



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TİTANYUM NİYOBYUM VE ZİRKONYUM
KATKILI 316L PASLANMAZ ÇELİKLERİN
***in vitro* BİYOUYUMLARININ**
ARAŞTIRILMASI

BÜŞRA ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç.Dr. Nagihan Gülsoy

İSTANBUL, 2015

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesinin yanısıra, yüksek lisans sürecim boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, bana hem hocalık hem ablalık yapan çok değerli danışmanım Sn. Doç.Dr. Nagihan Gülsoy’a şükranlarımı sunarım.

Tezimi planlamamda ve gerçekleştirmemde değerli fikirlerinden yararlandığım, tezimin tüm aşamalarında her zaman yanımda olan, çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için bana haftasonu bile yardım eden Sn. Arş. Gör. Özal Mutlu’ya ve çalışmalarımın istatistik aşamasında benden yardımını esirgemeyen ablam gibi sevdiğim Merve Doğruel Anuşlu’ya ayrıca arkadaşım Demet Yılmaz’a teşekkürü bir borç bilirim.

Sahip olduğum herşey için hergün teşekkür etmeme sebep babam Ömer Gündede ve annem Halime Gündede’ye hayattaki en değerli varlıklarım kardeşlerim Şeyda Gündede, Şule Gündede ve Berra Gündede’ye teşekkür ederim.

Son olarak en zor zamanlarımda yanımdan hiç ayrılmayan her zaman beni destekleyen ve yüreklendiren, tez çalışmam için elinden gelen maddi manevi her yardımı yapan beni anlayışla karşılayan sevgili eşim Burak Öztürk’e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FEN-C-YLP-120514-0160) tarafından desteklenmiştir.

Haziran, 2015

Büşra (GÜNDEDE) ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	x
BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Genel Bilgiler	6
1.1.1. Biyomalzeme-paslanmaz çelik(316L)	6
1.2.Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi ve Kullanılan Yöntemler	9
1.2.1. Hücre kültürü	14
1.2.2. Fibroblast hücrelerinin genel özellikleri	15
1.2.3. Hücre kültürü ortamı ve biyouyumluluk analiz yöntemleri	17
1.2.3.1.Sitotoksikite testleri	18
1.2.3.2.Hücre adezyonu ve morfolojilerinin belirlenmesi	23
1.2.3.3.İyon salınımının değerlendirilmesi	24
1.2.3.4.Simüle vücut sıvısı ile hidroksiapatit oluşumunun değerlendirilmesi	26
BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM	29
2.1. 316L Osenitik Tıp Paslanmaz Çelik	29
2.2.3T3 Fare Fibroblast Hücre Kültürü	32
2.3. Hücre kültürü Besiyeri Hazırlanması	32
2.4. Hücre Hattının Pasajlanması	33
2.5. Biyolojik ve Kimyasal Testler	36
2.5.1.Tripan mavisi ile canlı hücrelerin sayımı	36
2.5.2.MTT testi	38
2.5.3.ROS yöntemi	40
2.5.4.SEM yöntemi	41
2.5.5. ICP-MS yöntemi	43
2.5.6.SBF testi	44

2.5.7. İstatistiksel değerlendirme.....	45
BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	46
3.1.Ti, Nb ve Zr Katkılı 316L Paslanmaz Çelik ile 3T3 Fibroblast Etkileşimlerinin Faz-Kontrast Mikroskobu ile Görüntülenmesi.....	47
3.2. Sitotoksosite Belirlenmesi.....	49
3.2.1. Tripan mavisi yöntemi.....	49
3.2.2. MTT Testi.....	51
3.2.3. ROS Testi.....	54
3.3. SEM İle Biyomalzeme-Fibroblast İlişkisinin Belirlenmesi.....	55
3.4. ICP-MS ile İyon Salınımlarının Belirlenmesi.....	57
3.5. SBF Testi İle Apatit Oluşumlarının Değerlendirilmesi.....	59
BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME.....	62
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ÖZET

Biyomedikal uygulamalarda kullanmak amacıyla uzun yıllardır yapılan materyal araştırmaları ile metallerin ve alaşımlarının geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu metallerden olan 316L ve 316L alaşımlarının gerek korozyon dayanımları gerekse mekanik özelliklerinden dolayı biyouygulamalarda yaygın kullanım alanları bulunmaktadır. 316L alaşımlarının geliştirilebilmesi için biyomalzeme araştırmaları yapılmaktadır ve bu araştırmaların en önemli noktası üretilen yeni biyomalzemelerin biyoyumluluğunun arttırılmasıdır. Biyomalzeme araştırmaları için malzeme yüzeyinin işlevselliği, malzemenin içeriği ve korozyon dayanımı oldukça önemli noktalardır. Fakat malzeme özellikleri ve uygulanacağı biyolojik sistem arasındaki korelasyon çok karmaşıktır. İşte bu amaç doğrultusunda biyomalzemelerin uyumunu belirlemek için sitotoksisite testleri yapılmaktadır. Bu alışmada 316L senitik tip paslanmaz çeliğe titanyum (Ti), niyobyum(Nb) ve zirkonyum (Zr) katkıları yapılarak *in vitro* biyoyumlulukları değerlendirildi. Bu amaçla hazırlanan örneklerin biyoyumluluğunu değerlendirmek için Tripan Mavisi, MTT, ROS, SEM, ICP-MS ve SBF testleri yapıldı. 3T3 fibroblast hücre hattı kullanıldı ve 25T kültür kaplarına 1×10^5 hücre yoğunluğunda ekildi. Tripan mavisi testi sonuçları; 316L, 316L-Ti, 316L-Nb and 316L-Zr biyomalzemeleri için sırasıyla 96%, 92%, 95%, 90%, ve MTT testi için sonuçlar 100%, 108%, 103%, 107% olarak tespit edildi. ROS analizinde tüm test grupları birbirlerine çok yakın bulundu. Biyomalzemelerin yüzeyinde ki 3T3 fibroblast hücreleri SEM ile görüntülendi ve morfolojilerinin değişmediği görüldü. SBF testinde hidroksiapatit oluşumunun 316L ile benzer olduğu görüldü. Sonuç olarak yapılan katkılar 316L alaşımlarının biyoyumluluğunu arttırıcı yönde etki gösterdiği ve biyomedikal uygulamalar için uygun hale getirmiştir.

Haziran, 2015

Büşra ÖZTÜRK

ABSTRACT

EFFECT OF TITANIUM, NIOBIUM AND ZIRCONIUM ADDITIVES ON BIOCOMPATIBILITY OF 316L STAINLESS STEEL FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Over the years material research for to be used in biomedical application has been aimed to develop numerous metals and alloys. From these metals, 316L and 316L alloys are being widely used for their mechanical and corrosion resistance properties in biomedical applications. Biomaterial researches are being done to develop 316L alloys, and the most striking point is to improve the biocompatibility of these new materials. For the biomaterials research the functionality of materials surface, content, and corrosion resistance are the most important issues. But the correlation between the material properties and the biological systems are quite complex. For this purpose cytotoxicity tests are being done to determine the compatibility of biomaterials. In this study the effect of titanium (Ti), niobium (Nb), and zirconium (Zr) additives on injection molded austenitic grade 316L stainless steels were determined for their in vitro biocompatibilities. Trypan Blue, MTT, ROS, SEM, ICP-MS and SBF were performed to evaluate the potential biocompatibilities of the specimens. In the cell culture tests, the 3T3 mouse embryo fibroblast cell line was used and the cells were seeded at the density of 1×10^5 cell line in 25T flasks. Trypan Blue exclusion assay results were 96%, 92%, 95%, 90%, 91% and MTT results were found to be 100%, 108%, 103%, 107%, 316L, 316L-Ti, 316L-Nb and 316L-Zr, respectively. The results of ROS analysis indicated that the all test groups were nearly same as control group. SEM images demonstrated that of 3T3 cells attached on biomaterials and did not show any morphological changes. In SBF test hydroxyapatite formation were similar to 316L. As a result the additives on 316L improved the biocompatibilities of the alloys and allow them suitable for biomedical applications.

June, 2015

Büşra ÖZTÜRK

SEMBOLLER

Ti : Titanyum

Nb : Niyobyum

Zr : Zirkonyum

316L : Osenitik Tip Paslanmaz Çelik

M : Molar

% : Yüzde

°C : Santigrat derece

ml : Mililitre

µl : Mikrolite

cm : Santimetre

HCl : Hidroklorik asit

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

nm : Nanometre

MPa : Mega paskal

rpm : Devir sayısı

Ni : Nikel

Cr : Krom

Cu : Bakır

Fe : Demir

m/z : Kütle/yük

p : Anlamlılık seviyesi

kmol/m³ : kilomol/metreküp

mg : miligram

KISALTMALAR

3T3	: Fare Fibroblast Hücre Hattı
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
MTT	:(3 (4,5 Dimethylthiazol-2-yl) 2,5 Diphenyltetrazolium Bromide)
SEM	:Taramalı elektron mikroskobu
SBF	:Simüle vücut sıvısı
ICP-MS	: İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrofotometresi
EDTA	:Ethylenediaminetetraacetic acid
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
cDMEM	: Serum ve antibiyotik içeren sıvı besiyeri
DMEM	:Sıvı besiyeri
FBS	:Serum
HMDS	:Heksametildisilazan
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DCFH-DA	: 2'7' Dichlorofluorescein diacetate
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO₃	:Sodyum bikarbonat
KCl	:Potasyum klorür
K₂HPO₄ • 3H₂O	: Dipotasyum hidrjen fosfat
MgCl₂ • 6H₂O	:Magnezyum klorid heksahidrat
CaCl₂	:Kalsiyum klorid
Na₂SO₄	:Sodyum sülfat
(CH₂OH)₃CNH₂	:Tris (hidroksimetil) amminometan
AA	: Amilasetat

ŞEKİLLER

SAYFA

Şekil 1.1: Biyomalzemelerin kaynaklarına göre sınıflandırılması.....	4
Şekil 1.2: Kullanılan katkı elementlerinin periyodik cetveldeki yeri.....	8
Şekil 1.3: Biyomalzemelerin kullanıldığı bölgeler.....	10
Şekil 1.4: Piramit test protokolleri.....	11
Şekil 1.5: Biyouyumluluk belirlenmesinde en sık kullanılan test yöntemleri.....	13
Şekil 1.6: 3T3 Fibroblast Hücre Hattı a) 3.gün, b)5.gün, c)7.gün.....	16
Şekil 1.7: Tripan mavisi testi uygulama aşamaları.....	19
Şekil 1.8: MTT testinin temel prensibi.....	20
Şekil 1.9: Reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ve hücre zarından geçiş.....	23
Şekil1.10: SEM’de 3T3 hücrelerinin, kolajen yüzeyler ile etkileşimlerinin görüntülenmesi.....	24
Şekil 1.11: SBF sıvısı içinde tutulan bir metalde hidroksiapatit oluşumunun şematize edilmesi.....	27
Şekil 2.1: Tez çalışmasında izlenecek çalışma programı.....	29
Şekil 2.2: Kullanılan biyomalzemerin genel görünümü.....	31
Şekil 2.3:Kültür medyumunun hazırlanması.....	33
Şekil 2.4: Hücre hattının pasajlanma aşamaları.....	35
Şekil 2.5:Tripan mavisi test aşamaları.....	38
Şekil 2.6: MTTyönteminin uygulama aşamalar.....	39
Şekil 2.7: SEM tekniğinin uygulanma aşamaları.....	43
Şekil 3.1: 3T3 fibroblast hücre serisinin farklı biyomalzemeler ile etkileşimlerinin, faz kontrast mikroskopu mikrografları.....	48
Şekil 3.2: 96 saat sonunda kontrol ve uygulama gruplarındaki tripan mavisi ile tespit edilen hücre sayıları.....	49
Şekil 3.3: Tripan mavisi testi hücre canlılığı yüzde sonuçlarının grafik ile gösterimi....	50

Şekil 3.4: 570nm dalga boyunda 96 saat sonunda ölçülen MTT absorbans değerleri...	52
Şekil 3.5: 96 saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı sonuçları.....	52
Şekil 3.6: ROS analizi sonucu cansız hücrelerin floresan ışıma yapması.....	55
Şekil 3.7: Çeşitli katkılar yapılmış 316L ile 3T3 fibroblast hücrelerinin etkileşimlerini gösteren SEM mikrografları.....	56
Şekil 3.8: Sinterlenmiş 316L ve katkılı 316L örneklerinin 3 ve 30 günlük SBF uygulaması sonrası yüzey morfolojilerinin SEM mikrografları.....	61

TABLÖLER**SAYFA**

Tablo 1.1: 316 ve 316L paslanmaz çeliklerin kimyasal bileşenleri.....	7
Tablo 1.2: Biyomalzeme araştırmalarında yaygın olarak kullanılan hücre serileri.....	15
Tablo 1.3: SBF ile Kan plazmasında bulunan iyonların karşılaştırılması.....	26
Tablo 2.1: 316L, Ti, Nb ve Zr tozlarının, toz karakteristiği.....	30
Tablo 2.2: 316L paslanmaz çeliğin ve kullanılan biyomalzemelerin kimyasal bileşenleri.....	31
Tablo 2.3: Tripan mavisi yönteminde kullanılan gereçler.....	36
Tablo 2.4: MTT testi için gerekli kimyasal ve cihazlar.....	38
Tablo 2.5: ROS için gerekli kimyasallar ve cihazlar.....	40
Tablo 2.6: SEM için gerekli kimyasallar ve cihazlar.....	42
Tablo 2.7: SBF hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	45
Tablo 3.1: ICP-MS bulguları.....	57

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da yapay malzemeler olup, sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut sıvılarıyla(örneğin kan) temas etmektedirler [1,2]. Bu nedenle biyomalzemelerin canlı dokularla etkileşimi büyük bir önem arz etmektedir. Günümüzde büyük ilerlemelerin kaydedildiği bilim dallarından olan “biyomalzeme bilimi”nde, biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilecek yeni malzemelerin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır.

Bilimsel anlamda yeni bir alan olmasına karşın, uygulama açısından biyomalzeme kullanımı tarihin çok eski zamanlarına kadar uzanmaktadır. Mısır mumyalarında bulunan yapay göz, burun ve dişler bunun en güzel kanıtlarını oluşturmaktadır. Altının diş hekimliğinde kullanımı, 2000 yıl öncesine kadar uzanmaktadır. Bronz ve bakır kemik implantlarının kullanımı, milattan önceye dayanmaktadır. Bakır iyonunun vücudu zehirleyici etkisine karşın 19.yüzyıl ortalarına kadar daha uygun malzeme bulunamadığından bu implantların kullanımına devam edilmiştir. 19.yüzyılın son yıllarından itibaren yabancı malzemelerin vücut içerisinde kullanımına yönelik ciddi ilerlemeler kaydedilmiş, örneğin 1880’de fildişi protezler vücuda yerleştirilmiştir. İlk metal protez olan, vitallyum alaşımından 1938’de üretilmiş ve 1960’lara kadar kullanılmış olan bu protezler,korozyona uğradığından ciddi tehlikeler yaratmıştır. 1972’de alumina ve zirkonya isimli iki seramik yapı herhangi bir biyolojik olumsuzluk yaratmaksızın kullanılmaya başlanmış, ancak inert yapıdaki bu seramikler dokuya bağlanamadıklarından çok çabuk zayıflamışlardır. Aynı yıllarda Hench tarafından geliştirilen ve geliştirmeye devam eden biyoaktif seramikler (biyocam ve hidroksiapatit) ile bu problem çözülmüş bulunmaktadır. Buna ek olarak yine Hench ve arkadaşları yaptıkları araştırmalarda biyoaktif camların osteoporoz hastalarında bazı genleri tetiklediğini ve iyileştirici etkide bulunduğunubildirmişlerdir [1-6].

İlk başarılı sentetik implantlar,iskeletteki kırıkların tedavisinde kullanılan kemik plakalarıdır. Bunu 1950’lerde kan damarlarının değişimi ve yapay kalp kapakçıklarının geliştirilmesi, 1960’larda da kalça protezleri izlemiştir. Yapay kalp kapakçıkları ile ilgili yapılan çalışmalarda TiO_2/TiN (titanium dioksit/titanium nikel alaşımı) alaşımından

oluşan biyomalzeme kullanılmış ve kalpte TiO_2 'in kana uyumluluğu TiN 'in mekanik özellikleri arttırdığı gözlemlenmiştir [7]. Kalp ile ilgili malzemelerde esnek yapılı sentetik bir polimer olan poliüretan kullanılırken kalça protezlerinde ve kalp stentlerinde paslanmaz çelik öne geçmiştir. Bunun yanı sıra ilk olarak 1937'de diş hekimliğinde kullanılmaya başlanan polimetilmetakrilat (diş akriliği) ve yüksek molekül ağırlıklı polietilen de kalça protezi olarak kullanılmıştır. II. Dünya Savaşından sonra paraşüt bezinden (Vinyon N poliamid) damar protezlerinde yararlanılmıştır. 1970'lerde ilk sentetik bozunur yapıdaki ameliyat ipliği poliglaktik asit'den üretilmiştir. Son 30 yılda 40'ı aşkın metal, seramik ve polimer vücudun 40'dan fazla değişik parçasının onarımı ve yenilenmesi için kullanılmıştır [1,2,8,9].

Biyomalzemeler yalnızca implant olarak değil vücut dışına yerleştirilen ama vücutla etkileşim halindeki cihazlar gibi çeşitli eczacılık ürünlerinde ve teşhis kitlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde yüzlerce firma tarafından çok sayıda biyomalzeme üretilmekte ve 2700'den fazla çeşitte tıbbi cihaz, 2500 kadar farklı teşhis ürünü ve yaklaşık 39000 civarında değişik eczacılık ürünü ile bu teknolojinin en büyük pazarını oluşturmaktadır [1].

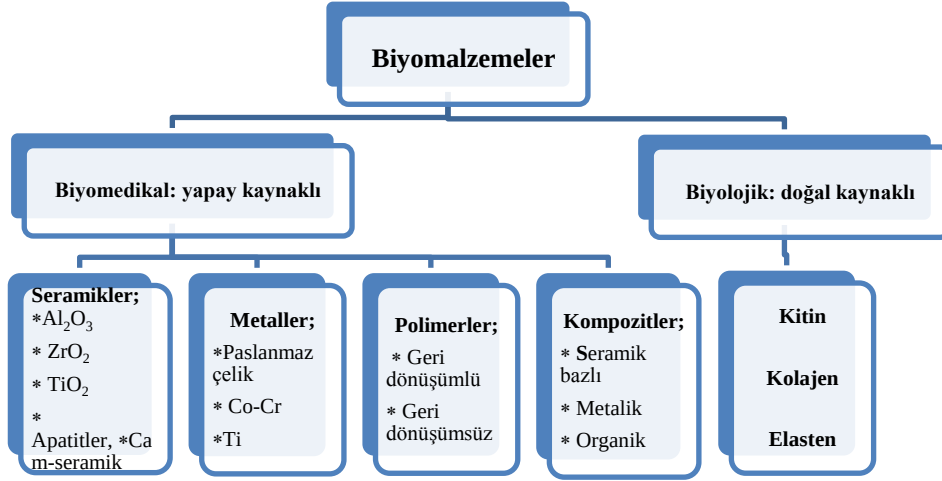
Tüm biyomalzemeler yerini aldıkları dokunun mekanik özellikleri ile doku üzerindeki malzemelerin biyokimyasal etkileri arasındaki dengeyi kurmak için kullanılırlar. Bununla beraber çoğu biyolojik sistemlerde biyomalzemeler için geniş bir özellik aralığı gereklidir; biyolojik aktivite, mekanik mukavemet ve kimyasal kararlılık bunlardan en önemlileridir. Korozyon dayanımı ve mekanik özellikleri iyi olan biyomalzemeler, bir yandan ortopedik uygulamalarda eklem protezi ve kemik yenileme malzemesi olarak kullanılırken diğer yandan yüz ve çene cerrahisi ile yapay kalp-damar cerrahisinde yapay kalp parçaları, katater, kalp kapakçığı olarak da kullanılmaktadırlar. Ayrıca biyomalzemeler omurga ve dişte kırık bölgelerin implantlarla değiştirilerek veya kırık bölgenin tabaka ve vidalar kullanılarak birleştirilip daha hızlı iyileşmesine yardımcı olurlar. Tüm bunlara ilaveten biyomalzemeler damar kaplama, sonda ve ortodontik kılavuz teli ayrıca kulak salyangozu implantlarının yapımında da kullanılırlar [1, 2].

İnsanlarda kullanılmak için çeşitli biyomalzemeler geliştirilmektedir, bunların içerisinde özellikle metal alaşımlarının, kristal yapıları, sahip oldukları güçlü metalik

bağları nedeniyle üstün mekanik özellikleri taşımalarından dolayı biyomalzeme alanındaki payı oldukça büyüktür. İlk geliştirilen metal alaşımı olan paslanmaz çelikler kırık kemiklerin tedavisinde vida ve plaka olarak kullanılmıştır. Biyomalzeme üretiminde kullanılan demir(Fe), bakır(Cu), krom(Cr), kobalt(Co), nikel(Ni), titanyum(Ti), tantalum (Ta), molibden (Mo) ve vanadyum(V) gibi çok sayıda metal ise az miktarda kullanılmak koşuluyla canlı vücuduna uygunluk göstermektedirler[11].

Metalik biyomalzemeler kas-iskelet sistemimizin mekanik koşullarına en iyi uyum gösteren malzemelerin başında gelmektedirler. Metallerin biyolojik ortama uygunluğu vücut içerisinde gösterdikleri korozyon direnci ile ilgilidir. Korozyon, metallerin çevreleriyle istenmeyen bir kimyasal reaksiyona girerek oksijen, hidroksit ve diğer başka bileşikler oluşturarak bozunması yani aşınmasıdır. İnsan vücudundaki akışkan sıvı, çözülmüş oksijen, klorür ve hidroksit gibi çeşitli iyonlar içermektedir. Bu nedenle insan vücudu biyomalzeme olarak kullanılan metaller için oldukça koroziv bir ortamdır. Malzeme korozyon sonucunda zayıflamakta daha da önemlisi korozyon ürünleri doku içerisine girerek hücrelere zarar verebilmektedir [1,2,12,16]. Bunun yanı sıra metalik biyomalzemeler, belirli sınırlarda, ağır, uzun süreli, değişken ve ani yüklemelere karşı özelliklerini kaybetmeden dayanabilmektedirler[2,13].

Biyouyumluluğu yüksek olan malzemelerin başında gelen metaller haricinde seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler de biyomalzeme olarak gruplandırılmaktadır (Şekil 1.1). Alüminyum oksit, biyoaktif cam, karbon ve hidroksiapatit (HA) biyoyumlu seramik malzemelere örnek olarak verilebilir. Biyomalzeme olarak kullanılan metaller ve alaşımlar ise, altın, tantal, paslanmaz çelik ve titanyum alaşımlarıdır. Bunların yanı sıra polimerler de, tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Her malzemenin kendine özgü uygulama alanı mevcuttur. Polimerler, çok değişik bileşimlerde ve şekillerde (lif, film, jel, boncuk, nanopartikül) hazırlanabilmeleri nedeniyle biyomalzeme olarak geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Ne var ki, bazı uygulamalar için örneğin, ortopedik uygulamalarda-mekanik dayanımları zayıftır. Ayrıca, sıvıları yapısına alarak şişebilmekte ya da istenmeyen zehirli ürünler (monomerler, antioksidanlar) salgılayabilmektedirler. Daha da önemlisi, sterilizasyon işlemleri polimer özelliklerini etkileyebilmektedir. Metaller, sağlamlıkları, şekillendirilebilir olmaları ve yıpranmaya karşı dirençli olmaları nedeniyle günümüzde biyomalzeme olarak yaygın bir şekilde tercih edilmektedirler[2,12,32,33].



