl)	Kalsiyum (Ca)
$Ti_{z/B}$ (Alt)	19.56	0.27	80.18	-	-
$Ti_{z/B}$ (Üst)	50.97	34.97	4.36	-	0.7
$Ti_{z/B/Isı}$ (Alt)	42.91	26.74	27.38	0.67	2.3
$Ti_{z/B/Isı}$ (Üst)	60.52	39.17	0.31	-	-

EDX analiz sonuçlarına bakıldığında  $Ti_{z/NaOH}$  deney grubunun alt kısımlarında bulunan O varlığı  $TiO_2$  tabakasından kaynaklanmaktadır. Termal muamele sonrası alt kısımlardaki O miktarındaki artış artan  $TiO_2$  tabakasına işaret etmektedir. Bazik oksidasyon ile oksitlendirilmiş Ti yüzeyinin üst kısımlarda bulunan O yüzdesinin alt kısımlara oranla daha fazla olması yüzeyde oluşturulan  $TiO_2$  tabakasına ilaveten sodyum titanat tabakasından gelen O varlığındandır.

**Çizelge 4.6.** Zımparalama sonrası NaOH ile bazik oksidasyona uğratılmış ( $Ti_{z/B}$ ) ve NaOH ile oksitlendirildikten sonra ısıtıl işlem uygulanmış ( $Ti_{z/B/Isı}$ ) Ti yüzeyine ait kütlece oksitlenmiş atom yüzdeleri.

Yüzey özelliği	Oksitlenmiş atom yüzdeleri (ağırlıkça %)			
	Sodyum oksit ( $Na_2O$ )	Titanyum oksit ( $TiO_2$ )	Kalsiyum oksit ( $CaO$ )	Fosfat ( $PO_4$ )
$Ti_{z/B}$ (Alt)	42.11	53.35	3.76	0.67
$Ti_{z/B}$ (Üst)	99.04	0.96	-	-
$Ti_{z/B/Isı}$ (Alt)	0.27	99.73	-	-
$Ti_{z/B/Isı}$ (Üst)	85.09	13.14	1.77	-

Çizelge 4.6'da belirtilen bazik oksidasyon sonrası yüzeyde bulunan ağırlıkça oksitlenmiş atom yüzdesi incelendiğinde SEM görüntülerinde de rastlanan sodyum titanat tabakasının varlığı  $Ti_{z/B}$  ve  $Ti_{z/B}/Isı$  örneklerinin üst yüzeylerinde yoğun bir şekilde görülmektedir. Fakat her iki grubunda alt kısımlarından alınan ölçümlerde  $Ti_{z/B}$  grubunda  $TiO_2$  miktarı %53'lerde iken ısı işlem sonrası bu miktarın %99'lara çıkması yüzeyde bulunan  $TiO_2$  tabakasının arttığına işarettir.

Titanyumun anataz fazından daha kararlı olan rutil faza tersinmez faz değişiminin 600–800°C'de gerçekleştiği bilinmektedir [97]. Bazik oksidasyonla oksitlendirilmiş yüzeylere uygulanan 600 °C'lik ısı sayesinde yüzeyde rutil fazda  $TiO_2$  oluşumu sağlanmıştır. Forsgren ve ark. Ti'u 800 °C ye maruz bırakarak rutil fazda elde ettikleri  $TiO_2$ 'in HA oluşumunu diğer fazlara oranla çok daha fazla desteklediğini belirtmişlerdir [140].

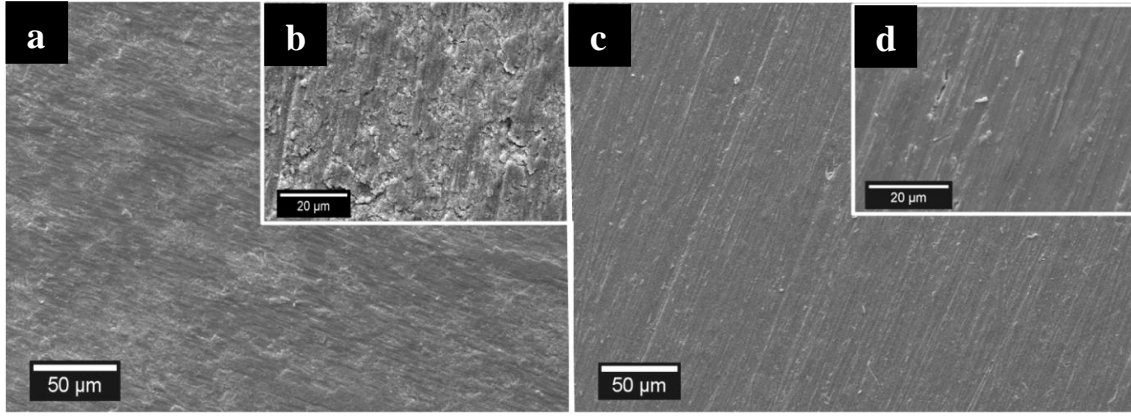
Sonuç olarak bazik oksidasyon çalışmaları sonrası Ti yüzeylerinde  $TiO_2$  tabakası oluşturulmuş ve bu tabakanın ısı işlem ile kalınlığının artırılması sağlanmıştır. Elde edilen  $TiO_2$  tabakası rutil fazda olup tez kapsamında istenilen amaca tam olarak hizmet etmektedir.

#### **4.1.3. Anodik oksidasyon işlemi öncesi hazırlanan titanyum plakaların karakterizasyonu**

##### **4.1.3.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi**

Tez kapsamında yüzeyin oksitlendirilmesinde anodik oksidasyon tekniği de kullanılmıştır. Yüzeyde gerçekleştirilecek modifikasyon işlemi öncesi plakalar 5'er dk rastgele olacak biçimde P120, P280, P400 ve P600 numaralı SiC zımpara kâğıtlarıyla zımparalanmıştır. Daha detaylı bilgiler Bölüm 3.2.2.1'de anlatılmıştır. Yüzey hakkında bilgi edinmek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Zımparalanmamış Ti yüzeyi ve anodik oksidasyon öncesi zımparalanmış Ti yüzeylerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.9'de verilmiştir.

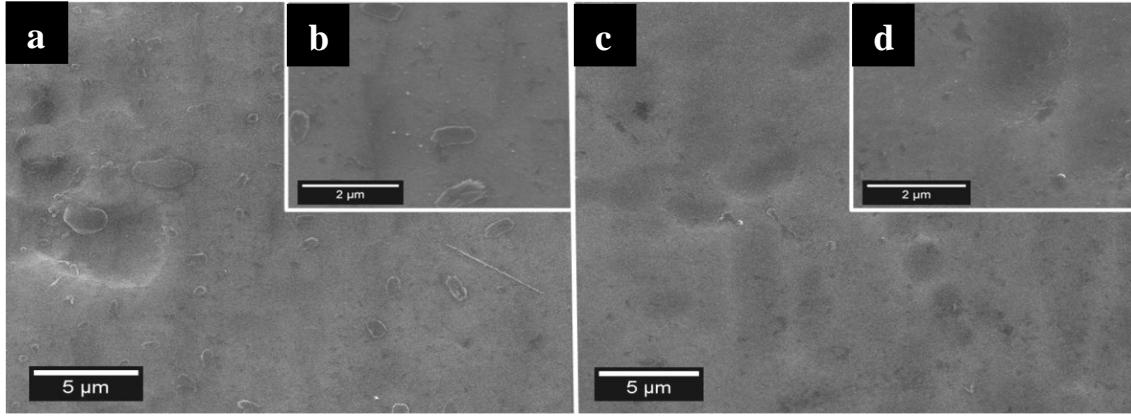




**Şekil 4.9.** Zımparalanmamış Ti yüzeyine (a) x1.00 K, (b) x5.00 K; P120, P280, P400 ve P600 numaralı zımpara kâğıtlarıyla zımparalanmış Ti yüzeyine (c) x1.00 K, (d) x5.00 K ait SEM görüntüleri

Şekil 4.9.c ve d incelendiğinde işlem görmemiş Ti yüzeyinde bulunan kirli doğal oksit tabakasının zımparalama işlemi sonrası uzaklaştığı görülmektedir. Ayrıca "aynalama" olarak adlandırılan ve bir seri zımpara kağıdıyla gerçekleştirilen zımparalama işlemi sonrası en son uygulanan P600 numaralı SiC zımpara kağıdının tanecik boyutu nedeniyle birbirine oldukça yakın ve derinliği az olan ortalama 2.5 µm (n=100) aralıklarla oluklar oluşturulduğu belirlenmiştir.

Zımparalama işlemi sonrasında anodik oksidasyon gerçekleştirilmeden önce yüzeyde bulunan doğal oksit tabakasının tam anlamıyla uzaklaştırılmasını sağlamak için %1 (v/v) HF; %1.5 (v/v) HNO<sub>3</sub>'lük çözelti ile yapılan ön uygulamanın, yüzey üzerine olan olası etkilerini anlamak amacıyla 5 ve 10 dk'lık iki farklı süre seçilmiştir. %1(v/v) HF; %1.5 (v/v) HNO<sub>3</sub>'lük çözelti ile gerçekleştirilen kimyasal aşındırma işlemi sonrasına ait SEM görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir.



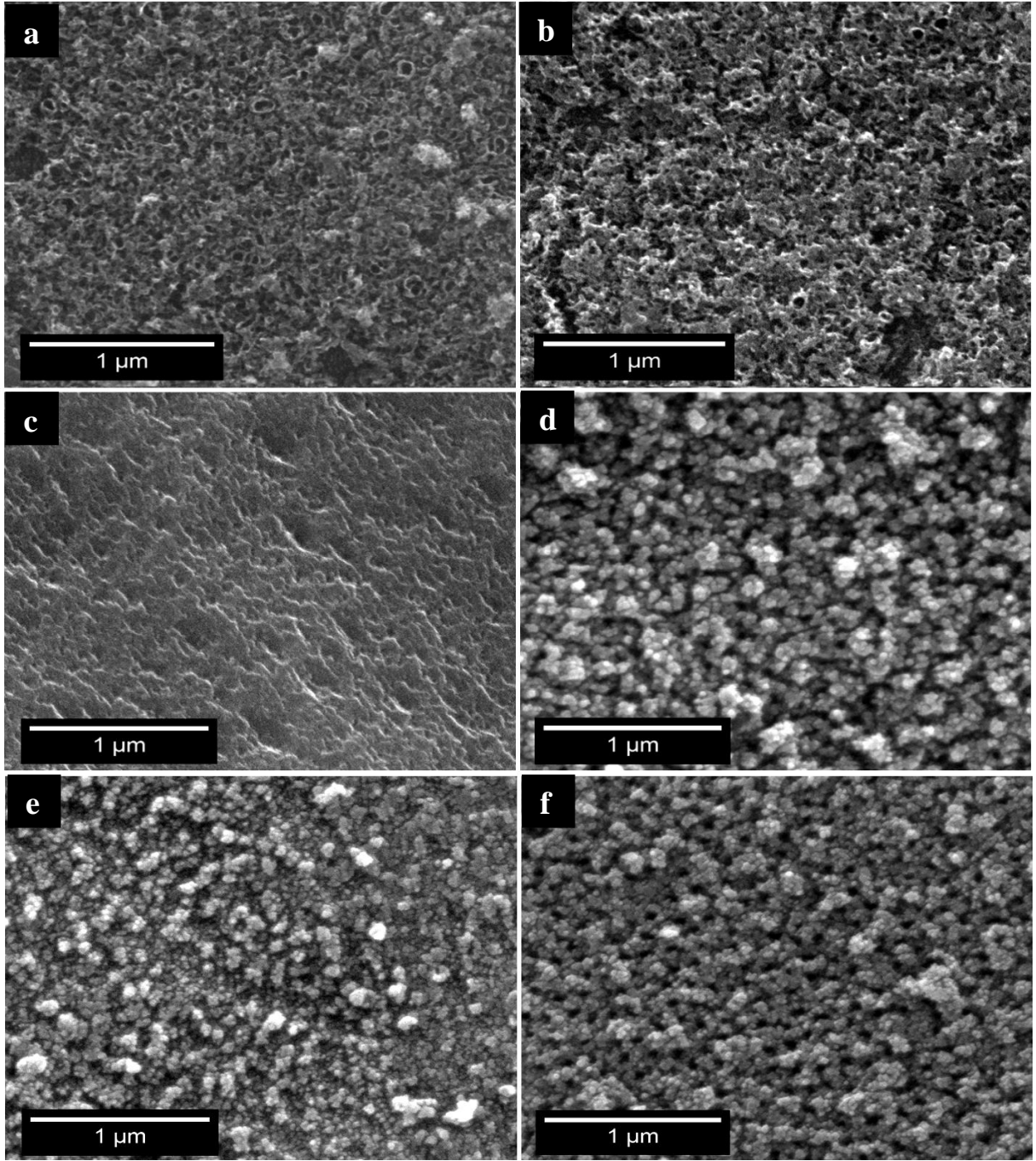
**Şekil 4.10.** Beş dakika %1 (v/v) HF; %1.5 (v/v) HNO<sub>3</sub>'lük çözelti ile muamele edilmiş Ti yüzeyine (a) x1.00 K, (b) x5.00 K; On dakika %1 (v/v) HF; %1.5 (v/v) HNO<sub>3</sub>'lük çözelti ile muamele edilmiş Ti yüzeyine (c) x1.00 K, (d) x5.00 K ait SEM görüntüleri

Şekil 4.8'de verilen 5 ve 10 dk'lık ön yüzey uygulamaları arasında 10 dk'lık yüzeyin daha temiz görülmesine rağmen iki süre arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu nedenle 5 dk'lık ön uygulama işleminin yeterli olduğu düşünülmüş ve çalışmanın devamı bu işlem süresi üzerinden gerçekleştirilmiştir.

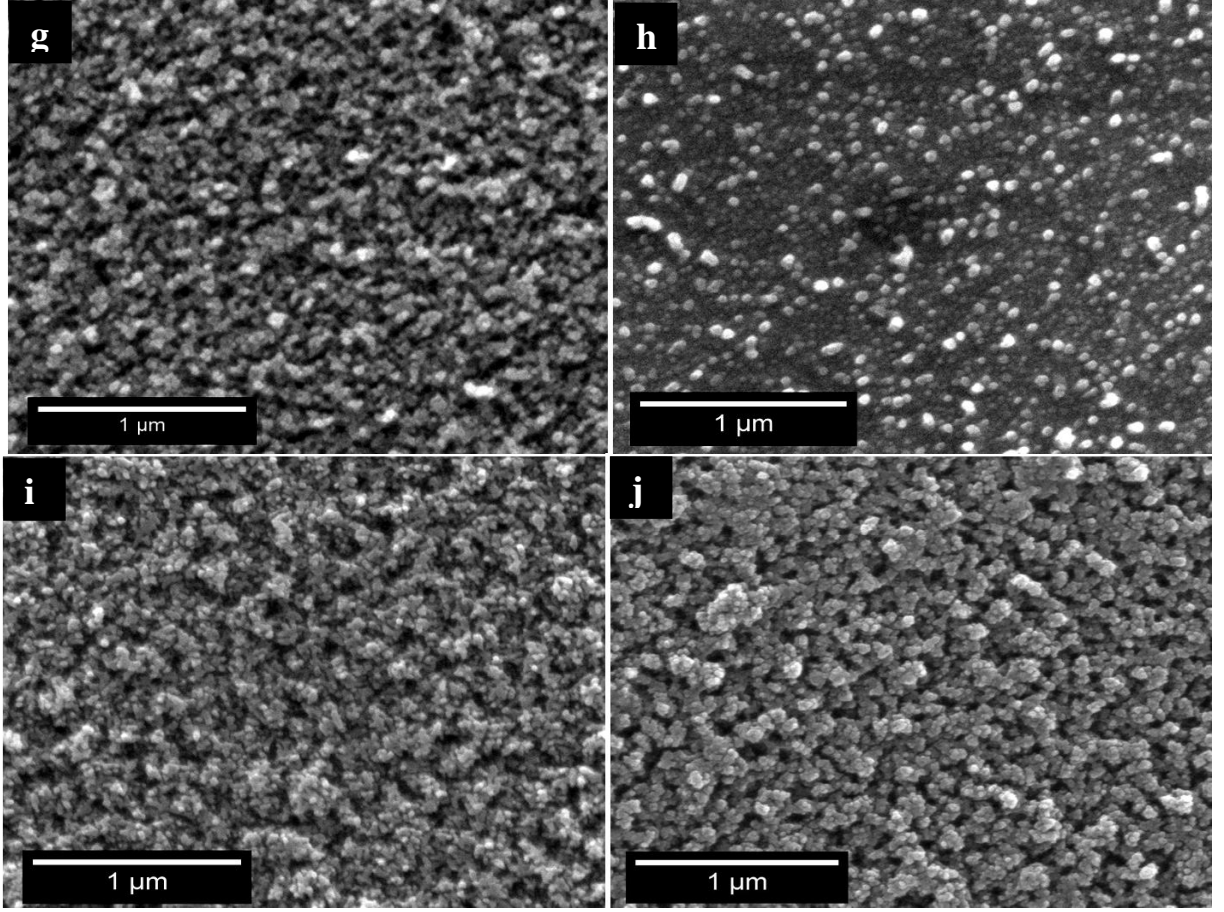
#### **4.1.4. Titanyum plakaların anodik oksidasyonu sonrası karakterizasyonu**

##### **4.1.4.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi**

Yüzde 1'lik HF çözeltisi içerisinde, 0–30 volt (V) potansiyel farkına sahip, 0–5 akım (A) aralığında doğru bir akım sağlayan güç kaynağı ile pozitif (+) ucuna titanyum plaka ve negatif (-) ucuna saf platin plaka tutturulan düzende anodizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan anodizasyon düzeneğinde işlem süresi ve potansiyel farkında değişiklikler yapılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Şekil 4.11'de belirtilen koşullara ait anodik oksidasyonla oksitlendirilmiş Ti yüzeylerin SEM görüntüleri verilmiş ve elektrolit ve potansiyel farkı değişimine göre yüzey morfolojileri Çizelge 4.7'de özetlenmiştir.



**Şekil 4.11.** Anodizasyon yöntemi ile oksitlendirilmiş Ti yüzeylerine ait SEM görüntüleri (x100.0 K); **(a)** 20V, 20dk, 1cm, **(b)** 20V, 20dk, 2cm, **(c)** 20V, 20dk, 3cm, **(d)** 20V, 30dk, 2cm, **(e)** 20V, 30dk, 3cm, **(f)** 20V, 45dk, 1cm.



**Şekil 4.11. devamı** Anodizasyon yöntemi ile oksitlendirilmiş Ti yüzeylerine ait SEM görüntüleri (x100.0 K); **(g)** 30V, 30dk, 2cm, **(h)** 30V, 30dk, 3cm, **(i)** 40V, 30dk, 2cm, **(j)** 40V, 30dk, 3cm.

**Çizelge 4.7.** Elektrolit ve potansiyel farkı değişimine göre yüzey morfolojileri.

Gerilim (Uygulama süresi)	Anot/katot arası mesafe		
	1cm	2cm	3cm
40 V (30 dk)	-	Homojen yapıda, kalın cidarlı, yaklaşık 47 nm civarında çapa sahip seyrek delikli ve kısmen poröz süngerimsi TiO <sub>2</sub> tabaka	Homojen yapıda, kalın cidarlı, yaklaşık 57 nm civarında çapa sahip yoğun delikli ve kısmen poröz süngerimsi TiO <sub>2</sub> tabaka
30 V (30 dk)	-	Homojen yapıda kısmen poröz süngerimsi TiO <sub>2</sub> tabaka	Homojen olmayan gözeneksiz pürüzlü TiO <sub>2</sub> tabaka
20 V (20 dk)	Homojen olmayan yapıda dışa doğru konikleşen tübüler şekli bozulmuş poröz süngerimsi TiO <sub>2</sub> tabaka	Homojen olmayan yapıda dışa doğru konikleşen tübüler şekli bozulmuş poröz süngerimsi TiO <sub>2</sub> tabaka	Homojen olmayan gözeneksiz pürüzlü TiO <sub>2</sub> tabaka
20 V (30 dk)	-	Homojen yapıda kalın cidarlı kısmen poröz süngerimsi TiO <sub>2</sub> tabaka	Homojen yapıda kalın cidarlı kısmen poröz süngerimsi TiO <sub>2</sub> tabaka
20 V (45 dk)	Homojen yapıda, kalın cidarlı, yaklaşık 75 nm civarında çaplara sahip çok yoğun delikli ve kısmen poröz süngerimsi TiO <sub>2</sub> tabaka	-	-

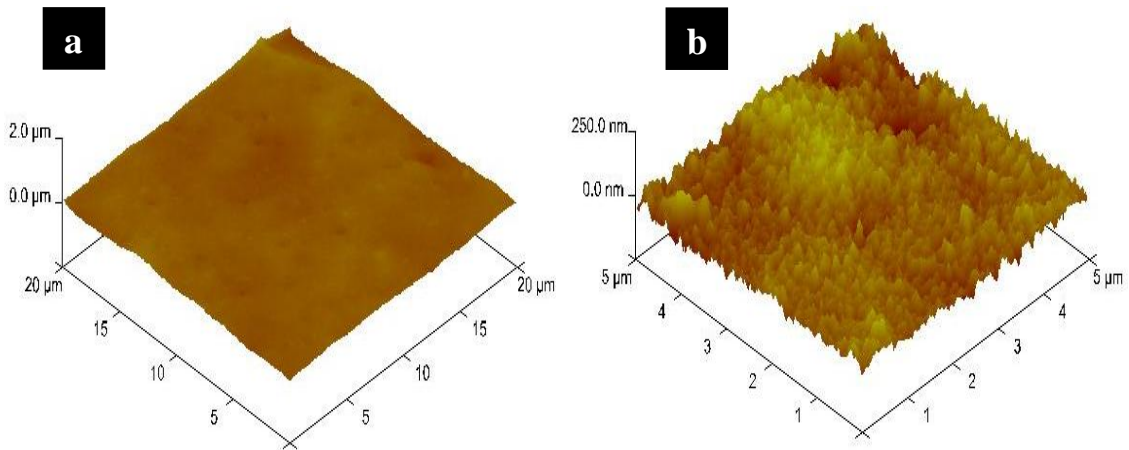
Anodik oksidasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre anot/katot arası mesafe arttıkça gözenekli yapının azaldığı ve yüzeyin sadece pürüzlü bir hal aldığı görülmektedir. Voltajın artmasıyla pürüzlü yapının delikli, poröz bir morfolojiye dönüştüğü dikkat çekmektedir. 20 volt anodizasyon değerinde 45 dk'lık uygulama süresi sonrası yaklaşık 75

nm kalınlığında Ti yüzeyinden yukarı doğru bireysel ve dairesel nano yapılar görülmektedir. Bu yapılar tam olarak tübüler bir biçim almamalarına rağmen homojen halde tüm yüzeyi kaplamaktadırlar. Oluşan bu poröz yapının nasıl meydana geldiği şu ana kadar tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, metal yüzeyinde bariyer görevi gören tabakanın kırılma gerilimi değerinin aşılması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Yüzeydeki değişim çukur bölgelerde elektrolitin tutunmasını sağlar ve nano tübüler yapıya benzer volkanimsi bir görüntüsü olan TiO<sub>2</sub> tabakası oluşur.

Uygulanan diğer voltaj, süre ve uzaklık değerlerinde iç içe girmiş, homojenliği bozulmuş TiO<sub>2</sub> tabakanın varlığına rastlanmıştır. Bu nedenle 45dk, 20 V ve 1cm koşullarına sahip anodizasyon işleminin istenilen amaca uygun olduğu düşünüldüğünden çalışmanın bundan sonraki basamakları bu koşullarda gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1.4.2. AFM analizi

Optimizasyon çalışmaları sonrasındaki SEM görüntülerinden yola çıkılarak tez çalışmalarının bundan sonraki basamaklarında uygulanma kararı alınan 1cm mesafeden 20 V değerinde 45 dk'lık anodizasyon işlemi sonrası yüzeyin üç boyutlu morfolojisinin belirlenmesinde AFM analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12'de bu yüzeye ait 20µm x 20µm ve 5µm x 5µm ölçülerindeki üç boyutlu AFM görüntüleri verilmiştir.



**Şekil 4.12.** Anodik oksidasyonla oksitlendirilmiş Ti yüzeyine (Ti<sub>Z/A</sub>) ait AFM görüntüleri (a) 20 µm<sup>2</sup>, (b) 5 µm<sup>2</sup>.

Şekil 4.12'deki AFM görüntüleri incelendiğinde yüzey morfolojisinin nano boyutlarda olduğu görülmektedir. Yüzeyde görülen sivri tepelerin bazik oksidasyon ile elde edilenlere oranla daha küçük boyutta ve daha yoğun oldukları gözlemlenmektedir. AFM analiziyle elde edilen pürüzlülük değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Anodik oksidasyon öncesi zımparalanmış ( $Ti_z$ ) ve anodik oksidasyonla oksitlendirilmiş yüzeye ( $Ti_{z/A}$ ) ait ortalama pürüzlülük değerleri.

Yüzey özelliği	Ra (nm)	Rq (nm)	Rmax (nm)
$Ti_z$	116	168	441
$Ti_{z/A}$	588	615	903

İlgili literatür incelendiğinde anodizasyon işlemleri sonrası nano boyuttaki yüzey pürüzlülüğünün artarken mikro boyuttaki pürüzlülüğün azaldığı anlaşılmaktadır. Larsson ve ark. Ti yüzeylerini anodizasyon ile oksitlendirdikten sonra yüzeydeki pürüzlülüğün %33 arttığını ifade etmişlerdir. Çizelge 4.8'de verilen pürüzlülük değerlerinden, anodizasyon işlemi sonrası zımparalanmış yüzeylere oranla nano boyuttaki pürüzlülüğün arttığı görülmektedir. Bu veriler SEM ve AFM analizi sonrası alınan sonuçları destekleyecek biçimdedir ve literatürle örtüşmektedir [141].

#### 4.1.4.3. Su temas açısı tayini

Deneysel çalışmalar kapsamında anodize edilmiş yüzeyin yüzey yükü, yüzey hidrofilitesi veya hidrofobitesini ve yüzey enerjisi hakkında bilgiler öğrenmek amacıyla su temas açısı analizleri gerçekleştirilmiştir. Zımparalanmış yüzeyin ve anodik oksidasyon sonrası Ti yüzeyine ait su temas açısı değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Anodik oksidasyon öncesi zımparalanmış ( $Ti_z$ ) ve anodik oksidasyonla oksitlendirilmiş yüzeye ( $Ti_{z/A}$ ) ait su temas açısı değerleri (n=3).

Yüzey özelliği	Su temas açısı ( $\theta_{su}$ [°])
$Ti_z$	$68.4 \pm 1.00$
$Ti_{z/A}$	$22.6 \pm 3.00$

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi yüzeye uygulanan modifikasyon işlemleri arttıkça ve nano boyutta morfolojiye doğru gidildikçe hidrofilitede ve yüzey ıslatılabilirliğinde artış görülmektedir. Zımparalanmış yüzeyin hidrofilitesi anodizasyon sonrası büyük artış göstermiştir. Bu durum yüzey enerjisinin de arttığının göstergesidir.

#### 4.1.4.4. Enerji saçılımlı x-ışınları (EDX) analizi

Tez çalışmaları kapsamında anodizasyon işlemi sonrasında yüzeyin elementel içeriği hakkında bilgi edinmek amacıyla EDX analizi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.10'da anodizasyon ile oksitlendirilmiş yüzeyin atom yüzdeleri (kütlece %) ve Çizelge 4.11'de oksitlenmiş atom yüzdeleri (kütlece %) verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Anodik oksidasyon öncesi zımparalanmış ( $Ti_z$ ) ve anodik oksidasyonla oksitlendirilmiş Ti yüzeyine ( $Ti_{z/A}$ ) ait kütlece atom yüzdeleri.

Yüzey özelliği	Atom yüzdeleri (kütlece %)				
	Oksijen (O)	Sodyum (Na)	Titanyum (Ti)	Klor (Cl)	Kalsiyum (Ca)
$Ti_z$	21.82	17.68	60.50	-	-
$Ti_{z/A}$	42.91	11.76	45.33	-	2.30

Zımparalanmış yüzeydeki Ti yüzdesinin anodizasyon sonrası düşmesi ve O yüzdesinin artması yüzeyde bulunan Ti'un  $TiO_2$  dönüştüğünün kanıtıdır.

**Çizelge 4.11.** Anodik oksidasyon öncesi zımparalanmış ( $Ti_z$ ) ve anodik oksidasyonla oksitlendirilmiş Ti yüzeyine ( $Ti_{z/A}$ ) ait kütlece oksitlendirilmiş atom yüzdeleri.

Yüzey özelliği	Oksitlenmiş atom yüzdeleri (kütlece %)			
	Sodyum oksit ( $Na_2O$ )	Titanyum oksit ( $TiO_2$ )	Kalsiyum oksit ( $CaO$ )	Fosfat ( $PO_4$ )
$Ti_z$	33.3	47.73	18.50	0.47
$Ti_{z/A}$	1.85	98.15	-	-

Wu ve ark. Ti'un rutil fazının O-O bağı ile apatitin Ca-Ca bağının mesafesinin ve kafes uygunluğunun, apatit kaplamasında çok önemli olduğunu bildirmişlerdir. Çünkü sıvı içindeki Ca iyonları ilk olarak O'in birikmiş olduğu yerlere girerek fosfat iyonlarını kendine çeker ve apatit formunu oluşturur. Kafes uygunluğu açısından bakıldığında rutil fazı daha iyi apatit oluşturma kapasitesine sahiptir [142]. Anodizasyon işlemi sonrası  $TiO_2$



yüzdesindeki dramatik artış yüzeyin başarılı bir şekilde TiO<sub>2</sub> kaplandığını göstermektedir. Üstelik bu tabaka bazik oksidasyon ile oluşturulan TiO<sub>2</sub> tabakasına oranla elementel açıdan daha az kirlilik içermekte ve kafes yapısı içerisinde rutil fazdan oluşmaktadır.

Sonuç olarak anodik oksidasyon çalışmalarında Ti yüzeylerinde rutil fazda TiO<sub>2</sub> tabakası oluşturulmuştur. Elde edilen bu tabaka tez kapsamında istenilen amaca tam olarak hizmet etmektedir.

## **4.2. İkinci Bölüm**

Yukarıda bahsedilen bazik ve anodik oksidasyon işlemleri sonunda uygun özellikleri sağlayan Ti yüzeyleri HA ile kaplanmıştır. Bu bölümde HA kaplı yüzeylerin karakterizasyon işlemlerinin sonuçları anlatılmıştır. Yapılan analizler sonucu çalışmanın bir sonraki basamağı için en uygun yüzey özelliğini sergileyen deney grupları seçilmiş ve bunlar üzerine HPβCD kaplanarak karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ardından HA/HPβCD kompozit taşıyıcı sisteme melatonin yükleme çalışmaları sonucu gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir.

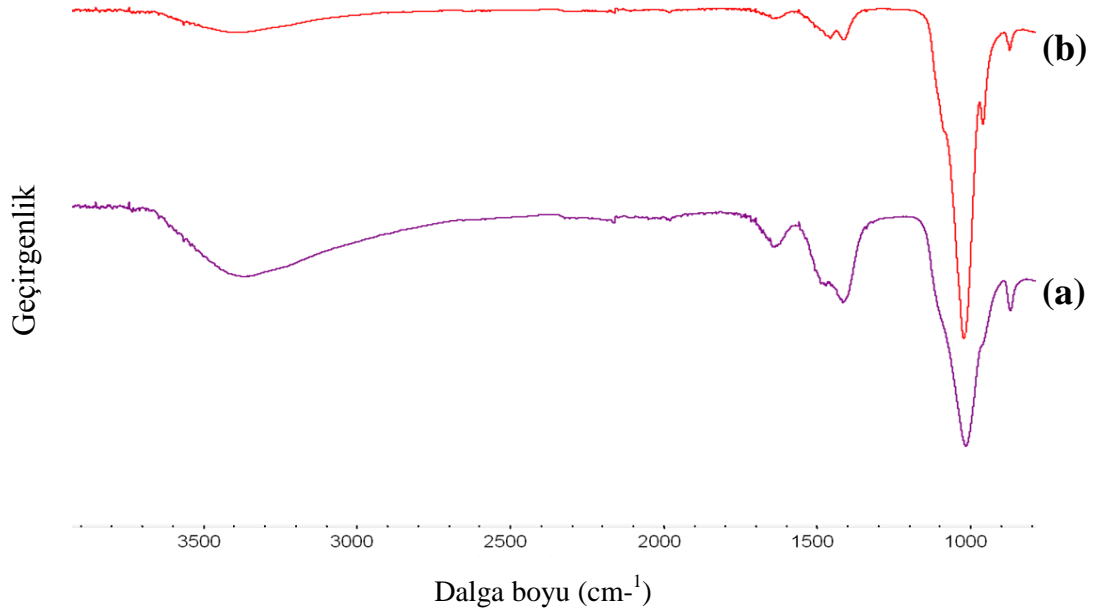
### **4.2.1. Bazik ve anodik oksidasyon işlemi sonrası titanyum plakaların HA ile kaplanması ve karakterizasyon çalışmaları**

Hidroksiapatitin en önemli özellikleri arasında mükemmel biyolojik uyumluluğu önde gelir. Hidroksiapatitin gözenekli yapısı; hücrelerin, gözeneklerin içine doğru büyümesini sağladığı gibi yüzeyi pürüzlü hale getirmesi yüzey alanında artış sağlamakta ve temas ettiği yüzeyin tutunma direncini de arttırmaktadır. Bu nedenle HA kaplamaların yaygınlaşması, kaplama teknikleri açısından önem arz ettiği gibi biyomimetik uygulamalar açısından da oldukça önemlidir. Bu kapsamda tez çalışmasında kemik yapıya yakınlığı ile bilinen HA'in oksitlendirilmiş Ti yüzeyler üzerine kaplanması amaçlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonrası gerçekleştirilen analizlerin sonuçları aşağıda detaylıca anlatılmıştır.

#### **4.2.1.1. ATR-FTIR analizi**

Titanyum plakaların biyoaktivitesini artırmak amacıyla biyomimetik yöntem ile yüzeylere kaplanan HA'in içeriğinin tespitinde ATR-FTIR analizleri kullanılmıştır. HA'in Ti plaka yüzeyine kaplanma yöntemi Bölüm 3.3.1'de detaylıca anlatılmıştır. Ti plakaların yüzeyine kaplanan HA tabakası spatül yardımıyla kazınarak ATR-FTIR analizleri yapılmıştır. Ayrıca yüzey üzerine çöken HA ile kaptaki bulunan HA arasında olası bir farklılığın varlığının tespiti için çöktürme yapılan kaptan da örnek alınarak analiz işlemleri

gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.13'de Ti yüzeyinden ve kaptan alınan HA partiküllerinin ATR-FTIR spektrumları verilmektedir.

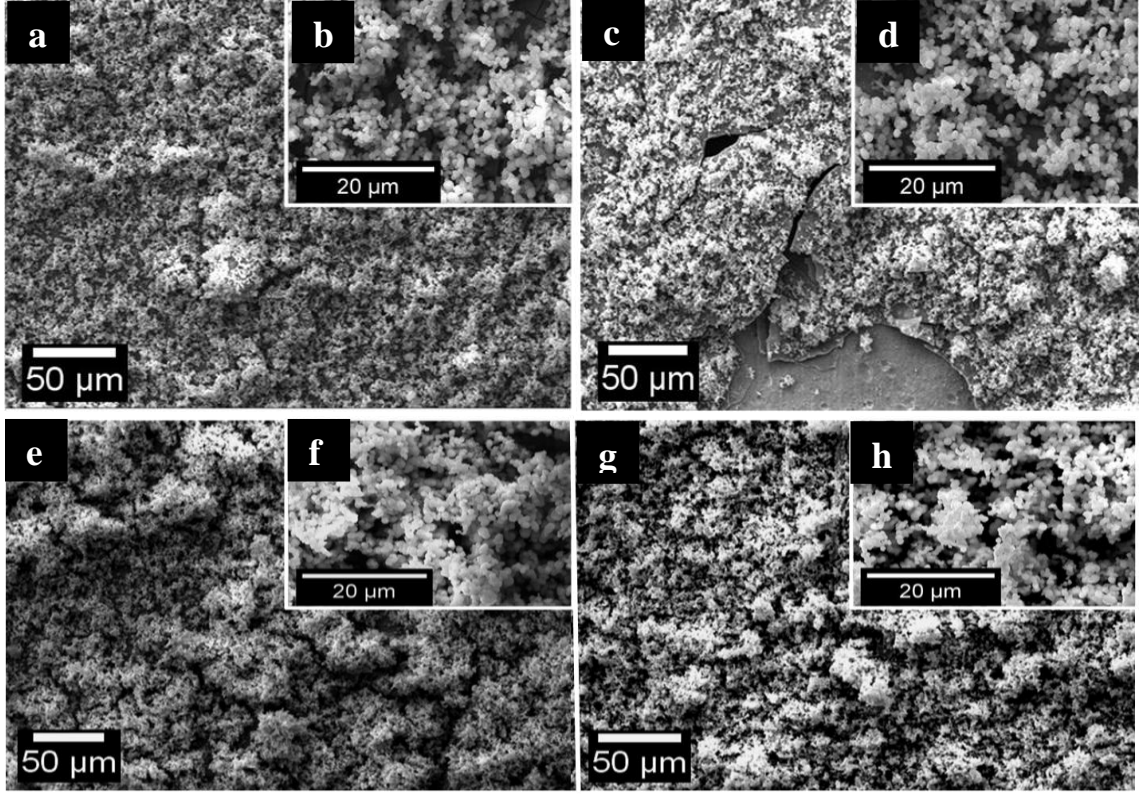


**Şekil 4.13.** Çöktürme yapılan kaptan (a) ve Ti yüzeyinden (b) alınan HA partiküllerine ait FTIR spektrumları

Ti yüzeyinden alınan HA'nın ATR-FTIR spektrumları (Şekil 4.13.a) incelendiğinde, 3000–3500  $\text{cm}^{-1}$  aralığında görülen geniş pik HA yapısına absorblanmış suyu, yaklaşık 1640  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pik ise bağlı olmayan HA ilişkili suyun varlığını göstermektedir. 3392  $\text{cm}^{-1}$  de görülen karakteristik pik HA yapısındaki OH bağlarına işaret etmektedir. Ayrıca 560, 600, 960 ve 1020  $\text{cm}^{-1}$  civarlarında gözlenen piklerin yapıdaki fosfat ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) iyonunun, 1410-1460  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki ve 872  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen piklerin çökeltme sırasında havadan ve SBF'den gelen karbonat ( $\text{CO}_3^{-2}$ ) iyonunun varlığını göstermektedir. İnorganik yapıda olan Ti'un herhangi bir kirlilik yaratma ihtimaline karşı ATR-FTIR spektrumları alınmış ve herhangi bir kirliliğe neden olacak piklerin varlığına rastlanmamıştır. Ayrıca kontrol amaçlı çöktürülme işleminin yapıldığı kabın cidarından alınan HA'e ait FTIR spektrumu Şekil 4.13.b'de gösterilmiştir. Spektrumlardan da anlaşılacağı üzere iki yapı arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

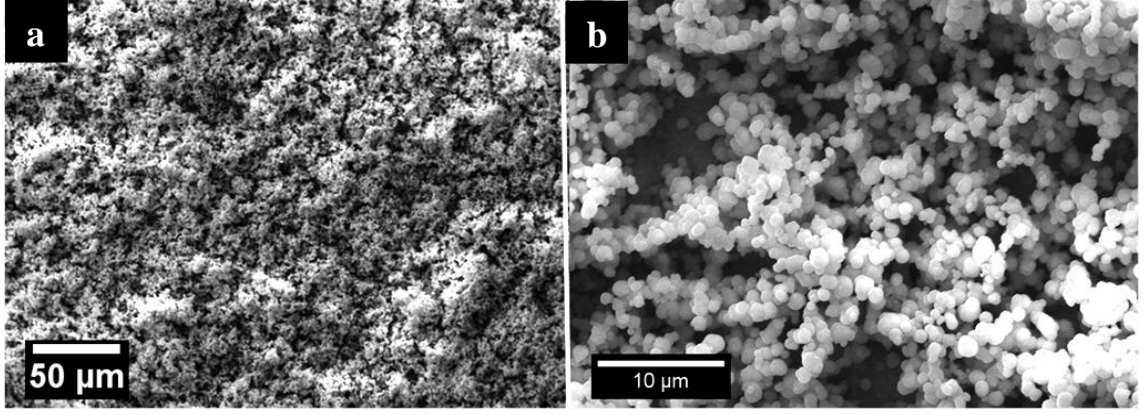
#### 4.2.1.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Fiziksel yüzey modifikasyonları ve oksitlendirme işlemleri sonrasında kaplanan HA tabakasına ait SEM görüntüleri Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.14.** NaOH ile bazik oksidasyona uğratılmış Ti yüzeyine kaplanan HA'e (a) x1.00 K, (b) x5.00 K; NaOH ile bazik oksidasyon sonrası HCl uygulanmış Ti yüzeyine kaplanan HA'e (c) x1.00 K, (d) x5.00 K; NaOH ile bazik oksidasyona uğratıldıktan sonra ısı işlem uygulanmış Ti yüzeyine kaplanan HA'e (e) x1.00 K, (f) x5.00 K; NaOH ile bazik oksidasyon sonrası HCl uygulanmış Ti yüzeyine ısı işlem uygulandıktan sonra kaplanan HA'e (g) x1.00 K, (h) x5.00 K; ait SEM görüntüleri.

Zımparalama sonrası NaOH ile muamele edilmiş ve ısı işlem uygulanmış yüzeylerdeki HA kaplamanın homojen bir yapıda olduğu ve tüm yüzeyi yoğun bir biçimde kapladığı Şekil 4.14.a, 4.14.b, 4.14.e ve 4.14.f'de görülmektedir. Küresel formda olan HA partikülleri ortalama 1.3  $\mu\text{m}$  boyutundadır. Şekil 4.14.c ve 4.14.d'de gözlenen HCl uygulaması sonrası HA kaplamanın bazı yerlerdeki kalkmalar dikkat çekmektedir. Bu durumun azalan yüzey pürüzlülüğü ve ince  $\text{TiO}_2$  tabakasından kaynaklandığı düşünülmektedir. HCl uygulanmış yüzeylere termal muamele sonrası artan  $\text{TiO}_2$ 'e bağlı olarak kaplamanın daha kararlı bir hale geldiği Şekil 4.14.g ve 4.14.h'da açıkça görülmektedir.



**Şekil 4.15.** Anodik oksidasyonla oksitlendirilmiş yüzeye kaplanan HA'e ait SEM görüntüleri (a) x1.00 K, (b) x5.00 K.

Anodizasyon işlemi sonrası HA kaplamaya ait SEM görüntüleri Şekil 4.15'de verilmiştir. Anodizasyon uygulanmış yüzeylerdeki HA yapısı bazik oksidasyon uygulanmış yüzeylerle benzerlik göstermesine rağmen kaplamanın daha seyrek olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca NaOH muamelesinden sonra termal işlem uygulanmış yüzeylerdeki HA kaplamada oluşan HA tepciklerinin çok daha kalın yapıda ve fazla sayıda olduğu görülmektedir.

#### **4.2.1.3. Enerji saçılımlı x-ışınları (EDX) analizi**

Tez çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen HA kaplamanın elementel içeriğinin tespitinde EDX analizi kullanılmıştır. SEM fotoğraflarından yola çıkılarak çalışmanın diğer basamaklarında HCl uygulamasından vazgeçildiği için NaOH ve NaOH uygulaması sonrası ısıtma işlemi uygulanmış ve HA kaplanmış yüzeylerin atom yüzdeleri (ağırlıkça %) Çizelge 4.12'de ve oksitlenmiş atom yüzdeleri (ağırlıkça %) Çizelge 4.13'de verilmiştir.

**Çizelge 4.12.** Bazik ve anodik oksidasyonlarla oksitlendirilmiş ve ısıtılmış Ti yüzeyleri üzerine kaplanmış HA'e ait atom yüzdeleri.

Yüzey özelliği	Atom yüzdeleri (ağırlıkça %)				
	Oksijen (O)	Sodyum (Na)	Fosfor (P)	Kalsiyum (Ca)	Magnezyum (Mg)
Ti <sub>z/B</sub> /HA (Alt)	3.22	0.02	-	-	3,22
Ti <sub>z/B</sub> /HA (Üst)	48.35	0.86	17.15	31.43	1.16
Ti <sub>z/B</sub> /Isı/HA (Alt)	19.56	0.27	-	-	-
Ti <sub>z</sub> Ti <sub>z/B</sub> /Isı/HA (Üst)	35.9	-	18.66	41.19	0.15
Ti <sub>z/A</sub> /HA (Alt)	18.50	-	-	-	2.18
Ti <sub>z/A</sub> /HA (Üst)	38.12	-	19.39	40.54	1.95

NaOH ile muamele edilmiş yüzeylerin üst kısımda bulunan HA'in Ca/P oranı 1.83'dür. Bu oran termal muamele sonrası 2.2 ye çıkmıştır. Anodizasyon ile oksitlendirilmiş yüzeylerde ise Ca/P oranı 2.0 olarak hesaplanmıştır. Doğal kemiğin ağırlıkça %34.8'i Ca iyonundan, %15.2'si ise P iyonundan oluşmaktadır ve Ca/P molar oranı yaklaşık 1.71 civarındadır. Doğal kemik yapısındaki apatitte bulunan Ca/P oranı tez kapsamında oluşturulan HA ile karşılaştırıldığında, kemik yapısı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. EDX analiz sonuçlarının NaOH ile muamele edilmiş ve NaOH sonrası termal işlem uygulanmış yüzeylerin alt kısımların TiO<sub>2</sub> tabakasının varlığına rastlanılmaktadır.

**Çizelge 4.13** Bazik ve anodik oksidasyonlarla oksitlendirilmiş ve ısıtılmış Ti yüzeyleri üzerine kaplanmış HA'e ait oksitlendirilmiş atom yüzdeleri.

Yüzey özelliği	Oksitlenmiş atom yüzdeleri (ağırlıkça %)				
	Sodyum oksit (Na <sub>2</sub> O)	Titanyum oksit (TiO <sub>2</sub> )	Kalsiyum oksit (CaO)	Magnezyum oksit (MgO)	Fosfat (PO <sub>4</sub> )
Ti <sub>z/B</sub> /HA (ALT)	-	100	-	-	-
Ti <sub>z/B</sub> /HA (ÜST)	1.14	1.75	43.36	1.9	51.85
Ti <sub>z/B</sub> /Isı/HA (ALT)	0.02	99.98	-	-	-

**Çizelge 4.13. devamı** Bazik ve anodik oksidasyonlarla oksitlendirilmiş ve ısıtılmış işlem uygulanmış Ti yüzeyleri üzerine kaplanmış HA'e ait oksitlendirilmiş atom yüzdeleri

Yüzey özelliği	Oksitlenmiş atom yüzdeleri (ağırlıkça %)				
	Sodyum oksit (Na <sub>2</sub> O)	Titanyum oksit (TiO <sub>2</sub> )	Kalsiyum oksit (CaO)	Magnezyum oksit (MgO)	Fosfat (PO <sub>4</sub> )
Ti <sub>z/B</sub> /Isı/HA (ÜST)	-	5.6	47.22	0.26	46.92
Ti <sub>z/A</sub> /HA (ALT)	-	100	-	-	-
Ti <sub>z/A</sub> /HA (ÜST)	-	8.7	42.15	0.25	48.81

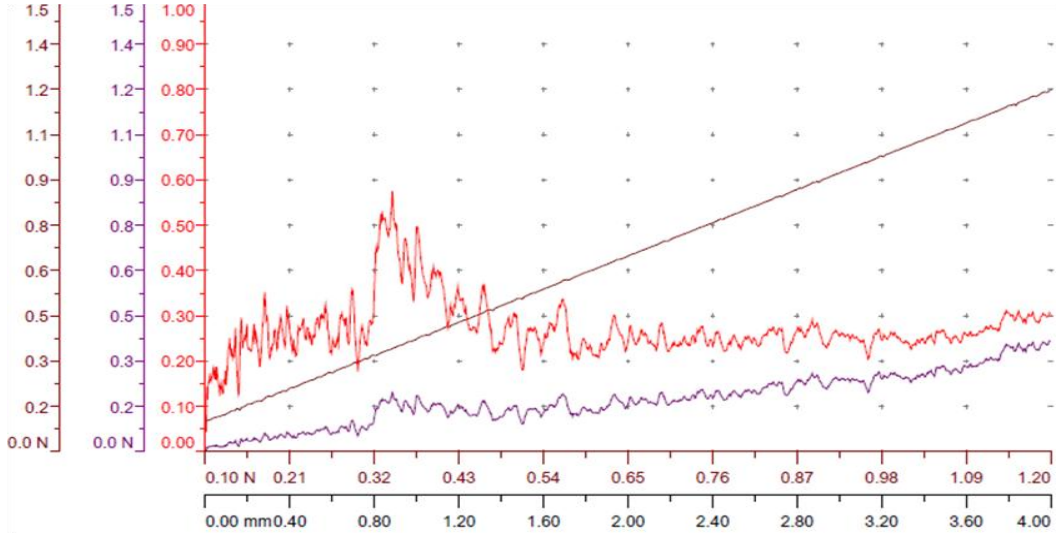
NaOH ile ön yüzey işlemi görmüş Ti metali SBF çözeltisine daldırıldığında birçok Ti-OH grupları oluşturur. Yüzeyde bulunan Na<sup>+</sup> iyonları H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> ile yer değiştirerek ortama Na<sup>+</sup> iyonlarının salınmasını sağlar. Negatif yüklenmiş yüzey pozitif Ca<sup>2+</sup> iyonları ile SBF içinde kalsiyum titanatlar oluşturur. Ca<sup>2+</sup> birikiminin sonucu olarak yüzey tekrar pozitif yüklenir ve negatif yüklü fosfat iyonları ile amorf kalsiyum fosfatlar oluştururlar. Bu kalsiyum fosfat yarı kararlıdır ve sonuç olarak kararlı kristal yapıya kemik benzeri apatite dönüşür. EDX analiz sonuçlarına bakıldığında yüzeyde bulunan sodyum titanat/TiO<sub>2</sub>'e bağlı olarak elde edilen HA nin biyomimetik olarak sentezlenen kemik yapısında olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.2.1.4. Mikro çizik analizi

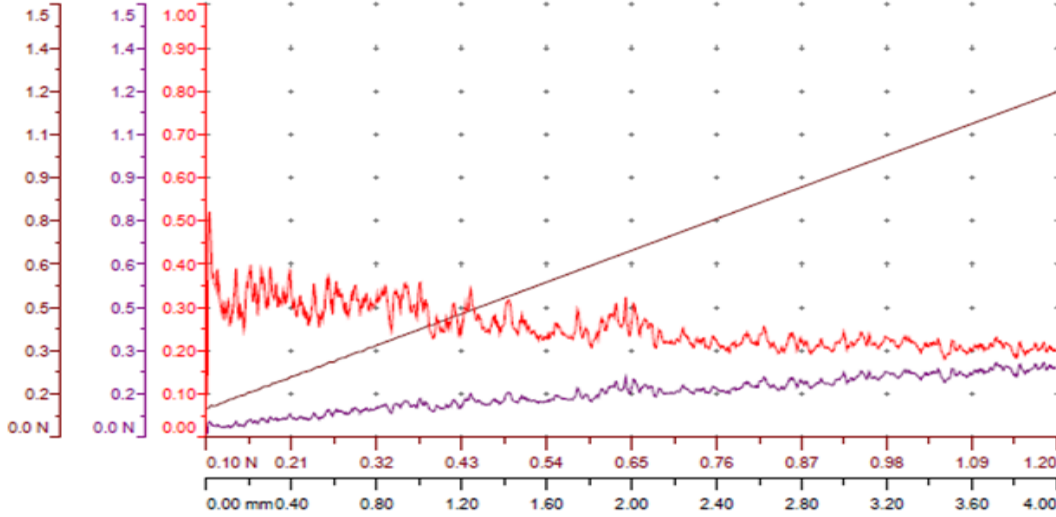
Mikro çizik test cihazı, ince film ve kaplamaların yüzeylerinin kırılma, deformasyon ve yapışma gibi mekanik özelliklerini belirlemek için kullanılır. Aynı zamanda altlık ve film sisteminin sürtünme ve yapışma kuvvetini karakterize etmede kullanılır. Bu teknik keskin bir uç ile malzemede kontrollü bir çizik oluşturmaya dayanır. Kritik yük değerinde kaplamada kırılmalar başlar. Kritik yükleme değeri yükleme koluna eklenmiş olan ses duyurucu ve optik mikroskop ile saptanır [143].