Şekil1.1: Biyomalzemelerin kaynaklarına göre sınıflandırılması.

Metalik biyomalzemeler saf metal veya alaşım elemanlarına göre sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar; CoCr alaşımları, Ti alaşımları ve paslanmaz çeliklerdir [2]. Korozyon dayanımı fazla olan ve iskelet kas sisteminin mekanik koşullarına uyum gösteren CoCr alaşımları, ağır yükler taşıyan kalça ve diz eklemlerinde protez sapı malzemesi olarak kullanılmaktadırlar [1]. Titanyum işleme teknolojisi zor ve pahalı olsa da Ti alaşımlarının hafif olması, kimyasal madde ve asitlerden etkilenmemesi, iyi korozyon direnci göstermesi, dokuda alerjik reaksiyon oluşturmaması, tuzlu sudan etkilenmemesi gibi üstün özelliklerinden dolayı; tıpta (kalça ve diz implantları, kalp valfi, diş dolgu maddesi v.s.) ve pek çok alanda kullanılmaktadır [1,2]. Son olarak bu tezin konusunu oluşturan paslanmaz çeliklerin ise iki türü bulunmakta olup 316 ve 316L olarak adlandırılmaktadır. 1950'li yıllarda 316 paslanmaz çeliğin karbon içeriği ağırlıkça %0,08'den %0,03'e düşürülerek 316L üretilmiştir. Biyomalzeme olarak yaygın kullanılan paslanmaz çelik 316L'dir. Yüksek korozyon dayanımına sahip olduklarından, yapılan *in vivo* çalışmalarda 316L paslanmaz çeliğin %95'inin bozulmamış olduğu görülmüştür [1,2,10]. Halen 316L paslanmaz çeliğine çeşitli katkıları yapılarak yeni biyomalzemeler geliştirilmekte ve biyoyum özellikleri artırılmaya çalışılmaktadır.

Biyomalzemelerin geliştirilmesi ile insan yaşamının kalitesinin arttırılacağı beklentisi yüksektir. Bu malzemelerin biyoyumlulukları da insan yaşam kalitesi için oldukça önemlidir [12]. Tüm bunların yanında insan vücudunda kullanılan ve insan

yedek parçası da denilebilen biyomalzemelerin kullanımı ile ilgili birçok sınırlamalar yani aşılammışsorunlar vardır. Bu malzemelerindoku uyumunda ve ömründe ortaya çıkabilecek problemlere çözüm sağlamak için son yıllarda doku mühendisliği verilerinin kullanımı artmış ve doku-organ tamiri veya yer değiştirmesi ile ilgili yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Böylece yeni biyomateriyallerin geliştirilmesinde, fiziksel ve mekanik özelliklerle birlikte biyolojik özellikleri ve biyoyumları da belirleyici hale gelmiştir [22].

Biyoyumluluk, bir materyalin uygulandığı bölgede uygun biyolojik cevabı oluşturabilmesi olarak tanımlanır [12,18]. Uygun doku cevabı, canlı bir sistem üzerinde bir materyalin yan etki göstermemesidir. Yan etki biyomalzemenin toksisitesinden kaynaklanabilir. Bu nedenle bu maddelerin sadece biyoyumlu olmaması bile toksik olmasının bir nedeni olabilir [19,20]. Biyoyumluluk, vücut içinde kullanılacak her materyal için önemli bir özelliktir ve biyolojik uyum, materyal, hasta ve fonksiyon arasındaki etkileşimin bir sonucudur, statik değil dinamiktir ve süreklilik göstermektedir [21]. Biyomalzemelerin istenilen mekanik özellikleri sağlamasının yanı sıra, bu malzemelerin biyoyumlu olması vücut uzuvları ve organlarının tedavisinde ve değiştirilmesinde oldukça önemlidir[24]. Bu nedenle yeni üretilen biyomalzemeler piyasaya çıkmadan önce, vücut içerisinde istenilmeyen bir etkiye sebep olmamaları amacıyla detaylı biyolojik testlere tabi tutulmak zorundadır.

Biyomalzemelerin biyolojik uyumlarının belirlenmesi için *in vitro* testler, hayvan testleri ve kullanım testleri gibi birçok test mevcuttur [21-26]. Biyomateriyallerin sitotoksitesinin belirlenmesi için özellikle *in vitro* hücre kültür testleri tercih edilmektedir. Hücre kültür ortamına eklenen biyomalzemenin, hücre büyüme oranı ve hücrelerin morfolojik özellikleri üzerine etkisi, kontrol grupları kullanılarak değerlendirilir. Böylece biyomalzemeler vücuda yerleştirildiklerinde bu malzemelere karşı oluşacak biyolojik reaksiyonların *in vitro* ortamda oluşturularak, uyumlu olup olmadığının önceden belirlenmesi hedeflenir [21,22,33]. Bu test sonuçlarına göre yeni biyomalzemeler geliştirilerek biyoyumluluk artırılmaya çalışılmaktadır. Bu nedenle insan vücudunda kullanılacak tüm restoratif yani implant materyallerin fiziksel ve mekanik özellikleri yanında biyoyumluluk yönünden de değerlendirilmesi büyük önem

arz etmektedir. Böylece daha güvenilir materyallerin seçilmesi ve geliştirilmesi sonucunda yapılan tedavilerin uzun dönem başarısı artacaktır.

Bu tez çalışmasının amacı Ti, Nb ve Zr katkıları yapılarak geliştirilen yeni 316L paslanmaz çeliklerin *in vitro* biyouyumluluklarının tespit edilmesidir. Bu amaçla örneklerin 3T3 fibroblast hücreleri ile etkileşimi, hücrelerin biyomalzemeyetoksik tepki verip vermediği ve canlılık oranları gibi birçok sorunun, tez çalışmamız ile cevaplanacağı düşünülmektedir. Tez çalışmamız mekanik özellikleri geliştirilmiş olan yeni biyomalzemelerin yaygın kullanıma geçmesine önemli ölçüde katkı sağlayacaktır.

1.1 Genel Bilgiler

1.1.1 Biyomalzeme-paslanmaz çelik (316L)

Paslanmaz çelik kullanılarak imal edilmiş ilk metalik biyomalzeme 18/8 Cr/Ni paslanmaz çelik implanttır. Bu tip biyomalzemeler sağlamlık ve yüksek korozyon dayanımından dolayı Vanadyum çeliğinden yapılmıştır. Vanadyum çeliğinin implant olarak uzun süre *in vivo* şartlarda kullanılması korozyon dayanımının yetersizliğinden dolayı uygun bulunmamıştır [10,12]. Daha sonra 18/8sMo paslanmaz çeliğinin % Mo oranı bir miktar daha arttırılarak tuzlu su solüsyonuna karşı korozyon dayanımı biraz daha artırılmıştır. Bu alaşım ASTM 316 (American Society For Testing andMaterials) paslanmaz çeliği olarak bilinen alaşımdır. 1950’de 316 paslanmaz çeliğin içerisindeki karbon (C) maksimum %0,08’den %0,03’e indirilmiştir ve bu alaşımın korozyon dayanımının tuzlu su solüsyonuna karşı daha iyi olduğu tespit edilmiştir [10-17]. C oranı % 0.03’e düşürülmüş olan 18/8 CrNi paslanmaz çeliğine ASTM 316L çeliği adı verilmektedir. ASTM standartlarında, “L” karbon içeriğinin düşük olduğunu ifade etmek için eklenmiştir[14,16].316L, %17-29 krom ve %12-14 nikelden oluşmaktadır.Nikelin %8’in üzerinde olması, ostenitini oda sıcaklığında kararlı hale getirdiğinden, bu tür paslanmaz çelikler ostenitik paslanmaz çelik olarak isimlendirilmektedir.

316Lpaslanmaz çeliklerin bileşiminde fazla miktarlarda bulunan krom,korozyon dayanımını etkileyen ana alaşım elamanıdır ve Cr’un minimum %11 olması

gerekmektedir. Krom aktif olmayan bir elementtir, fakat krom ve krom alaşımlarının %30 nitrik asitli solüsyonlara karşı korozyon dayanımı mükemmeldir. Krom yüzeyde kararlı bir oksit tabakası oluşturarak korozyon direncinin gelişmesini sağlar [2,13,15,16].

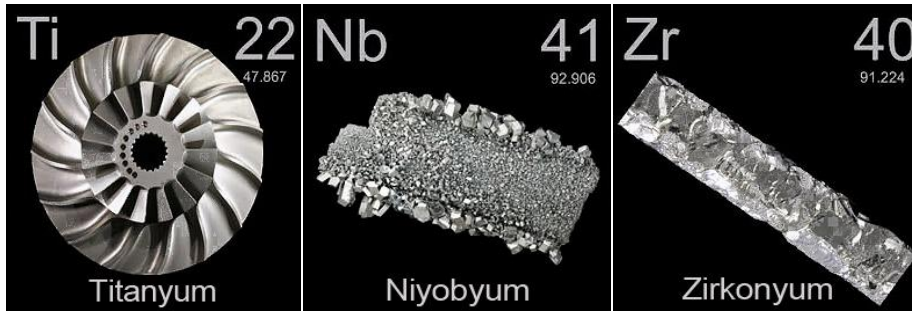
Paslanmaz çeliklerin implant üretiminde kullanımını sağlayan önemli diğer bir özellik de, karbon içeriğinin % 0.03 altında olmasıyla vücut içerisinde korozyon riskini en aza indirmesidir [58,59].Ostenitik paslanmaz çeliklerde karbon içeriği % 0.03'den fazla ise, tane sınırlarında krom karbür çökeltme olasılığı söz konusudur. Krom karbür çökeltmesi, etrafındaki kromu tüketerek ostenitik paslanmaz çeliğin tane sınırlarında korozyon gelişmesini (tanelerarası korozyon) teşvik eder. Bu nedenle, implant uygulamalarında kullanılan ostenitik paslanmaz çelikler, vücut sıvısının sebep olacağı korozyon riskini minimize etmek için % 0.03'den daha az oranda karbon içermelidir (Tablo 1.1). Tanelerarası korozyon direncini artırmak amacıyla karbon oranı düşürülmüş olan en basit ostenitik paslanmaz çelik sınıfı 304L kalitedir. Bu çeliğin korozif ortamda oyuklanmaya karşı direncini geliştirmek amacıyla bileşime % 2 mertebesinde Mo ilave edilmiş versiyonu 316L kalitedir. Günümüzde ortopedik uygulamalarda en yaygın kullanılan ostenitik paslanmaz çelik sınıfı olan 316L dir.

316 ve 316L paslanmaz çeliklerinden imal edilmiş metalik biyomalzemeler oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu grup paslanmaz çelikler diğer paslanmaz çeliklere göre *in vivo* ortamda daha yüksek korozyon dayanımına sahiptirler [12,14-16]. Alaşıma Mo katılarak alaşımın tuzlu su ortamındaki korozyona karşı olandirenci arttırabilmektedir [10]. Bahsedilen bu özelliklerinden dolayı ASTM, biyomalzeme olarak kullanmak amacıyla, 316L tipi paslanmaz çeliği 316 paslanmaz çeliğinden daha fazla tercih edilmektedir [1,2,12,14-16].Günümüz biyomalzeme biliminde, mekanik dayanım bakımından da vücut içerisinde 10-15 yıl ömür biçilen ve yaygın olarak tercih edilen 316L ostenitik paslanmaz çeliğin özellikle içerik ve yüzey özelliklerinin geliştirilmesi yoluyla aşınma dirençleri ve mukavemetleri arttırılarak kullanım ömürleri 20-25 yıla kadar çıkarılması hedeflenmektedir.

Tablo 1.1: 316 ve 316L paslanmaz çeliklerin kimyasal bileşenleri.

Element	316	316L
Krom(Cr)	16.0-18.0	16.0-18.0
Nikel (Ni)	10.0-14.0	10.0-14.0
Molibden(Mo)	2.00-3.00	2.00-3.00
Karbon(C)	0.080	0.030
Mangan(Mn)	2.00	2.00
Fosfor(P)	0.045	0.045
Sülfür(S)	0.03	0.03
Silikon(Si)	0.75	0.75
Azot(N)	0.1	0.1
Demir(Fe)	Yeterli	Yeterli

Bu çalışmada yeni katkılar yapılarak geliştirilen 316L paslanmaz çeliğinin biyoyoumluluk özellikleri araştırılmaktadır. Paslanmaz çeliğe yapılan bu katkılar yaygın olarak kullanılan bazı metallerdir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Kullanılan katkı elementlerinin periyodik cetveldeki yeri.

Kullanılan katkı metallerinden ilki sembolü Ti olan 22 atom numaralı titanyumdur. Titanyum; hafif, güçlü, parlak, korozyona karşı dirençli grimsi bir geçiş metalidir. Demir, alüminyum, vanadyum, molibden gibi elementler ile alaşım yapabilir. Bu güçlü, hafif alaşımlar havacılık (jet motorları, füzeler ve uzay araçları) askeri, endüstriyel işlemler (kimyasallar ve petrokimyasallar, arıtma santralleri, kâğıt hamuru

ve kâğıt) otomotiv, yiyecek, tıp (protezler, implantlar, dental endodontik malzemeler), spor eşyaları, mücevher, cep telefonu ve diğer uygulamalarda kullanılmaktadır [64,65].

İkinci katkı elementi, rengi oda koşullarında metalik gri olan niyobyumdur. Oda koşullarında katı halde bulunur. Katıksız haldeyken yumuşak ve sünek bir metal olan niyobyumun görünümü çeliğe benzer, parlatıldığında da platini andırır. Demirle tümüyle karışabildiğinden kaynak ve ısıtma sırasında kararlı olmalarını sağlamak için bazı paslanmaz çeliklere ferroniyobyum şeklinde katılır. Niyobyum nikel temelli yüksek sıcaklıklı alaşımların başlıca alaşımlama elementidir. Yüksek dayanımlı yapı çeliklerine de katkı maddesi olarak eklenmektedir [65].

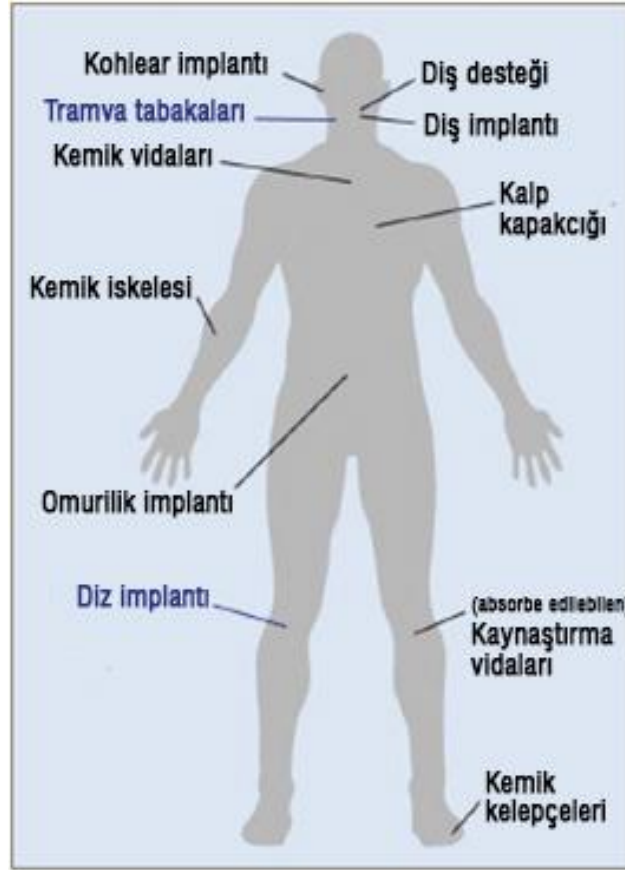
Diğer katkı elementi ise, oda sıcaklığında heksagonal sıkı paketlenmiş kristal yapıda olan zirkonyumdur. Zirkonyum sıcaklığa ve korozyona karşı çok dirençlidir ve tıpkı paslanmaz çelik gibi çok güçlüdür. Zirkonyum reaktif bir metal olduğu için, hava veya çözelti ile temas ettiğinde yüzeyinde hemen oksit tabakası oluşturur. Oluşan oksit tabaka zirkonyumun korozyona karşı dirençli olmasını sağlamaktadır [66].

1.2 Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi ve Kullanılan Yöntemler

Biyomalzemeler, çok değişken koşullara sahip olan insan vücudu ortamında kullanılırlar. Vücut sıvılarının pH değeri farklı dokulara göre 1 ile 9 arasında değişir [1,12]. Günlük aktivitelerimiz sırasında kemiklerimiz yaklaşık 4 MPa, tendonlar ise 40-80 MPa değerinde basınç ve gerilmeye maruz kalırlar. Bir kalça eklemiindeki ortalama yük, vücut ağırlığının 3 katına çıkabilir, sıçrama gibi faaliyetler sırasında ise bu değer vücut ağırlığının 10 katına çıkabilir. Vücudumuzdaki bu gerilmeler ayakta durma, oturma ve koşma gibi faaliyetler sırasında sürekli tekrarlanır. Biyomalzemelerin tüm bu zor koşullara dayanıklı olması ve vücut içerisinde kullanıldığı bölgeye göre özenle seçilmesi gerekmektedir (Şekil 1.3) [1,2].

Seçilen biyomalzeme vücutla sürekli etkileşim halinde olacağından biyouyumlu olması üstünde durulan en önemli konudur. Biyouyum, malzemenin yerine geçtiği dokunun işlevini yerine getirmesi için ilk ve en büyük önemi arz eden ölçüttür. Bir malzemenin biyouyumlu olup olmadığının anlaşılabilmesi için çeşitli testlerden geçmesi

gerekmektedir. Bu testler ile malzemelerin uyumu anlaşılabilir ve yeni biyomalzemeler geliştirilebilecektir.

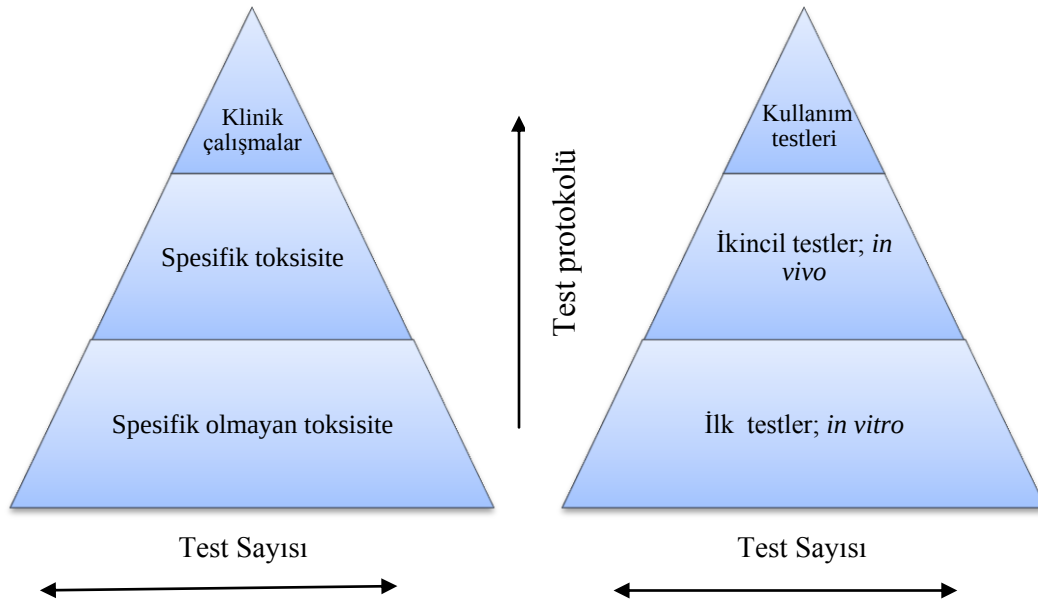


Şekil1.3:Biyomalzemelerin kullanıldığı bölgeler.

Biyouyumluluk değerlendirilmesinde en önemli aşama uygun test yönteminin seçilmesidir. Seçilen yöntemlerin kolay kontrol edilebilir, tekrarlanabilir, etkili, güvenilir ve materyallerin temel özelliklerini değerlendirmek için uygun olmaları gerekmektedir. Bu özellikler *invitro* testlerin avantajları arasında kabul edilirken; yapılan değerlendirmelerin biyolojik reaksiyonların *in vivo* sistem mekanizmasından bağımsız olması ve uygulanan test yöntemleri için her test sürecinde benzer sonuçlara ulaşılacak standartlar geliştirilmesi gerekliliği bu test sistemlerinin dezavantajlarıdır. Biyolojik uyum standartlarının belirlenmesi ile biyomalzeme gelişiminde izlenen teknik ilerlemelerin farklı hızda gerçekleşmesi; hücresel ve moleküler biyolojideki hızlı ilerlemeler, materyalin biyouyumluluğunu belirleyecek çok çeşitli testlerin varlığı, bu

testlerin standardize edilememesi sonucunu doğurur. Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu “*International organization for Standardization*”(ISO)’nun yayınlanan kılavuzunda; biyolojik testler öncül, ikincil testler ve kullanım testleri olarak üç grupta sınıflandırılmıştır (Şekil1.4).

İlk olarak vücut dışında (*in vitro*) daha sonra da vücut içinde ki (*in vivo*) testler yapılmalı, bunu takiben klinik denemelerle malzemenin biyolojik güvenilirliği ve performansı tespit edilmelidir [25].



Şekil 1.4: Piramit test protokolleri.

Test protokollerinin standardize edilmesinde oluşturulan piramitlerde ancak ilk basamağı geçebilen materyaller, ikinci basamakta uygulanan test protokolleri ile muamele edilirler ve sonrasında klinik çalışmalarda test edilebilirler. Bu sebeple üç aşamalı değerlendirmenin ilk basamağı olan *in vitro* testler büyük önem taşımaktadırlar. Öncül laboratuvar testleri yapılmadan hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesi çok zaman alıcı ve masraflı olmaktadır, *in vitro* ve *in vivo* testler arasında iyi bir korelasyonun varlığını ortaya koyan deneysel çalışmalar, *in vitro* testlerin materyal seçimi için faydalı bir sistem olduğunu göstermiştir [23,27-29].

Hücre kültürü testlerinin (*in vitro*) avantajları şu şekilde sıralanabilir;

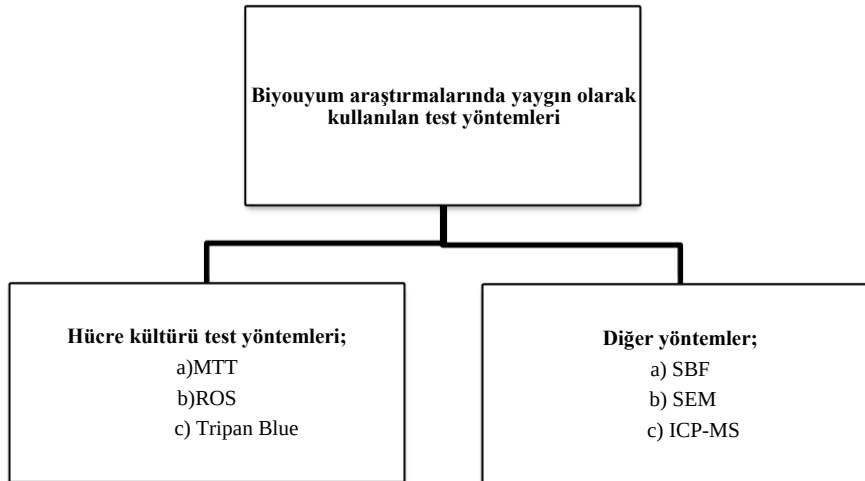
- Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilebilmesi,
- Çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak değerlendirilebilmesi,
- Tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir şartlarda yapılan ve karşılaştırılabilir sonuçlar veren hücre kültür koşulları ile daha güvenilir sonuçlara ulaşılabilmesi,
- Test yöntemlerinin standardize edilebilmesi,
- Kullanım testlerine oranla toksik maddenin daha hassas değerlendirilebilmesi,
- Hassasiyetlerinden dolayı, toksik materyalin hayvan deneylerine geçmeden elimine edilmesine imkan tanımaları ve materyalin toksik profili hakkında ön bilgi sağlamaları,
- Hayvan ve kullanım testlerine göre daha geniş kullanım alanına sahip olmaları [20,24-31].