Titanyum plakaların NaOH çözeltisi ile muamelesinden sonra ısıtılmış işlem uygulanmış yüzeyleri üzerine ve anodize edilmiş yüzeyler üzerine kaplanan HA tabakasının kararlılığının tespitinde mikro çizik analizinden yararlanılmıştır. Mikro çizik analizinde 4mm'lik mesafe boyunca yük uygulanmıştır. Kaplama yapılmış numunelerin yüzeyinde

0.1 N'dan başlayarak 1.2 N'a kadar artacak şekilde yük verilmiştir. Analizlerde radüsü 100 µm olan Rockwell I-128 elmas uç kullanılmıştır. Yük 0.55 N/dk ve 2 mm olacak biçimde uygulanmıştır. Mikro çizik analizine ait veriler şekil 4.16 ve şekil 4.17'de verilmiştir.



**Şekil 4.16.** Bazik oksidasyon ile oksitlendirilmiş Ti yüzeyi üzerine kaplanan HA'e ait mikro çizik grafiği (Kırmızı eğri: Sürtünme katsayısı, Mor eğri: Sürtünme kuvveti, Bordo eğri: Kesite uygulanan dikey yöndeki güç).



**Şekil 4.17.** Anodik oksidasyon ile oksitlendirilmiş Ti yüzeyi üzerine kaplanan HA'e ait mikro çizik grafiği (Kırmızı eğri: Sürtünme katsayısı, Mor eğri: Sürtünme kuvveti, Bordo eğri: Kesite uygulanan dikey yöndeki güç).

Analiz sonuçlarına bakıldığında  $Ti_{z/B}/Is1/HA$  deney grubuna ait başlangıç kaplama deformasyonu 0.39 N değerinde ve elmas ucun başlangıç noktasından yaklaşık 1 mm uzaklaşmasından sonra başladığı görülmektedir. Bu değer yaklaşık 19 µm derinliğe denk

gelmektedir. 0.69 N kuvvet değerinde ise ilk yüzey katman ayrılması gerçekleşmiştir. Bu kuvvet değeri elmas ucun başlangıç noktasından 2.2 mm uzaklıkta ve yaklaşık 36 µm derinliğe denk gelmektedir.

Anodik oksidasyon sonrası HA kaplı yüzeylerde ise başlangıç kaplama deformasyonu 0.28 N değerinde, yatay ekseninde elmas ucun başlangıç noktasından yaklaşık 0.77 mm uzakta yaklaşık 15 µm derinliğe denk geldiği görülmektedir. İlk yüzey ayrılması 0.60 N değerinde elmas ucun başlangıç noktasından 1.8 mm uzaklıkta ve yaklaşık 30 µm derinliğe denk gelmektedir.

İki oksidasyon yöntemi ile oluşturulan yüzeyler üzerine kaplanan HA tabakasının mikro çizik analizlerine göre bazik oksidasyon ile elde edilmiş kaplamanın kararlılığının artan sürtünme kuvvetinden yola çıkılarak daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı zamanda bazik oksidasyon yöntemi ile elde edilen kaplamanın anodik oksidasyon ile elde edilen kaplamaya oranla çok daha kalın olduğu belirlenmiştir.

#### **4.2.2. Hidroksipropil-β-siklodekstrin temelli taşıyıcı sistemlerin oluşturulması ve karakterizasyon çalışmaları**

Polimerik esaslı doku iskelelerini fonksiyonelleştirmek veya hidrojel formunda, ilaçların kontrollü salımını gerçekleştirmek için, metalik veya seramik esaslı implant malzemeleri ile birlikte kullanıldığı uygulamalara ilgili literatürde sıkça rastlanmaktadır [144, 145]. Sahip olduğu üstün özellikler sebebiyle HPβCD üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu yapıya olan ilginin temel sebebi biyolojik bir ürün olması ve inklüzyon kompleksi oluşturabilmeleridir. İlgili literatür incelendiğinde, suda serbest halde bulunan siklodekstrin ve türevlerinin, inklüzyon kompleksi oluşturabilme kapasiteleri sayesinde, biyomolekül salımı veya istenmeyen molekülleri hapsedebilme özellikleri üzerine olan çalışmalar son yıllarda oldukça yoğun olarak sürmektedir. Bunun yanı sıra etilenglikoldiglisidiler (EGDE) [117] veya bütantetrakarboksilik asit (BTCA) [146] gibi çapraz bağlayıcı ajanların kullanılması ile oluşturulan HPβCD temelli hidrojellerin sentezi sayesinde, suda çözünmeyen kararlı yapıların bahsi geçen uygulamalarda kullanılması sağlanmıştır. Bu yaklaşım, kemik doku mühendisliği uygulamalarında doku rejenerasyonu için gerekli olan süre boyunca fiziksel kararlılığını koruyabilen ve kontrollü biyosinyal salımını gerçekleştirebilen sistemlerin üretimini mümkün kılmaktadır. Ayrıca HPβCD kullanımı çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünü artırmasından dolayı yüksek biyoyararlanım, nantoksik özellik, artan raf ömrü, daha az

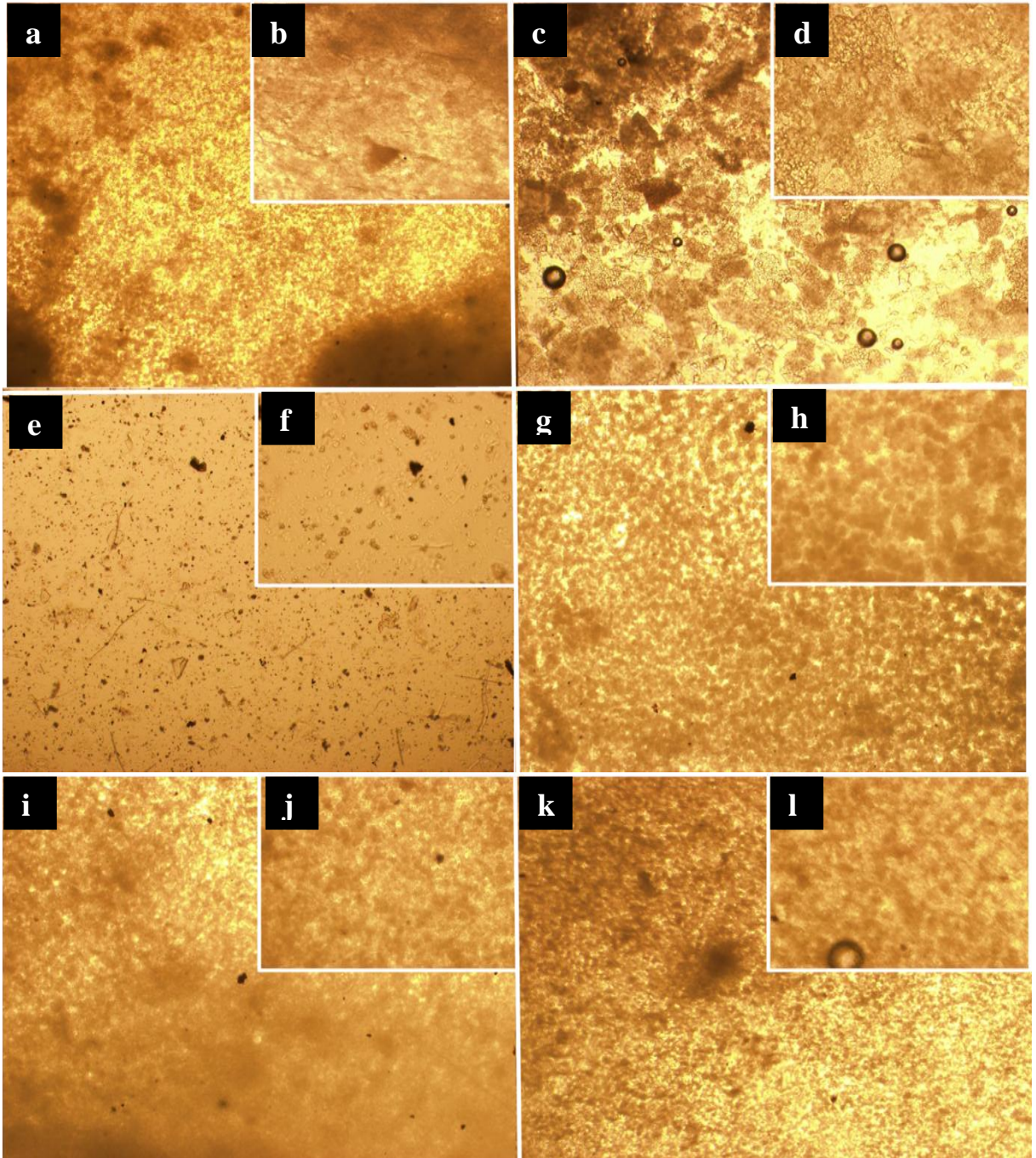


yan etki gibi avantajlara da sahiptir [147]. Thi ve arkadaşları mikro gözenekli hidroksiapatit doku iskelelerini HPβCD ile fonksiyonelleştirerek çözünürlüğü düşük olan iki farklı antibiyotik ile salım çalışmaları gerçekleştirmişlerdir [144]. Ayrıca HA kaplı titanyum ve Co-Cr materyallerinin çeşitli siklodekstrin türevleriyle kaplanarak antibiyotik salımı için kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır [148, 149]. Nitekim, Taha ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada plazma sprej yöntemi ile HA kaplanmış titanyum yüzeyler siklodekstrin ve birkaç türevi ile modifiye edilmiş ve bir antibiyotik ile inklüzyon kompleksi yapıları sağlanarak antibakteriyel çalışmalarda etkinliği incelenmiştir [150]. Bununla birlikte, biyomimetik yöntem ile HA kaplanan titanyum üzerinde HPβCD ile kemik rejenerasyonunu arttıracak özellikte bir biyosinyal salımının hedeflendiği, osseointegrasyonun artırılmasına yönelik tasarlanmış kompozit sisteme literatürde rastlanmamıştır. Bu kapsamda Ti/HA kompozit sistemler üzerine HPβCD'den oluşan bir taşıyıcı tabaka oluşturulması amaçlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonrası elde edilen analiz sonuçları aşağıda detaylıca anlatılmaktadır.

#### **4.2.2.1. İnvirt mikroskop ile görüntüleme**

Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalarda HPβCD'nin çapraz bağlanma reaksiyonu BTCA ile termal muamele sonrası gerçekleştirilmiştir. Isıl işlem uygulanmadan önce Ti/HA yüzeyler üzerine damlatılan çözeltinin pH'nın 1 olduğu tespit edilmiştir. İlgili literatür incelendiğinde, Lui ve ark pH: 6, 9 ve 14 değerlerinde HA yapılarını ve yoğunluklarını inceledikleri çalışmalarında pH düştükçe HA yoğunluğunun azaldığını SEM görüntüleriyle göstermişlerdir [151]. Ayrıca Clark ve Zhang'ın bir seri pH değerleriyle (2-8) HA'nın çözünürlüğünü inceledikleri çalışmalarında aşırı bazik ve aşırı asidik şartlarda HA'nın çözünürlüğünün arttığını ifade etmişlerdir [152]

Titanyum yüzeyine kaplanan HA ile HPBCD/BTCA çözeltisi arasındaki ilişkinin tespiti için farklı pH değerlerine sahip HPβCD çözeltilerinin içerisine HA partikülleri eşit miktarda ilave edilerek invert mikroskop ile incelenmiştir. Şekil 4.18'de 10M NaOH ile farklı pH değerlerinde hazırlanan HPβCD/BTCA çözeltisine ait mikroskop görüntüleri verilmiştir.



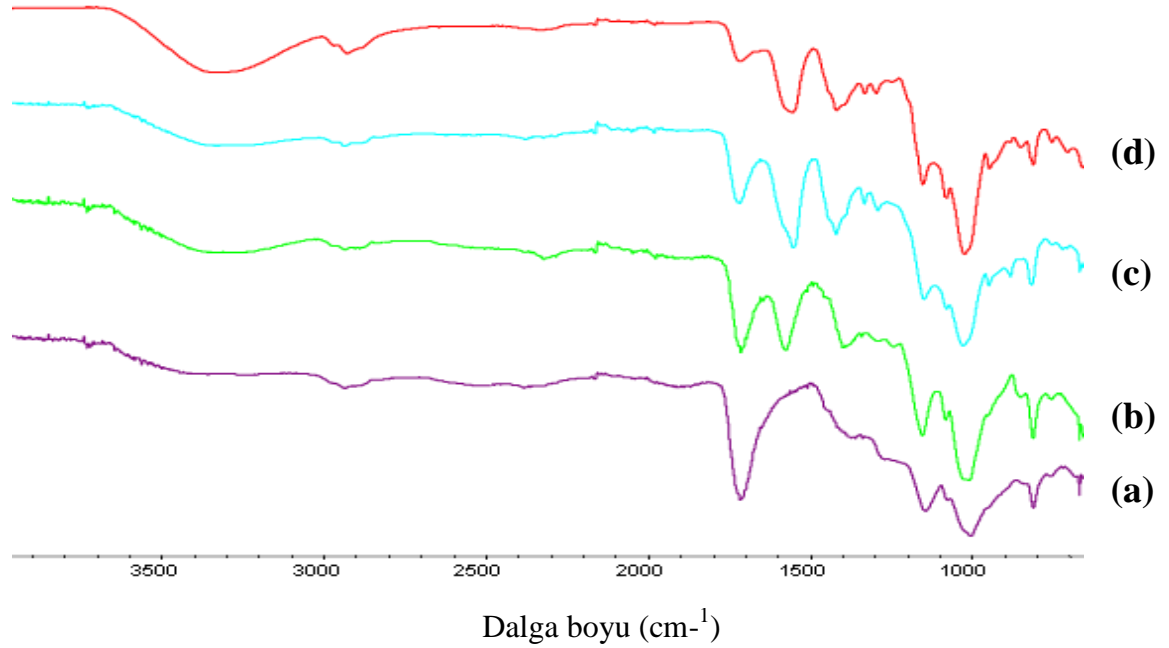
**Şekil 4.18.** Farklı pH değerlerine sahip distile su ve HP $\beta$ CD çözeltilerinin içerisindeki HA partiküllerin invert mikroskop görüntüleri, distile su (pH:7) (a) x10, (b) x40; distile su (pH:1) (c) x10, (d) x40; HP $\beta$ CD çözeltisi (pH:1) (e) x10, (f) x40; HP $\beta$ CD çözeltisi (pH:2) (g) x10, (h) x40; HP $\beta$ CD çözeltisi (pH:4) (i) x10, (j) x40; HP $\beta$ CD çözeltisi (pH:6) (k) x10, (l) x40.

Hem pH:1 hem de pH:7 değerinde distile su içerisine ilave edildikten sonra yüzeye homojen biçimde yayılan HA partiküllerine ait görüntü referans alınarak farklı pH değerindeki HA partiküllerinin görüntüleri karşılaştırılmıştır. pH:1'deki polimer çözeltisi

içinde bulunan HA partiküllerinin pH'ın etkisine bağlı olarak neredeyse tamamen çözüldüğü görülmektedir. Artan pH ile birlikte HA partiküllerinin yoğunluğunun da arttığı gözlemlenmektedir. Distile su içerisindeki yoğun HA partiküllerine pH:4 ve pH:6 değerlerinde rastlanmıştır. Literatürdeki bu bilgiler ışığında pH etkisinin, tasarlanan sistem üzerindeki olası sonuçlarını görmek amacıyla tez çalışmasının bundan sonraki basamaklarında pH:1 ve pH:4'teki HP $\beta$ CD polimer çözeltilerinin kullanılması kararı alınmıştır.

#### 4.2.2.2. ATR-FTIR analizi

Bölüm 3.3.2.'de anlatılan yöntem ile hazırlanan çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD membranların kimyasal yapısının incelenmesi için ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.19'de pH:1 ve pH:4'deki çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD'nin ve bu çözeltilerin HA içeren hallerinin polimerizasyon işlemi sonrasındaki FTIR spektrumları verilmektedir.



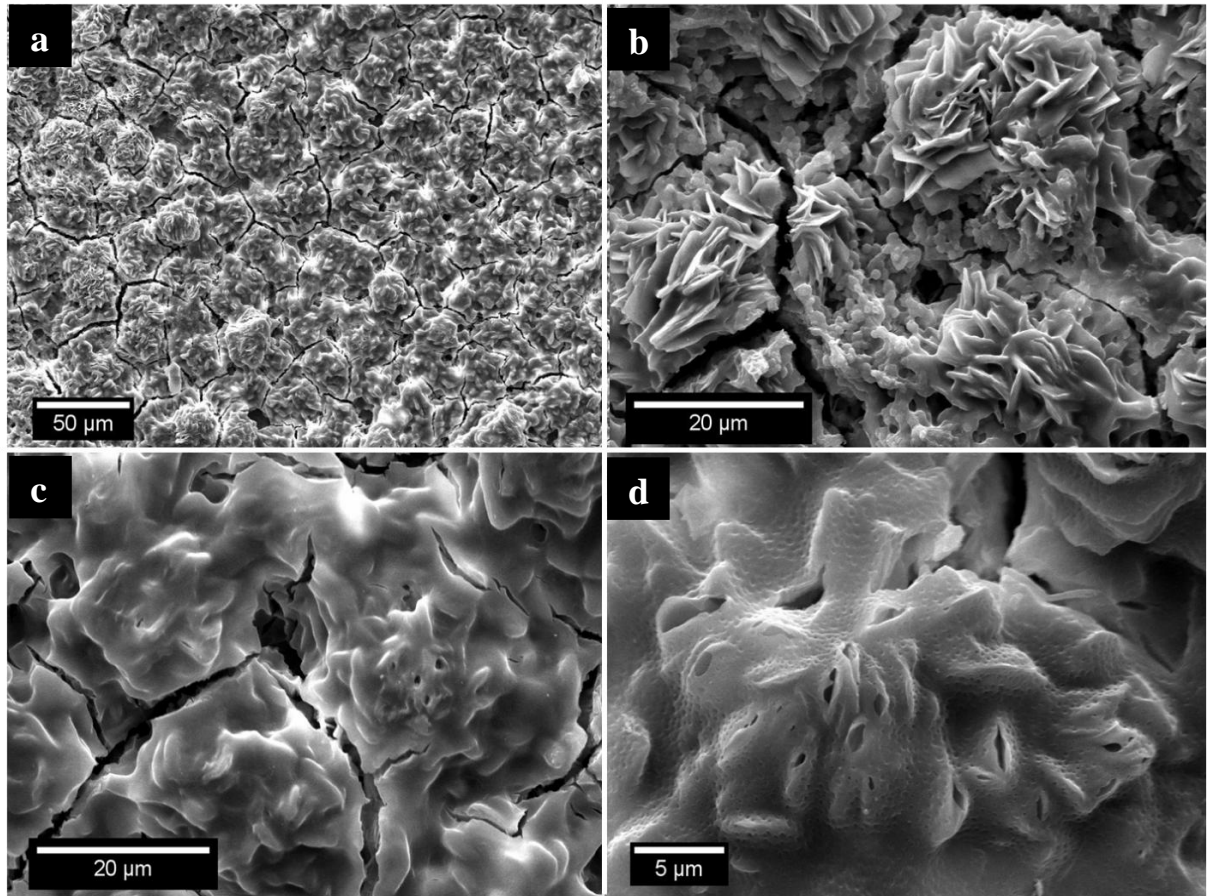
**Şekil 4.19.** a) HP $\beta$ CD (pH:1), b) HP $\beta$ CD (pH:4), c) HP $\beta$ CD/HA (pH:1), d) HP $\beta$ CD/HA (pH:4) karışımlarına ait FTIR spektrumları.

ATR-FTIR spektrumları incelendiğinde saf HP $\beta$ CD 3333 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pik, yapıda bolca bulunan -OH bağlarına işaret etmektedir. 2930–2970 cm<sup>-1</sup>'de -C-H vibrasyon pikine, 1647, 1331, 1150, 1080 cm<sup>-1</sup>'de ise -C-C-H, -C-O-C ve H-C-H bağlarına ait piklere rastlanmıştır. Ayrıca 946 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pik siklodekstrinin  $\alpha$ -1,4 bağlarına ait spesifik bir piktir.

İki farklı pH değerinde (pH:1 ve pH:4) BTCA ile çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD'nin FTIR piklerine bakıldığında  $1000\text{ cm}^{-1}$  ve  $1700\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler dışında kalan diğer pikler arası benzerlik dikkat çekmektedir.  $1575\text{ cm}^{-1}$  ve  $1080\text{ cm}^{-1}$  görülen kapanmamış -C-H, -C-O ve -C-C bağlarına ait piklere bakıldığında, çapraz bağlanma derecesinin pH değeri arttıkça azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca HA içeren pH:1 ve pH:4 değerlerindeki çapraz bağlı HP $\beta$ CD'nin FTIR piklerinde anlamlı bir farklılığın görülmemesi, HA'in yapıya kimyasal bağlarla değil fiziksel bağlarla katıldığına ispatıdır. Her iki pH değerine sahip yapıların su, etanol ve aseton içerisine atıldığında hiçbir şekilde çözünmemesi bağlanma dereceleri farklı olsa dahi yapıların başarılı bir şekilde çapraz bağlandığının göstergesidir.

#### 4.2.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Titanyum plakalar üzerine oluşturulan suda çözünmez, çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD membranlara ait çeşitli SEM görüntüleri Şekil 4.20'de verilmiştir.

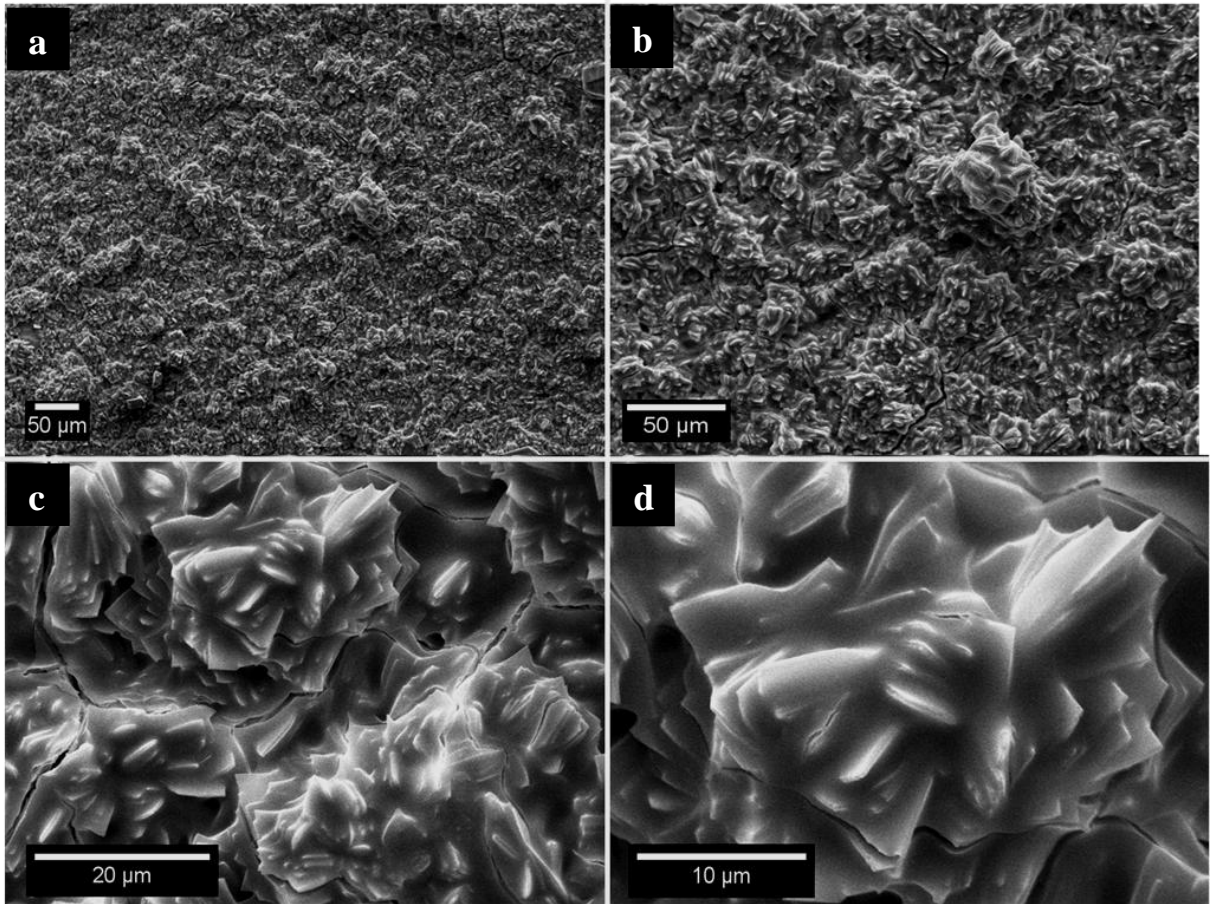


**Şekil 4.20.** Suda çözünmez, çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD membranlara ait SEM görüntüleri (a) x1.00 K, (b) x2.50 K, (c) x5.00 K, (d) x10.00 K.



Bazik oksidasyon ve anodik oksidasyon işlemleri sonrasında HA kaplı yüzeylere farklı pH değerlerinde damlatılarak oluşturulan çapraz bağlı HP $\beta$ CD'nin yüzeyi tamamen ve homojen biçimde kapladığı görülmektedir. Her iki pH değerinde de aynı morfolojinin gözlemlendiği membranların yüzeyi incelendiğinde, membranın neredeyse tamamında Şekil 20.b'de görülen yaprakçıklar halinde yüzeyde kümelendiği görülmektedir. Ayrıca bu membranın yüzeyi bir tabaka halinde kaplamadığı, yer yer HA partiküllerinin varlığı SEM görüntülerinden görülmektedir. HP $\beta$ CD membranın yüzeyinde ısıl işleme ve vakuma bağlı olarak çatlak oluşumu ve Şekil 20'de görülen gözenekli yapı dikkat çekmektedir. Su içerisine daldırılan membranın yapısında herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

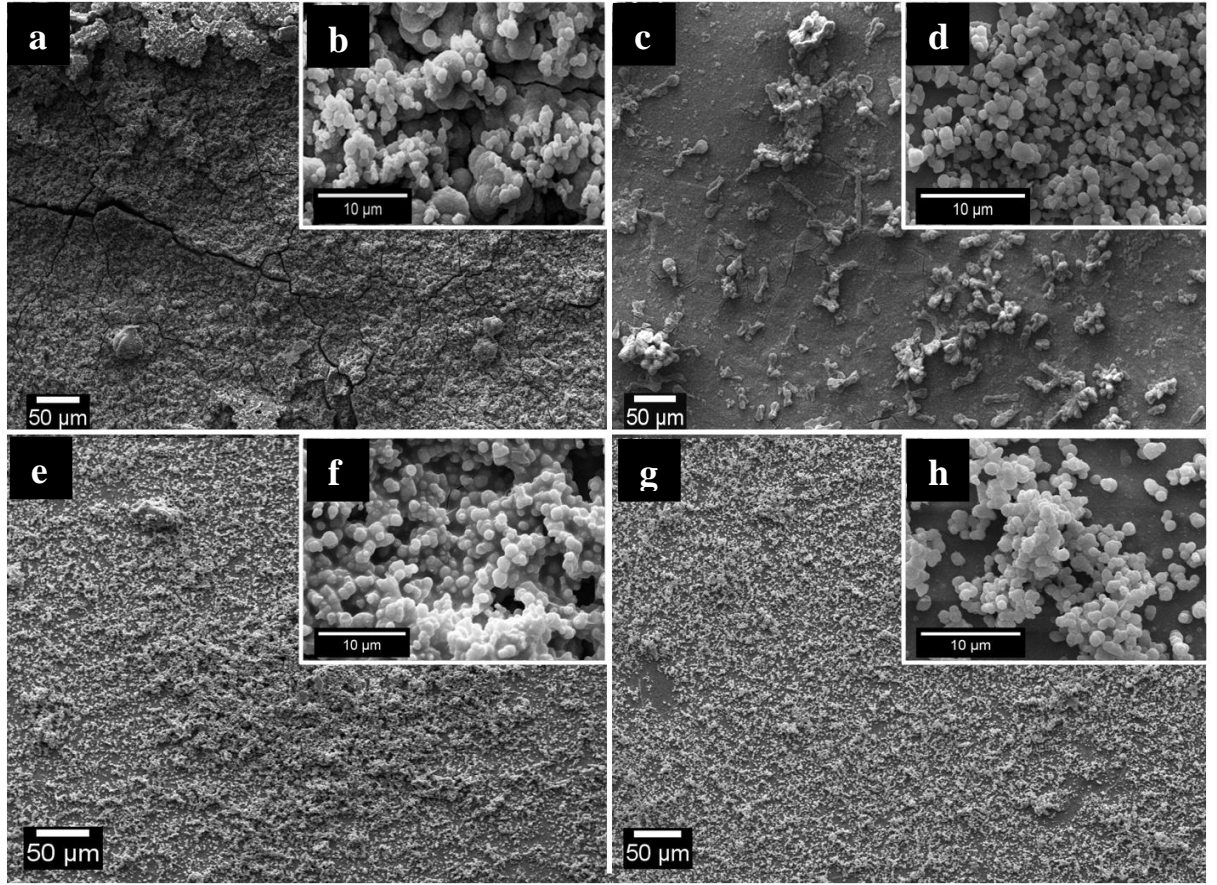
Ayrıca Bölüm 3.3.5'de anlatıldığı gibi suda çözünür, çapraz bağlanmamış HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksi içeren çözeltinin Ti/HA yüzeylere bir tabaka halinde oluşturulduğu sisteme ait çeşitli SEM görüntüleri Şekil 4.21'de verilmiştir.



**Şekil 4.21.** Suda çözünür, çapraz bağlanmamış HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksi içeren membranlara ait SEM görüntüleri (a) x1.00 K, (b) x2.50 K, (c) x5.00 K, (d) x10.00 K.

Hidroksiapatit kaplı yüzeyler üzerine damlatılarak oluşturulmuş suda çözünür, çapraz bağlanmamış HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksi içeren membranın yüzeyi homojen bir biçimde kapladığı görülmektedir. Kaplama esnasında damlat/kurut işlemleri sonucu yapısındaki suyu kaybetmesi sebebiyle polimer yüzeyinde çatlamlar meydana gelmiştir.

Bazik ve anodik oksidasyon ile oksitlendirilmiş Ti/HA yüzeyler üzerine oluşturulan bu yapının 5 dk ve 10 dk boyunca durgun suda bekletildikten sonraki SEM görüntüleri Şekil 4.22'de verilmiştir.



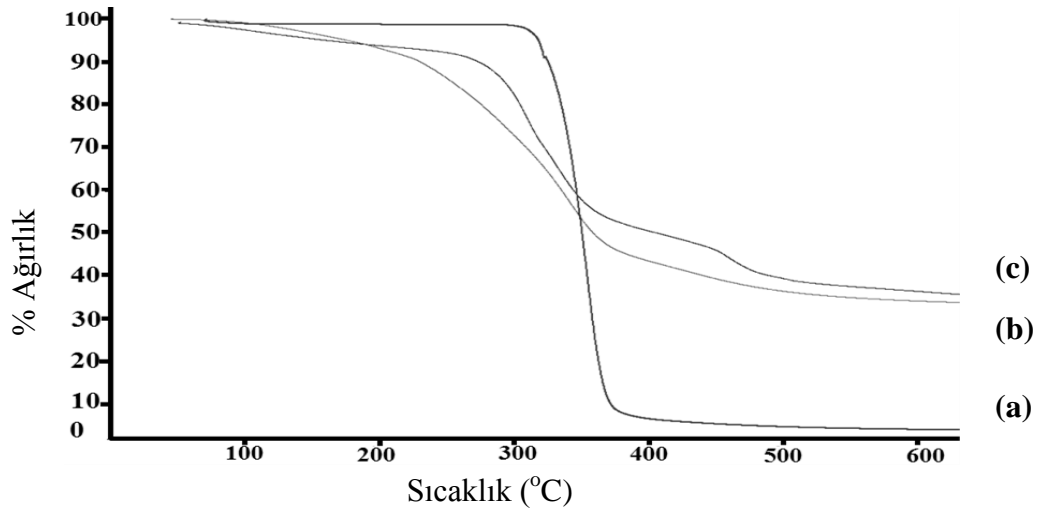
**Şekil 4.22.** Ti<sub>2</sub>/B/HA üzerine kaplanan suda çözünür HP $\beta$ CD/Melatonin kaplamanın 5 dk suda bekletilen yüzeyine (a) x1.00 K, (b) x10.00 K; Ti<sub>2</sub>/A/HA üzerine kaplanan suda çözünür HP $\beta$ CD/Melatonin kaplamanın 5 dk suda bekletilen yüzeyine (c) x1.00 K, (d) x10.00 K; Ti<sub>2</sub>/B/HA üzerine kaplanan suda çözünür HP $\beta$ CD/Melatonin kaplamanın 10 dk suda bekletilen yüzeyine (e) x1.00 K, (f) x10.00 K; Ti<sub>2</sub>/A/HA üzerine kaplanan suda çözünür HP $\beta$ CD/Melatonin kaplamanın 10 dk suda bekletilen yüzeyine (g) x1.00 K, (h) x10.00 K ait SEM görüntüleri.

Şekil 4.22 incelendiğinde serbest haldeki HP $\beta$ CD'nin melatonin ile kompleks oluşturmasından sonra elde edilen sulu çözeltisinin yüzeye herhangi bir çapraz bağlama

ajanı kullanılmadan doğrudan tabaka halinde kaplanmasından dolayı yapının su içerisine girdiğinde çözünerek uzaklaştığı görülmektedir. Ayrıca bu uzaklaşma esnasında yüzeye tutunan HA'nın yoğunluğunda da azalmaya rastlanmıştır. Bunun nedeninin parçalar halinde kopan melatonin tabakasının alt kısımdaki HA'ları mekanik olarak uzaklaştırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Su ile temas süresi arttıkça çözünürlüğün arttığı gözlenmiştir. Beş dk su içerisinde tutulan yüzeyin alt kısımlarında kaplanan polimer tabakanın varlığına rastlanırken 10 dk suda beklemiş yüzeylerde bu tabakanın neredeyse tamamen uzaklaştığı görülmektedir. Bu durum her iki oksidasyon yöntemi sonrası için aynı sonucu göstermiştir.

#### 4.2.2.4. Termogravimetrik-differensiyal termal analiz (TGA)

İki farklı pH değerindeki (pH:1 ve pH:4) HP $\beta$ CD polimerinin termal özellikleri belirlenmesi amacı ile yapılan TGA analizinden elde edilen termogramlar Şekil 4.23'de ve termal özelliklerine ait sayısal veriler Çizelge 4.14'de verilmiştir.



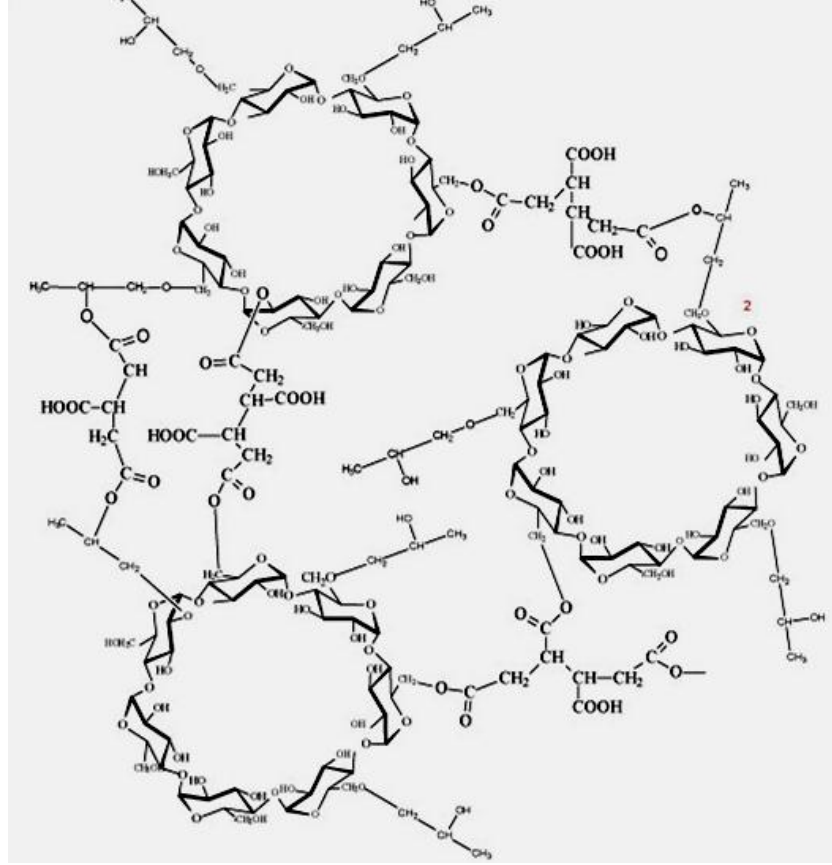
Şekil 4.23. a) Saf HP $\beta$ CD, b) pH:4'deki ve c) pH:1 HP $\beta$ CD'e ait TGA eğrileri

Çizelge 4.14. Saf HP $\beta$ CD, pH:1 ve pH:4'deki HP $\beta$ CD'e ait TGA eğrilerinde elde edilen sayısal değerler.

	Saf HP $\beta$ CD	HP $\beta$ CD (pH:1)	HP $\beta$ CD (pH:4)
<b>Başlangıç bozunma sıcaklığı (°C)</b>	255	202	220
<b>Maksimum bozunma sıcaklığı (°C)</b>	520	405	430
<b>Bozunma sıcaklığı (°C)</b>	349	311	341
<b>Kalıntı miktarı (%)</b>	10	40	40

Şekil 4.23'de görüldüğü ve Çizelge 4.14'de belirtildiği üzere saf HPβCD'nin termal bozunması 349°C'de gerçekleşmektedir. Tek aşamalı bozunmanın gerçekleştiği bu termogramda malzemenin kararlı olduğu sıcaklık aralığı 250°C ile 520°C olarak tespit edilmiştir.

Tez kapsamında BTCA ile gerçekleştirilen çapraz bağlanmanın muhtemel reaksiyonu Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. HPβCD ile BTCA'nın muhtemel çapraz bağlanma reaksiyonu [144].

pH:1'de çapraz bağlanması gerçekleştirilen HPβCD'nin termogramında bozunma sıcaklığının 311°C'ye kadar düştüğü gözlenmiştir. Çoklu bozunmanın gerçekleştiği bu termogramda ara ürünlerin varlığı görülmektedir. Artan termal kararsızlık nedeniyle düşük sıcaklıklarda bozunmanın gerçekleştiği tespit edilmiştir. Çapraz bağlanma sonrası termal karakterdeki bu düşüşün nedeninin Şekil 4.24' de gösterilen çapraz bağlanma reaksiyonun yanı sıra düşük pH değerinin glikoz birimleri arasındaki glikozidik bağları kırmasından kaynaklanan termal kararsızlığın artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. pH'ın 4 yükselmesiyle termal bozunma sıcaklığının 341°C'e çıkması bu teoriyi doğrulamaktadır. Ayrıca azalan pH değeriyle birlikte yapının kristalinitesinin arttığı söylenebilir. Artan pH



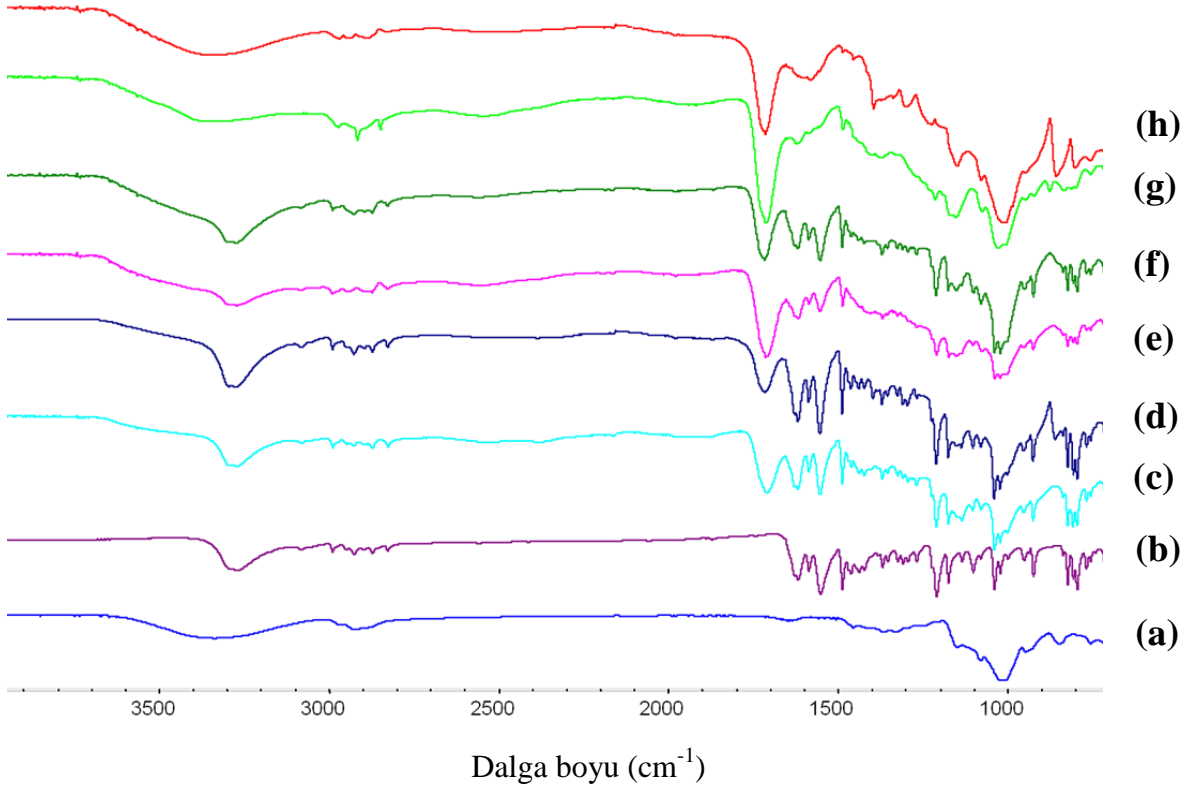
değeriyle birlikte termal özelliklerin saf HP $\beta$ CD'ne benzerlik göstermesi kristalinitenin ve termal kararsızlığın azaldığının göstergesidir.

#### **4.2.3. Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin/Melatonin inklüzyon kompleksinin oluşturulması ve karakterizasyonu**

Vücutta birçok görevi olduğu aydınlatılan melatoninin kemik metabolizmasına olan etkisi üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir. Melatonin döngüsünün engellenmesi sonucu serum kalsiyum konsantrasyonunun düştüğü, melatonin uygulamasının ise bu değerleri artırdığı görülmüştür. İlgili literatürde melatonin ve siklodekstrinin bir arada bulunduğu birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Melatoninin UV ışınlarına maruz kaldığında bozunması ve sudaki çözünürlüğünün sınırlı olması gibi sorunlarının aşılmasında siklodekstrinler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bongiorno ve ark., melatonin ve CD çeşitlerinin arasında oluşturulan inklüzyon kompleksi ile melatoninin sudaki çözünürlük davranışlarını inceledikleri çalışmalarında tüm CD çeşitlerinin melatonin ile 1:1 sitokiyometride kompleks oluşturduğunu ve sudaki melatonin çözünürlüğünün  $\beta$ CD> $\alpha$ CD> $\gamma$ CD olarak sıralandığını tespit etmişlerdir [153]. Babu ve ark. melatonin ile HP $\beta$ CD ve RM $\beta$ CD (rastgele modifiye edilmiş metilen  $\beta$ CD) arasında oluşturulan inklüzyon kompleksi sayesinde melatoninin nazal geçirgenliğinin arttığını belirtmişlerdir [154]. Bu kapsamda osseointegrasyonda olumlu etkileri bilinen melatonin hormonunun Ti/HA üzerine oluşturulmuş HP $\beta$ CD taşıyıcı sistemler üzerine yüklenerek çözünürlük artışıyla birlikte kontrollü salımının sağlanarak osseointegrasyon potansiyelinin artırılması hedeflenmiştir.

##### **4.2.3.1. ATR-FTIR analizi**

Bölüm 3.3.3'de anlatılan yöntemler ile oluşturulan çapraz bağlı HP $\beta$ CD polimeri ile serbest haldeki HP $\beta$ CD'nin melatonin ile yaptığı inklüzyon kompleksinin yapısının aydınlatılması amacıyla ATR-FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25'de saf HP $\beta$ CD, saf melatonin, iki farklı pH (pH:1 ve pH:4) değerlerinde çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD ile farklı çözücülerde çözülmüş melatonin arasında gerçekleştirilen iki farklı yükleme işlemi sonrası oluşturulan inklüzyon komplekslerine ait FTIR spektrumları sunulmuştur.



**Şekil 4.25.** a) Saf HPβCD'nin, b) saf melatonin, c) pH:1'deki ve d) pH:4'deki HPβCD/Melatonin fiziksel karışımının, suda çözülmüş melatonin ile e) pH:1'deki ve f) pH:4'deki çapraz bağlı HPβCD'nin kompleks yapmış halinin, su/etanol karışımında çözülmüş melatonin ile g) pH:1'deki ve h) pH:4'deki çapraz bağlı HPβCD'nin kompleks yapmış halinin FTIR spektrumları.

Hidroksipropil-βCD ve melatonine ait spesifik pikler Şekil 4.25.a ve 4.25.b'de görülmektedir. Şekil 4.25.c ve 4.25.d'de pH:1 ve pH:4'deki HPβCD/Melatoninin fiziksel karışımı verilmiştir. Her iki pH değerinin fiziksel karışımların ait FTIR spektrumuna bakıldığında ağırlıklı olarak melatonin pikinin baskın olduğu ve iki molekül arasında FTIR pikinde tespit edilecek kadar kuvvetli bir etkileşimin gerçekleşmediği görülmektedir.