Geliştirilen biyomalzemeler canlı dokularla uzun süre ve/veya sürekli temas halinde kalmalarından dolayı yaygın kullanıma geçilmeden önce bu materyallerin dokular üzerindeki zararlı etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Biyolojik ortamlar için biyomalzeme tasarımı, birbiri ile etkileşen üç ayrı dinamik unsurun varlığından dolayı son derece zordur. Bu unsurlar; biyomateryal yüzeyinin kimyasal yapısı, biyomalzeme-doku ara yüzey tabakasının kimyasal yapısı, biyomalzemeyi çevreleyen konakçı hücrenin oluşacak biyomalzeme-doku etkileşimine yanıtıdır[32].

Biyomalzemeler, konakçıda oluşturabilecekleri biyolojik etkilere göre biyotolere, biyoinert, biyoaktif ve toksik etki gösterbilirler[32,33]. Gösterdikleri bu etkiler biyoyum için oldukça önemlidir. Biyomalzeme uygulandığı bölgede, sınırlı fibröz doku ile çevreleniyorsa biyotolere etkiden söz edilir. Günümüzde kullanılan çoğu biyomalzemede bu durum görülmektedir. Çoğu zaman biyomalzemeler uygulandıkları dokuyu, dokularda kendilerine uygulanan metaryali etkilemek çabasıdadırlar, bu tür etkileşimlerin görülmediği biyomalzeme-doku ilişkisine biyoinet etki adı verilmektedir. Biyomalzeme, uygulandığı dokuda, benzer hücrelerin oluşumuna yardım

ediyorsa bu biyoaktif etki olarak adlandırılır ve tüm biyomazlemelerde hedeflenen bu etkinin oluşturulabilmesidir. Ortopedi ve travmatolojide kullanılan biyomalzemeler birçok testten geçtikten ve biyouyumluluğu onandıktan sonra kullanım alanına girmektedirler. Tüm bu testlere rağmen biyomalzemelerin allerjik, immün, nonimmün, mutajenik, kanserojenik ve inflamatuvar etkileri olabilir bu duruma toksik etki adı verilmektedir. Bu yüzden, kullanılacak biyomalzemenin toksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan testler oldukça önemlidir.

Biyomalzemelerin kullanımında biyolojik performansı önceden belirlemede, kullanılabilecek *in vitro* ve *in vitro* olmayan testler vardır ve bunlar geliştirilmektedir. Bu testlerin çoğu kullanılması düşünülen biyomalzemenin herhangi bir potansiyel toksisitesini, korozyonunu, iyon salınımını ve uygulandığı hücre hattına nasıl bir etki yaptığını belirlemek için uygulanır. Yapılacak uygulama için testlerin seçimi, anlamlı sonuçların bulunması ve gereksiz harcamalardan kaçınılmasında önemlidir. Biyomalzeme olarak kullanılacak paslanmaz çeliklerin uyumluluklarının araştırılması ve geliştirilmesinde, etkinlik ve güvenilirliklerinin belirlenmesinde *in vitro* biyouyumluluk çalışmaları çok önemli rol oynamaktadır. Şekil 1.5’ da en sık kullanılan test yöntemleri verilmiştir [105, 106].



Şekil 1.5: Biyouyumluluk belirlenmesinde en sık kullanılan test yöntemleri.

1.2.1 Hücre kültürü

Ross Harison'un 1907'de kurbağa embriyolarıyla yaptığı çalışma ile başlayan süreç daha sonraki yıllarda çeşitli araştırmacıların sentetik besi yerlerini keşfediş kullanımlarıyla günümüzdeki modern doku kültürü metodlarının doğmasını sağlamıştır [106]. Doku kültürü; organ kültürü ve hücre kültürü yerine de kullanılan jenerik bir terimdir ve genellikle birbirlerinin yerine de kullanılırlar.

Hücre kültürü; canlı birdoku veya organdan alınan küçük bir parçanın *in vitro* ortamda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemine verilen isimdir. Hücre kültürleri primer doku eksplantları veya hücre süspansiyonlarından meydana gelir. Hücre kültürleri genel olarak süspansiyon kültür ve monolayer kültür olmak üzere ikiye ayrılırlar. Süspansiyon kültürler; genellikle kan, kemik iliği ve bazı tümör hücrelerinden yapılan, kültür kabınayapışmayan kültürlerdir. Monolayer kültürler yapışma ihtiyacı hisseden amniyon hücreleri ve fibroblastlar gibi hücrelerden hazırlanırlar [30,51-54].

Hücre ve doku kültürü; aşı, monoklonal antikor ve çeşitli enzimlerin üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca hücre içi aktivite ölçümü, DNA ve RNA replikasyonu araştırmaları gibi yeni tekniklerle birleştirilerek kullanılabilir. Hücre içi protein sentezi, enerji metabolizmasının araştırılması, sinyal iletim mekanizması, hücre haberleşmesi, hücrenin beslenme özelliklerinin aydınlatılmasında yaygın bir kullanım alanına sahiptir [51-54].

Birçok omurgalı hücreleri kültürde sınırlı sayıda bölünmeden sonra hücre yaşlanması (cell senescence) denilen bir sürece girerek bölünmeyi durdururlar. Örneğin, bu tez çalışmada da kullanılan fare fibroblast hücreleri sadece 25-40 kez kadar bölünebilirler. Bu olay telomerlerin kısalmasıyla açıklanabilir. İnsan somatik hücreleri telomeraz enziminin yapımını durdurdukları için telomerler kısalmakta ve bunun sonucunda hücrelerin yaşamı da sınırlı olmaktadır [30,53,55]. Bu nedenle kullanılan hücre serilerinin saklanması ihtiyaç duyulur ve hücre serileri sıvı azotta (-196°C) saklanabilmektedir. Çözündükleri zaman da canlılıklarını koruyabilmektedirler. Biyomalzeme araştırmalarında yaygın olarak kullanılan hücre serileri ve köken aldıkları dokular (Tablo 1.2) listelenmiştir [52-55].

Hücre kültürü hazırlamak için alınan küçük doku veya organ parçasına eksplant denir. Çalışmalarda daha çok diploid hücreler kullanılır. Eksplantın doku veya

organdanalınıp ilk ekiminin yapıldığı kültüre primer kültür, burada oluşan yeni hücrelerin başka besiyerine ekimiyle oluşan kültüre ise pasaj veya subkültür denir. Primer hücre kültürlerinin kültürde belirli süre ömürleri vardır.

Tablo 1.2:Biyomalzeme araştırmalarında yaygın olarak kullanılan hücre serileri.

Hücre Hattı	Hücre hattının açık adı
3T3	embriyonik fibroblast
L929	fibroblast
MC3T3-E1	pre-osteoblast
HGF	dişeti fibroblastı
MG-63	osteosarcoma
MO3-13	oligodentrosit
hFOB 1.19	osteoblast
V79	akciğer fibroblastı

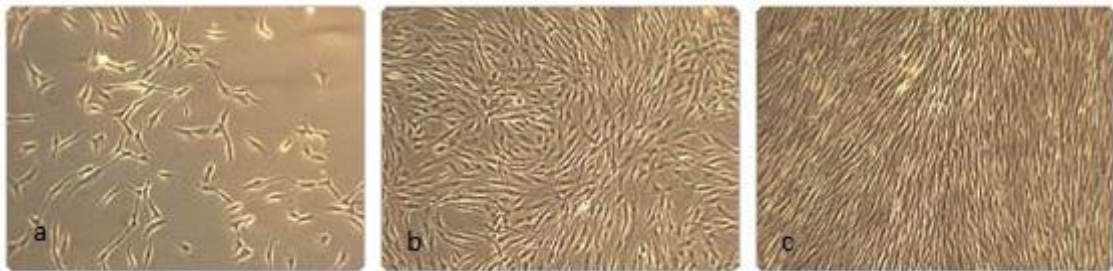
1.2.2 Fibroblast hücrelerinin genel özellikleri

Fibroblastlar, farkedilmemiş mezodermal hücrelerden köken alırlar. Aktif ya da inaktif durumda bulunabilirler. Aktif fibroblastlar çoğunlukla kollajen demetlere yakın ve bunların uzun eksenine paralel olarak yerleşirler. Aktif fibroblastlar yassılaştırmış yıldız şeklinde hücrelerdir, gittikçe incelen sitoplazmik uzantıları vardır. Hematoksilin-eozin ile boyandığında bu uzantıların kollajenden ayırt edilmesi zordur. Hücrenin geniş, granüllü, oval bir çekirdeği ve 1 ya da 2 adet belirgin çekirdekçisi bulunur. Gövde kısımlarından sitoplazmik uzantılar çıkar, çekirdekleri oval olan hücrelerdir. Bağ dokunun ana maddesi olan ve yaraların iyileşmesinde işlevi olan kollajen adlı proteinin yapımından sorumlu hücrelerdendirler. Fibroblastlar, farklı

hücre çeşitlerinin öncüllerine (osteoblastlar) dönüşebilirler. Fibroblast lifleri oluşturur [51, 56, 117].

Fibroblast hücresi elektron mikroskop ile incelendiğinde, özellikle hücrenin aktif olarak ara madde (matriks) bileşenlerini ve fibrilleri ürettiği durumlarda (örneğin büyüme sürecinde ve yara iyileşmesinde), iyi gelişmiş golgi aygıtı ve granüllü endoplazma retikulumu (GER) keseleri göze çarpar. Aktif sentez sebebiyle endoplazma retikulumu keseleri genişlemiş olarak görülür. Genel olarak fibroblastların dış (eksternal) laminası ve hücrelerarası bağlantı kompleksleri bulunmaz. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalarda, hem düzenli hem de düzensiz sıkı bağ dokusundaki fibroblastlar arasında epitel hücrelerindeki benzer bağlantı kompleksleri gösterilmiştir. Sitoplazması mezenkimal hücrelere özgü ara filamanlar olan vimentin filamanlarından zengindir [32,117].

Biyouyum çalışmalarında sıklıkla kullanılan hücre hattı 3T3 Fare Fibroblastlarıdır. İlk kez 1962 yılında New York Üniversitesi Tıp Okulu Patoloji Departmanında George Todaro ve Howard Green tarafından izole edilerek pasajlanmıştır. Bu hücrelere 3T3 denilmesi ise; ilk 3- hücrelerin 3 günde pasajlanacak yoğunluğa erişmeleri, T harfi- transfer yani taşınması olarak, ikinci 3- pasajlanmaları için gereken yoğunluklarının 3×10^5 olması gerektiğindendir. 3T3 mouse embriyonik fibroblast kök hücrelerinin *in vitro* pasajlanması ömürleri ortalama 25-40 jenerasyondur ve fibroblastlar bir yüzeye tutunarak büyüme eğiliminde olan hücrelerdir [56].



Şekil 1.6: 3T3 Fibroblast Hücre Hattı **a)** 3.gün, **b)**5.gün, **c)**7.gün(www.lifetechnologies.com).

1.2.3 Hücre kültürü ortamı ve biyouyumluluk analiz yöntemleri

Hücrelerin *in vitro* ortamda yaşabilmeleri büyümeleri ve çoğalmaları için uygun besiyerlerine ihtiyaçları vardır. İyi bir besiyeri; hücrelerin canlılığını sürdürmelerini, proliferasyonlarını ve farklılaşmalarını sağlamalı esansiyel ve non-esansiyel amino asitleri, vitaminleri, tuzları, şekerleri, serum, penisilin ve streptomisin gibi antibiyotikleri, çeşitli iyonları (Na, K, Ca, Mg, Cl, P, NaHCO₃), iz elementleri (CO₂, Fe, Zn, Se) ve lipidleri ihtiva etmelidir. Besiyeri kültürü yapılacak hücrelerin beslenme özelliklerine göre ya da özel seçim yapılarak ilgili tercih yapılır. Memeli hücresinin kültürü için gerekli besiyerinin bileşenleri amino asitler, vitaminler, tuzlar, glukoz, antibiyotikler ve serumu (serum kullanılmıyorsa da gerekli proteinleri) kapsar [6,7,11,15,107].

İyi bir besiyerinin pH'sı 7,2–7,3'e ayarlanmalı (6,8–7,4) ve pH indikatörü (fenol kırmızısı) içermelidir. Besiyerinin renk görünümü; pH 7,2–7,4 arası gülcürusu, pH 6,8'den aşağıda sarı ve pH 7,4'ten yukarıda kırmızıdır. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu dikkate alınmalıdır. Hücre yoğunluğunun artması ile ortam pH'sı düşer, besin maddeleri azalır ve atık ürün miktarı artar. Bu nedenle hücrelerin yoğunluklarının azaltılması gerekir ve bu azaltma işlemine pasajlama adı verilir. Hücrelerin kültür kabından alınmaları için, besiyerinin uzaklaştırılmasının ardından bir seri tampon çözelti [PBS (phosphate buffered saline)] ile yıkama işlemi yapılır. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmaları için tripsin gibi proteolitik enzimler genellikle etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ile kombine edilerek ya da tek başına EDTA kullanılır [16,19]. Enzimlerin kullanıldığı yöntem, hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilecek etkiye sahip proteolitik reaksiyona sebep olabilirler, fakat tripsin etkisiyle hücreler yüzeyden kalktıktan sonra besiyerinin eklenmesi ile proteolitik etki engellenir ve hücreler süspanse edilerek yeni kültür kaplarına aktarılır [22,25,27].

Kültür kapları, biyolojik olarak inert, non-toksik ve optik olarak ışığa geçirgen yüzeye sahip olmalıdır. Bilinen çoğu kültür kapları özel polistren plastikten yapılmış, steril ve tek kullanımlıktır. Petri, çok kuyucuklu plaklar, mikropalaklar, silindirik şişeler, vidalı kapaklı flasklar (T-25, T-75, T-150 (cm²/yüzey)) çeşitli kültür kaplarına örnek olarak verilebilir [6,7,11,15,107].

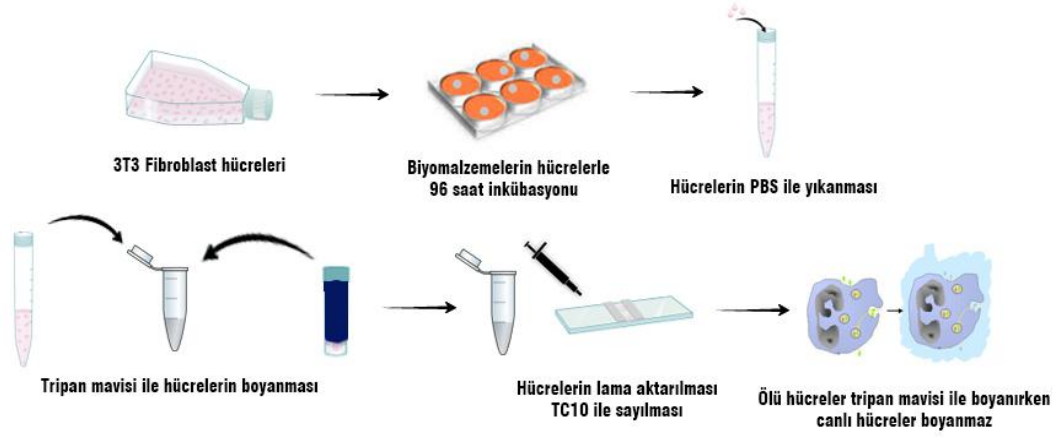
Hücre kültürü çalışmalarının yapılabilmesi için steril ortam gerekmektedir ve UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla steril edilmesi gereken laminar akımlı kabinlerde çalışmalar yapılmalıdır. Horizontal ve vertikal olmak üzere iki ana çeşit laminar akım kabini vardır. Her iki çeşit laminar akım kabinin de havadaki partikülleri uzaklaştıran HEPA (high efficiency particible) filtre kullanılır [25,27,29]. Horizontal kabinler ortamı steril eder, vertikal kabinler ise steril edilen havanın çalışılan ortamın önünden aşağıya doğru bir şelale gibi akmasını sağlayarak iç ortam ile dış ortamın karışmasını engeller. Laminar akımlı kabinde hücreler pasajlanmalı ve sonrasında kültür kapları CO₂ etüvünde (37°C, %5 CO₂ ve %95 nem) inkübe edilmelidir. Hücre kültürü kaplarının kapakları CO₂ giriş çıkışına uygun olmalı, ya da gevşek olarak kapatılmalıdır. İnkübatörlerin kapısı uzun süreli açık kalmamalı, sıcaklık düşmesi ve kontaminasyon riski unutulmamalıdır. Ortamın nemi inkübatördeki su kabının daima temiz ve dolu olmasıyla sağlanır. Hücre kültürleri için uygun sıcaklık 36,5–37°C'dir [6,11,41,42,44,59,74]. Kültür devam ederken hücrelerin büyümesi, morfolojik özellikleri ve kontaminasyon olup olmadığı invert mikroskop ile takip edilir. Hücreleri gözlemek için de faz kontrast mikroskoplar kullanılır.

Hazırlanan hücre kültür ortamında biyomalzemelerin biyouyumluluklarının belirlenmesi için bir çok analiz yapılmaktadır. Bu analizler içinde yaygın olarak sitotoksitesite testleri (Tripın Mavisi, MTT ve ROS testi), hücre morfolojisinin belirlenmesi testi (SEM incelemesi), iyon salınımının değerlendirilmesi (ICP-MS analizi) ve simüle vücut sıvısı (SBF testi) ile apatit oluşumu saptanması yapılmaktadır. Yapılan tüm testlerde 5-10 pasaj sayısı aralığında 3T3 fare fibroblast hücreleri kullanılmaktadır [60,61,63,67,70,74].

1.2.3.1 Sitotoksitesite testleri

Biyomalzemelerin sitotoksitesitesinin belirlenmesinde kullanılan pek çok test mevcuttur. Yapılan birçok araştırma göz önüne alındığında, araştırmacıların kullandıkları ve güvenilir olan testler Tripın Mavisi, MTT ve ROS'dur. Bu testlerden **tripın mavisi**, vital boyadır ve kültür koşullarında kantitatif analiz sağlar[24,26,28,38]. Bu metodun temel prensibi, canlı hücrelerin boyayı almayıp ölü hücrelerin almasıdır. Tripın mavisi sadece ölü hücrelerin membranından içeri geçerek

onları boyar. Hücre süspansiyonuna tripan mavisi ile dilüsyon yapıldığında canlı hücreler küçük, yuvarlak ve refraktif olarak görünürler (Şekil 1.7). Ölü hücreler şişer, büyük ve koyu mavi hale gelirler. Tüm hücrelerin ve canlı hücrelerin sayısı mililitre başına belirlenebilir [40,44,45,107].



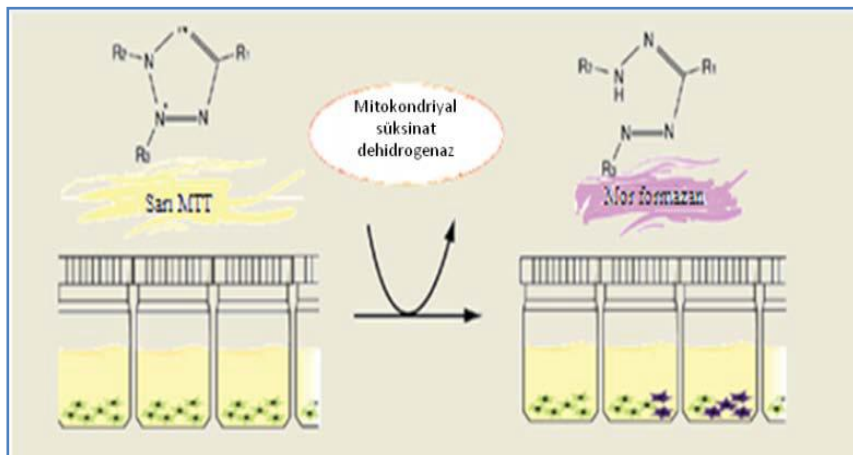
Şekil 1.7: Tripan mavisi testi uygulama aşamaları.

Tripan mavisi test tekniği kullanılarak çeşitli biyomalzemelerin farklı hücreler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Hamzeh ve Sunahara [86] TiO_2 nanoparçacıklarının fibroblastlar üzerinde sitotoksik etkilerini incelemişler, nanoparçacık kaplanmış mikron boyutta ki TiO_2 'in hücre canlılığını etkilmediğini tespit etmişlerdir. Catauro ve ark. [108] SiO_2 /PEG hibrit polimerinin 3T3 fibroblast hücre hattı ile biyoyumluluklarını araştırmışlar, hücre bölünmesi ve canlılığına olumlu etki yaptığını söylemişlerdir.

Mosmann tarafından geliştirilen ve sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem ise **MTT(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue)** testidir [106,109]. Sarı renkte, suda çözünebilen tetrazolyum tuzlarının (MTT), metabolizmaları aktif olan canlı hücreler tarafından alınması ve mitokondriyal bir enzim olan süksinik dehidrogenaz tarafından parçalanarak suda çözülmeyen mor renkli tetrazolyum formazan yan ürünü (hücresel dehidrogenaz aktivitesi) salınması esasına dayanır [114-116]. Canlı hücrelerdeki mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalaması olarak bilinen

indirgenme ve ölü hücrelerin bu boyayı indirgeme özelliğini yitirmesi prensibinden yararlanılır [68,75,77].

Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası, koyu mavi-mor formazan kristaline dönüşmektedir. Formazan oluşum miktarının hücre sayısı ile doğru orantılı olması esas alınarak kalan canlı hücre sayıları MTT testi ile belirlenebilir. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan suksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Sitotoksik etki nedeni ile dehidrogenazların aktif olmadığı durumda formazan oluşumu gözlenmez [68,107]. Sonuçta canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renk boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (Şekil 1.8). Ölçümler ise, plak okuyucusunda, absorbans değerleri 570nm dalga boyu kullanılarak yapılır. Suda çözünmeyen formazan kristalleri DMSO (dimetil sülfoksit) veya başka bir organik çözücü içinde çözünebilir ve çözünen materyallerin optik yoğunlukları (absorbans) spektrofotometre (570-690 nm) yardımı ile ölçülür ve hücre hattında metabolizmaları aktif olan hücre sayısı ile doğru orantılı bir değer elde edilir[20,26,34-39]. Bu yöntemle, bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı, kolorimetrik yöntemle nicel olarak saptanabilmektedir. MTT testi ile canlılığın (%) hesaplanması test gruplarının optik yoğunluğunun, kontrol gruplarının optik yoğunluğuna bölünerek 100 ile çarpılmasıyla elde edilir.



Şekil 1.8: MTT testinin temel prensibi [114].