Ayrıca Şekil 4.25.e ve 4.25.f'de görülen suda çözülmüş melatonin ve pH:1 ve pH:4'deki çapraz bağlı HPβCD'nin komplekslerine ait FTIR spektrumları ile fiziksel karışımlarda görülen spektrumlar arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Ancak su/etanol karışımı içerisinde çözülen melatonin ile pH:1 ve pH:4'deki HPβCD komplekslerine ait spektrumlarda  $1556\text{ cm}^{-1}$  ve  $1216\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pikin yoğunluğundaki ve şiddetindeki azalma iki yapı arasındaki inklüzyon kompleksi oluşumuna işaret etmektedir. Ayrıca  $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  aralığındaki melatonine ait -OH pikinin genişlemesi melatonin ve HPβCD moleküllerinin -OH gruplarının etkileşimini göstermektedir.

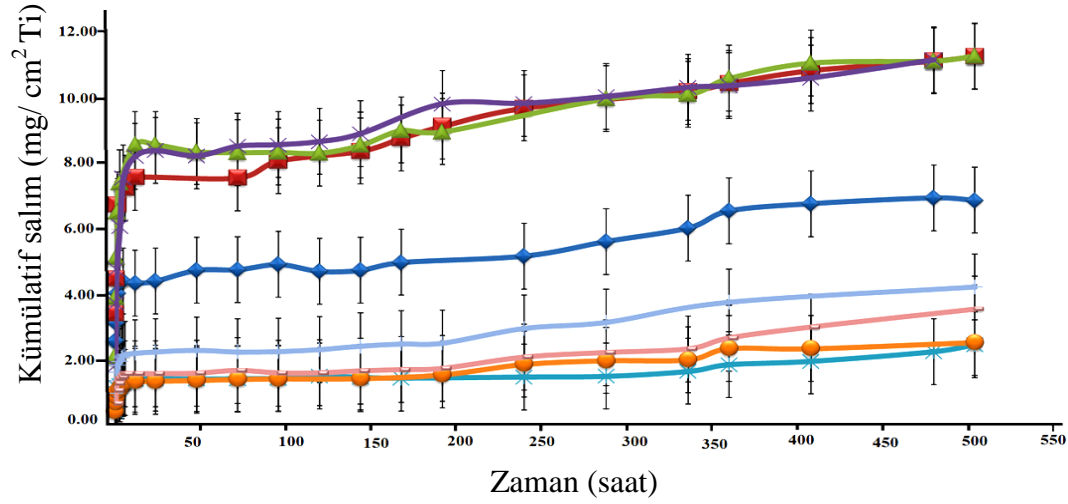
#### 4.2.3.2. İn vitro salım çalışmaları

Melatonin taşıyıcı Ti/HA/HP $\beta$ CD kompozit sistemlerin vücut içerisindeki kullanım potansiyelinin anlaşılması amacıyla PBS (37°C, pH=7.4) içerisinde salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. UV-Vis spektrofotometrede yapılan analizler sonucu elde edilen salım miktarlarından kümülatif salım değerleri hesaplanmış ve salınan melatonin miktarı kümülatif salım miktarı (mg/cm<sup>2</sup> Ti) olarak grafiğe geçirilmiştir. Melatoninin PBS içerisindeki kalibrasyon grafiği EK.1'de verilmiştir. Şekil 4.26'de melatonin taşıyıcı Ti/HA/HP $\beta$ CD kompozit sistemlerden salınan melatonin miktarının ilk 20 gününe ait salım eğrileri verilmiştir.

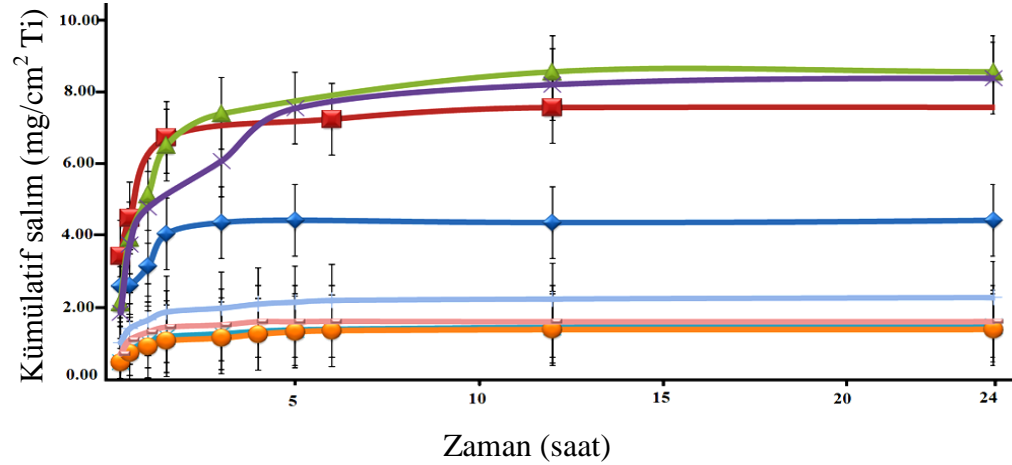
Şekil 4.26'de 1cm<sup>2</sup>'lik Ti plakaların üzerine pH:1 ve 4'deki çapraz bağlanmış membranlara yüklenen melatonin için 20 günlük kümülatif salım miktarları mg olarak verilmiştir. Hazırlanan Ti/HA/HP $\beta$ CD kompozit taşıyıcı sistemlerden melatonin salımı, 20 günün sonunda yaklaşık yüklenen melatonin miktarının %60-%80'i oranında tamamlanmıştır.

Salım profillerine bakıldığında pipetleme ve daldırma yöntemleriyle gerçekleştirilen yükleme çalışmaları sonucunda pipetleme tekniğinin daha yüksek salım değerleri verdiği görülmektedir. Bunun nedeninin pipetleme esnasında yüzeye emdirilen melatoninin iç kısımlarına kadar difüzyonun membran yüzeyinde tutulmasından ve yıkama basamağı uygulanmamasından dolayı salım ortamına doğrudan verilmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Bununla birlikte daldırma yönteminde melatonin, yapıya büyük ölçüde membran ile inklüzyon kompleksi oluşturarak katılmıştır.

Melatoninin sadece suda çözülmesiyle oluşturulan HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksinin pH:1 ve pH:4'deki kümülatif salım olarak değerlendirildiğinde birbirine çok yakın değerlerdedir. Fakat su/etanol karışımı içerisinde çözülen melatoninin HP $\beta$ CD ile yapmış oldukları inklüzyon kompleksine ait salım profilinde pH:4'de salımın daha yüksek değerlerde olduğu bulunmuştur. Artan pH değeriyle birlikte çapraz bağlanma derecesinin azalmasından dolayı sisteme yüklenen melatoninin HP $\beta$ CD molekülleri arasından geçişinin kolaylaştığı ve ortama daha fazla salındığı söylenebilir.



Şekil 4.26. Çapraz bağlı HPβCD/Melatonin kompozit sistemlerin 20 günlük salım eğrileri.



Şekil 4.27. Çapraz bağlı HPβCD/Melatonin kompozit sistemlerin 20 günlük salım eğrileri.

- ◆ Ti/HAHPβCD/Melatonin (pH:1, Su/Pipetleme),
- Ti/HA/HPβCD/Melatonin (pH:4, Su/Pipetleme),
- ▲ Ti/HA/HPβCD/Melatonin (pH:1, Su-etanol/Pipetleme),
- ✕ Ti/HA/HPβCD/Melatonin (pH:4, Su-etanol/Pipetleme),
- ✧ Ti/HAHPβCD/Melatonin (pH:1, Su/Daldırma),
- Ti/HAHPβCD/Melatonin (pH:1, Su/Daldırma),
- + Ti/HA/HPβCD/Melatonin (pH:4, Su-etanol/Daldırma),
- Ti/HA/HPβCD/Melatonin (pH:1, Su-etanol/Daldırma)

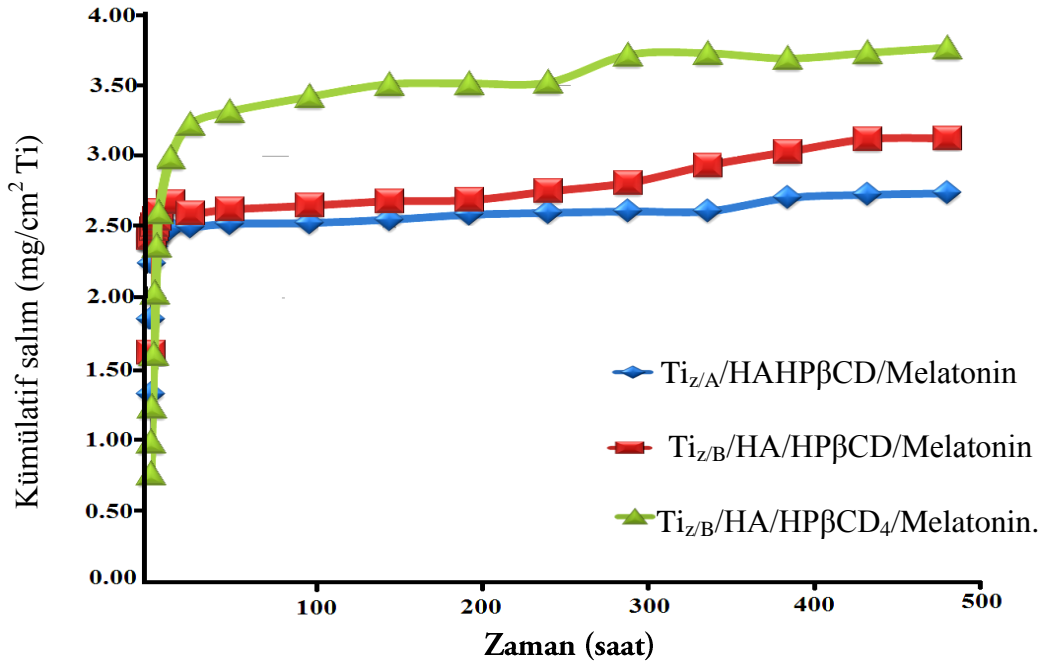
Her iki yükleme tekniğinde de su/etanol karışımının ani salım ve toplam salımda suya oranla daha yüksek salım değerleri verdiği tespit edilmiştir. Bunun nedeni Bölüm 4.2.3.1'de verilmiş olan FTIR analizi sonuçlarından da görüldüğü gibi su/etanol karışımı içerisinde çözülen melatoninin HPBCD ile inklüzyon kompleksi oluşturması sayesinde çözünürlüğünün artmasıdır.

Ti/HA/HP $\beta$ CD taşıyıcı sistemlerden melatonin salımının ilk 24 saatlik diliminde yapıdaki melatonin yaklaşık %50 sini ani olarak saldıgı gözlemlenmektedir. Şekil 4.27'de ilk 24 saatlik salım verilerine ait grafik verilmiştir.

Şekil 4.27'de görüldüğü gibi HP $\beta$ CD membranlardan melatonin salımı çok hızlı bir biçimde gerçekleşmektedir. Bunun nedeninin oldukça ince bir kalınlıkta olan HP $\beta$ CD membran üzerine yüklenen aşırı melatoninin salım ortamına bir anda verilmesinden kaynakladığı ve ilk 5 saat sonrasında geri kalan az miktardaki melatoninin salımının ise difüzyonla gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak oluşturulan kompozit sistem ilk başlarda ani sonrasında ise kontrollü ve uzatılmış bir salım profili sergilemektedir. Taha ve ark. Ti yüzeyini HA ile kapladıktan sonra  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD, ve Me $\beta$ CD'ni yüzeye çapraz bağlayarak bir tabaka halinde yüzey kaplaması oluşturmuşlardır. Hazırlanan Ti/HA/CD disklerin toluidine blue O (TBO) ile inklüzyon kompleksi yapmasını sağlayarak kontrollü bir salım profili elde etmişler, bu sayede Ti yüzeyinde oluşturulan bu çok katmanlı sistem ile siklodekstrinlerin implant malzemelerinde yüzey modifikasyon yöntemi olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir [118]. Ayrıca grubun yaptığı diğeri bir çalışmada aynı yöntemle hazırladıkları Ti/HA/CD kompozit sistemdeki CD ile antibiyotik ajanlardan rifampicin ve tobramycin ile inklüzyon kompleksi yapması sağlanmış, çalışmanın sonunda antibakteriyel amaçlı kullanılabilecek, geciktirilmiş ve uzatılmış salım profili sergileyen implant malzemeleri elde edildiğini belirtmişlerdir [119]. Bu durum tez kapsamında oluşturulan Ti/HA/HP $\beta$ CD/Melatonin kompozit sistemlerin kontrollü ve uzatılmış salım profilini desteklemektedir. Tez kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* salım değerleri ilgili literatürü ile karşılaştırıldığında benzerlik göstermektedir.

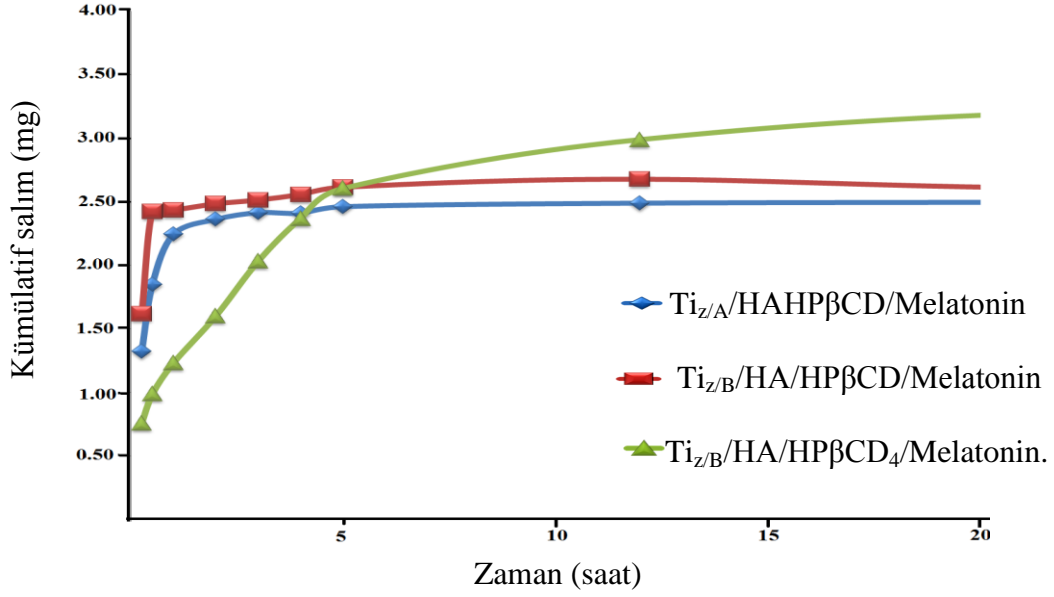
Çapraz bağlı polimer membranlara alternatif olarak oluşturulan ve Ti yüzeyine kaplanan HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksine ait 15 günlük salım profilleri Şekil 4.28'da verilmiştir.



Şekil 4.28. Serbest HPβCD/Melatonin kompozit sistemlerin 15 günlük salım eğrileri.

Bu çalışmada çapraz bağlanmamış, suda çözünen HPβCD/Melatonin kompleksi (Ti<sub>z/A</sub>/HAHPβCD/Melatonin) ile çapraz bağlandıktan sonra melatonin ile kompleks yaptırılan HPβCD (Ti<sub>z/B</sub>/HA/HPβCD<sub>4</sub>/Melatonin) membran sistemlerin salım davranışları arasındaki farklılıkların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda elde edilen veriler incelendiğinde çapraz bağlanmamış HPβCD/Melatonin tabakanın salımının neredeyse tamamının ilk gün gerçekleştiği görülmektedir. Bazik ve anodik oksidasyonlarla oksitlendirildikten sonra HA kaplanan ve yüzeyine çapraz bağlanma olmaksızın HPβCD/Melatonin tabakası oluşturulan yüzeyler karşılaştırıldığında bazik olarak oksitlendirilmiş yüzeyden daha fazla salım gerçekleşmesine rağmen aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Melatonin ile yüklenmiş çapraz bağlanan HPβCD (Ti<sub>z/B</sub>/HA/HPβCD<sub>4</sub>/Melatonin) membranlardan elde edilen salım eğrisi incelendiğinde daha önce elde edilen salım profiline oldukça benzer bir eğri elde edilmiştir. Bu durum tasarlanan sistemin tekrarlanabilirliğinin var olduğunu göstermektedir.

Ani salımın gerçekleştiği bu sistemdeki olası değişikliklerin daha iyi anlaşılması için salımın ilk 24 saatine ait eğriler Şekil 4.29'da verilmiştir.



**Şekil 4.29.** Serbest HPβCD/Melatonin kompozit sistemlerin 24 saatlik salım eğrileri

Şekil 4.29 incelendiğinde Ti<sub>z/A</sub>/HA/HPβCD/Melatonin kompozit sistem ile Ti<sub>z/B</sub>/HA/HPβCD/Melatonin sistemin salım çalışmasının ilk saatlerinde neredeyse tamamının ortama salındığı görülmektedir. Oysa çapraz bağlanmış kompozit sistemde salım geciktirilmiştir.

### 4.3. Üçüncü Bölüm

Bu bölümde istenilen amaca uygun Ti<sub>z</sub>/HA/HPβCD/Melatonin kompozit taşıyıcı sistemin uygunluğuna yönelik *in vitro* bulgular elde etmek amacıyla hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### 4.3.1. Ön hücre kültür çalışmaları

Ana hücre kültür çalışmalarında Ti/HA/HPβCD/Melatonin kompozit taşıyıcı sistemler üzerine uygulanacak hücre kültür koşullarının tespiti için ön hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

##### 4.3.1.1. Ön hücre kültürü MTT Analizi

Aşağıda belirtilen gruplar üzerine ekilen hücrelerin plakalardaki üremesi, MTT testi kullanılarak incelenmiş ve karşılaştırmalar yapılmıştır. Plakaların yüzeylerinde 8 günlük inkübasyon periyodunda çoğalması sağlanan MC3T3-E1 hücrelerinin 1., 3., 5. ve 8. günlerdeki MTT analiz sonuçları Şekil 4.30'da verilmiştir.

İncelenen Ti plakalar;

1) TCPS,

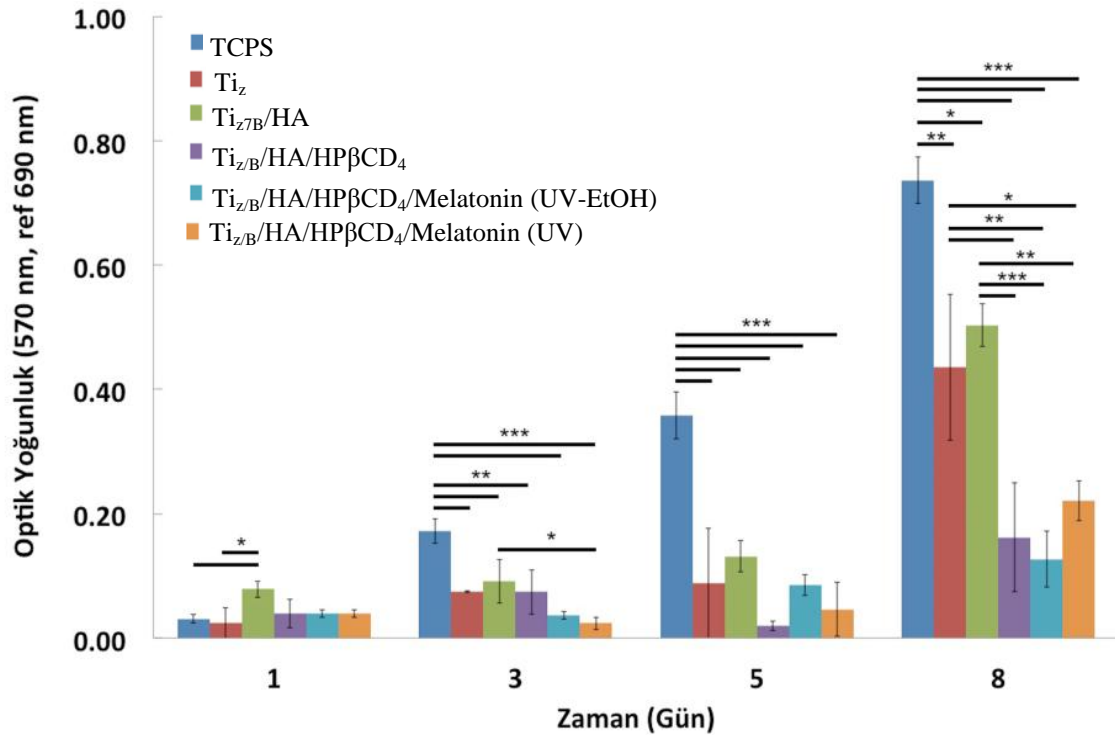
1) Zımparalanmış Ti plaka ( $Ti_z$ ),

2) Bazik oksidasyon sonrası HA ile kaplanmış Ti plakalar ( $Ti_{z/B}/HA$ ),

3) Bazik oksidasyon sonrası membran halinde oluşturulmuş HP $\beta$ CD (pH:4) ile kaplı Ti/HA plakalar ( $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4$ ),

4) Sadece etanol ile sterillemiş melatonin yüklü  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4$  plakalar,

5) Etanol/UV ile sterillemiş melatonin yüklü  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4$  plakalardır.



**Şekil 4.30.** TCPS,  $Ti_z$ ,  $Ti_{z/B}/HA$  Ti,  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4$ ,  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$  (UV),  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$  (UV-EtOH) plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

Gerçekleştirilen ön hücre kültür çalışmalarında titanyum yüzeyinde oluşturulan HA/HP $\beta$ CD/Melatonin kompozit sistemin hücre yapışmasına ve canlılığına olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca melatonin yüklü örneklerde iki farklı sterilizasyon yaklaşımı uygulanarak, hücre ekimi öncesi malzemelere yüklenen melatoninin aktivitesinin ve varlığının korunması üzerine çalışmalar yapılmıştır.



MTT sonuçları incelendiğinde, hücre ekiminden bir gün sonra grupların absorbans değerlerinin düşük ve birbirine yakın olduğu görülmüştür. Çalışmanın 1.günüdeki hücre canlılığına bakıldığında HA kaplı yüzeydeki ( $T_{z/B}/HA$ ) canlılığın zımparalanan Ti yüzeylerine ( $T_z$ ) oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p<0.05$ ) yüksek olduğu görülmüştür.

Kültürün 3. gününe ait absorbans değerleri incelendiğinde en yüksek absorbansa TCPS grubunda rastlanmıştır. Bununla birlikte Ti bazlı modifiye yüzeyler arasında anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Sadece  $T_{z/B}/HA$  kaplı yüzeyin UV ile sterillemiş  $T_{z/B}/HA/HP\beta CD_4$ /Melatonin kaplı yüzeye göre anlamlı derecede ( $p<0.05$ ) yüksek olduğu görülmüştür. Üçüncü günde elde edilen absorbans değerlerinin düşük olması ( $<0.10$ ) bulguların değerlendirilmesini zorlaştırmıştır.

Kültürün 5. gününde  $HP\beta CD$  kaplı Ti plakalar ( $T_{z/B}/HA/HP\beta CD_4$ ) hariç tüm yüzeylerdeki hücre canlılığının kültürün 3. günündeki hücre canlılığına benzerlik gösterdiği söylenebilir.  $T_{z/B}/HA/HP\beta CD_4$  plakaların hücre canlılığında 3. güne oranla %50 bir düşüş saptanmıştır. Kültürün 8. gününe gelindiğinde hücre canlılığının tüm gruplarda arttığı görülmektedir.  $T_{z/B}/HA$ 'nın istatistiksel açıdan  $T_{z/B}$  ve melatonin içeren diğer guruplar arasında önemli derecede ( $p<0.01$ ) yüksek hücre canlılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca melatonin yüklü  $HP\beta CD$  kaplı Ti yüzeyleri üzerindeki hücre canlılığının artması dikkat çekerken, bu artışın diğer gruplara oranla istenilen seviyede olmadığı tespit edilmiştir.

Genel olarak elde edilen hücre canlılığı verilerine bakıldığında Ti bazlı modifiye yüzeyler üzerine ekilen hücrelerin  $T_z$  ve  $T_{z/B}/HA$  kaplı yüzeye, kültürün erken dönemlerinde diğer gruplara göre daha fazla tutunduğu ve çoğaldığı görülmektedir. Knabe ve ark. Ti plakalarla yaptıkları çalışmada HA kaplanan Ti yüzeylerin hücre tutunmasını ve çoğalmasını daha iyi desteklediğini belirtmişlerdir. Bunun nedeninin HA kaplamadan salınan iyonların hücreyi olumlu yönde etkilemesi olduğunu ifade etmişlerdir [155]. Ayrıca Vercaigne ve ark. yaptıkları çalışmada Ti implantların yüzeyinde pürüzlülük oluşturmak için plazma sprej kaplama (Plazma-Spray Coating, TPS) yöntemini kullanmış ve yine aynı yöntem ile Ti yüzeyinin HA ile kaplanmasını sağlamıştır. Keçilerde yürütülen *in vivo* çalışmalarda, HA'nın kimyasal etkisinin kemik büyümesini arttırdığını ve bu etkinin yüzey pürüzlülüğü etkisinden daha fazla olduğunu görülmüştür [156]. Bu nedenle ön hücre çalışmaları kapsamına HA kaplanmış yüzeylerdeki hücre canlılığının yüksek olması literatürdeki verilerle uyumludur.

Pürüzlü yüzeyler, yüzeye bağımlı hücreler için daha fazla tutunma noktası sağlamaktadır. Ayrıca artan yüzey alanı hücre yapışması öncesi yüzeye tutunan serum proteinlerinin artmasına neden olarak hücre yapışmasını desteklemektedir. Tez çalışmasında kullanılan zımparalanmış ve HA ile kaplanmış Ti yüzeylerin pürüzlü olmasının da hücre yapışmasını desteklediği düşünülmüştür. HP $\beta$ CD kaplı yüzeylerin de Şekil 4.18'de görüldüğü gibi yüzeyleri oldukça pürüzlüdür. Buna rağmen MTT sonuçlarına bakıldığında bu yüzeylerin hücre tutunmasını desteklemediği görülmüştür. Bunun nedeninin yüzeyin fiziksel özelliklerinden çok kimyasal içeriğinden olduğu düşünülmektedir. Hidrofilik yüzeyler hücre yapışması öncesi serum proteinlerinin malzeme yüzeyine tutunmasında yardımcı olur. Bu da hidrofilik yüzeylere hücre tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştırır. Fakat aşırı hidrofilik yüzeyler su molekülleriyle etkileşim içine girer ve yüzeyde bir hidrasyon tabakası oluşturur. Yüzey üzerinde osmotik bir itme kuvveti uygulayarak proteinlerin yüzeye tutunmasını engeller [157]. HP $\beta$ CD'nin moleküler yapısındaki -OH bağlarının yapıya hidrofilik özellik kazandırdığı görülmektedir. Ayrıca BTCA ile çapraz bağlanma reaksiyonu sonrası yapıya katılan fazladan -COOH bağları yapının hidrofilitesini arttırmaktadır. Bu nedenle aşırı hidrofilik hale gelen çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD yüzeyi hücre tutunması ve çoğalmasını engellediği düşünülmektedir.

Ayrıca yüzeye yukarıda bahsedilen nedenden dolayı hücrelerin yüzeye tutunamayıp çoğalamaması araştırma konusu olan için sterilizasyon yönteminin etkisinin net olarak anlaşılmasını engellemiştir.

#### **4.3.2. Ana hücre kültür çalışmaları**

Ön hücre kültür çalışmalarında çapraz bağlı HP $\beta$ CD yüzeyler üzerine hücre yapışması sağlanamadığında dolayı kemik ara yüzeyinde melatonin HP $\beta$ CD kompleksinin etkisinin arttırılabilmesi için HP $\beta$ CD/Melatonin kompleksinin HA kaplı Ti yüzeylere çapraz bağlanma gerçekleştirilmeden eklenmesine karar verilmiştir.

Ön hücre kültür çalışmalarından elde edilen veriler ışığında aşağıda belirtilen gruplar üzerine ekilen hücrelerin, hücre canlılığı MTT testi ile incelenmiş ve karşılaştırmalar yapılmıştır. Ayrıca hücre morfolojilerinin incelenmesi amacıyla kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde SEM analizi yapılmıştır.

İncelenen Ti plakalar,

- 1) Zımparalanmış Ti plakalar (Ti<sub>z</sub>),
- 2) Bazik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar (Ti<sub>z/B</sub>/HA),

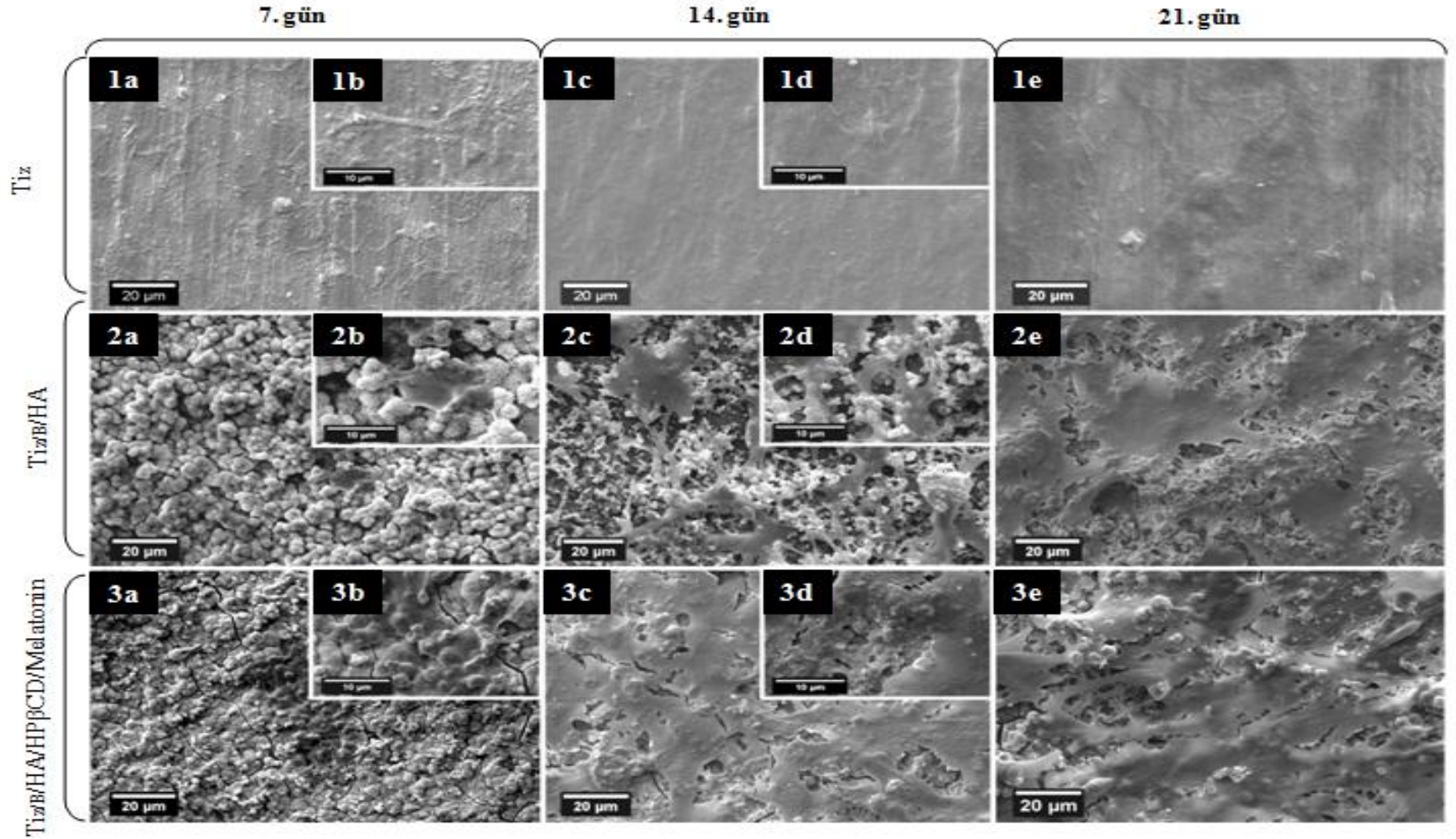
- 3) Bazik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar üzerine çapraz bağlayıcı bir ajan kullanmadan membran halinde oluşturulan ve melatonin ile inklüzyon kompleksi yapmış HPβCD kaplı plakalar ( $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD/Melatonin$ ),
- 4) Bazik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar üzerine çapraz bağlanmış membran halinde oluşturulan ve melatoninle inklüzyon kompleksi yapmış HPβCD (pH:4) ile kaplı plakalar ( $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$ ),
- 5) Anodik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar ( $Ti_{z/A}/HA$ ),
- 6) Anodik oksidasyon sonrası HA ile kaplı Ti plakalar üzerine çapraz bağlayıcı bir ajan kullanmadan membran halinde oluşturulan ve melatonin ile inklüzyon kompleksi yapmış HPβCD kaplı plakalardır ( $Ti_{z/A}/HA/HP\beta CD/Melatonin$ ).

#### **4.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi**

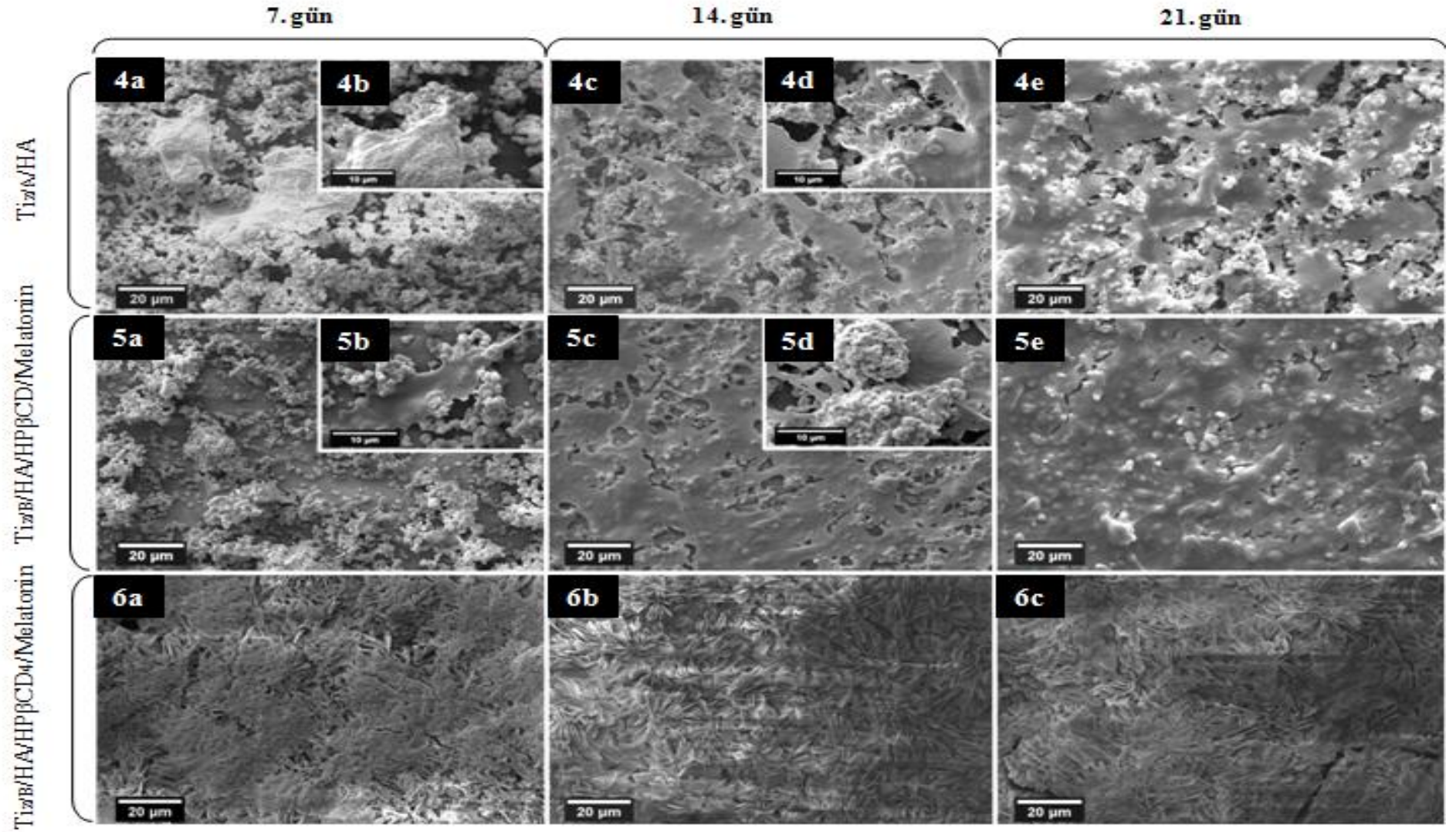
Yukarıda bahsedilen gruplar üzerinde üreyen hücrelerin morfolojilerini belirlemek amacıyla yapılan ana hücre kültür çalışmalarının 7., 14., ve 21. günlerin SEM görüntüleri Şekil 4.31'de verilmiştir.

Kültürün 7. gününde Şekil 4.31'de verilmiş çapraz bağlanmış HPβCD/Melatonin kompleksi içeren  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$  yüzeyler dışında tüm yüzeylerde hücrelerin tutunduğu ve yayıldığı görülmektedir. Beyaz oklar hücrelerin sitoplazmik uzantıları sayesinde birbiriyle ve malzeme ile olan etkileşimlerini göstermektedir. 7.güne bakıldığında hücrelerin tüm yüzeylerde ayrık morfolojide oldukları görülmektedir.  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$  grubunun yüzeyinde hücre kalıntılara rastlanmış ancak sağlıklı bir hücre-yüzey etkileşimi olmadığı görülmüştür. Kültürün 14. gününe ait SEM görüntülerinde, hücre katmanlarının artarak plaka yüzeyini yoğun bir şekilde sardığı ve kendi ECM'lerini ürettikleri gözlenmektedir. Yedinci günde ayrık morfolojide olan hücrelerin kültürün 14. gününde hücresel uzantılar kurarak hücre katmanı oluşturdukları görülmektedir. Ayrıca nitel olarak  $Ti_{z/A}/HA/HP\beta CD/Melatonin$  ve  $Ti_{z/A}/HA/HP\beta CD/Melatonin$  gruplarının yüzeyinde hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu söylenebilir.  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$  grubuna ait yüzeyde ise yüzeyinde hücre bulunmamaktadır. Kültürün 21. gününde yüzeyinde hücre tutunmasına izin veren tüm gruplarda hücrelerin malzeme yüzeyini kapladığı gözlenmekteyken,  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$  grubunu hücre tutunmasını hala destelemediği açıkça görülmektedir.

Sonuç olarak çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD içeren grup hariç tüm gruplarda hücre tutunmasının, yayılmasının ve çoğalmasının desteklendiği görülmüştür. Aynı zamanda hücre çoğalmasıyla birlikte modifiye yüzeylerdeki ECM birikiminin 7. günden 21. güne arttığı tespit edilmiştir. Çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD/Melatonin kompleksi içeren yüzeylerin hücre yüzey etkileşimine izin vermediği görülmüştür. Bunun nedeninin Bölüm 4.3.1.1'de açıklanan yüzeyin kimyasal içeriği nedeniyle aşırı hidrofilik yapıda olmasının hücrelerin malzeme yüzeyine yapışmasını büyük ölçüde engellediği düşüncesidir.



Şekil 4.31. Ana hücre kültür çalışmasına ait SEM görüntüleri: (1, 2, 3a), (1, 2, 3c), (1, 2, 3e) x5.00 K, (1, 2, 3b), (1, 2, 3d) x10.00 K.



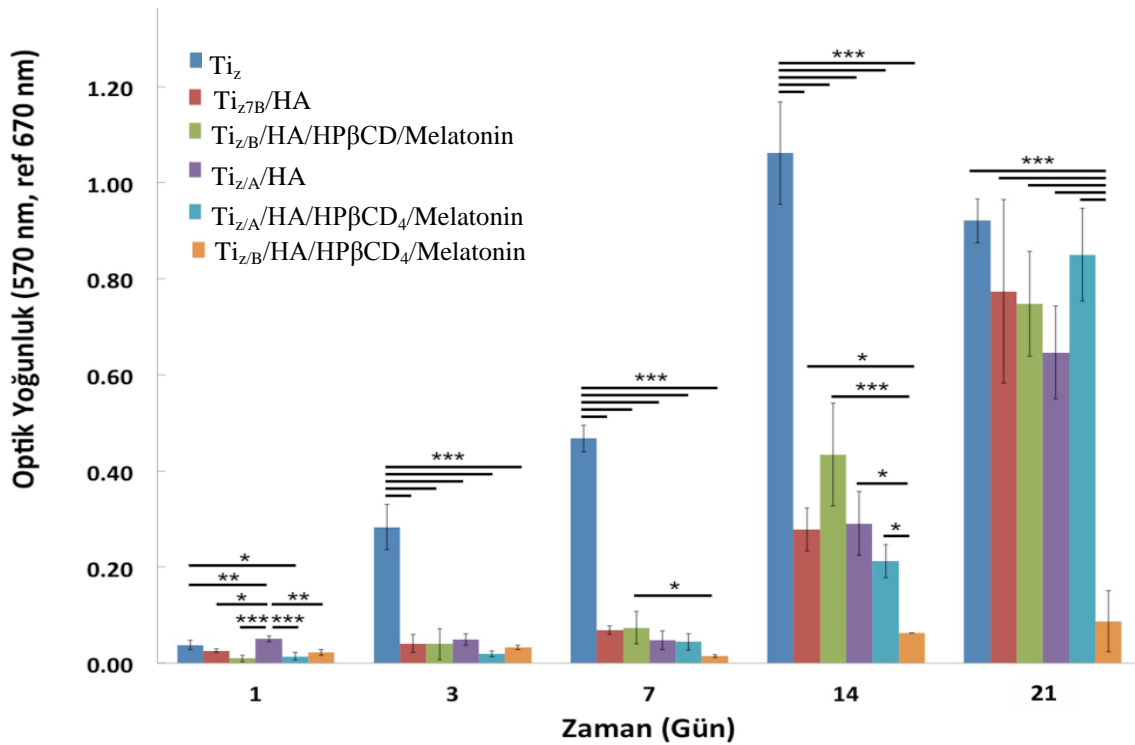
Şekil 4.31. devamı Ana hücre kültür çalışmasına ait SEM görüntüleri: (4, 5, 6a), (6b), (4, 5, 6c), (4, 5e) x5.00 K, (4, 5b), (4, 5d) x10.00 K.



#### 4.3.2.2 Ana hücre kültürü MTT Analizi

Ana hücre kültür çalışmaları kapsamında hücre canlılığı MTT testi ile incelenmiş ve karşılaştırmalar yapılmıştır. Plakaların yüzeylerinde çoğalması sağlanan MC3T3-E1 hücrelerinin 1., 3., 7., 14. Ve 21. günlerine ait MTT analiz sonuçları Şekil 4.32'de verilmiştir

MTT sonuçları incelendiğinde hücre ekiminden bir gün sonra ön hücre kültür çalışmalarında olduğu gibi grupların absorbans değerlerinin düşük ve birbirine yakın olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, yapılan istatistiksel analiz gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. İstatistiksel analiz sonuçları incelendiğinde anodizasyon sonrası HA kaplı yüzeylerde ( $Ti_{z/A}/HA$ ) hücre tutunmasının diğer gruplardan daha fazla olduğu görülmüştür. Gruplar arasındaki farklılıklar Şekil 4.32'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.32.  $Ti_z$ ,  $Ti_{z/B}/HA$ ,  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD/Melatonin$ ,  $Ti_{z/A}/HA$ ,  $Ti_{z/A}/HA/HP\beta CD/Melatonin$ ,  $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$  plakalar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

Kültürün 3. gününde zımparalanmış Ti ( $Ti_z$ ) yüzeylerdeki hücre canlılığında dikkate değer bir artış görülmektedir. Bununla birlikte, diğer gruplardaki hücre canlılığının  $Ti_z$ 'a göre önemli derecede düşük ( $p<0.001$ ) ve benzer olduğu dikkat çekmektedir.

Kültürün 7. gününde zımparalanmış Ti yüzeyi ( $Ti_z$ ) hariç diğer grupların hücre canlılıklarında dikkat çekici bir artış görülmemiştir. Bununla birlikte zımparalanmış yüzey ( $Ti_z$ ) ile diğer yüzeyler arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.001$ ) devam etmektedir. Ayrıca bazik oksidasyon sonrası HA kaplı Ti yüzeylerin ( $Ti_{z/B}/HA$ ) çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD/Melatonin kompleksi içeren yüzeylere ( $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$ ) göre anlamlı derecede ( $p<0.001$ ) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her ne kadar absorbans değerleri düşük olsa da bu sonuç çapraz bağlı HP $\beta$ CD yapısının serbest halde olana göre hücre canlılığını daha az desteklediğini işaret etmektedir.

Kültürün 14. gününde tüm grupların absorbans değerlerinde artışa rastlanmıştır. Bu durum hücre canlılığını tüm gruplarda sürdürdüğü anlamına gelmektedir. Kültürün 3. ve 7. günlerinde elde edilen verilere benzer olarak zımparalanmış yüzeyde ( $Ti_z$ ) hücre canlılığı diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p<0.001$ ) yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte ön hücre kültür çalışmalarına benzer olarak, en düşük hücre canlılığına çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD/Melatonin ( $Ti_{z/B}/HA/HP\beta CD_4/Melatonin$ ) içeren grupta rastlanmıştır. Kültürün 14. gününde oksidasyon yönteminin ya da melatonin varlığının hücre canlılığı üzerinde dikkate değer bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Kültürün 21. gününe gelindiğinde zımparalanmış Ti yüzeyindeki ( $Ti_z$ ) hücre canlılığında azalma gözlenirken diğer grupların hücre canlılığında dikkat çekici artış görülmektedir. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde çapraz bağlanmış HP $\beta$ CD/Melatonin kompleksi bulunan yüzeyde diğer tüm yüzeylere göre anlamlı derecedeki ( $p<0.001$ ) farklılık devam ederken diğer gruplar arasında herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir.

Titanyum yüzeyde hücre canlılığının azalması, kültürün ilerleyen günlerinde malzeme yüzeyinin tamamen hücrelerle kaplanması ve üremenin bu nedenle yavaşlaması ile açıklanabileceği gibi hücrelerin osteojenik olarak farklılaşmasının da hücre canlılığını etkilediği söylenebilir.

Genel olarak MTT sonuçları incelendiğinde bazik ve anodik oksidasyon sonrasında HA ile kaplanan yüzeylerde benzer düzeyde hücre canlılığının elde edilmesi oksidasyon yönteminin elde edilen HA tabakasının biyouyumluluk özelliklerini değiştirmediğini ortaya koymuştur. Yüzeyin HA ile kaplanması hücre tutunması ve çoğalmasına olumlu

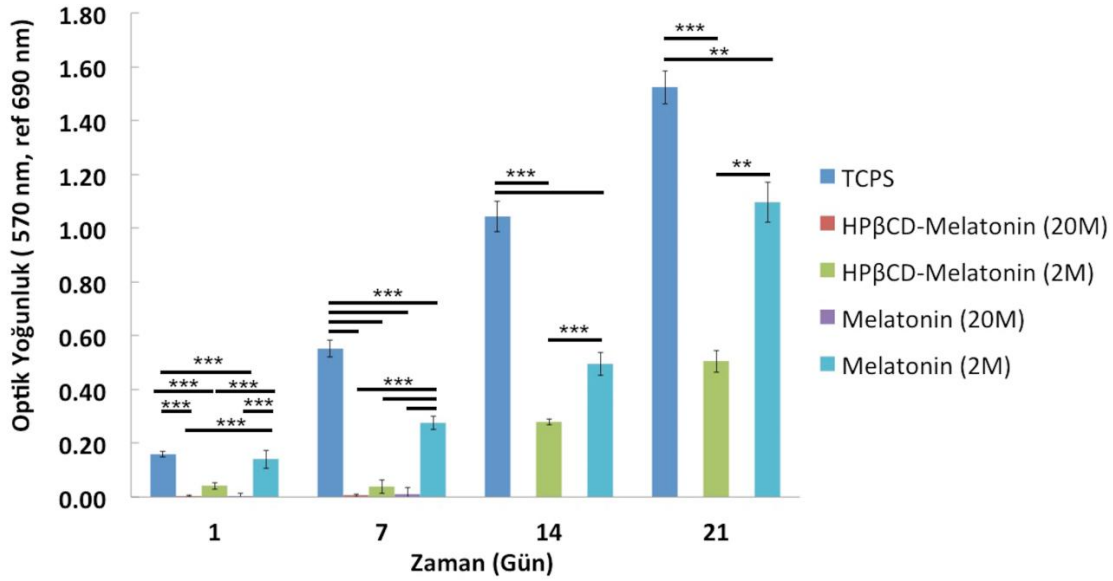


yönde etkilemiştir. Hücrelerin çapraz bağlı HPβCD içeren yüzeylere tutunmamasından ve çoğalmamasından dolayı melatoninin osseointegrasyondaki etkisi görülememiştir. Ti plakalar üzerine oluşturulan suda çözünür HPβCD membran tabakanın kültürün ilk günlerinde hücre canlılığını baskılamasına rağmen geç zamanda hücre canlılığını desteklediği görülmüştür.