MTT test tekniği kullanılarak çeşitli biyomalzemelerin *in vitro* biyoyumluluklarını incelemek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Papargeorgiou ve ark. [71] CoCr alaşımının insan fibroblastları üzerine etkilerini MTT testi ile incelemiş, nano boyuttaki alaşımın mikron boyutlara göre daha sitotoksik olduğunu tespit etmişlerdir. Cimpean ve ark. [73], ise Ti-25Ta-25Nb alaşımının osteoblastlar ile 2,4,7 günlük etkileşimlerini araştırmışlar, alaşımın hücre canlılığını olumsuz etkilemediğini belirtmişlerdir. Habermehl ve ark. [61] geliştirdikleri çeşitli kolajen bazlı materyaller ile 3T3 fibroblast hücrelerinin biyoyumluluklarını 24 saat ve 1 hafta periyotlarında değerlendirmişlerdir. 24 saat sonunda asidik kolajende hücre canlılığı azalıırken 1 hafta sonunda asidik kolajenin tamamen sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Li ve ark. [89] $Zr_{61}Ti_2Cu_{25}Al_{12}$ içerikli metalik cam dental implant malzemesini üç farklı hücre grubu üzerinde çalışmış ve tüm gruplarda hücre canlılığını olumsuz etkilemediğini tespit etmişlerdir. Yun ve ark. [110] Magnezyum metalinin osteoblast hücreleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve magnezyumun sadece 10mM'den fazla miktarlarda hücre bölünmesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Chen ve ark. [111] titanyum ve titanyum-zirkonyum alaşımlarının osteoblast hücreleri üzerine *in vitro* etkilerini incelemişler, Ti ve Ti-Zr alaşımlarının implant malzeme olarak kullanılabilir olduklarını söylemişlerdir. Zhou ve ark. [112] hidroksiapatit kaplanmış biyoseramiklerin kemik dokusu üzerindeki etkilerini MTT ile incelemiş, bu biyomalzemenin kemik dokuda kullanılabilir olduğunu söylemişlerdir. Fagali ve ark. [113] demir tuzu ilaveli stentlerin sitotoksitelerini değerlendirmişler ve kontrol gruplarına göre Fe^{3+} tuzu ilaveli olanların mitokondriyal aktivitelerinin daha iyi olduğunu belirtmişlerdir.

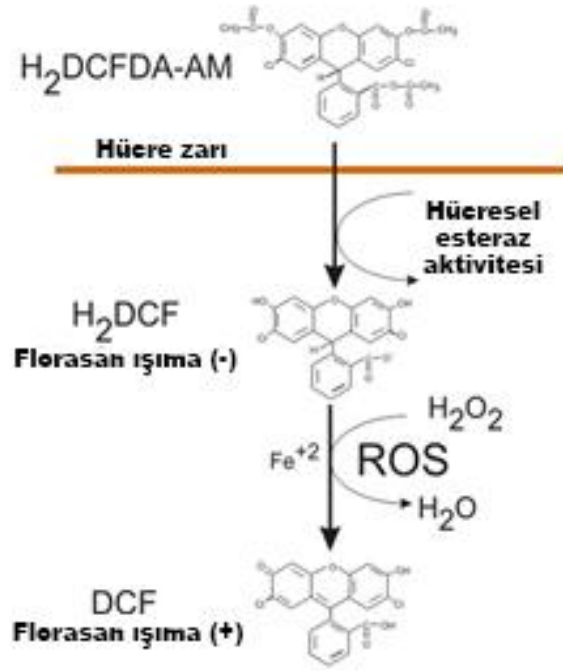
ROS analizi sitotoksisite ve oksidatif stresin tespiti için oldukça kullanışlı bir tekniktir. Reaktif oksijen türevleri kaynağını moleküler oksijenden alan bir grup kimyasal reaktif molekdr ve bu molekülün çeşitli hücre sel mekanizmaların regülasyonunda önemli vazifeleri olduğu gibi canlı organizmalarda da ciddi yıkımlara neden olabilecek birçok zararlı etkilere sahiptir [73,76,77,85].

ROS oluşumunun canlı organizmalar üzerine sebebiyet verdiği zarara oksidatif hasar denir. ROS oluşumu pek çok kaynaktan kkenlenebilir. Ultraviyole ışınlar, radyasyon, ısı ve terapötik ilaçlar gibi kaynaklar da dışarıdan etkileyerek ROS üretiminin gerçekleşmesine neden olabilirler. Ayrıca tütün kullanımı, kronik fazla egzersiz gibi bazı aktiviteler de ROS sentezi sonucu ortaya çıkan oksidatif hasara

katkıda bulunurlar [117]. ROS moleküler seviyede, serbest oksijen radikalleri ve non-radikal moleküller olarak iki sınıfta değerlendirilebilir. Serbest oksijen radikalleri bir ya da daha çok e lenmemi  elektronu var olan ve serbest şekilde görülebilen bir kimyasal molekül grubudur. Serbest oksijen radikalleri ile non-radikal moleküllerin birbirleri ile etkileşerek yeni bir radikal oluşumuna sebep olabilmeleri her iki grup için de önemli bir özelliktir [86,117]. Başlıca en çok görülen serbest radikal moleküller hidroksili radikal (OH⁻), nitrik oksit (NO) ve s peroksittir (O²). Diğer yandan hidrojen peroksitin (H₂O₂) ve singlet oksijenin (¹O₂) de aralarında bulunduğu bir grup molekül ise non-radikaller sınıfındadır [117].

Biyomalzemelerden salınan bazı monomerler direkt olarak ya da “reaktif oksijen türleri” (ROS; H₂O₂, süperoksit anyon, OH radikali)  zerinden indirekt olarak mutajenik etki gösterebilirler. Biyomalzemelerin hücrelerde oluşturduğu reaktif oksijen türevleri (ROS) oksidatif strese ve inflamasyona neden olabilir. Bunun yanında lipitler, proteinler ve DNA üzerinde çeşitli hasarlar meydana getirirler. Bu reaktif oksijen türevlerinin varlığının tespitinde ROS tekniği kullanılmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunun tespit edilmesinde floresans detektörlerden yararlanılır. Bir asetat ester türevi olan H₂DCFDA-AM membranı geçebilen bir moleküldür ve hücre içine girdiğinde hücresel esterazların etkisiyle floresan olmayan H₂DCFDA’ ya dönüşürler. Bu molekülün ROS’lar ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan DCF ise floresan ışıma yapar( ekil 1.9) [117,120,121].

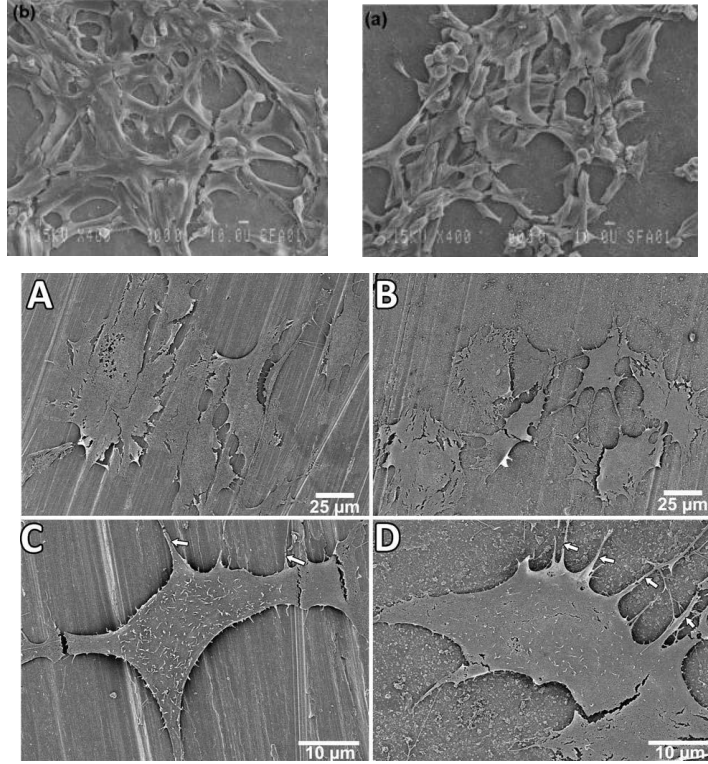
ROS analizinin kullanıldığı biyoyum çalışmaları mevcuttur. Bunlardan bazıları: Kapanen ve ark. [118] 316L, Ti, Ni ve NiTi biyomalzemelerinin osteosarkoma hücreleri ile etkileşimlerini incelemiş, paslanmaz çelikten sonra NiTi alaşımının en az sitotoksik etkiyi yaptığını ve apoptoz oranlarında en az hücre ölümüne 316L paslanmaz çeliğin sebep olduğunu belirtmişlerdir. Tseausi ve ark. [119] alüminyum oksit (Al₂O₃) ve CoCr ala ımını *in vitro* olarak kar ıla tırmı  ve Al₂O₃’in daha az reaktif oksijen türevleri oluşturduğunu izlemişlerdir. Alinovi ve ark. [120] Co ve TiO₂ nanoparçacıklarının endotel hücrelerinde oksidatif strese sebep olduklarını söylemişlerdir. Alafiri ve ark. [121], ise Co₃O₄ nanopartiküllerinin insan hepatokarsinoma hücrelerinde oksidatif strese sebep verip vermediğini incelemişler ve sitotoksik olduğunu izlemişlerdir.



Şekil 1.9: Reaktif oksijen türevlerinin hücre zarından geçişi (www.biotek.com).

1.2.3.2 Hücre adezyonu ve morfolojisinin belirlenmesi

Biyomalzeme ile hücre arasındaki ilişkinin belirlenmesinde hücre morfolojisindeki değişimler ve hücrelerin biyomalzeme üzerine adhere olup olmadığı da önemlidir. Bu özelliklerin tespit edilebilmesi için taramalı elektron mikroskopu kullanılmaktadır. Taramalı elektron mikroskopu (SEM); biyolojik botanik, hücre biyolojisi, tıp, malzeme bilimleri ve yeryüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 100.000 kez büyütürken yüzey yapılarını görüntüler böylece örnek yüzeyinde meydana gelen farklılıklar değerlendirilir. SEM’de elektron tabancasından (tungsten filaman) yayılan elektronlar, örneğin üzerinden geçirilerek üç boyutlu hayali bir görüntü oluşturulur. Hücre biyomalzeme etkileşiminin gösterilmesi SEM ile mümkündür. Yapılan çeşitli çalışmalarda, 3T3 Fibroblast hücre hattının çeşitli yüzeylere tutunmaları (Şekil 1.10) gösterilmiştir [61,62].



Şekil 1.10: SEM’de 3T3 hücrelerinin, kolajen yüzeyler (a,b) ve farklı kaplama yüzeyler (A,B,C,D) ile etkileşimlerinin gösteren SEM mikrografları [61,62].

Cui ve ark. [70] kalsiyum fosfat kaplı NiTi örnekleri üzerinde 3T3 fibroblast hücrelerinin adezyonlarını görüntülemiş ve hücrelerin tutunduklarını belirtmişlerdir. Kılıç [87] L929 fibroblast hücrelerinin üç farklı cam bazlı dolgu materyalinin etkileşimini incelemiş, tüm dolgu materyallerinde yoğunluk farkı bulunmasına rağmen fibroblast morfolojilerinde değişiklik gözlemlememiştir. Nazhan ve ark. [122] insan dişine fibroblastların tutunmalarını incelemiş ve diş yüzeyine fibroblastların morfolojilerinde herhangi bir değişiklik olmadan ve yoğun bir şekilde dış yüzeyine tutunduklarını göstermişlerdir. Ye ve ark. [123] oksit kaplanmış Ti-Al-V alaşımı üzerindeki fibroblastlar ve osteoblastları izlemiş, hücrelerin morfolojilerinin değişmediğini söylemişlerdir.

1.2.3.3 İyon salınımının değerlendirilmesi

Metalik biyomalzemeler 37°C ve pH 7.3'de çözünmüş gazların hücrelerin elektrolitlerinin ve proteinlerinin olduğu sulu solüsyonda yani fizyolojik ortam içine konulduklarında korozyona uğrayarak iyonlarını ortama bırakırlar. Bu durum biyoyumluluğu azaltarak implantların kaderini olumsuz etkilemektedir. Metalik biyomalzemelerden besiyerine iyon salınımını tespit etmek için, ICP-MS (indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi) testi kullanılmaktadır. ICP-MS, katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, ucuz, hassas ve doğru biçimde, niteliksel, niceliksel ya da yarı-niceliksel olarak ölçülmesine olanak sağlayan bir analiz tekniğidir. ICP-MS direk olarak çözeltide iz element derişimlerinin belirlenmesi için de uygundur [133].

Birçok element için gözlenebilme sınırı mg/L'nin (ppb ve daha düşük derişimler) altındadır. Çok sayıda elementi aynı anda analiz edebilme özelliği sayesinde nitel analizlerde ve izotop oranlarının belirlenmesinde olduğu gibi, başta metalik elementler olmak üzere periyodik tablodaki elementlerin büyük çoğunluğunun nicel ve yarı-nitel tayinlerinde bu teknik yaygın olarak kullanılmaktadır. ICP-MS'in çalışma aralığı diğer yöntemlere oranla oldukça geniştir. Birçok element için pg-mg/L arasında kalibrasyon grafikleri çizilebilmektedir ve bu farklı derişime sahip birçok elementin aynı anda analizine olanak sağlamaktadır. ICP-MS analizinin yapılmasındaki temel amaç biyomalzemenin besiyerine iyon salınımı olup olmadığını belirlemektir. Tüm analizlerden farklı olarak burada hücrelerin yaşadığı ortama biyomateryallerden iyon geçişi miktarı saptanır. Belirlenen bu değer ile biyomalzemenin besiyeri içinde salınan iyon miktarı tespit edilir ve biyoyumluluğun değerlendirilmesinde önemli bir belirteç olarak kullanılır. Ayrıca iyon salınımı biyomalzemenin korozyon dayanımının ortaya konmasında önemli bir belirteçtir, yani iyon salınımının az olması kullanılan malzemenin korozyona uğramadığını göstermiş olur [32,125,133].

ICP-MS ile iyon salınımının belirlenerek biyoyumluluk değerlendirmesinin yapıldığı çalışmalar mevcuttur. Diaz ve ark. [124] kalça protezlerinde kullanılan CoCr alaşımlarından toksik iyon salınımını azaltmak için bu alaşımın yüzeyini nanoparçacıklarla kapladıktan sonra, salınımına tekrar baktıklarında nano kaplı olan alaşımdan toksik iyon salınımının azaldığını bildirmişlerdir. Puskar ve ark. [125] dental

implant olarak kullanılan Co-Cr-Mo alaşımlarının tükürük benzeri bir besiyeri içinde 3 farklı pH'da iyon salınımı üzerinde çalışma yapmışlardır. Asidik pH'da iyon salınımının artış gösterdiğini, salınan iyon miktarının ISO'da belirtilen miktarlara göre güvenli düzeyde olduğunu izlemişlerdir. Shen ve ark. [126] nano ölçekli vasküler endotel büyüme faktörü ile kaplanan NiTi alaşımı, simüle vücut sıvısı içine konularak 3,7,21 ve 30 günlük iyon salınım miktarlarını incelemişlerdir. Yapılan kaplamanın Ni iyonu salınımını önemli ölçüde azalttığını izlemişlerdir. Gonzales ve ark. [127] vücudun çeşitli kısımlarında implant malzeme olarak kullanılan titanyum metalini 18 aylık bir farenin uyluk kemiğine yerleştirmiş ve aşınma olmadan kalmasını sağlamışlardır. Kan ve akciğer gibi organlarda iyon salınım miktarlarına bakmışlar, normalde olması gerekenden fazla olduğunu saptamışlardır.

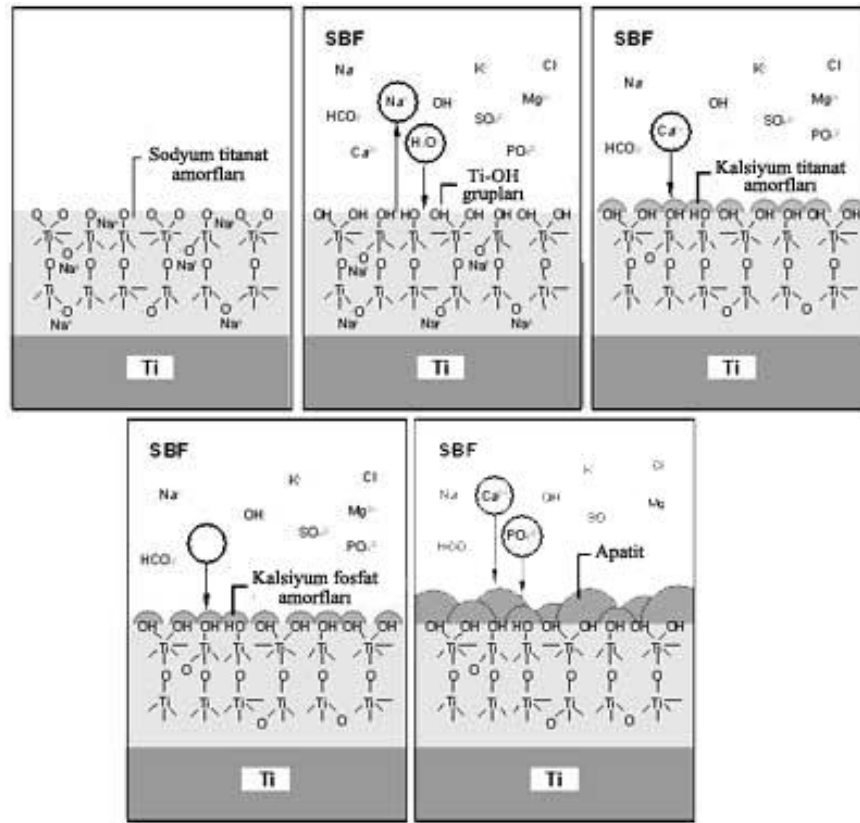
1.2.3.4 Simüle vücut sıvısı ile hidroksiapatit oluşumu

Biyouyum değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer yöntem ise kan pH'sına ve iyon konsantrasyonuna yakın olan SBF(simüle vücut sıvısı) ile biyomalzemelerin belirli bir süre bir arada tutulmasıdır. SBF iyon konsantrasyonu bakımından insan kan plazmasına çok yakın benzerlikte bir çözeltidir (Tablo1.3). Bu yakın benzerlik kullanılarak biyomalzeme için hücrelerle etkileşmeden önce bir simülasyon ortamının oluşturulması sağlanmaktadır.

Tablo1.3: SBF ile Kan plazmasında bulunan iyonların karşılaştırılması.

İyonlar	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Kan plazması	142.0	5.0	2.5	1.5	27.0	103.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	2.5	1.5	4.2	147.8	1.0	0.5

SBF içerisinde konulan biyomalzemenin yüzeyinde oluşacak hidroksiapatit kristalleri sayesinde, kullanılan malzemenin biyoyumu saptanır. Oluşan hidroksiapatit kristalleri ne kadar fazla ise biyomalzeme o kadar biyoyumludur denilmektedir [46,95]. Örnek bir metal(titanyum) yüzeyinde ilk olarak sodyumun titanyuma bağlanmasıyla sodyum titanat amorfı meydana gelmiş ve bu oluşumu hidroksil iyonları ile kalsiyum izlemiş, kalsiyum titanat amorfını oluşturmuştur. Oluşan bu amorf kristallerine fosfatın eklenmesi ile hidroksiapatit meydana gelmiştir(Şekil 1.11).



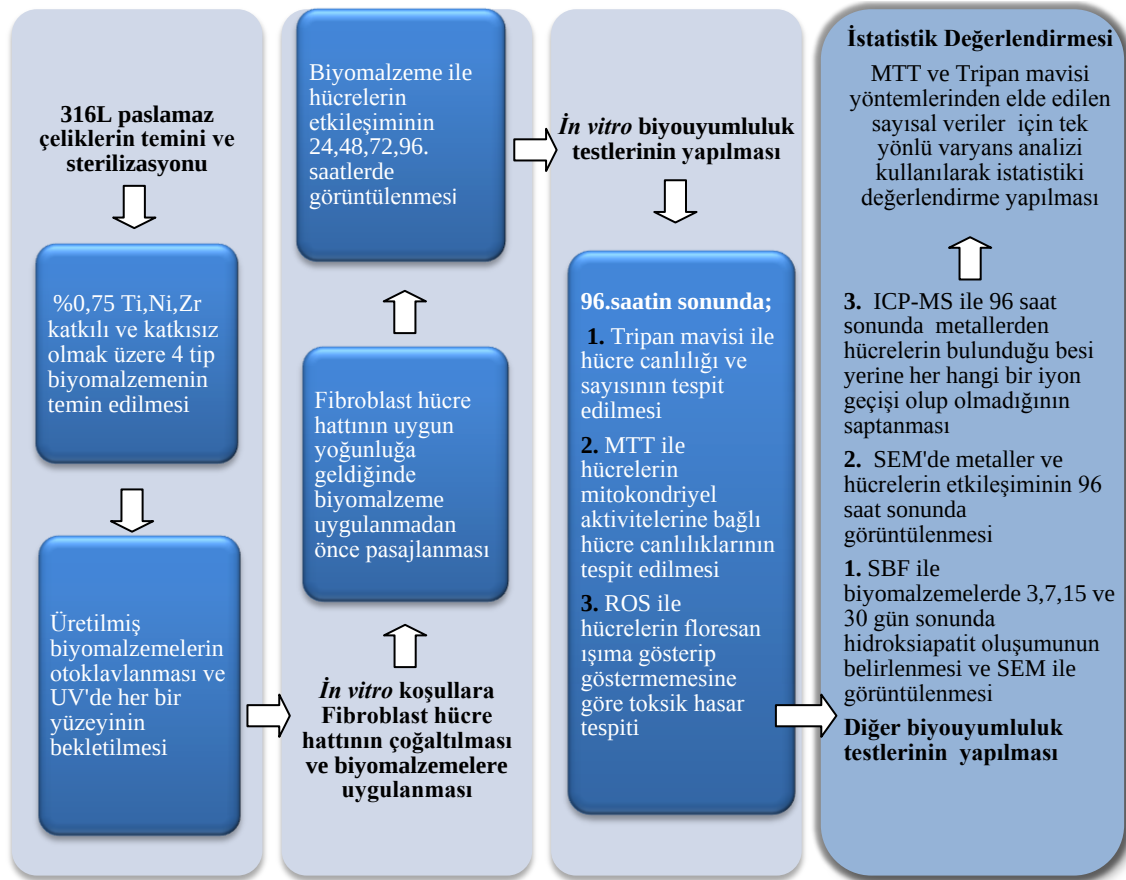
Şekil 1.11: SBF sıvısı içinde tutulan bir metalde hidroksiapatit oluşumu [46].

SBF test tekniği kullanılarak biyomalzemelerin korozyon dayanımını incelemek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bazı çalışmalar şöyledir: Wang ve ark. [128] medikal uygulamalarda kullanılan 316L paslanmaz çeliği zirkonyum karbonitrat kaplayarak SBF sıvısı içindeki korozyon dayanımını araştırmış ve kaplanmış 316L'nin korozyon direncinin arttığını belirtmişlerdir. Yazıcı ve ark [129] farklı sıcaklıklarda nitrillenmiş 316L'nin korozyon direnci üzerine 3, 7, 21 ve 30 günlük SBF test tekniği çalışmış ve nitrilleme işleminin korozyon dayanımını arttırdığını izlemişlerdir. Korozyon

dayanımı, hidroksiapatit oluşumuyla yani SBF testi ile ilişkilidir. Hidroksiapatit kristallerinin oluşumu artması biyomalzeme uygulandığı bölge ile bütünleştiğini ve biyouyumlu olduğunu gösterir. Bu artışta kullanılan biyomalzemenin aşınmasını engelleyerek korozyona karşı direncinin arttırmaktır. Antunes ve ark. [130] TiCN kaplanmış 316L paslanmaz çeliklerde yapılan kaplamanın 30 günlük SBF testi sonucunda korozyon dayanımını arttırdığını belirtmişlerdir. Hiromoto ve ark. [131] kalsiyum fosfat ve hidroksiapatit kaplamanın magnezyum alaşımının korozyon dayanımı olumlu etkilediğini izlemiştir. Xue ve ark. [132] Ti-19Zr-10Nb-1Fe alaşımının korozyon özelliklerini araştırmış ve NiTi alaşımına göre bu demir katkılı alaşımın korozyon direncinin daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, biyomalzeme olarak kullanılacak ve farklı katkıları yapılarak üretilmiş 316L paslanmaz çeliklerinin *vitro* ortamda biyouyumları araştırıldı. Dört farklı özellikteki biyomalzemelerin hem hücre kültür ortamında 3T3 fibroblast hücre hattı kullanılarak, hem de laboratuvarında farklı test yöntemleri uygulanarak biyouyumluluk değerlendirilmesi gerçekleştirildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Tez çalışmasında izlenecek çalışma programı.

2.1316L Ostenitik Tip Paslanmaz Çelik (Biyomalzeme)

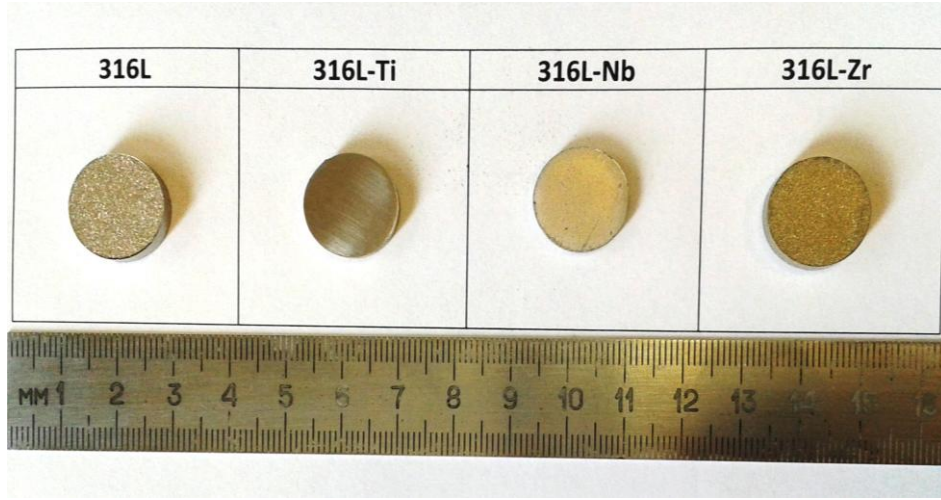
Bu tez çalışmasında biyomalzeme (vücut içinde kullanılan) ve biyomedikal malzeme (vücut dışında kullanılan) olmak üzere 316L ostenitik tip paslanmaz çelik malzemeler kullanıldı. 316L tipi paslanmaz çelikler, genel paslanmaz çelik türleri

içerisinde yüksek korozyon dayanımı ve mükemmel yakın düzeydeki biyoyum özelliklerinden dolayı uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. 316L paslanmaz çelik malzemeler gelişmiş bir üretim tekniği olan Toz Enjeksiyon Kalıplama (TEK) metodu ile Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği, Isıl İşlem Laboratuvarında üretilmiş olup fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Yeni üretilen Ti, Nb ve Zr katkılı 316L paslanmaz çeliklerin boyut ve karakteristik özellikleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo2.1: 316L, Ti, Nb ve Zr tozlarının, toz karakteristiği.

Madde	316L	Zr	Nb	Ti
Üretici Firma	Osprey Metals	Alfa Aesar	Alfa Aesar	Alfa Aesar
Şekil	Küresel	Düzensiz	Düzensiz	Düzensiz
Parçacık Boyutu				
D ₁₀	4.41	1.95	3.01	2.35
D ₅₀	12.01	6.97	8.21	7.81
D ₉₀	27.70	26.72	25.62	30.2
Saflık, %	--	99.9	99.9	99.9

316L paslanmaz çeliklerin içerisine belirli oranlarda ilave edilen elemental Ti, Nb ve Zr ile malzemelerin performansları artmıştır fakat biyoyumluluklarında değişim olup olmadığı bilinmemektedir. Biyoyum özelliklerinin belirlenebilmesi için 1.6cm çapında dairesel olarak hazırlanmış ve yüzeyleri parlatılmış numuneler, hücre kültür çalışmaları için temin edildi (Şekil 2.2 ve Tablo 2.2). Çalışmamıza kontrol grubu (besiyeri+hücre) yanı sıra karşılaştırma yapılabilmesi için 316L (biyoyumlu olduğu bilinen) grubu da dahil edildi.



Şekil 2.2: Kullanılan biyomalzemenin genel görünümü.

Tablo 2.2: 316L paslamaz çeliğin ve kullanılan biyomalzemelerin (%w) kimyasal bileşenleri.

Element	316L-Ti	316L-Nb	316L-Zr
Krom(Cr)	16.0-18.0	16.0-18.0	16.0-18.0
Nikel (Ni)	10.0-14.0	10.0-14.0	10.0-14.0
Molibden(Mo)	2.00-3.00	2.00-3.00	2.00-3.00
Karbon(C)	0.030	0.030	0.030
Mangan(Mn)	2.00	2.00	2.00
Fosfor(P)	0.045	0.045	0.045
Sülfür(S)	0.03	0.03	0.03
Silikon(Si)	0.75	0.75	0.75
Azot(N)	0.1	0.1	0.1
Demir(F)	Yeterli	Yeterli	Yeterli
Titanyum(Ti)	0.75	–	–
Niyobyum(Nb)	–	0.75	–
Zirkonyum(Zr)	–	–	0.75

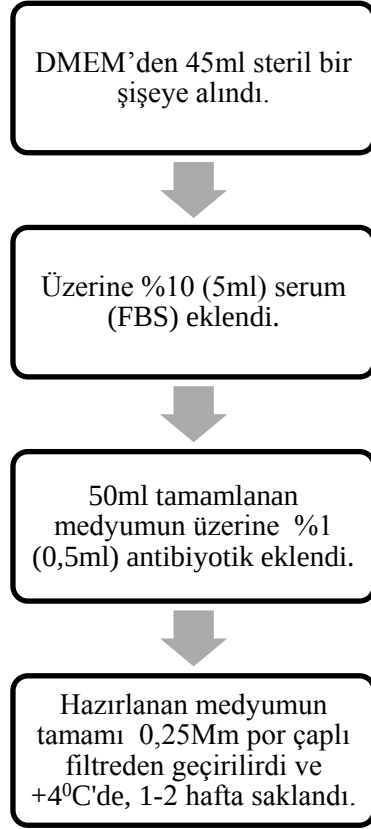
2.2. 3T3 Fare Fibroblast Hücre Kültürü

Araştırmamızda 3T3 hücre hattı (ATCC, ABD) kullanıldı. Hücreler öncelikle, 25 cm²'lik flasklarda (TPP, İsviçre) %10 serum (FBS, Gibco, İtalya) ve %1 antibiyotik [Penicillin-streptomisin (Gibco, İtalya)] içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, İtalya) ortamında kültüre edildi. Hücreler, 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 hava içeren %95 bağıl nemli ortamın sağlandığı etüvde (Heraeus, Almanya) inkübe edilerek çoğaltıldı. Hücreler, monolayer (tek tabaka) olarak çoğaltıldıktan ve kültür kabının tabanındaki yüzeyi tamamen kapladıktan sonra pasajlandı. Hücrelerin üremeleri ve kültür kabının yüzeyini kaplayıp kaplamadıkları Faz-Kontrast mikroskobu (Olympus CKX41) kullanılarak gözlemlendi.

Hücre pasajı yapılmadan önce 25 cm²'lik kültür kabı öncelikle PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl 1,44 g Na₂HPO₄) (Amresco, ABD) ile 2 kere yıkandı. Daha sonra, Trypsin-EDTA Solüsyonu (Gibco, İtalya) ilave edilerek ve 2-4 dakika beklendi. Tripsinin proteolitik etkisi ile birlikte hücreler yüzeyden kaldırıldı ve cDMEM (serum ve antibiyotik eklenmiş besiyeri) içerisine alınan bu hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi (NF200, Nüve, Türkiye) sonra oluşan süpernatant uzaklaştırıldı. PBS tamponu ile tekrar yıkanarak santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edildi. Peletin üzerine, hücre miktarına göre 5-8 mL besiyeri ilave edilerek süspansiyon haline getirilen hücreler, biyouyumluluk testlerini gerçekleştirmek amacı ile 6 kuyucuklu kültür kaplarına (TPP, İsviçre) ekildi. Yapılan tüm bu işlemler steril kabinde (Esco Class II Type A2, Esco Micro, Singapur) gerçekleştirildi.

2.3 Besiyeri Hazırlanması

3T3 fare fibroblast kültür hücreleri, Dulbecco Modified Eagle Medyumu (DMEM) içinde çoğaltıldı. DMEM sıvı besiyerinin kullanılabilmesi için içerisine antibiyotik ve FBS belirli miktarlarda eklenerek tamamlanmış kültür ortamı hazırlandı (cDMEM). Bu medyumdan 50 ml hazırlamak için Şekil 2.3'de ki basamaklar uygulandı.



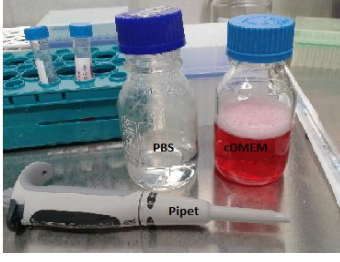
Şekil 2.3: Kültür medyumunun hazırlanması.

2.4 Hücre Hattının Pasajlanması

Monolayer kültür halinde üreyen hücreler üredikleri yüzeyde belirli yoğunluğa ulaştıkları zaman buradan alınarak başka kültür kaplarına ekilmeleri yani alt kültür yapılabilmesi için pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Bu çalışmada kullanılan 3T3 fibroblast hücrelerinin pasajlanma aşamaları aşağıda verilen sıraya ve Şekil 2.4'e göre yapıldı.

1. Hücre besiyeri cDMEM ve tampon çözelti PBS su banyosunda 37°C'ye ısıtılarak hücreler ile aynı sıcaklıkta olması sağlandı. Hücreleri kültür kabından ayırmak için kullanılan Tripsin-EDTA (%0,25) çözündürüldü.
2. Hücreler CO₂ inkübatöründen (37°C, %95nem, %5CO₂) çıkarıldı ve faz-kontrastmikroskopunda yoğunlukları incelendi.

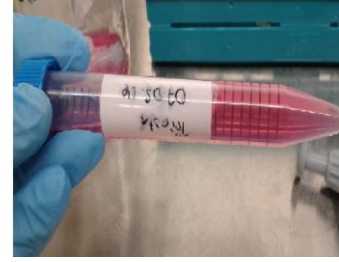
3. Kültür kabı dik konuma getirildi, hücre tabakasının olduğu yüzeyle pipetdeğdirilmeden eski besiyeriuzaklaştırıldı.
4. Kültür kabının alt köşesine 2ml PBS eklenerek kültür kabı ve hücreler eski besiyerinden uzaklaştırılıp yeni eklenecek solüsyona hazırlanmış oldu.Bu işlem iki kere tekrarlandı.
5. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılabilmesi için ortama 1ml tripsin-EDTA eklendi ve kültür kabı tekrar 2-3 dakika CO₂ inkübatörüne konularak hücrelerin daha hızlı ayrılması ve tripsin reaksiyonundan daha az zarar görmesi sağlandı.
6. Mikroskopta,hücrelerin kültür kabından ayrıldığı gözlendiğinde, kültür kabına2ml cDMEMeklenerek tripsin reaksiyonu durduruldu.
7. Hücrelerin tripsin ve besiyerinden ayrılması için 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek pelet haline gelmesi sağlandı.
8. Pelet tüpün tabanında bırakılacak şekilde süpernatant (tripsin ve cDMEM) uzaklaştırıldı.
9. Hücre pelletinin üzerine 1ml PBS eklenerek pipetaj yapıldı. PBS ile yıkanan hücrelerin tamamen tüm solüsyonlardan arındırılması için, 1500rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, kalan peletin üzerine 1ml cDMEM eklenerek pipetaj yapıldı ve hücre süspansiyonu şeklinde pasaja hazır hale getirildi.
10. Hücre sayımı yapılarak fibroblast hücre hattı için uygun ekim yoğunluğunda (hücre sayısı=3×10⁵) olacak şekilde yeni kültür kaplarına önce 3-5 ml cDMEM sonrada yaklaşık 1ml kadar hücre süspansiyonundan eklenerek pasajlandı.
11. Kültür kapları üzerine hücre hattı ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazıldı. Kültür kabı tekrarCO₂ inkübatörüne (37 C ve %5CO₂) yerleştirildi.



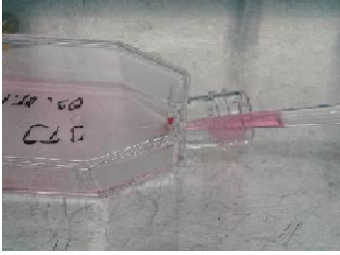
Su banyosunda 37⁰ C’de PBS ve cDMEM ısıtıldı.



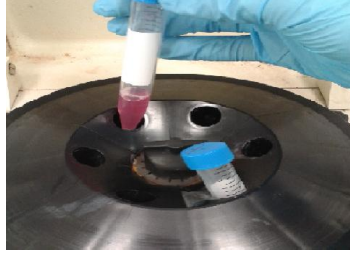
Hücrelerin yoğunlukları faz-kontrast mikroskobunda incelendi.



2ml PBS eklendi ve 1ml tripsin eklenerek hücrelerin kalkması gözlemlendi.



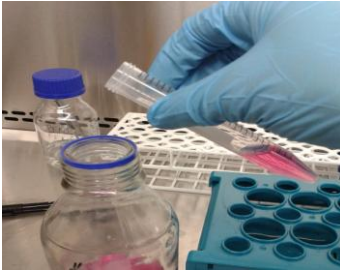
2ml cDMEM eklenerek tripsin reaksiyonu durduruldu.



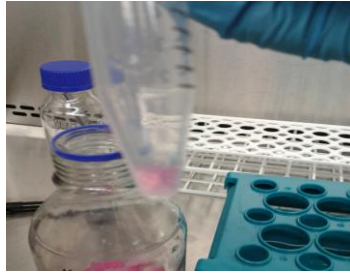
Flastaki hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alındı.



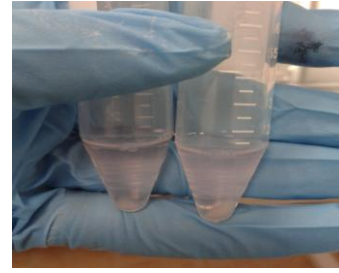
1500 rpm’de 5dakika santrifüj edilir.



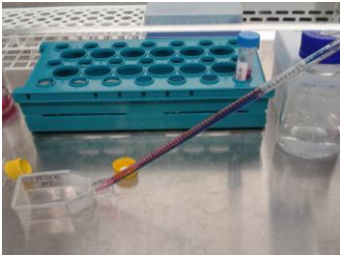
Süpernatant atıldı.



1ml PBS eklenerek pipetaj yapıldı. 1500rpm’de 5dakika santrifüj edildi.



1ml cDMEM ile pipetaj yapılarak süspansiyon haline getirildi.



Flasklara 3-5ml cDMEM eklendi.



Hücreler sayıldı ve her flaska 3×10⁵ olacak şekilde eklendi.



Pasajlanan hücreler CO₂ etüvüne konuldu.

Şekil 2.4: Hücre hattının pasajlanma aşamaları.

2.5 Biyolojik ve Kimyasal Testler:

2.5.1 Tripan mavisi testi

Çalışmamızda uygulanacak biyolojik test yöntemlerinden ilki, tripan mavisi boyası ile hücre membran geçirgenliğinin canlılığa bağlı ölçülmesidir. Bu test için üretici firmanın kılavuzunda ki prosedür uygulandı (TC10, Biorad, ABD). Ayrıca Oktar [107] ve Catauro ve ark. [108]'den de yararlanılarak optimize edildi.

Canlı ve ölü hücreleri belirleyen membran geçirgenliğinin ölçülmesi için, hücre zarını geçebilen tripan mavisi ile hücreler boyandı ve sayıldı. Bu testin uygulanması için gerekli gereçler ve yöntem Tablo2.3ve Şekil 2.5'de verildi.

Tablo: 2.3: Tripan mavisi yönteminde kullanılan gereçler.

Gereçler		Marka adı
Kimyasallar	PBS	Amresco
	Tripan Mavisi	Gibco
	DMEM (besiyeri)	Gibco
	Tripsin-EDTA	Gibco
Aletler ve sarf malzemeleri	Mikrosantrifüj tüpleri	TPP
	6 kuyucuklu hücre kültür kapları	TPP
	Pipetörler, uçlar	Rainin
	Hücre sayıcı (TC10)	BioRad
	Faz kontrast mikroskop	Olympus
Hücre hattı	3T3 fare fibroblast hücresi	ATTC

Hücreler ekildikleri 25T kültür kaplarında yeterli yoğunluğa eriştiklerinde kültür kaplarından biri alınarak tripan mavisi testi uygulaması için kullanıldı. Tripan mavisi testi için 96 saatlik hücre-malzeme etkileşimi 6 kuyucuklu kültür kaplarında çift tekrarlı olarak uygulandı. 6 kuyucuklu kültür kaplarına sayısı bilinen hücrelerin eşit miktarda aktarılabilmesi için; daha önce belirtilen pasajlama yöntemine göre 25T kültür kabında bulunan hücreler 1ml'lik süspansiyon haline getirildi. Bu karışım içinden 100µl yeni bir endorfa alındı ve üzerine 100µl tripan mavisi eklenerek pipetaj yapıldı. Karışım içinden 10µl alındı ve hücre sayım cihazında (TC10, Biorad, ABD) ortalama 1×10^6 adet

hücre sayıldı. 1ml'lik hücre süspansiyonuna 9ml cDMEM eklenerek toplam hacim 10ml'ye tamamlanarak hücre seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltme ile elde edilen 10ml'lik süspansiyondan 1ml alındığında içinde 1×10^5 hücre olması sağlandı.

Tez çalışmasında değerlendirmeyi planladığımız toplam 4 grup biyomalzeme ile pozitif (H_2O_2) ve negatif kontrollerle (cDMEM) birlikte 6 grup oluşturuldu. Tüm biyomalzemelerin ön ve arka yüzü UV'de 24 saat steril edildikten sonra, kültür kaplarına yerleştirildi ve kuyucuklar işaretlendi. Her bir kuyucuğa 2,5ml cDMEM ve belirtildiği gibi hazırlanan 10ml'lik hücre süspansiyonundan 500µl konularak kuyucukta 5×10^4 hücre olması sağlandı ve toplam hacim 3ml'ye tamamlandı. Kültür kapları CO_2 inkübatörüne konularak inkübasyona bırakıldı. 24, 48, 72 ve 96 saat sonra faz-kontrast mikroskopta biyomalzeme ile etkileşimleri incelenerek hücrelerdeki değişiklikler ve proliferasyonları izlendi. 96. saatin sonunda canlılık testi için kuyucuklardaki medyumlar aspire edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 1ml tripsin eklenerek hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılması sağlandı. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 2ml cDMEM eklendi ve biyomalzemeler çıkartıldı.

Kuyucuklarda kalan tüm besiyeri pipet yardımıyla toplandı, her biri ayrı ayrı 15ml'lik santrifüj tüplerine konuldu ve 5 dakika 1500rpm'de santrifüj edildi. Tripsin içeren süpernatant atıldı ve peletin üzerine 1ml PBS eklenerek pipetaj yapıldı, bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Her tüpte kalan peletin üzerine 600µl PBS eklendi.

Her tüp sayısı kadar hazırlanan ependorfların içine 100µl tripan mavisi ve hücre solusyonundan 100µl eklenerek pipetaj yapıldı. Bu karışımın içinden 10µl alınarak hücre sayım cihazına yüklendi (Şekil 2.5). Hücreler tripan mavisi ile 1:1 seyreltme oranından sayıldığından cihazda okunan değer iki ile çarpılarak gerçek hücre sayısı elde edildi. Ölçümler her bir ependorf için 3 kere tekrarlandı ve tekrarlanan bu ölçümlerin ortalaması alınarak hücre sayısı belirlendi. Böylelikle her bir kuyucukta biyomalzeme etkileşimine bağlı hücre sayısı değişimi cihaz ile saptanmış oldu. Canlılık oranları her numune için yapılan 3-5 ölçümün ortalamasının alınması ile hesaplandı.



Şekil 2.5: Tripan mavisi test aşamaları (<http://www.nebiogroup.com/>).

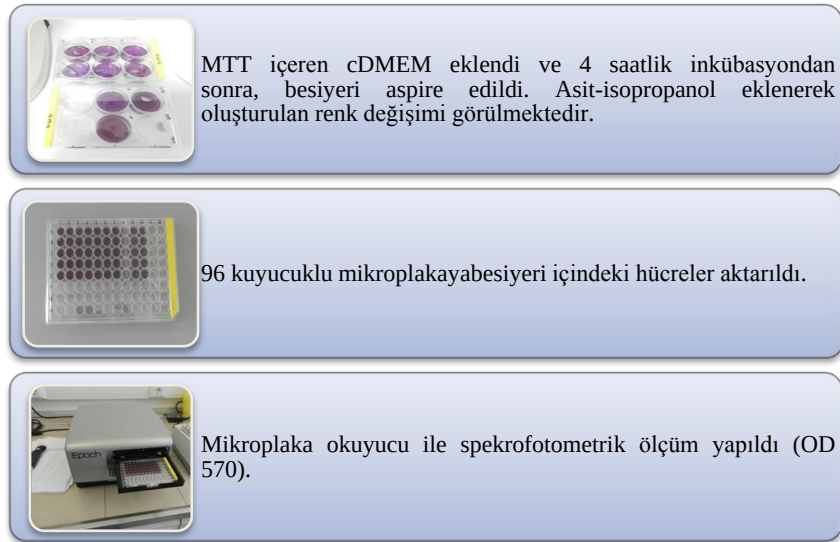
2.5.2 MTT testi

In vitro uygulanacak ikinci yöntem ise enzimatik testlerden olan MTT testidir. MTT mitokondriyel aktivitenin ölçüldüğü bir çeşit hücre kültür test tekniğidir[40-42]. Bu testin uygulanması için gerekli gereçler ve yöntem aşağıda Tablo 2.4 ve Şekil 2.6'de verildi.

Tablo 2.4: MTT testi için gerekli kimyasal ve cihazlar.