Ayrıca HPβCD varlığının ve melatoninin derişiminin hücreler üzerine olan etkisinin tespit edilebilmesi için bir hücre kültür çalışması daha gerçekleştirilmiştir. Yüzeye çapraz bağlanarak oluşturulan, suda çözünmez (çapraza bağlı) HPβCD<sub>4</sub>/Melatonin membran ile mikrodalga ile oluşturulan HPβCD/Melatonin kompleksi içeren suda çözünür membranlar kültür ortamına bırakıldıktan belirli bir süre salım yapmaktadır. Hücre kültür çalışmalarında hücrelerin gerekli olan besininin sağlanması için belirli zaman aralıklarında ortam değişimi gerçekleştirilir. Bu değişim esnasında kültür ortamına salınan melatoninde uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle ortama eklenen melatoninin etkisi net bir biçimde görülememektedir. Melatoninin etkisinin araştırılması için yapılan hücre kültür çalışmasında TCPS kaplara ekilen ve çoğalmaya bırakılan MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattının üzerine her ortam değişimi sonrası aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda melatonin ilave edilmiştir. Bu sayede ortamda bulunan sürekli melatonin varlığının hücreler üzerine olan etkisinin tespit edilmesi sağlanmıştır. Hücre kültür çalışmaları aşağıda belirtilen gruplar ile gerçekleştirilmiştir. Bunlar,

- 1) Kontrol grubu olarak TCPS,
- 2) TCPS kaplara 20 mM derişimde serbest halde bulunan melatonin,
- 3) TCPS kaplara 2 mM derişimde serbest halde bulunan melatonin,
- 4) TCPS kaplara 20 mM derişimde HPBCD ile kompleks yapmış melatonin,
- 5) TCPS kaplara 2 mM derişimde HPβCD ile kompleks yapmış melatonin

boş TCPS kaplara ekilerek üzerine 15. pasajda bulunan  $1 \times 10^4$  hücre.mL<sup>-1</sup> derişimdeki hücre süspansiyonu eklenmiştir. Tüm hücre kültür çalışmaları üç paralel örnekle yürütülmüştür.



**Şekil 4.33.** 20 mM derişimde serbest halde bulunan melatonin, 2 mM derişimde serbest halde bulunan melatonin, 20 mM derişimde HPBCD ile kompleks yapmış melatonin, 2 mM derişimde HPβCD ile kompleks yapmış melatonin içeren TCPS kaplar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği. İstatistiksel anlam farklılığı, n=3, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

Şekil 4.33'de verilen MTT sonuçlarına bakıldığında kontrol grubu olan TCPS yüzeylerde hücre yapışmasının ve canlılığının 1. günden 21. güne kadar düzenli olarak arttığı gözlemlenmiştir. 1 gün elde edilen veriler değerlendirildiğinde 20 mM derişimdeki HPβCD/Melatonin ve serbest melatonin içeren gruplarının hücrelerin canlılıklarını yitirdikleri dikkat çekmektedir. Ayrıca 2 mM serbest melatonin içeren grubun kontrol grubuna yakın bir canlılık düzeyi sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte 2 mM derişimde ki HPβCD/Melatonin hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı derecede (p<0.001) düşük olduğu dikkat çekmiştir.

Yedinci günde kontrol grubuna benzer olarak 2 mM serbest melatonin içeren grubun hücre canlılığının arttığı diğer gruplarda ise hücre canlılığının anlamlı derecede (p<0.001) düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte 7. günde 2 mM serbest melatonin içeren grubun hücre canlılığının baskılandığı görülmektedir. Kültürün 14. gününe 20 mM melatonin içeren deney gruplarındaki hücre canlılığı tamamen ortadan kaybolduğu görülmüştür. 2 mM melatonin içeren gruplarda ise hücre canlılığı 7. güne oranla yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. Kontrol grubu ile serbest melatonin içeren grubun HPβCD/Melatonin içeren grupla olan anlamlı derecedeki (p<0.001) farklılığının devam ettiği görülmektedir.

Kültürün 21. gününde gelindiğinde TCPS, 2 mM serbest melatonin ve HP $\beta$ CD/Melatonin içeren grupların hücre canlılıklarının artarak devam ettiği görülmektedir. Tüm grupların hücre canlılığında kültürün 14. gününe benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. 20 mM melatonin varlığının toksik etki göstererek hücreleri öldürdüğü gözlenmiştir. Liu ve ark. (2013), insan osteosarkoma MG-63 hücre hattı kullanarak, melatoninin artan konsantrasyon miktarına bağlı olarak hücre üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Yaptıkları hücre kültür çalışmalarında 1 nM'den 2 mM'a kadar melatoninin hücre üremesini engelleyecek herhangi bir etki yaratmadığını fakat 4 mM ile 10 mM aralığındaki melatonin konsantrasyonlarında hücreler üzerinde üremeyi durdurucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir. [123]. Bu kapsamda 20 mM konsantrasyondaki melatoninin hücreler üremesini durdurması beklendik bir durumdur. Ayrıca gerçekleştirilen tüm hücre kültür çalışmalarında melatonin varlığının her koşulda hücre canlılığını baskıladığı görülmektedir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda ilk günden 21. güne kadar 2 mM serbest melatonin içeren gruplardaki hücre canlılığının HP $\beta$ CD içerenlere oranla daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Canlılığın azalmasında HP $\beta$ CD'nin çok büyük rolü olduğu düşünülmektedir. Farnosötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan HP $\beta$ CD'nin toksik etki yaratmadığı ilgili literatürde belirtilse de hücreler üzerine olan etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu kapsamda, bu konuyu aydınlatmak açısından tez çalışmasında elde edilen bulgular önem taşımaktadır.

## 5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, Ti implantlarda osseointegrasyonu hızlandırmak ve etkinliğini arttırmak amacıyla, HA ve biyosinyal taşıyıcı hidroksipropil-beta-siklodekstrin (HP $\beta$ CD) esaslı, çok katmanlı bir kompozit yapının meydana getirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, ilk aşamada titanyum yüzeyinde mekanik olarak pürüzlülük oluşturulmuş, ardından bazik oksidasyon ve anodik oksidasyon yöntemleriyle yüzeyde titanyum oksit (TiO<sub>2</sub>) tabakası meydana getirilmiştir. Bu tabaka HA ile kaplanarak Ti osseointegrasyon kapasitesi arttırılmıştır. HA kaplı yüzeyler üzerine suda çözünür/suda çözünmez HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksi içeren bir polimerik tabaka oluşturulmuştur. Hazırlanan melatonin yüklü HA/HP $\beta$ CD kompozit taşıyıcılarla kaplanmış titanyum plakaların osseointegrasyon potansiyeli, preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı ile yürütülen *in vitro* kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda gözlenen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- ❖ Bazik oksidasyon öncesi yüzeye uygulanan zımparalama tekniği ile Ti yüzeydeki doğal oksit tabakasının uzaklaştırılmış, birbirine paralel oluklar oluşturulmuş ve bu pürüzlülük sayesinde yüzey alanının artışı sağlanmıştır.
- ❖ Yüzey pürüzlülük değerlerine bakıldığında zımparalanan Ti yüzeylerde zımparalanmamış yüzeylere oranla pürüzlülüğün daha fazla olduğu görülmüş, yüzeyde meydana getirilen bu pürüzlülüğün sadece yüzey alanının arttırmakla kalmayıp ıslatılabilirliği ve yüzey enerjisini de arttırdığı bulunmuştur.
- ❖ Zımparalama işleminden sonra artan yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak su temas açısında düşüş görülmüş.
- ❖ Bazik oksidasyon çalışmalarında NaOH uygulaması sonrası elde edilen yüzeylerde sodyum tuzları, alkali titanat tabakası ve TiO<sub>2</sub> içeren bir kaplama gerçekleştirilmiş, HCl uygulaması sonrasında sodyum tuzları, alkali titanat tabakası ortadan kalktığı ve yüzeyde sadece TiO<sub>2</sub> tabakasının kaldığı görülmüştür. HCl ile muamelenin bu yapıyı uzaklaştırması, nano boyuttaki pürüzlülüğü artırılmasına rağmen mikron boyuttaki pürüzlülüğü azaltmaktadır.
- ❖ Bazik oksidasyon sonrası 600°C'ye maruz bırakılmış örneklerdeki TiO<sub>2</sub> tabakasının ısı işlem uygulanmamış yüzeylere daha kalın yapıda olduğu görülmüştür.
- ❖ Bazik oksidasyon sonrası alınan AFM görüntüleri ve pürüzlülük değerlerine göre yüzeyi NaOH ile muamele etmek yüzey pürüzlülüğünü arttırmış ve fakat ısı işlem

uygulamasý sonrası pürüzlülük yarı yarıya azalmıştır. Ayrıca NaOH uygulamasından sonra yüzey aşırı hidrofilik bir özellik kazanmış, ısıt işlem sonrası bu özellikte azalma gözlenmiştir.

- ❖ Bazik olarak oksitlenmiş yüzeylerde oluşturulması istenen TiO<sub>2</sub> tabakasının varlığı EDX analizleriyle ispatlanmış ve ısıt işlem sonrası bu tabakanın yüzeyi %100' e yakın kapladığı görülmüştür.
- ❖ Anodik oksidasyon öncesi yüzeye uygulanan zımparalama tekniği ve ve 5 dk'lık HF:HNO<sub>3</sub> muamelesinin Ti yüzeydeki doğal oksit tabakasının uzaklaştırılması için yeterli olduğu tespit edilmiştir.
- ❖ Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda istenilen amaca en uygun yüzey özellikleri 20V gerilim altında, 45 dk işlem süresince ve anot/katot arası mesafenin 1cm olduğu durumda elde edildiği bulunmuştur.
- ❖ Anodizasyon işleminde bazik oksidasyon yöntemine oranla yüzey pürüzlülüğünde daha fazla artış sağlandığı tespit edilmiştir.
- ❖ Anodizasyon işlemi sonrası artan nano boyutta morfolojisiyle hidrofilitésinin de arttığı görülmüştür.
- ❖ Anodik olarak oksitlenmiş yüzeylerde oluşturulması istenilen TiO<sub>2</sub> tabakasının varlığı EDX analizleriyle ispatlanmış ve bu tabakanın yüzeyi %100' e yakın kapladığı görülmüştür. Ayrıca bazik oksidasyona oranla elementel içeriğinin daha temiz olduğu tespit edilmiştir.
- ❖ Her iki oksidasyon yöntemi sonrası yüzeye kapalan HA'in kemik benzeri yapıda olduğu tespit edilmiş ve tüm yüzeyleri yoğun bir şekilde kapladığı görülmüştür.
- ❖ Bazik oksidasyonla elde edilmiş yüzey üzerine kaplanan HA tabakasının tutunma kararlılığının anodik olarak oksitlendirilmiş yüzeylere oranla daha fazla olduğu bulunmuştur.
- ❖ HA kaplı Ti yüzeyler üzerine oluşturulacak çapraz bağlı HPβCD membran için en uygun pH değerinin 4 olduğu, bu pH da HA partiküllerinin çözünmediği, yapıya kimyasal bağlarla değil fiziksel bağlarla katıldığını tespit edilmiştir.
- ❖ Ti/HA taşıyıcı sistemleri üzerine oluşturulan çapraz bağlı HPβCD membranların neredeyse tamamında yaprakçıklar halinde yüzeyde kümelendiği ve yüzeyi bir tabaka halinde kaplamadığı görülmüştür. Ayrıca yer yer HA partiküllerinin varlığına rastlanmış, polimerizasyon işlemi sırasındaki sıcaklığa ve vakuma bağlı olarak gözenekli bir yapının olduğu görülmüştür.

- ❖ Serbest haldeki HP $\beta$ CD'nin melatonin ile kompleks oluşturmasından sonra elde edilen sulu çözeltilisinin yüzeye herhangi bir çapraz bağlama ajanı kullanılmadan doğrudan tabaka halinde kaplanmasından dolayı yapının su içerisine girdiğinde çözünerek uzaklaştığı görölmüştür. Su ile temas süresi arttıkça çözünürlüğün arttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu uzaklaşma esnasında yüzeye tutunan HA'nın yoğunluğuunda da azalmaya rastlanmıştır.
- ❖ pH:1 ve pH:4'deki çapraz bağlı HP $\beta$ CD membranların sadece su/etanol karışımı içerisinde çözülen melatonin ile inklüzyon kompleksi yaptığı tespit edilmiştir.
- ❖ Hazırlanan Ti/HA taşıyıcı sistem üzerine oluşturulan çapraz bağlı HP $\beta$ CD membranlardan melatonin salımının, ilk 6 saatte ani olarak gerçekteştiği ve daha sonra uzatılmış ve gecikmeli bir salım profili sergilediği bulunmuştur.
- ❖ Pipetleme ve daldırma yöntemleriyle gerçekteştirilen yükleme çalışmaları sonucunda pipetleme tekniğinin daha yüksek salım değerleri verdiği görölmüştür.
- ❖ Melatoninin sadece suda çözümlenmesiyle oluşturulan HP $\beta$ CD/Melatonin inklüzyon kompleksinin pH:1 ve pH:4'deki kümülatif salım olarak değerlendirildiğinde birbirine çok yakın değerlerde olduğu fakat su/etanol karışımı içerisinde çözülen melatoninin HP $\beta$ CD ile yapmış oldukları inklüzyon kompleksine ait salım profilinde pH:4'de salımın daha yüksek değerlerde olduğu bulunmuştur.
- ❖ Her iki yükleme tekniğinde de su/etanol karışımının ani salım ve toplam salımda suya oranla daha yüksek salım değerleri verdiği tespit edilmiştir.
- ❖ Bazik ve anodik oksidasyonlarla oksitlendirildikten sonra HA kaplanan ve yüzeyine çapraz bağlanma olmamaksızın oluşturulan HP $\beta$ CD/Melatonin tabakasından melatonin salımının nerdeyse tamamının ilk 4 saat içinde gerçekteşerek ani salım profili sergilediği görölmüştür.
- ❖ Gerçekteştirilen ön hücre kültür çalışmalarında Ti bazlı modifiye yüzeyler üzerine ekilen hücrelerin Ti<sub>z</sub> ve Ti<sub>z/B</sub>/HA kaplı yüzeyde, kültürün erken dönemlerinde diğer gruplara göre daha fazla tutunduğu ve çoğaldığı anlaşılmıştır.
- ❖ Ti/HA taşıyıcı yüzey üzerine oluşturulan çapraz bağlı HP $\beta$ CD hücre tutunmasını desteklemediği görölmüştür.
- ❖ Ana hücre kültür çalışmalarında, yüzeye çapraz bağlanmadan oluşturulan serbest HP $\beta$ CD/Melatonin kompleksinin tabakanın kültürün ilk günlerinde hücre canlılığını baskılamasına rağmen geç zamanda hücre canlılığını desteklediği görölmüştür.

- ❖ Gerçekleştirilen tüm hücre kültür çalışmalarında melatonin varlığının her koşulda hücre canlılığını baskıladığı tespit edilmiştir.
- ❖ Serbest melatonin içeren gruptaki hücre canlılığının HPβCD içerenlere oranla daha fazla olduğu anlaşılmış ve bu durumun HPβCD varlığının toksik etki yarattığından kaynaklandığı bulunmuştur.

İlgili literatür incelendiğinde Ti implantlar üzerinde yüzey pürüzlülüğünün ve titanyum oksit tabakası oluşumunun sağlandığı birçok çalışmaya rastlanmıştır. Aynı zamanda bu implantların HA ile kaplandığı veya polimerik taşıyıcılarla birleştirildiği bazı çalışmalar da mevcuttur. Fakat birbirinden bağımsız olan bu çalışmaların bir arada bulunduğu bir çalışma literatürde rastlanmamıştır. Tez kapsamında bahsedilen kompozit sistemlerin bir arada incelediği Ti/HA/HPβCD/Melatonin taşıyıcı kompozit sistem sayesinde Ti implantların HA kaplanmasının osseointegrasyonu desteklediğini bulunmuştur. Ayrıca ilaçların uzatılmış ve geciktirilmiş salımına olanak sağladığı kanıtlanan çapraz bağlı HPβCD membranların hücre yapışmasının istenmediği ve osseointegrasyonu destekleyebilecek alternatif bir implant kaplama malzemesi olduğu tespit edilmiştir.

Bazik ve anodik oksidasyon yöntemleri ile TiO<sub>2</sub> oluşturma ve bunların osseointegrasyon etkinliği literatürde daha önce hiç karşılaştırılmamıştır. Bu kapsamda tez çalışmalarından elde edilen bulgular ışığında, bazik oksidasyonla elde edilmiş yüzeylerin HA tutunma dayanımı ve osseointegrasyonu desteklemesi açısından daha uygun yüzeyler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışma HPβCD ve melatonin arasındaki inklüzyon kompleksi oluşumunun sağlandığı, çapraz bağlı suda çözünmez halde bulunan HPβCD'nin melatonin ile inklüzyon kompleksinin oluşturulduğu ilk çalışma olarak literatüre katkı sağlamaktadır. Bununla birlikte HPβCD'nin hücreler üzerine olan etkisinin ilk kez araştırıldığı bu tez çalışması bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalar için öncülük etmekte ve eksik olan özelliklerin tamamlanmasıyla biyomedikal uygulamalarda kullanılabilecek alternatif bir kaplama malzemesi üretimine olanak sağlanmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Long, M. and Rack, H., Titanium alloys in total joint replacement-a materials science perspective, *Biomaterials*, 19, 1621-1639, **1998**.
- [2] Nuss, K. M. and von Rechenberg, B., Biocompatibility issues with modern implants in bone-a review for clinical orthopedics, *The Open Orthopaedics Journal*, 2, 66, **2008**.
- [3] Albrektsson, T., Brånemark, P.-I., Hansson, H.-A. and Lindström, J., Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man, *Acta Orthopaedica*, 52, 155-170, **1981**.
- [4] Pilliar, R. M., Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs, *Implant Dentistry*, 7, 305-314, **1998**.
- [5] Cooper, L. F., A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 84, 522-534, **2000**.
- [6] Bagnò, A. and Di Bello, C., Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15, 935-949, **2004**.
- [7] Wong, M., Eulenberger, J., Schenk, R. and Hunziker, E., Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone, *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, 1567-1575, **1995**.
- [8] Klokkevold, P. R., Nishimura, R. D., Adachi, M. and Caputo, A., Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit, *Clinical Oral Implants Research*, 8, 442-447, **1997**.
- [9] Habibovic, P., Barrere, F., Blitterswijk, C. A., Groot, K. and Layrolle, P., Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants, *Journal of the American Ceramic Society*, 85, 517-522, **2002**.
- [10] Singh, M., Sharma, R. and Banerjee, U., Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnology Advances*, 20, 341-359, **2002**.
- [11] Ostrowska, Z., Kos-Kudła, B., Marek, B., Kajdaniuk, D., Staszewicz, P., Szapska, B. and Strzelczyk, J., The influence of pinealectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism in experimental osteoporosis in the rat, *Neuro Endocrinology Letters*, 23, 104-109, **2002**.
- [12] Griffith, L. G. and Swartz, M. A., Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 211-224, **2006**.
- [13] Doblaré, M., García, J. and Gómez, M., Modelling bone tissue fracture and healing: a review, *Engineering Fracture Mechanics*, 71, 1809-1840, **2004**.
- [14] Gibson, L. J., Biomechanics of cellular solids, *Journal of Biomechanics*, 38, 377-399, **2005**.
- [15] Açıkalın, A. E., Gürer, F., Aral, E., (ed: Bayram, N.), Kemik dokusu, Histoloji, *T.C. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları*, 124-144, **1995**.
- [16] Hutmacher, D. W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21, 2529-2543, **2000**.



- [17] Amini, A. R., Laurencin, C. T. and Nukavarapu, S. P., Bone tissue engineering: recent advances and challenges, *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 40, **2012**.
- [18] Wang, P., Zhao, L., Liu, J., Weir, M. D., Zhou, X. and Xu, H. H., Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells, *Bone Research*, 2, **2014**.
- [19] Healy, K. and Guldberg, R., Bone tissue engineering, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 7, 328, **2007**.
- [20] Betz, R. R., Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions, *Orthopedics*, 25, S561, **2002**.
- [21] Salgado, A. J., Coutinho, O. P. and Reis, R. L., Bone tissue engineering: state of the art and future trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-765, **2004**.
- [22] Fisher, J. and Reddi, A., Functional tissue engineering of bone: signals and scaffolds, *Topics in Tissue Engineering*, 1, 1-29, **2003**.
- [23] Pavlovic, M. and Balint, B., *Stem Cells and Tissue Engineering*, Springer Science & Business Media, **2012**.
- [24] Ducy, P., Schinke, T. and Karsenty, G., The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance, *Science*, 289, 1501-1504, **2000**.
- [25] Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. and Bieback, K., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells*, 24, 1294-1301, **2006**.
- [26] Xiao, G., Gopalakrishnan, R., Jiang, D., Reith, E., Benson, M. D. and Franceschi, R. T., Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells, *Journal of Bone and Mineral Research*, 17, 101-110, **2002**.
- [27] Mayr-Wohlfart, U., Fiedler, J., Günther, K. P., Puhl, W. and Kessler, S., Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitute materials, *Journal of Biomedical Materials Research*, 57, 132-139, **2001**.
- [28] Pang, W.-Y., Wang, X.-L., Wong, K.-C., Leung, P.-C., Yao, X.-S. and Wong, M.-S., Total flavonoid fraction of *Rhizoma Drynaria* improves bone properties in ovariectomized mice and exerts estrogen-like activities in rat osteoblast-like (UMR-106) cells, *Journal of Food and Drug Analysis*, 20, 265-269, **2012**.
- [29] Eliaz, N., *Degradation of implant materials*, Springer Science & Business Media, **2012**.
- [30] Cooper, L. F., Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 80, 439-449, **1998**.
- [31] Albrektsson, T. and Johansson, C., Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *European Spine Journal*, 10, S96-S101, **2001**.
- [32] Deporter, D., Watson, P., Pilliar, R., Howley, T. and Winslow, J., A histological evaluation of a functional endosseous, porous-surfaced, titanium alloy dental implant system in the dog, *Journal of Dental Research*, 67, 1190-1195, **1988**.

- [33] Branemark, P.-I., Osseointegration and its experimental background, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 50, 399-410, **1983**.
- [34] Brånemark, P. I., Engstrand, P., Öhrnell, L. O., Gröndahl, K., Nilsson, P., Hagberg, K., Darle, C. and Lekholm, U., Brånemark Novum: A new treatment concept for rehabilitation of the edentulous mandible. Preliminary results from a prospective clinical follow-up study, *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 1, 2-16, **1999**.
- [35] Ramazanoglu, M. and Oshida, Y., Osseointegration and bioscience of implant surfaces-current concepts at bone-implant interface, Intech Open Access Publisher, **2011**.
- [36] Eriksson, R. and Adell, R., Temperatures during drilling for the placement of implants using the osseointegration technique, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 44, 4-7, **1986**.
- [37] Darouiche, R. O., Treatment of infections associated with surgical implants, *New England Journal of Medicine*, 350, 1422-1429, **2004**.
- [38] Hinode, D., Tanabe, S. i., Yokoyama, M., Fujisawa, K., Yamauchi, E. and Miyamoto, Y., Influence of smoking on osseointegrated implant failure: a meta-analysis, *Clinical Oral Implants Research*, 17, 473-478, **2006**.
- [39] Meral, G. and Kan, B., Diabetes mellitus, osteoporozis ve radyoterapinin osseointegrasyon aşamaları üzerindeki etkileri, *Türkiye Klinikleri Dış Hekimliği Bilimleri Dergisi*, 16, 155, **2010**.
- [40] Van Steenberghe, D., Jacobs, R., Desnyder, M., Maffei, G. and Quirynen, M., The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage, *Clinical Oral Implants Research*, 13, 617-622, **2002**.
- [41] Palma-Carrió, C., Maestre-Ferrín, L., Peñarrocha-Oltra, D., Peñarrocha-Diago, M. A. and Peñarrocha-Diago, M., Risk factors associated with early failure of dental implants. A literature review, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16, e514-7, **2011**.
- [42] Esposito, M., Hirsch, J. M., Lekholm, U. and Thomsen, P., Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants,(II). Etiopathogenesis, *European Journal of Oral Sciences*, 106, 721-764, **1998**.
- [43] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. and Lemons, J. E., Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, Academic Press, **2004**.
- [44] Zhao, G., Raines, A., Wieland, M., Schwartz, Z. and Boyan, B., Requirement for both micron-and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography, *Biomaterials*, 28, 2821-2829, **2007**.
- [45] Gümüşderelioğlu, M., Biyomalzemeler, *Bilim ve Teknik Dergisi*, Tubitak, 50-62, **2002**.
- [46] Pasinli, A., Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler, *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4, 25-34, **2004**.
- [48] Oldani, C., Dominguez, A. and Eli, T., Titanium as a biomaterial for implants, Intech Open Access Publisher, **2012**.
- [49] Brunette, D. M., Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses, and medical applications, Springer Science & Business Media, **2001**.