	Gereçler	Marka adı
Kimyasallar	PBS	Amresco
	MTT solusyonu	Sigma
	DMEM (besiyeri)	Gibco
	Tripsin-EDTA	Gibco
	Asit-İzopropanol	Gibco
Aletler ve sarf malzemeleri	Mikrosantrifüj tüpleri	TPP
	6 kuyucuklu hücre kültür kapları	TPP
	96'lık plaklar	TPP
	Pipetörler, uçlar	Rainin
	Faz kontrast mikroskop	Olympus
	Mikroplaka okuyucu	Epoch
Hücre hattı	3T3 fare fibroblast hücresi	ATTC

Bu testte kullanılacak 10ml MTT stok solusyonunun hazırlanması için 50mg toz halde bulunan MTT, 10ml PBS içinde çözündürüldü. Filtreden geçirilip, kullanılacağı zamana kadar -20° C’de saklandı. Çalışmada kullanılacak MTT için 10ml hazırda bulunan stok çözeltisinden 1ml ayrı bir tüpe alınarak üzerine 9ml cDMEM eklendi. Durdurucu solüsyon olan asit-isopropanol hazırlamak için 20ml asit-isopropanolun içine 200µl 4N HCl [2,5ml distile suyun içine 7,5ml HCl (37°C)] eklendi. Hücreler ile metallerin belirtildiği gibi 96 saatlik etkileşiminden sonra 6 kuyucuğun her birine, 0,5mg/ml MTT içeren cDMEM(1-2ml)’den eklendi. 3-4 saat kadar 37°C ve %5CO₂’de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra kuyucuklardaki eski medyum atıldı. Her bir kuyucuk 1ml PBS ile yıkandı ve yıkama işlemi bitince kuyucuklardan aspire edildi. Kuyucuklara 2ml kadar asit-isopropanol eklendive karışması sağlandı. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptamaktadır [68,106]. Asit izopropanol ekledikten 10 dakika sonra formazan kristalleri çözünerek renk değişimini sağladı (Şekil2.6). Renk değişiminin gözlenmesinin ardından 96’lık mikrolakaya, her bir kuyucuğa 200µl olacak şekilde, yüklendi. Ayrıca ayrı bir kuyucuğa 200µl asit-isopropanol konularak kör tüp oluşturuldu ve tüm plak, plak okuyucuda (Epoch, BioTek, ABD) OD570nm’de üç tekrarlı olarak okutuldu.



Şekil 2.6: MTT yönteminin uygulama aşamaları.

Elde edilen optik yoğunluklar ile hücrelerin % canlılık değerleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = 100 \times \frac{\text{Test gruplarının optik yoğunluğu}}{\text{Kontrol gruplarının optik yoğunluğu}}$$

2.5.3 ROS testi

Sitoksisite değerlendirmesinde kullanılan bir diğer yöntem ise ROS (reaktif oksijen türevleri) tekniğidir. Biyomalzemelerin hücrelerde ortaya çıkarttığı reaktif oksijen türevleri (ROS) oksidatif strese ve inflamasyona neden olurken lipitler, proteinler ve DNA üzerinde çeşitli hasarlar meydana getirir. Bütün bu belirteçler reaktif oksijen türevlerinin meydana geldiğini ve hücreye zarar verdiğini göstermektedir. Reaktif oksijen türevleri DCFH-DA (2'7'Dichlorofluorescein diacetate) adlı bir kimyasal aracılığı ile ölçülür. Bu kimyasal hücre dışında inaktif olup hücre içine girdiği zaman floresans ışıma verir. Floresans ışıma ne kadar çok ise ROS oluşumu da o kadar çoktur [49]. Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz bu test yöntemi üretici firmanın (Sigma) prosedürüne göre uygulandı. Floresan mikroskopunda (Olympus BX51) 485-535 nm dalga boyu aralığında görüntüler elde edildi. Gerekli kimyasallar ve gereçler Tablo 2.5'de verildi.

Tablo 2.5: ROS için gerekli kimyasallar ve cihazlar.

Gereçler		Marka adı
Kimyasallar	PBS	Amresco
	DMEM (besiyeri)	Gibco
	DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
	DCFH-DA (2'7'Dichlorofluorescein diacetate)	Sigma
Aletler ve sarf malzemeleri	Mikrosantrifüj tüpleri	TPP
	6 kuyucuklu hücre kültür kapları	TPP
	96'lık plaklar	TPP
	Pipetörler, uçlar	Rainin
	Faz kontrast mikroskop, floresan ataçmanı	Olympus
Hücre hattı	3T3 fare fibroblast hücresi	ATTC

Öncelikle stok ROS solusyonu hazırlandı, bunun için; 50mg DCFH-DA 10ml DMSO içinde çözündürüldü. Karışımdan 50µl alınarak 5ml PBS'te seyreltilerek 100µM solüsyon oluşturuldu. Hazırlanan DCFH-DA 1ml ependorflara ayrılarak -20° C'de saklandı ve uygulama aşamasında her bir uygulama için 50µl DCFH-DA kullanıldı. Tripan mavisi yönteminde olduğu gibi 96. saatlik uygulama sonrası tripsinizasyon yapıldı ve bu reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa 2ml cDMEM eklendi. Her kuyucuktan pipet yardımıyla hücreler ayrı ayrı santrifüj tüplerine aktarıldı ve 5 dakika 100rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve pelet kısmına 1ml PBS eklenip yıkanarak santrifüj edildi. PBS uzaklaştırıldı ve kalan pelletteki hücrelere 600µl PBS eklenerek yeniden çözündürüldü. Hücre süspansiyonundan 450µl alındı ve 50µl DCFH-DA'dan eklenerek 60 dakika 37° C'de etüvde (%5 CO₂) inkübasyona bırakıldı. 60 dakikanın sonunda 500µl PBS eklenerek pipetaj yapıldı ve 5 dakika 1500rpm'de santrifüj edildi (bu işlem iki kere tekrarlandı). Üst kısım atıldı, pelet kısmındaki hücreler lamın üzerine alınarak floresan mikroskop altında incelenip ışımaya yapıp yapmadıklarına bakıldı. Pozitif kontrol için besiyerine 10uM hidrojen peroksit (H₂O₂) eklenerek, negatif kontrol için ise sadece besiyerinde inkübe edilen fibroblast hücreleri kullanıldı. [49].

2.5.4 SEM testi

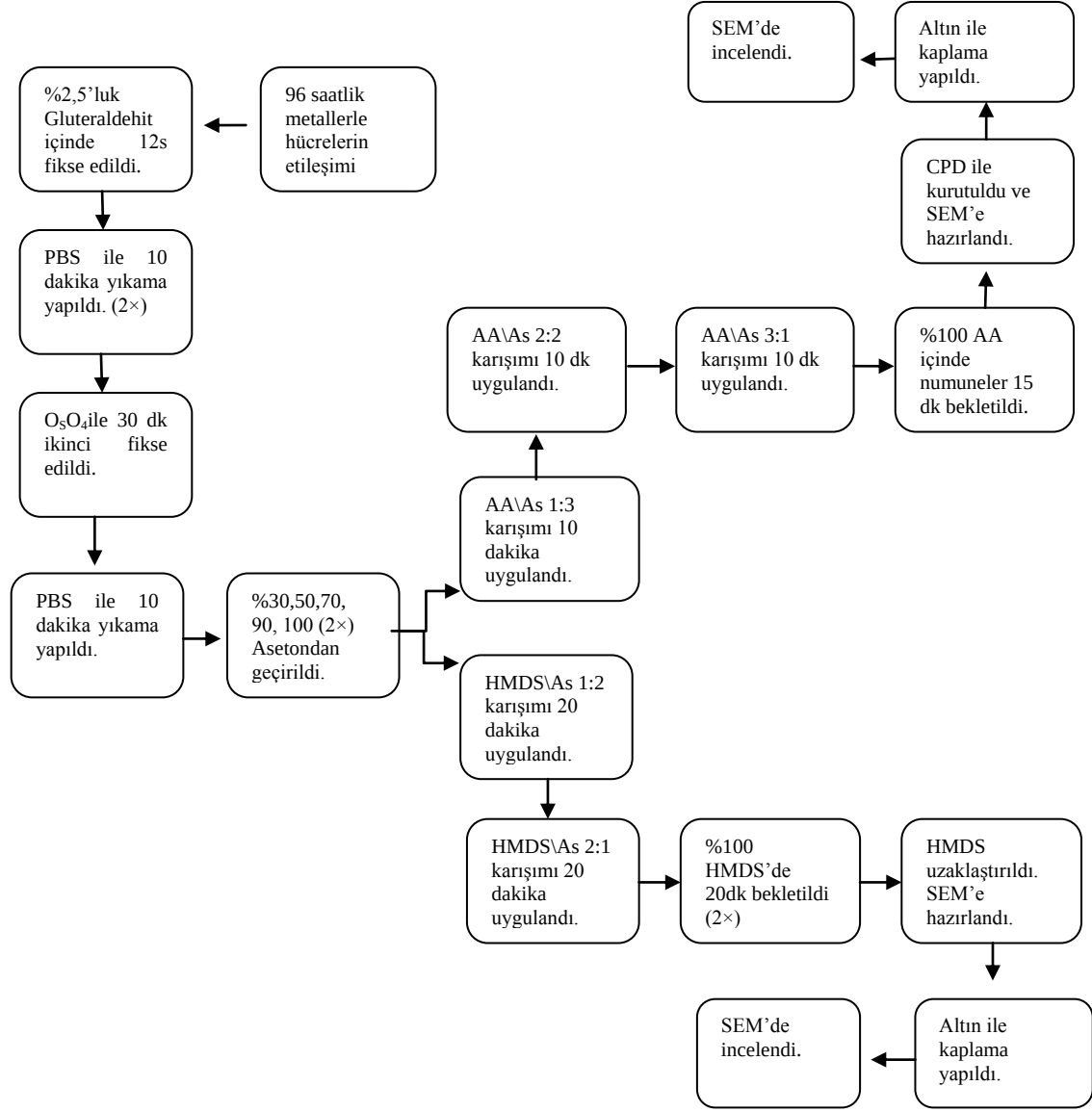
Biyomalzemelerin fare fibroblast hücreleri ile 96 saatlik etkileşimleri sonunda, hücre-metal ilişkilerinin gösterilebilmesi için SEM incelemesi yapıldı. Bu sayede biyomalzemelerin hücrelerin morfolojileri üzerinde nasıl bir etki yaptığı ortaya konuldu. SEM tekniği ile hücre morfolojilerini incelemek için gerekli gereçler Tablo 2.6'da verildi.

Daha önce belirtildiği gibi 96 saat sonunda hücre ve biyomalzemelerin etkileşimi ile kuyucuklarda bulunan besi yerleri bir pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Kuyucukların her birine %2,5'luk gluteraldehit konularak 12 saat süresince ön fiksasyon yapıldı ve böylece hücreler tutundukları yüzeylerde sabitlendi. 2 kere 10 dakika süresince PBS tamponu ile yıkandı. Osmium tetraoksit (%1) ile 30 dakika ikinci fiksasyon yapıldı. Örnekler sırasıyla 15-20 dakika aseton serilerinden [% 30'lik, - %50'lik, - % 70'lik, % 90'lik (2×), 100'lük (2×)] geçirilerek dehidrasyonları sağlandı.

Tablo 2.6: SEM için gerekli kimyasallar ve cihazlar.

Gereçler		Marka adı
Kimyasallar	PBS	Amresco
	Gluteraldehit (%2,5)	Ted Pella
	DMEM (besiyeri)	Gibco
	Osmium tetraoksit (O ₈ O ₄) (%1)	Sigma
	Aseton (As)	Merck
	Amilasetat (AA)	Merck
	HMDS(hexamethyldisilazane)	Sigma
Aletler ve sarf malzemeleri	Pipetörler, uçlar	Rainin
	Kritik nokta kurutucusu (CPD)	705I, Quorum
	SEM (taramalı elektron mikroskopu)	FEISirion
Hücre hattı	3T3 fare fibroblast hücresi	ATTC

Kritik nokta kurutucusu (CPD, 705I, Quorum, İngiltere) ile metaller üzerindeki hücrelerin kurutma işlemi gerçekleştirildi. Bunun için yüksek basınç haznesinin yarısı amilasetat ile dolduruldu ve örnekler yerleştirildi. Tüm vanalar kapatıldı ve CO₂ ile hazne dolduruldu. Hazne sıcaklığı 5°C' ye ayarlandı. 5 dakika sonra gaz çıkışı vanası açılarak hazne boşaltıldı. Gaz doldurma ve gaz boşaltma işlemi 7-8 defa tekrarlandı. Amilasetatın tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığı, gaz çıkışı vanasına tutulan kağıt mendil ile kontrol edildi. Koku hissedilmediğinde haznenin yarısına kadar CO₂ gazı bulurken, haznenin ısıtıcı sistemi çalıştırılıp, ısı 40°C'ye yükseltildi. Isıtma düğmesi 45°C'ye getirilip gaz çıkış vanası açıldı ve gaz yavaşça boşaltıldı. Bu işlem sonunda hücreler tamamen kurutuldu [56-58]. Kurutma işlemi kritik nokta kurutucusu dışında HMDS (hexamethyldisilazane) kullanılarak da ayrıca gerçekleştirildi. Kurutulmuş hücreler SEM ile incelemenden önce iletkenlik sağlanabilmesi için kaplama cihazında (Sputter Coating, Polaron, SC7640) 60 saniye (30 miliamper) boyunca altın ile kaplandı. Hazırlanan örnekler FEI Sirion marka taramalı elektron mikroskopunda incelendi. Çalışmalar 1,3kv voltaj değerinde gerçekleştirilip, metal yüzeyine adhere olmuş hücrelerin fotoğrafları çekildi.



Şekil 2.7: SEM tekniğinin uygulanma aşamaları.

2.5.5 ICP-MS Testi

Biyomalzemelerden besiyerine yani ortama salınan iyonların tespit edilebilmesi için ICP-MS tekniği uygulandı. Bu teknikte besiyerine geçiş yapan iyonların iyonlaşma enerjileri cihazda kullanılan Argonun iyonlaşma enerjisinden küçük olduğu için geçiş

yapan elementler (Cr, Co, Fe, Ti, Nb, Zr) plazma içerisinde pozitif iyonlara dönüşürler. Bu dönüşüm sayesinde besiyerindeki iyonların miktarı tayin edilmiş olur [104].

ICP-MS test tekniği, biyomalzemeler ile hücrelerin 96 saatlik etkileşimlerinin ardından, biyomalzemelerin aşınmasına bağlı besiyerindeki iyon çeşitleri ve miktarları saptandı. Biyomalzemeler besiyeri içinden çıkartıldı ve her bir besiyeri analize gönderilmek üzere ayrı ayrı tüplere konuldu, etiketlendi ve +4°C’de muhafaza edildi. Mersin Üniversitesi, Jeoloji Mühendisliği, Çevre Jeokimyası Laboratuvarına gönderildi. Burada, analizi yapılan besiyerlerindeki elementler ICP de iyonlaştırıldıktan sonra kütle spektroskopisine (MS) gönderildive kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılarak ölçüldüler. Böylece biyomalzemelerden besiyerine geçiş yapan iyonların miktarı tespit edilmiş oldu.

2.5.6SBFtesti

Biyomalzeme yüzeyinde hidroksiapatit oluşumunun gösterilmesi için örnekler SBF sıvısı içerisinde, 37°C’de inkübe edildi. Hergün SBF sıvısı yenilenilerek, mümkün olduğunca gerçek doku ortamı simüle edildi. 3,7,21 ve 30 gün devam eden bu işlemten sonra biyomalzeme üzerinde hidroksiapatit kalıntıları olup olmadığı SEM ile incelendi. Böylece biyomalzemenin *in vivo* kemik dokusuna benzer bir şekilde apatit oluşumuna izin verip vermediği gözlemlendi [50]. Bu testin uygulanması için gerekli gereçler ve yöntem aşağıda Tablo 2.7’de verildi. SBF (NaCl, KCl, CaCl₂.2H₂O, MgCl₂.6H₂O, NaHCO₃, K₂HPO₄.3H₂O, Na₂SO₄) distile su içinde çözülüp HCl ve tris (hydroxymethyl)-aminomethane [(CH₂OH)₃CNH₂] ile 37.5°C ve pH 7.4 de insan kan plazması ile aynı olacak şekilde, Kukubo ve arkadaşlarına göre 750ml distile su içerisinde hazırlandı [96,97]. Son olarak pH ayarlaması 1kmol/m³HCl (150ml distile su %34’lük sıvı HCl) yavaş yavaş eklenerek pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı. pH ayarlaması yapıldıktan sonra distile su eklenerek toplam hacim 1000ml’ye tamamlandı. Tüm süreler sonunda, örnekler SBF içinden çıkartılarak distile su ile yıkandı ve 1 gün boyunca 45°C’de kurutuldu. Apatit oluşumlarını en iyi gösteren 3 ve 30 günlere ait örnekler SEM’de görüntülenmek için kaplama aletinde altın ile kaplandı. Bu örnekler FEI Sirion taramalı elektron mikroskopunda incelenip, fotoğrafları çekildi.

Tablo 2.7: SBF hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Kimyasal	Yüzdelere ve Marka adı	Miktar
NaCl	% 99.5 Sigma	7.996 g
NaHCO ₃	% 99.5-100.3 Sigma	0.350 g
KCl	%99.5 Sigma	0.224 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	%99.0Sigma	0.228 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	%98.0Sigma	0.305 g
1kmol/m ³ HCl	87.28mL %35,4Sigma	40 cm ³
CaCl ₂	%95.0Sigma	0.278 g
Na ₂ SO ₄	%99.0Sigma	0.071 g
(CH ₂ OH)3CNH ₂	%99.9Sigma	6.057 g
1kmol/m ³ HCl	Sigma	pH 6,7

2.5.7 İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) programı ile yapıldı. Gruplardan elde edilen değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Verilerimizin değerlendirilmesinde normallik testi ve eşit varyans testi yapılarak, ONE-WAY ANOVA; Scheffe Post Hoc testi uygulandı. Bu değerlerin istatistiksel analizlerinde ve $p>0,05$ ve\veya $p>0,01$ 'in üstündeki benzerlikler anlamlı olarak değerlendirilirken, $p<0,05$ ve\veya $p<0,01$ 'in altındaki farklılıkları anlamlı olarak kabul edildi.

3.BULGULAR VE TARTIŞMA

In vitro biyoyumluluk testlerinin amacı, materyallerin canlı dokular üzerindeki biyolojik etkilerinin laboratuvar ortamında belirlenmesidir. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalar, deneye etki eden faktörlerin daha kolay kontrol edebilmesinden dolayı araştırmacılara büyük bir avantaj sağlamaktadır. Araştırmaların *in vitro* basamağında farklı hücre hatları kullanılmasına rağmen 3T3 hücre hatları, homojen morfolojileri ve büyüme karakteristiklerinin yanı sıra kolay bulunabilmeleri ve *in vitro* hücre kültürü koşullarında güçlü üreme özellikleri nedeni ile ISO standartları tarafından kullanılması önerilen hücrelerdendir [68].

Bu tez çalışmasında, 316L paslanmaz çelik içerisine farklı oranlarda elemental Ti, Nb ve Zr katkıları yapılarak üretilen biyomalzemelerin *in vitro* koşullarda biyoyum ve sitotoksite özellikleri 3T3 embriyonik fare fibroblast hücre hattı kullanılarak değerlendirildi. Sıklıkla kullanılan sitotoksite testlerinde, hücre ölümü ve hücre canlılığı en önemli değerlendirme kriteri olarak görülmektedir.

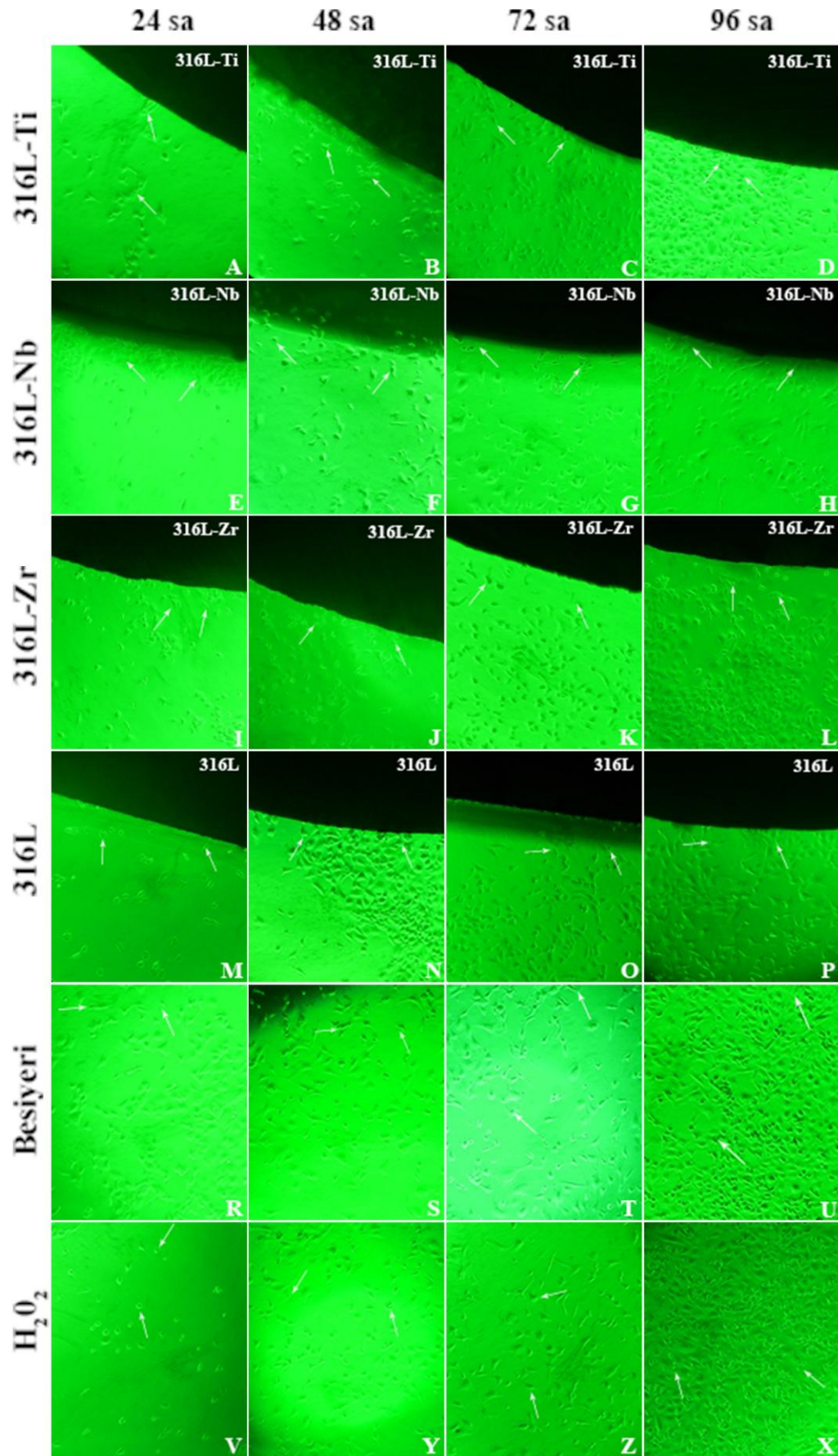
Daha önce yapılmış birçok araştırmada olduğu gibi, bu çalışmada da *in vitro* sitotoksite, süksinik dehidrogenaz (SDH) mitokondriyal enziminin aktivitesinin MTT testi ile ölçülmesiyle değerlendirildi. Buna ek olarak Tripan mavisi ile hücre canlılığı belirlendi ve ROS sitotoksite ve oksidatif hasar florimetrik olarak gösterilirken. SEM ile kullanılan biyomalzemelere tutunan hücreler incelendi. ICP-MS tekniği ile hücre kültür ortamına salınan iyon miktarı tespit edildi. Ayrıca *in vitro* testlerin dışındaki bu malzemelerin kan plazması ve inorganik maddeler arasındaki biyoaktivitelerinin sonucu gelişen korozyon dayanımının belirlenmesi için SBF sıvısı (simüle vücut sıvısı) içinde belirli zaman aralıklarında oluşan hidroksiapatit yapıları incelendi.

Literatürde 316L paslanmaz çeliğin biyoyumlu olduğuna dair birçok araştırma bulunmaktadır fakat günümüz yeni teknolojileri ile 316L'nin mekanik özelliklerini geliştirmek için Ti, Nb ve Zr katkıları henüz yapılmıştır. Bu katkıların 316L'nin biyoyumluluğunu nasıl etkileyeceği konusunda mevcut bir araştırma yapılmamış olup, bu çalışma ile literatürdeki bu eksiklik tamamlanacaktır.

3.1 Ti, Nb ve Zr Katkılı 316L Paslanmaz Çelik ile 3T3 Fibroblast Etkileşimlerinin Faz-Kontrast Mikroskobu ile Görüntülenmesi

Hücre kültür ortamında 3T3 fibroblast hücre hattının bu tez konusunu oluşturan biyomalzeler ile 24, 48, 72 ve 96 saat süresince etkileşimleri faz kontrast mikroskobu altında incelendi. Tüm örneklerle ve zamanlaraait görüntüler Şekil 3.1’ de verildi. Şekilde de görüldüğü gibi negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Ti katkılı 316L, Nb katkılı 316L ve Zr katkılı 316L gruplarındatüm zaman periyotlarında hücre sayısında benzer artışların olduğu gözlemlendi. Biyoyumlu olduğu bilinen katkısız 316L paslanmaz çelik grubunda da hücreler aynı oranda artış gösterdi. Toksik etkisi olduğu bilinen H₂O₂ uygulama grubunda ise hücrelerin öldüğü mikroskop incelemesi ile tespit edildi.

Bühler ve ark. [69] fibroblastların titanyum bazlı yüzeylere tutunmasını taramalı elektron mikroskobu ile görüntülemiş ve Ti alaşımı üzerinde hücrelerin oldukça fazla miktarda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Cui ve ark. [70] yaptıkları çalışmada Ni (nikel) kaplanmış alaşım yüzeylere oranla, NiTi kaplanmış metal yüzeylere 3T3 fibroblastların daha yoğun adhere olduklarını belirtilmiş ve faz kontrast mikroskobunda metal yüzeyler ile hücrelerin etkileşimini göstermişlerdir. Fibroblastlar biyomalzemeye tutunma eğilimde olan hücrelerdir ve Ti alaşımı herhangi bir toksik etki göstermediğinden, hücreler daha fazla adhere olmuştur. Çalışmamızda kullanılan Ti katkılı 316L ile fibroblastlar arasındaherhangi bir toksik etki gözlenmemesi bu çalışmalarla ilişkilendirilebilir. Nb ve Zr katkılı 316L ve 3T3 fibroblast hücreleri arasındaki etkileşim 316L-Ti ile farklılık göstermemiştir. Ti ile ilgili yukarıda bahsedilen çalışmalara paralel olan sonuçlarımıza bakarak diğer biyomalzemelerinde (Nb, Zr katkılı) en az 316L-Ti kadar biyoyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Papageorgiou ve ark. [71] mikron boyutta ki CoCr alaşımına, nano-CoCr alaşımı ile karşılaştırdıklarında, fibroblastların daha kolay uyum sağladığını ve mikron boyutta olan alaşımın daha az toksik etki yaptığını göstermişlerdir. Kullandığımız biyomalzemeler mikron boyutta hazırlanmış olup tüm örneklerde hücrelerin kontrol grubunu oluşturan fibroblastlar ile biyoyumluluğu bilinen 316L paslanmaz çelik ile yakın yoğunluklardabulunduğu ve cansız hücrelerin daha az olduğu görüntülendi (Şekil3.1).

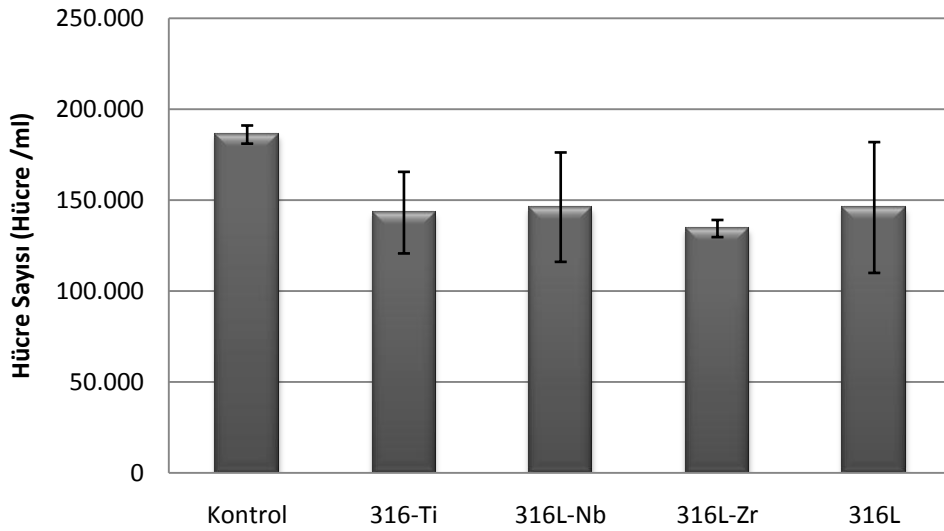


Şekil 3.1: 3T3 fibroblast hücre serisinin farklı biyomalzemeler ile etkileşimlerinin, faz kontrast mikroskopu görüntüleri; **A:**316L-Ti/24sa **B:** 316L-Ti/48sa **C:**316L-Ti /72sa **D:**316L-Ti/96sa **E:**316L-Nb/24sa **F:**316L-Nb/48sa **G:**316L-Nb/72sa **H:**316L-Nb/96sa **I:**316L-Zr /24sa **J:**316L-Zr/48sa **K:**316L-Zr/72sa **L:**316L-Zr/96sa **M:**316L/24sa **N:**316L/48sa **O:**316L/72sa **P:**316L/96sa **R:**Negatif kontrol/24sa **S:**Negatif kontrol/48sa **T:**Negatif kontrol/72sa **U:**Negatif kontrol/96sa **V:**Pozitif kontrol/24sa **Y:**Pozitif kontrol/48sa **Z:**Pozitif kontrol/72sa **X:**Pozitif kontrol/96sa.

3.2 Sitotoksite Belirlenmesi

3.2.1 Tripan Mavisi Yöntemi

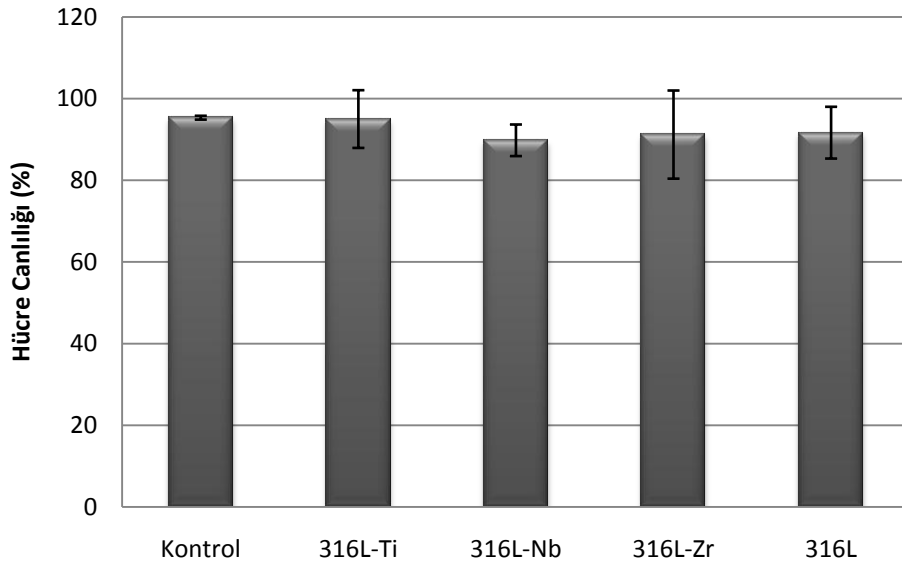
Tripan mavisi ile hücre boyanması, 96 saat süresince biyomalzemelerle inkübasyona bırakılan 3T3 fare fibroblast hücrelerinin canlılık veyüzde canlılığının saptanmasında kullanılmıştır. Bu analiz ile canlı ve ölü hücre oranları ile birlikte biyomalzemelerin sitotoksitesi belirlendi. Analiz sonucu elde edilen değerler aşağıda grafik halinde verilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: 96 saat sonunda kontrol ve uygulama gruplarındaki tripan mavisi ile tespit edilen hücre sayıları.

Kullanılan biyomalzemelerin hücre canlılık miktarları sırasıyla; Ti katkılı 316L 143.080 hücre\ml, Nb katkılı 316L 146.100hücre\ml, Zr katkılı 316L 134.333hücre\ml, katkısız 316L 145.900hücre\ml ve sadece hücrelerin bulunduğu grupta ise 186.000hücre\ml olarak saptandı. Tüm örneklerde hücre canlılığının birbirlerine çok yakın olduğu ayrıca biyouyumlu grup olarak kullanılan 316L ve metal ile etkileşime bırakılmamış hücrelerle de benzer olduğu görüldü ($p>0,05$). Tek yönlü varyans analizine göre tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Bunların yanında tüm örnekler arasında canlı hücre sayısı kontrol gruplarına en yakın olan Nb katkılı 316L'nin olduğu görüldü. Fakat bu fark kıyaslama yapılacak kadar büyük oranlarda olmadığından kullanılan tüm biyomalzemelerin sitotoksik etki göstermediğini söyleyebiliriz.

Hücrelerin yüzde canlılık oranları ise; (316L-Ti) %95, (316L-Nb) % 89,80, (316L-Zr) %91,20, kontrol grubu %95,33 ve (316L) %91,67 olarak saptanmıştır. Kontrol grubuna en yakın Ti katkılı 316Lbulundu.



Şekil3.3: Tripan mavisi testi hücre canlılığı yüzde sonuçlarının grafik ile gösterimi.

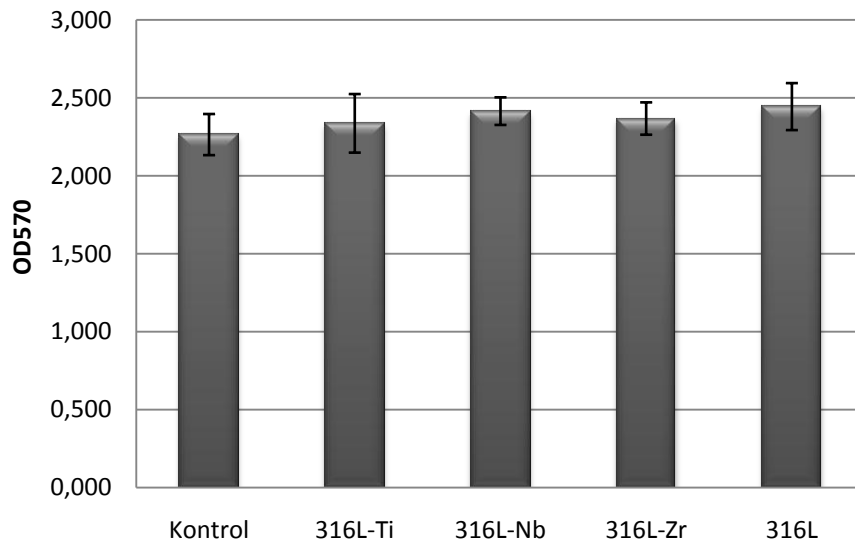
Akawaga ve ark. [72]yaptıkları çalışmalarındaTi ve Zr implantlarının hücre canlılık oranlarını karşılaştırmış ve iki grup arasında herhangi bir farklılık bulunmadığını tespit etmişlerdir.Bu araştırma ile benzer sonuçlar elde ettiğimiz tez çalışmamızda biyomalzeme gruplarında saptadığımız sonuçlar birbirleriyle ve kontrol grubu ile aralarında belirgin farklılıklar gözlenmedi ($p>0,05$). Fakat hücre sayısı bakımından Nb katkılı 316L çok az farkla biraz daha uyumlu bulundu. Sonuçlarımıza paralel olarak Cimpean ve ark.[73]hazırladıkları iki farklı Ti alaşımının 2,4 ve 7 günlük hücre canlılığınıincelemiş ve Ti katkılı olan alaşımın katkısız alaşıma oranla daha fazla hücre yoğunluğuna sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Hamzeh ve ark. [86] TiO_2 (titanyumdioksit)nanopartiküllerinin ve mikron boyuttaki alaşımın fibroblastlar üzerinde *in vitro* sitotoksik etkilerini tripan mavisi testi ile incelemişlerdir. Nanopartikül kaplanmış alaşımın en az sitotoksik etkiyi yaptığını belirtmişlerdir. Bu tezde mikron boyutta kullandığımız örneklerde herhangi bir sitotoksik etki tespit edilmedi.

3.2.2 MTT Testi

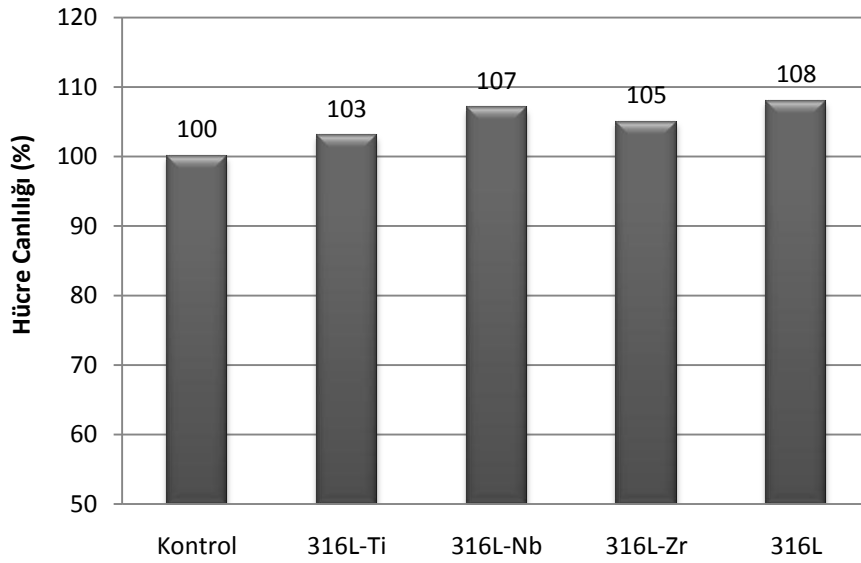
Biyomalzemeler ile 3T3 fibroblast hücre hattının 96 saatlik inkübasyonu sonrasında yapılan MTT testinde,kontrole göre tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). Ortalama absorbans değerleri(Δ); Ti katkılı 316L için 2,337nm, Nb katkılı 316L için 2,415nm, Zr katkılı 316L için 2,367nm, katkısız 316L için 2,444nm ve sadece hücrelerin bulunduğu negatif kontrol grubunda 2,265nm olarak ölçüldü (Şekil 3.4).Hücrelerin yüzde canlılık değerleri ise Ti katkılı 316L:%103, Nb katkılı 316L:%107, Zr katkılı 316L:%105, katkısız 316L:%108ve sadece hücrelerin bulunduğu negatif kontrol grubu için %100 olarak saptandı (Şekil 3.5).Verilere bakıldığında biyomalzeme uygulanmış gruplardan kontrole göre çok az yüksek sonuçlar elde edildi. Bunun sebebi ise, absorbans değerinin hücre yoğunluğuna göre farklılık göstermesi ve aynı maddenin iki, üç kez art arda ölçüldüğündefarklı sonuçlar elde edilebilir olmasıdır.Bu küçük sayısal farklılıklar göz önüne alınacak kadar anlamlı bulunmamaktadır ($p>0,05$).

MTT testi sonuçlarında kontrol grubuna göre diğer biyomalzemelerin mitokondriyel aktivitelerine bağlı hücre canlılıkları birbirleriyle ve kontrolle uyumlu

bulundu yani tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Issa ve ark.[75] gingival fibroblast hücre hattıyla yaptıkları çalışmada, MTT testine göre metallerin sitotoksik olmadıklarını söylemişlerdir. Sjögren ve ark.[76] yaptıkları çalışmada metal, metal alaşımları ve seramiklerin 3T3 fibroblast hücre hattı üzerine etkilerini araştırmış ve MTT testini kullanarak saf Ti ve Au (altın) metallerinin hafif sitotoksik olduğunu söylemişlerdir. Bu tezde kullandığımız 316L üzerine Ti, Nb ve Zr katkıları ağırlıkça%0,75 yani oldukça düşük oranlarda olması nedeniyle herhangi bir sitotoksikite oluşturmadığı görüldü.



Şekil 3.4: 570nm dalga boyunda 96 saat sonunda ölçülen MTT absorbans değerleri.



Şekil 3.5: 96 saat sonunda MTT testi ile hücre canlılığı sonuçları.

Möller ve ark.[77] Ti ve Zr implantlarının osteoblast hücreleriyle *in vitro* biyoyumlarını MTT yöntemiyle incelemiş ve hücre canlılıklarını %85-%100 olarak tespit etmiş ve iki malzeme arasında belirgin bir farklılık olmadığını söylemişlerdir. Yaptığımız MTT testinde Möller ve ark.[77] belirttiği gibi çalışmamızda da Ti katkılı 316L ve Zr katkılı 316L arasında oldukça benzer sonuçlar elde edildi. Bu sonuçlara göre 316L'ye yapılan Ti ve Zr katkılarının biyoyumlu olduğu ve biyoyumluluğu arttırdığı söylenebilir. MTT testinin kullanıldığı bir başka çalışmada Györgyen ve ark.[78] tarafından TiO_2 , Ti-lazerli ve Ti^{3+} implant malzemelerinin osteoblast hücre hattı ile *in vitro* biyoyumları araştırılmış ve tüm gruplar birbirleriyle çok yakın bulmuştur.

Subramanian ve ark.[79] 316L kaplanmış metalik ince cam filminin ($\text{Zr}_{38}\text{Cu}_{36}\text{Al}_8\text{Ag}_8$) ve 316L'nin MTT ile hücre canlılığını incelemiş ve hücre canlılıklarını %99-%100 olarak tespit etmişlerdir. Zr katkısı hücre canlılığını olumlu yönde etkilemiş ve çalışmamızda olduğu gibi 316L biyoyumlu bulunmuştur. Mansooriafor ve ark.[80] ortopedik implant olarak kullanılan nanoelmasların osteosarkoma ve L929 hücrelerine etkisini MTT testi ile incelemişlerdir. İki hücre hattı için sırasıyla canlılık yüzdeleri %95 ve %85 olarak belirlemişler ve hücre canlılığını osteosarkoma hücre hattında daha fazla olmasının sebebinin kemik orijinli olmasından

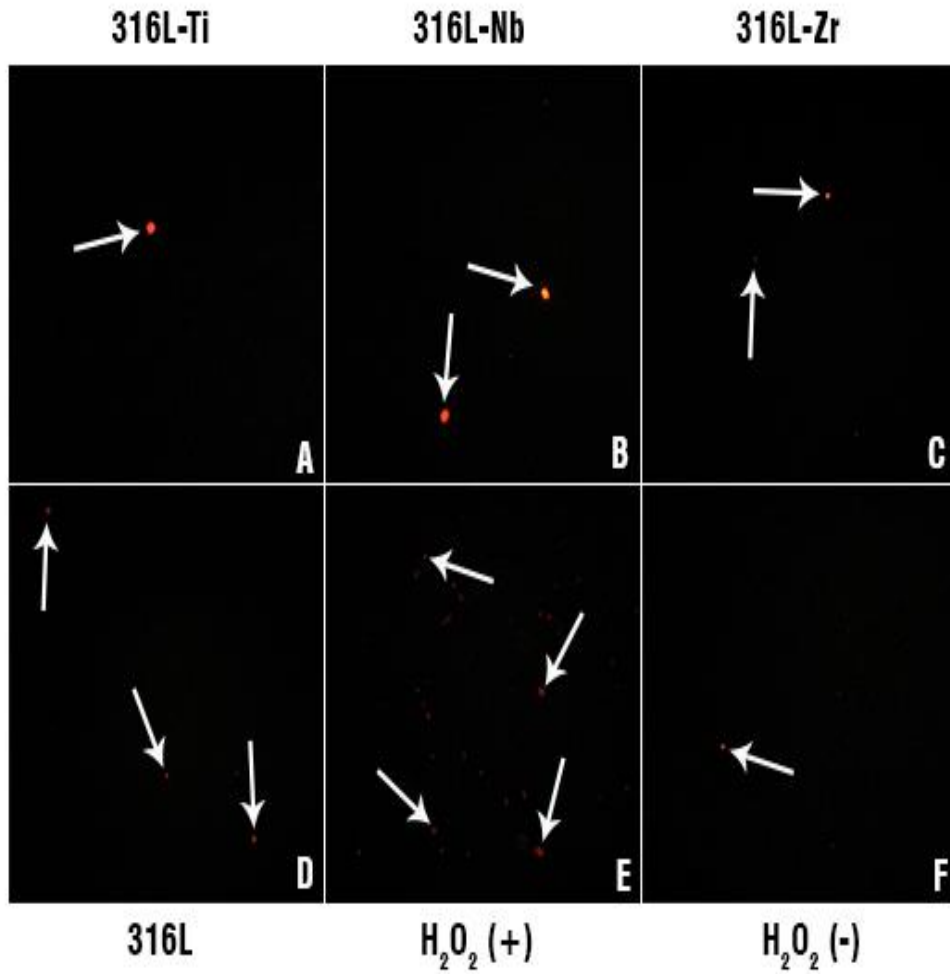
kaynaklı olduğunu söylemişlerdir. Bahsedilen bu çalışmada sonuçların olumlu çıkabilmesi için biyomalzemenin normal koşullarda hangi doku türüne uygulandığı da önemlidir. Seçtiğimiz 3T3 fibroblast hücre hattı, kullandığımız biyomalzemeler için oldukça uygun bir ortam oluşturmaktadır.

Milena ve ark.[81] Ti üzerine Zr kaplamanın osteoblastlar üzerinde 3,5,7 ve 10 günlük etkisini MTT testi ile incelemişlerdir. Kontrol grubu olarak Zr kaplanmamış Ti kullanmış ve tüm grupların birbirleriyle yakın olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçlarımızla uyumlu olarak, Ti ve Zr'un biyoyumlu olduğunu söylemişlerdir. Ion ve ark. [82]Ti alaşımına katkı yapılarak üretilen yeni alaşımın (Ti-23Nb-0,7Ta-2Zr) biyoyum özelliklerini osteoblast hücreleri ile değerlendirmişlerdir. Hücrelerin tıpkı titanyum alaşımına bağlandıkları gibi yeni üretilen alaşıma da adhere olduklarını ve canlılıklarının değişmediğini söylemişlerdir. Shi ve ark.[83] Ion ve ark. kullandığı Nb ve Zr katkılı alaşımı tavşan üzerine *in vivo* uygulamış ve normal titanyum alaşımına göre kemik onarımını önemli ölçüde geliştirdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak yapılan Nb ve Zr katkıları hücreler üzerinde sitotoksik bir etki yapmamış aksine mekanik ve uyum özellikleri bakımından alaşımı güçlendirmiştir ve doku onarımına olumlu etki yapmıştır.