- [50] Leyens, C. and Peters, M., Titanium and titanium alloys, Wiley Online Library, **2003**.
- [51] Ashrafizadeh, A. and Ashrafizadeh, F., Structural features and corrosion analysis of thermally oxidized titanium, *Journal of Alloys and Compounds*, 480, 849-852, **2009**.
- [52] Liu, X., Chu, P. K. and Ding, C., Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 47, 49-121, **2004**.
- [53] Niinomi, M., Hattori, T. and Niwa, S., Material characteristics and biocompatibility of low rigidity titanium alloys for biomedical applications, *Biomaterials in Orthopedics*, 2, 41-62, **2004**.
- [54] Nag, S., Banerjee, R. and Fraser, H., Microstructural evolution and strengthening mechanisms in Ti-Nb-Zr-Ta, Ti-Mo-Zr-Fe and Ti-15Mo biocompatible alloys, *Materials Science and Engineering: C*, 25, 357-362, **2005**.
- [55] Cremasco, A., Messias, A. D., Esposito, A. R., de Rezende Duek, E. A. and Caram, R., Effects of alloying elements on the cytotoxic response of titanium alloys, *Materials Science and Engineering: C*, 31, 833-839, **2011**.
- [56] Werner K H Geurtsen, Biocompatibility of dental casting alloys, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13, 71-84, **2002**.
- [57] Li, L.-H., Kong, Y.-M., Kim, H.-W., Kim, Y.-W., Kim, H.-E., Heo, S.-J. and Koak, J.-Y., Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation, *Biomaterials*, 25, 2867-2875, **2004**.
- [58] Majeed, A., He, J., Jiao, L., Zhong, X. and Sheng, Z., Surface properties and biocompatibility of nanostructured TiO<sub>2</sub> film deposited by RF magnetron sputtering, *Nanoscale Research Letters*, 10, 1-9, **2015**.
- [59] Wise, D. L., Encyclopedic Handbook of biomaterials and bioengineering application, CRC Press, 2, 855-1657, **1995**.
- [60] Ellingsen, J. E., Thomsen, P. and Lyngstadaas, S. P., Advances in dental implant materials and tissue regeneration, *Periodontology 2000*, 41, 136-156, **2006**.
- [61] Kulkarni, M., Mazare, A., Schmuki, P. and Iglič, A., Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications, *Nanomedicine*, 111, 111, **2014**.
- [62] Geçkili, O., Mumcu, E., Bural, C., Bilhan, H. and Bilgin, T., Dental implant yüzeylerinde osseointegrasyonun geliştirilmesi için yapılan modifikasyonlar:surface treatments of dental implant to improve osseointegration, *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 34, 60-69, **2010**.
- [63] Alla, R. K., Ginpalli, K., Upadhya, N., Shamma, M., Ravi, R. K. and Sekhar, R., Surface roughness of implants: a review, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 25, 112-118, **2011**.
- [64] Anil, S., Alghamdi, H., Jansen, J. and Anand, P., Dental implant surface enhancement and osseointegration, Intech Open Access Publisher, **2011**.
- [65] Khan, M., Donos, N., Salih, V. and Brett, P., The enhanced modulation of key bone matrix components by modified titanium implant surfaces, *Bone*, 50, 1-8, **2012**.

- [66] Kim, H., Miyaji, F., Kokubo, T. and Nakamura, T., Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8, 341-347, **1997**.
- [67] Been, J. and Grauman, J., Titanium and titanium alloys, *Uhlig's Corrosion Handbook*, 3, 861-878, **2011**.
- [68] Hanawa, T., In vivo metallic biomaterials and surface modification, *Materials Science and Engineering: A*, 267, 260-266, **1999**.
- [69] Kokubo, T. and Takadama, H., How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, 27, 2907-2915, **2006**.
- [70] Morra, M., Cassinelli, C., Cascardo, G., Cahalan, P., Cahalan, L., Fini, M. and Giardino, R., Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and *in vitro* and *in vivo* studies, *Biomaterials*, 24, 4639-4654, **2003**.
- [71] Gerçek, B. I., *Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli(kaprolakton) doku iskeleleri: sentez, karakterizasyon ve kemik doku mühendisliği uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Kimya mühendisliği, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [72] Duan, K. and Wang, R., Surface modifications of bone implants through wet chemistry, *Journal of Materials Chemistry*, 16, 2309-2321, **2006**.
- [73] Morra, M., Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins, *Eur Cell Mater*, 12, 1-15, **2006**.
- [74] Hildebrand, H., Blanchemain, N., Mayer, G., Chai, F., Lefebvre, M. and Boschin, F., Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices, *Surface and Coatings Technology*, 200, 6318-6324, **2006**.
- [75] Oshida, Y., *Bioscience and bioengineering of titanium materials*, Elsevier, 1, 11-419, **2010**.
- [76] Şirin, H. T., *Biyoaktif metalik implantların üretimi*, Doktora Tezi, Biyomühendislik, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [77] Rupp, F., Scheideler, L., Olshanska, N., De Wild, M., Wieland, M. and Geis-Gerstorfer, J., Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76, 323-334, **2006**.
- [78] Geetha, M., Singh, A., Asokamani, R. and Gogia, A., Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review, *Progress in Materials Science*, 54, 397-425, **2009**.
- [79] Raines, A. L., Olivares-Navarrete, R., Wieland, M., Cochran, D. L., Schwartz, Z. and Boyan, B. D., Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy, *Biomaterials*, 31, 4909-4917, **2010**.
- [80] Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D. and Boyan, B., High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 74, 49-58, **2005**.
- [81] Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P. and Amouriq, Y., Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dental Materials*, 23, 844-854, **2007**.

- [82] Schwarz, F., Wieland, M., Schwartz, Z., Zhao, G., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Schedle, A., Broggini, N., Bornstein, M. M. and Buser, D., Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 88, 544-557, **2009**.
- [83] Le Guehennec, L., Lopez-Heredia, M.-A., Enkel, B., Weiss, P., Amouriq, Y. and Layrolle, P., Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces, *Acta Biomaterialia*, 4, 535-543, **2008**.
- [84] Gittens, R. A., McLachlan, T., Olivares-Navarrete, R., Cai, Y., Berner, S., Tannenbaum, R., Schwartz, Z., Sandhage, K. H. and Boyan, B. D., The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation, *Biomaterials*, 32, 3395-3403, **2011**.
- [85] Albrektsson, T., Lundgren, A.-K. and Jan Gottlow, Y.-T. S., Experimental studies on oxidized implants. A histomorphometrical and biomechanical analysis, *Applied Osseointegration Research*, 1, 21-24, **2000**.
- [86] Diamanti, M. and Pedefferri, M., Effect of anodic oxidation parameters on the titanium oxides formation, *Corrosion Science*, 49, 939-948, **2007**.
- [87] Wang, L.-N. and Jin, M., Surface modification of metallic implants with anodic oxide nanotubular arrays via electrochemical anodization techniques, *Nanomedicine*, 1, 314-333, **2013**.
- [88] Das, K., Bose, S. and Bandyopadhyay, A., Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti, *Acta Biomaterialia*, 3, 573-585, **2007**.
- [89] Yao, C. and Webster, T. J., Anodization: a promising nano-modification technique of titanium implants for orthopedic applications, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2682-2692, **2006**.
- [90] Wang, L.-N., Jin, M., Zheng, Y., Guan, Y., Lu, X. and Luo, J.-L., Nanotubular surface modification of metallic implants via electrochemical anodization technique, *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4421, **2014**.
- [91] Oh, S., Daraio, C., Chen, L. H., Pisanic, T. R., Finones, R. R. and Jin, S., Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 78, 97-103, **2006**.
- [92] Çalışkan, N., Bayram, C., Erdal, E., Karahaliloğlu, Z. and Denkbaş, E. B., Titania nanotubes with adjustable dimensions for drug reservoir sites and enhanced cell adhesion, *Materials Science and Engineering: C*, 35, 100-105, **2014**.
- [93] Fojt, J., Moravec, H. and Joska, L., Nanostructuring of titanium for medical applications, *Proceedings of Nanocon*, 10, 209-213, **2010**.
- [94] Sul, Y.-T., Johansson, C. B., Jeong, Y. and Albrektsson, T., The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes, *Medical Engineering & Physics*, 23, 329-346, **2001**.
- [95] Kummer, K. M., Taylor, E. and Webster, T. J., Biological applications of anodized TiO<sub>2</sub> nanostructures: a review from orthopedic to stent applications, *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 4, 483-493, **2012**.

- [96] Özdemir, Y., *Termal Oksidasyon İşleminin Ticari Saflıktaki Ti ve Ti6Al4V Alaşımında Yüzey Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Makina Mühendisliği Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, **2012**.
- [97] Güleriyuz, H. and Çimenoglu, H., Oxidation of Ti–6Al–4V alloy, *Journal of Alloys and Compounds*, 472, 241-246, **2009**.
- [98] Güleriyüz, H. and Çimenoğlu, H., Effect of thermal oxidation on corrosion and corrosion–wear behaviour of a Ti–6Al–4V alloy, *Biomaterials*, 25, 3325-3333, **2004**.
- [99] Güleriyuz, H. and Çimenoglu, H., Surface modification of a Ti–6Al–4V alloy by thermal oxidation, *Surface and Coatings Technology*, 192, 164-170, **2005**.
- [100] Burns, K., Yao, C. and Webster, T. J., Increased chondrocyte adhesion on nanotubular anodized titanium, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88, 561-568, **2009**.
- [101] Nishiguchi, S., Nakamura, T., Kobayashi, M., Kim, H.-M., Miyaji, F. and Kokubo, T., The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium, *Biomaterials*, 20, 491-500, **1999**.
- [102] Ferna, E., Gil, F., Ginebra, M., Driessens, F., Planell, J. and Best, S., Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, 169-176, **1999**.
- [103] Evis, Z. and Kockan, U., Prediction of hexagonal lattice parameters of non-stoichiometric apatites by artificial neural networks, *minerals, Metals and Materials Society/AIME, 420 Commonwealth Dr., P. O. Box 430 Warrendale PA 15086 United States.[np]. Feb*, **2011**.
- [104] Demirtaş, T. T., Kaynak, G. and Gümüşderelioğlu, M., Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation, *Materials Science and Engineering: C*, 49, 713-719, **2015**.
- [105] Aday, S. and Gümüşderelioğlu, M., Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: characterization and osteoblastic activity, *Polymer Composites*, 31, 1418-1426, **2010**.
- [106] Mavis, B., Demirtaş, T. T., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G. and Çolak, Ü., Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 5, 3098-3111, **2009**.
- [107] Kokubo, T., Takadama, H., How useful is SBF in predicting in vivo bone activity? , *Biomaterials*, 30, 2175-2179, **2009**.
- [108] Kumar, R. R. and Wang, M., Functionally graded bioactive coatings of hydroxyapatite/titanium oxide composite system, *Materials Letters*, 55, 133-137, **2002**.
- [109] Kodama, A., Bauer, S., Komatsu, A., Asoh, H., Ono, S. and Schmuki, P., Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO<sub>2</sub> nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia*, 5, 2322-2330, **2009**.
- [110] Del Valle, E. M., Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046, **2004**.

- [111] Szejtli, J., Cyclodextrin technology, Springer Science & Business Media, 1, 1-435, **2013**.
- [112] Bender, M. L. and Komiyama, M., Cyclodextrin chemistry, Springer Science & Business Media, 1, 1-91, **2012**.
- [113] Vyas, A., Saraf, S. and Saraf, S., Cyclodextrin based novel drug delivery systems, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 62, 23-42, **2008**.
- [114] Harada, A., Takashima, Y. and Yamaguchi, H., Cyclodextrin-based supramolecular polymers, *Chemical Society Reviews*, 38, 875-882, **2009**.
- [115] JS, P., Kadam, D., Marapur, S. and Kamalapur, M., Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: a review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2, 29-34, **2010**.
- [116] Loftsson, T. and Duchene, D., Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 329, 1-11, **2007**.
- [117] Başbağ, A. B., Gümüşderelioğlu, M., Şimşek, M. and Güner, A., Poly (HEMA)/cyclodextrin-based hydrogels for subconjunctival delivery of cyclosporin A, *Journal of Applied Polymer Science*, 12, 131, **2014**.
- [118] Connors, K. A., The stability of cyclodextrin complexes in solution, *Chemical Reviews*, 97, 1325-1358, **1997**.
- [119] Zhang, J. and Ma, P. X., Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 1215-1233, **2013**.
- [120] Uekama, K., Hirayama, F. and Irie, T., Cyclodextrin drug carrier systems, *Chemical Reviews*, 98, 2045-2076, **1998**.
- [121] Aleem, O., Kuchekar, B., Pore, Y. and Late, S., Effect of  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 535-540, **2008**.
- [122] Pola, M., Algarra, M., Becerra, A. and Hernandez\*, M., Cyclodextrin enhanced spectrofluorimetric determination of melatonin in pharmaceuticals and urine, *Analytical Letters*, 33, 891-903, **2000**.
- [123] Liu, L., Xu, Y. and Reiter, R. J., Melatonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63, *Bone*, 55, 432-438, **2013**.
- [124] Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M. and Maestroni, G. J., Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells, *Journal of Pineal Research*, 28, 193-202, **2000**.
- [125] Roth, J. A., Kim, B.-G., Lin, W.-L. and Cho, M.-I., Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 22041-22047, **1999**.
- [126] Srinivasan, V., Spence, W. D., Pandi-Perumal, S. R., Zakharia, R., Bhatnagar, K. P. and Brzezinski, A., Melatonin and human reproduction: shedding light on the darkness hormone, *Gynecological Endocrinology*, 25, 779-785, **2009**.

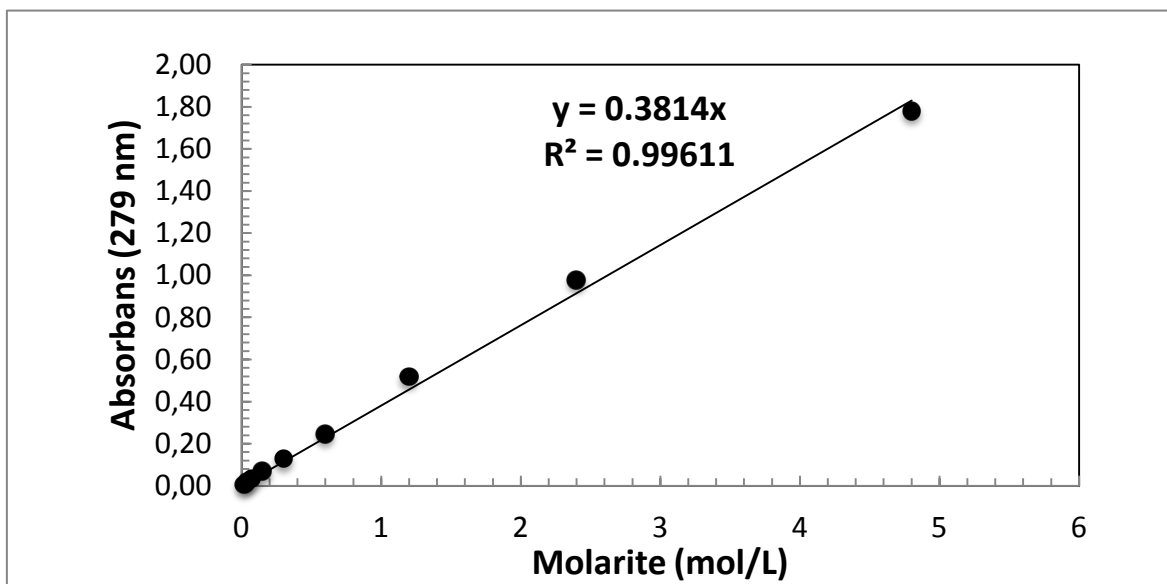
- [127] Ravichandran, R., Ng, C. C., Liao, S., Pliszka, D., Raghunath, M., Ramakrishna, S. and Chan, C. K., Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning, *Biomedical Materials*, 7, 015001, **2012**.
- [128] Roguska, A., Pisarek, M., Andrzejczuk, M., Dolata, M., Lewandowska, M. and Janik-Czachor, M., Characterization of a calcium phosphate–TiO<sub>2</sub> nanotube composite layer for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C*, 31, 906-914, **2011**.
- [129] Bayram, C., Demirbilek, M., Yalçın, E., Bozkurt, M., Doğan, M. and Denkbaş, E. B., Osteoblast response on co-modified titanium surfaces via anodization and electrospinning, *Applied Surface Science*, 288, 143-148, **2014**.
- [130] Leprêtre, S., Chai, F., Hornez, J.-C., Vermet, G., Neut, C., Descamps, M., Hildebrand, H. F. and Martel, B., Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers, *Biomaterials*, 30, 6086-6093, **2009**.
- [131] Topal, B., *Kemik Doku Mühendisliğinde Melatonin-βCD İnküzyon Komplekslerinin Etkinliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [132] Deligianni, D. D., Katsala, N., Ladas, S., Sotiropoulou, D., Amedee, J. and Missirlis, Y., Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti–6Al–4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials*, 22, 1241-1251, **2001**.
- [133] Mendez-Vilas, A., Donoso, M., González-Carrasco, J. L. and Gonzalez-Martin, M., Looking at the micro-topography of polished and blasted Ti-based biomaterials using atomic force microscopy and contact angle goniometry, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52, 157-166, **2006**.
- [134] Derya Kalelioğlu, M. G., *Kemik doku implant malzemeleri: osseointegrasyon ve antibakteriyel etkinlik*, Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [135] Özkan, A., *Plazma polimerizasyon tekniği ile farklı yüzey kararlılığı oluşturulan tip 4 titanyum implantmateryaline 2 farklı yüzey enerjisine sahip oral streptokokların in vitro adezyonunun incelenmesi*, Doktora Tezi, Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [136] Pegueroles, M., Gil, F., Planell, J. and Aparicio, C., The influence of blasting and sterilization on static and time-related wettability and surface-energy properties of titanium surfaces, *Surface and Coatings Technology*, 202, 3470-3479, **2008**.
- [137] Pattanayak, D. K., Kawai, T., Matsushita, T., Takadama, H., Nakamura, T. and Kokubo, T., Effect of HCl concentrations on apatite-forming ability of NaOH–HCl- and heat-treated titanium metal, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 2401-2411, **2009**.
- [138] Fujibayashi, S., Nakamura, T., Nishiguchi, S., Tamura, J., Uchida, M., Kim, H. M. and Kokubo, T., Bioactive titanium: Effect of sodium removal on the bone-bonding ability of bioactive titanium prepared by alkali and heat treatment, *Journal of Biomedical Materials Research*, 56, 562-570, **2001**.



- [139] Ghosh, R., Paul, G. and Basak, D., Effect of thermal annealing treatment on structural, electrical and optical properties of transparent sol-gel ZnO thin films, *Materials Research Bulletin*, 40, 1905-1914, **2005**.
- [140] Forsgren, J., Svahn, F., Jarmar, T. and Engqvist, H., Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates, *Acta Biomaterialia*, 3, 980-984, **2007**.
- [141] Larsson, C., Thomsen, P., Aronsson, B.-O., Rodahl, M., Lausmaa, J., Kasemo, B. and Ericson, L., 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**.
- [142] Wu, J. M., Hayakawa, S., Tsuru, K. and Osaka, A., Low-temperature preparation of anatase and rutile layers on titanium substrates and their ability to induce *in vitro* apatite deposition, *Journal of the American Ceramic Society*, 87, 1635-1642, **2004**.
- [143] Mittal, K. L., Adhesion measurement of films and coatings, *VSP*, 1, 1-435, **1995**.
- [144] Thi, T. H., Chai, F., Leprêtre, S., Blanchemain, N., Martel, B., Siepmann, F., Hildebrand, H., Siepmann, J. and Flament, M., Bone implants modified with cyclodextrin: study of drug release in bulk fluid and into agarose gel, *International Journal of Pharmaceutics*, 400, 74-85, **2010**.
- [145] Blanchemain, N., Laurent, T., Chai, F., Neut, C., Haulon, S., Krump-konvalinkova, V., Morcellet, M., Martel, B., Kirkpatrick, C. J. and Hildebrand, H. F., Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: cytotoxicity and microbiological evaluation, *Acta Biomaterialia*, 4, 1725-1733, **2008**.
- [146] Martel, B., Ruffin, D., Weltrowski, M., Lekchiri, Y. and Morcellet, M., Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly (carboxylic acid) s: A study of the preparation parameters, *Journal of Applied Polymer Science*, 97, 433-442, **2005**.
- [147] Wu, W., Wu, J. and Bodor, N., Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the solubility, stability, and pharmacological activity of the chemical delivery system of TRH analogs, *Die Pharmazie*, 57, 130-134, **2002**.
- [148] Sobocinski, J., Laure, W., Taha, M., Courcot, E., Chai, F., Simon, N., Addad, A., Martel, B., Haulon, S. and Woisel, P., Mussel inspired coating of a biocompatible cyclodextrin based polymer onto cocr vascular stents, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 3575-3586, **2014**.
- [149] Perez Anes, A., Gargouri, M., Laure, W., Van Den Berghe, H., Courcot, E., Sobocinski, J., Tabary, N., Chai, F., Blach, J.-F. and Addad, A., Bio-inspired titanium drug eluting platforms based on poly- $\beta$ -cyclodextrin/chitosan layer-by-layer self assembly targeting infections, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2015**.
- [150] Taha, M., Chai, F., Blanchemain, N., Goube, M., Martel, B. and Hildebrand, H., Validating the poly-cyclodextrins based local drug delivery system on plasma-sprayed hydroxyapatite coated orthopedic implant with toluidine blue O, *Materials Science and Engineering: C*, 33, 2639-2647, **2013**.
- [151] Liu, J., Ye, X., Wang, H., Zhu, M., Wang, B. and Yan, H., The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method, *Ceramics International*, 29, 629-633, **2003**.

- [152] Zhang, P. and Ryan, J. A., Transformation of Pb (II) from cerrusite to chloropyromorphite in the presence of hydroxyapatite under varying conditions of pH, *Environmental Science & Technology*, 33, 625-630, **1999**.
- [153] Bongiorno, D., Ceraulo, L., Mele, A., Panzeri, W., Selva, A. and Liveri, V. T., Structural and physicochemical characterization of the inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with melatonin, *Carbohydrate Research*, 337, 743-754, **2002**.
- [154] Babu, R. J., Dayal, P. and Singh, M., Effect of cyclodextrins on the complexation and nasal permeation of melatonin, *Drug Delivery*, 15, 381-388, **2008**.
- [155] Knabe, C., Klar, F., Fitzner, R., Radlanski, R. and Gross, U., *In vitro* investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surfaces using a rat bone marrow stromal cell culture system, *Biomaterials*, 23, 3235-3245, **2002**.
- [156] Vercaigne, S., Wolke, J. G., Naert, I. and Jansen, J. A., Bone healing capacity of titanium plasma-sprayed and hydroxylapatite-coated oral implants, *Clinical Oral Implants Research*, 9, 261-271, **1998**.
- [157] George, P. A., Donose, B. C. and Cooper-White, J. J., Self-assembling polystyrene-block-poly (ethylene oxide) copolymer surface coatings: Resistance to protein and cell adhesion, *Biomaterials*, 30, 2449-2456, **2009**.
- [158] Yavuz, M. N., Aydin Yavuz, A., Ulku, C., Sener, M., Yaris, E., Kosucu, P. and Karslioglu, I., Protective effect of melatonin against fractionated irradiation-induced epiphyseal injury in a weanling rat model, *Journal of Pineal Research*, 35, 288-294, **2003**.

**EK-1**



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Meryem Sümeyye AKDEMİR

Doğum Yeri : Çanakkale

Medeni Hali : Bekar

E-Posta : meryemsumeyye@hacettepe.edu.tr

Adres : Ahi Mesut cad., Alize konutları., No:71/40, Elvankent/ANKARA

### Eğitim

Lise : Pendik Anadolu Lisesi (2008)

Lisans : Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Kimya  
Bölümü (2012)

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Fakültesi, Kimya  
Öğretmenliği Bölümü (2012)

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana  
Bilim Dalı (2015)

Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı

(-)

Doktora : (-)

Yabancı Dil ve Düzeyi İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç)

## **İş Deneyimi (-)**

### **Deneyim Alanları (-)**

#### **Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi**

- Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje Kodu: FHD-2015-7226, Hidroksiapatit ile Desteklenmiş Hidroksipropil-beta-siklodekstrin Kompozit Taşıyıcıların Geliştirilmesi ve Osseointegrasyon Etkinliğinin Araştırılması – 20,227 TL.

#### **Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)**

#### **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

- **Akdemir, M.S.**, Gerçek Beşkardeş, I., Gümüşderelioğlu, M., Development of hydroxyapatite/cyclodextrin composite carriers to enhance osseointegration, 4<sup>th</sup> International Conference on Tissue Science and Regenerative Medicine, 27-29 Temmuz 2015, Roma, (Poster sunumu).