3.2.3 ROS Testi Bulguları

ROS analizi ile reaktif oksijen türevlerinin oluşumu yaniDCFDA testi tüm hücrede ROS üretimini gösterir. ROS tüm hücresele zarar verebilir. Hücreler floresan ışığa göstermeleri nedeni ile mikroskop altında incelendi. Biyomalzemeler ile 3T3 fibroblast hücre hattının 96 saatlik inkübasyonu sonrasında uygulanan ROS analizinde, tüm örneklerde floresan ışığa yapan hücreler belirlendi(Şekil 3.4). Elde edilen görüntülere ve ışık miktarına bakılarak tüm grupların kontrol grubuna ve birbirlerine yakın olduğu belirlendi. Antunes ve ark. [84] 316L paslanmaz çelik ile yaptıkları çalışmada, bu tez çalışmasına uygun olarak 316L'nin herhangi bir genotoksik ve hücre canlılığına zarar verici etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Saquib ve ark. [85] TiO₂ nanoparçacıklarının sitotoksitesini *in vitro* MTT ve ROS analizleri ile değerlendirmiş, ROS oluşumunda doza bağlı artış olduğunu söylemişlerdir.

Kullandığımız katkılı biyomalzemelerin mikron boyutlarda olması ve katkı miktarında düşük olması nedeniyle söz konusu çalışmadan farklı olarak toksik etki tespit edilmedi. Üstelik Hamzeh ve ark.[86] TiO_2 nanoparçacıklarının fibroblastlar üzerinde sitotoksik etkilerini ROS testi ile araştırmışlar ve DNA hasarı olmadığını gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında, ışıma yapan hücrelerin az miktarda oluşu ve negatif kontrole benzer görüntüler elde edilmesi uyguladığımız biyomalzemelerin genotoksik olmağını ve hücrelerde DNA hasarı oluşturmadığını kanıtlar niteliktedir.

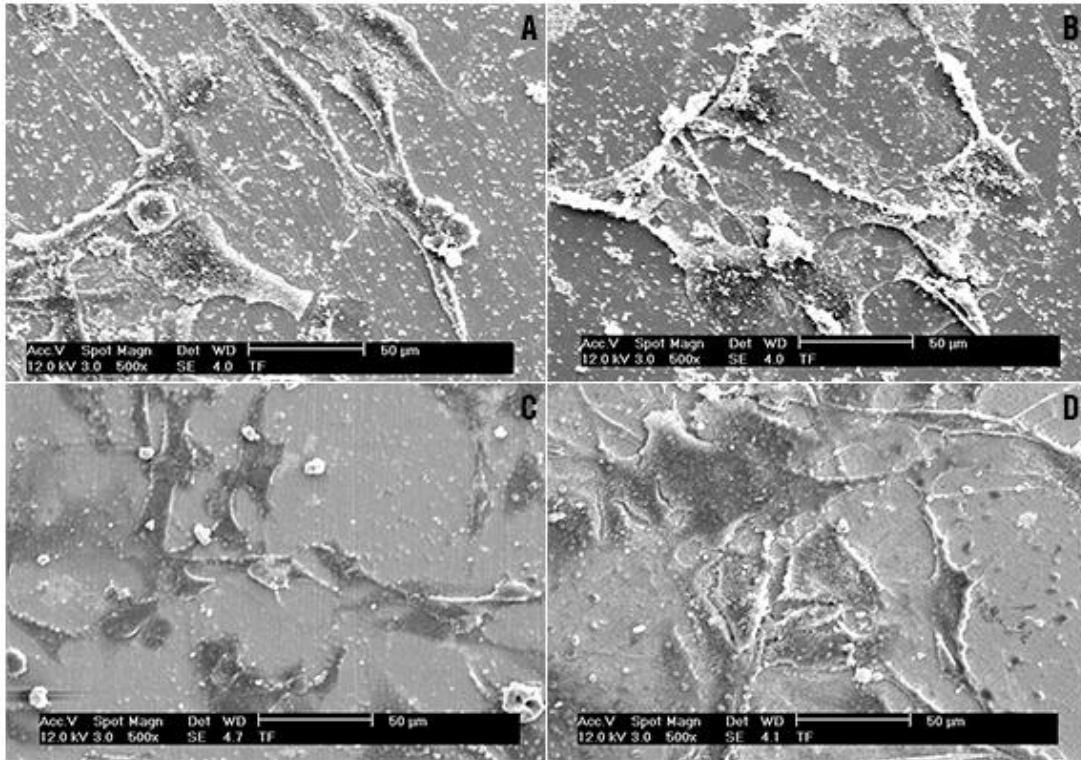


Şekil 3.6: ROS analizi sonucu hasarlı hücrelerin floresan ışıma göstermesi; **A:** Ti katkılı 316L, **B:** Nb katkılı 316L, **C:** Zr katkılı 316L, **D:** katkısız 316L, **E:** H_2O_2 eklenmiş, pozitif kontrol ve **F:** H_2O_2 eklenmemiş, negatif kontrol.

3.3 SEM ile Biyomalzeme-Fibroblast İlişkisinin Belirlenmesi

3T3 fare fibroblast hücre hattı ile biyomalzemelerin 96 saatlik inkübasyonu sonrasında, taramalı elektron mikroskopu ile biyomalzeme üzerinde adezyon yapmış fibroblastların morfolojilerinin ve malzeme ile etkileşimlerinin görüntülenmesi sağlandı (Şekil 3.7).

SEM görüntülerine bakıldığında tüm örneklerimizin üzerinde fibroblastlar tespit edildi ve hücrelerin normal fibroblastlara göre morfolojilerinde ve filopod boylarında herhangi bir değişiklik görülmedi. Habermehl ve ark. [87] kolajen ve kolajen bazlı materyallerin üzerine 3T3 fibroblast hücrelerinin 24 saatlik ve 1 haftalık morfolojilerini SEM ile incelemişlerdir. Fibroblastların bu yüzeylere adhere olduklarını ve morfolojilerinin değişmediğini görüntülemişlerdir.



Şekil 3.7:Çeşitli katkıları yapılmış 316L ile 3T3 fibroblast hücrelerinin etkileşimlerini gösteren SEM mikrografları (500x) **A:** Ti katkılı 316L üzerine tutunmuş fibroblastlar, **B:**Nb katkılı 316L üzerine tutunmuş fibroblastlar, **C:**Zr katkılı 316L üzerine tutunmuş fibroblastlar ve **D:**katkisiz 316L üzerine tutunmuş fibroblastlar izlenmektedir.

Faghihi ve ark. [88] 316L'nin kalp stentlerinde en çok kullanılan biyomalzeme olduğunusöylemişler ve bunu geliştirmek içinçalışmalarında 316L'yi şekil olarak değiştirerek çubuk ve levha halinde kullanmışlardır. SEM görüntülerinde ise, hücre hattı olarak yağ doku kaynaklı kök hücrelerini kullanmışlar ve SEM incelemeleri sonucu en fazla çubuk şeklindeki yüzeye tutunduklarını belirtmişlerdir. Her iki çalışmada hücre-metal etkileşimlerini gösteren sonuçlar birbirleriyle oldukça benzerdir. Li ve ark. [89] Zr katkılı Ti alaşımının üç farklı hücre grubuna etkilerini araştırmış ve hücre morfolojilerinde bir değişim olmadığını, Zr katkısının olumlu etki yaptığını belirtmişlerdir. Gülsoy ve ark. [12] Ti alaşım tozlarının iki farklı yapısının (küre şekilli ve düzensiz şekilli) ve 3T3 fibroblast hücre hattını kullanmışlar, SEM ile elde edilen görüntülerin kontrol grubuyla aynı morfolojik özelliklere sahip olduğunu fakat düzensiz şekilli olan Ti alaşım tozunda hücre yoğunluğunun fazla olduğunu söylemişlerdir. Yukarıda verilen çalışmalarla uygun olarak bu çalışmanın konusunu oluşturan katkılı 316L'nin hücre morfolojisini değiştirmedğini ve üzerine yapılan katkı maddelerinde olumlu etki yaptığını söyleyebiliriz.

3.4 ICP-MS ile Biyomalzemelerin İyon Salınımlarının Belirlenmesi

Bu yöntem ile kullanılan biyomalzemelerden 96 saat sonunda cDMEM içerisine korozyona bağlı element geçişi olup olmadığı tespit edildi.Belirli elementlerin analizi yapıldı ve elementler vebesiyeri içinde tespit edilen miktarları birlikte (Tablo 3.1) verildi.Titanyum elemetinin besiyerine geçişi sadece titanyum katkılı 316L'de çok düşük miktarlarda tespit edildi. Nb katkılı ve Zr katkılı 316L'de ise katkı elementleri olan Nb ve Zr elementlerinin geçişleri eser miktarlarda izlendi. Paslanmaz çelik içerisinde yer alan Cr, Fe ve Ni elementlerinin tüm numunelerden ortama çok düşük miktarlarda salındığı belirlendi.Elde edilen sonuçlara bakılarak biyomalzemelerden iyon salınım seviyelerinin çok düşük olduğu söylenebilir.

Tablo 3.1: ICP-MS bulguları

Örnekler	Ti (mg/ml)	Cr (mg/ml)	Fe (mg/ml)	Ni (mg/ml)	Zr (mg/ml)	Nb(mg/ml)
316L-Ti	0,000322	0,0001239	0,000913	0,00013420		
316L-Nb		0,000937	0,000981	0,0003770		<0,0001
316L-Zr		0,000488	0,0001042	0,0006005	<0,0001	
316L	---	0,000801	0,0001004	0,0005875	---	---
Kontrol	---	---	---	---	---	---

ICP-MS tekniği birçok alanda kullanılmakta ve oldukça yarar sağlamaktadır. Cameon ve ark. [90] yaptıkları bir çalışmada ağız içine yerleştirilen metalik implanttan bakır, kobalt, krom ve nikel salınımına bakmış, sonuç olarak salınan metal iyonlarının vücutta bulunması gereken miktar aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Amini ve ark. [134] ise Ni salınımının implant malzeme uygulanmış hastalarda fazla olduğunu söylemiş Cr ve Co miktarını Cameon ve arkadaşları ile benzer tespit etmişlerdir. Ni kullanılmayan malzemelerde Fernandez-Minano ve ark. [135] Cr ve Fe iyonlarının ağız içi mukozasında bulunduğunu söylemişlerdir. Hafez ve ark. [136] 6 aylık sabit ortodontik implantlardan ağız içi epitel hücrelerine geçiş yapan Ni ve Cr iyon varlığını tespit etmişlerdir. Staffioni ve ark. [137] implant malzemelerden Ni, Cr ve Cu iyon salınımları üzerinde çalışmış ve Cu iyonlarının malzemeden ağız içi hücrelerine geçiş yaptığını izlemişlerdir. Ağız içi oldukça korozif bir ortam olduğu için implantlardan salınacak metal iyonları zararlı etkiler yapabilir. Bu sebeple uygulanacak biyomalzemeden salınan iyon seviyeleri vücutta olması gereken miktarlarda olmalıdır. Bu çalışmalara göre, tez çalışmamızda da kullandığımız biyomalzemelerden zararlı olacak miktarlarda iyon salınımı olmadığından biyomalzemelerin vücutta korozif ve zararlı bir etki yapmayacağı düşünülebilir.

Harifnabi ve ark. [91] yaptıkları çalışmalarda sonuçlarımızı desteklemektedir. İnsan vücudu için kullanılan Mg ile doyurulmuş ve florapatit kaplanmış 316L'nin fizyolojik ortamdaki iyon salınımını incelemişler ve çalışmamızla uygun olarak kaplanmış olan biyomalzemeden Fe, Cr, Ni gibi iyonların salınımının yok denecek kadar az olduğunu ve kontrol olarak kullanılan 316L ile aralarında belirgin bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Tez çalışmamızda daha önce bahsedilen sitotoksitesite testleri

ve diğer sonuçlarımızda da herhangi toksik etkinin gözlenmemiş olması, alaşımlardan ortama salınan metal katkılarının hücreler için zararlı miktarlara ulaşmadığının bir göstergesidir.

3.5 SBF ile Apatit Oluşumlarının Belirlenmesi

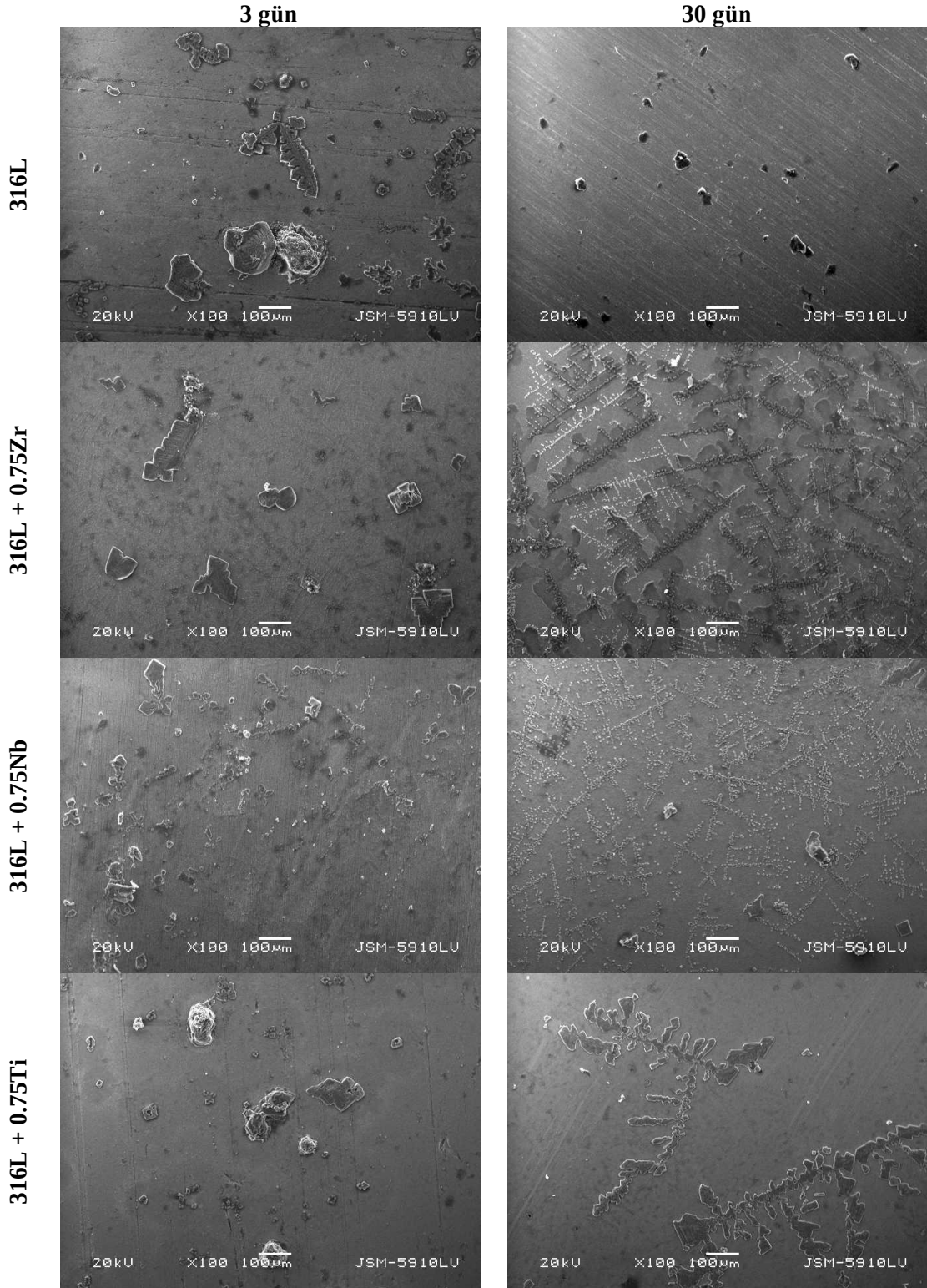
İmplant malzemelerin SBF sıvısı içinde bekletilmesiyle yüzeyde gelişen hidroksiapatit oluşumları implantın kemik ile uyum sağlayacağını bir göstergesidir. SBF içine konulan biyomalzemelerden başlangıçta Ca ve P iyonları çözünür, fakat Ca ve P iyonlarının saturasyon oranları düşüktür. Bu nedenle iyon konsantrasyonunun arttığı bölgelerde apatit kristalleri oluşmaya başlar. Oluşan bu kristaller iyonlara tutunarak büyürler. Ca-apatit kristalleri, kemik apatiti özelliğinde olduklarından apatit oluşumu biyoaktivitenin çok fazla olduğunu göstermektedir [12,99-102]. Yapılan çalışmalarda SBF biyoyum belirlenmesinde oldukça fazla kullanılan ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir.

Tez çalışmamızda kullanılan biyomalzemeler 3, 7, 15 ve 30 gün olmak üzere SBF sıvısı içinde tutuldu ve sonrasında 3. ve 30. güne ait örnekler SEM ile görüntülenerek hidroksiapatit oluşumları incelendi. 3günlük SBF sonrası küresel apatit parçacıklarının örneklerin yüzeyinde büyüdüğü 30 günlük örneklerde ise apatit oluşumlarının arttığı görüldü. Örneklerin porlu ve çizikli kısımlarında hidroksiapatit oluşumunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Tüm örnekler için hidroksiapatit oluşumlarının zamana bağlı olarak boyutlarında ve kalitelerinde artış tespit edildi (Şekil 3.8).

Fathi ve ark. [92] biyoseramik, metalik ve biyoseramik-metalik kaplanmış dental implant 316L'lerin *in vitro* korozyon dayanımını araştırmışlardır. SBF analizi yapılan malzemelerden biyoseramik-metalik ve metalik kaplamanın olumlu korozyon davranışı etkisi yaptığını belirtmişlerdir. Subramanian ve ark. [93] 316L' nin SBF ve kan hücreleri ile uyumu üzerinde çalışmış ve korozyon dayanımının oldukça yüksek olduğunu, kan hücrelerinin 316L yüzeyine tutunduklarını belirtmişlerdir. Maolihe ve ark. [94] gümüş kaplanmış Mg-Ca-Zr alaşımının SBF'de 5, 12 ve 48 saatlik korozyon dayanımını araştırmış ve bu alaşımda hidroksiapatit oluşumunun fazla olduğunu,

dayanıklılık ve korozyon bakımından gelişmiş olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan Zr katkısı gümüş kaplama ile birlikte olumlu sonuçlar vermiştir. Bu araştırmalar ile benzer olarak, çalışmamızda da Zr katkılı biyomalzemede hidroksiapatit oluşumunun daha fazla olduğu tespit edildi. Hidroksiapatit oluşumu biyomalzemenin ne kadar uyumlu olduğunu göstermektedir bu nedenle hidroksiapatit oluşumu ne kadar fazla ise kullanılan malzeme için o kadar uyumludur denilebilmektedir [12,46,95]. Hidroksiapatit kaplanmış TiO_2 ve Mg alaşımının korozyon dayanımı ve *in vitro* biyoyumu ile ilgili Amravathy ve ark. [96] yaptıkları bir çalışma sonucu, hidroksiapatit kaplı TiO_2 -Mg alaşımının hidroksiapatit kaplı Mg alaşımına göre osteoblast hücrelerine daha iyi bağlandığı ve ayrıca korozyon dayanımının daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara bakarak Ti katkısının olumlu etki yaptığını ve biyoyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Bayraktaroğlu ve ark. [50] 316L paslanmaz çeliğe bor katkısı yapılarak üretilen biyomalzemenin mekanik ve korozyon özelliklerini SBF içinde araştırmışlardır. Bor katkılı 316L ve 316L'nin korozyon özelliklerinin oldukça iyi olduğunu belirtmişlerdir. Kullandığımız biyomalzemelerin 316L ve 316L katkılı metaller olduğundan sonuçlarımızı bu çalışma ile ilişkilendirerek tüm örneklerimizin biyoyumlu olduklarını söyleyebiliriz.

Subramanian ve ark. [97] 316L kaplanmış ve kaplanmamış Zr, Cu, Al, Ag alaşımlı metalik cam filmlerinin SBF ile korozyon miktarı üzerine çalışmışlardır. Her iki biyomalzemenin yüksek korozyon direnci gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmadan yola çıkarak 316L'yeyapılan Zr katkısının olumlu etki yaptığı düşünülebilir. Junping ve ark. [98] Nb ve Ag kaplanmış 316L ile yaptıkları çalışmada, Nb tanecik saflaşmasını sağlarken korozyon dayanımını da arttırdığını belirtmişlerdir. Kullandığımız biyomalzemelerden Nb katkılı olan 316L'nin korozyon dayanımı da bu çalışma ile benzer özellik göstermektedir.



Şekil 3.8:Sinterlenmiş 316L ve katkılı 316L örneklerinin 3 ve 30 günlük SBF uygulaması sonrası yüzey morfolojilerine ait SEM mikrografları.

4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

Son 40 yıl içerisinde biyomedikal alanda çok büyük gelişmeler olmaktadır. Yapay kalpten kalça protezlerine kadar birçok biyomalzeme üretilmektedir. Biyomalzeme konusundaki çalışmalar; hasarlı dokunun yerine sağlamlının yerleştirilmesinin aksine, vücudun kendisini yenileme kapasitesini kullanarak doğal dokuların yeniden yapılanmasına yönelik olmalıdır. Bunun için doğal dokuların yeniden yapılanmasını sağlayacak yeni biyomalzemelerin geliştirilmesi esastır. Bu nedenle üretilen yeni biyomateriyallerin biyolojik yönden uyumlu olması, toksik ve karsinojenik olmaması, kimyasal açıdan inert ve stabil olması, yeterli mekanik kuvvete sahip olması, yoğun bir yaşama uyum gösterebilmesi, uygun ağırlık ve dansitede olması çok önemlidir. Yapılan tüm çalışmalar belirtilen özelliklere uygun, kullanım ömrü uzun, mekanik ve biyoyum özellikleri mükemmel olan biyomalzeme geliştirme amacını taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamız oldukça önemli bir konuyu kapsamaktadır.

Birçok araştırmacının belirttiği üzere paslanmaz çeliklerin stabilitesi ve korozyon dayanımı ayrıca biyoyum özellikleri de yüksektir, ancak teknolojik ilerlemelerle bu özelliklerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında böylesine üstün özellikleri olan bir biyomalzemenin daha yaygın ve sağlıklı bir şekilde kullanılması için Ti, Nb ve Zr katkıları yapılarak üretilmiş 3 farklı 316L paslanmaz çeliğin, *in vitro* koşullarda hücre kültüründe ve diğer bazı yöntemlerle biyoyumluluğu değerlendirilmiştir.

Hücre kültüründe hücre-metal etkileşimi, Tripan mavisi ve MTT testinin uygulanması ile yapılan toksisite ve hücre canlılığı değerlendirmelerinin ardından; materyallerin DNA üzerinde oksidatif hasar oluşturma potansiyelleri, ROS test sistemi ile incelendi. *In vitro* değerlendirmelerinin yanındapaslanmaz çelik biyomalzemelerin SBF sıvısı içindeki korozyon miktarları ve hidroksiapatit oluşumları değerlendirildi. Bu materyallerin içerdikleri iyonlarla ilişkili olarak canlı dokularda toksik ve/veya mutajenik etkiler oluşturduğu varsayımı ile test materyallerinden salınımları muhtemel iyonların tespiti ICP-MS yöntemi ile gerçekleştirildi.

Tüm bu çalışmalar sonucunda katkılı 316L paslanmaz çeliklerin biyoyumlu olduğu bilinen katkısız 316L ile oldukça benzer özellikler gösterdiği, sitotoksisite

açısından ise hemen hemen yakın oldukları görüldü. Korozyon dayanımları ise hem birbirleri ile yakın katkısız 316L ile oldukça benzerdi. Bu sonuçlara bakılarak Ti katkılı 316L'nin, Nb katkılı 316L'nin ve Zr katkılı 316L'nin en az katkısız 316L kadar biyouyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Daha önce yapılmış çalışmalara bakıldığında 316L ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına rağmen metal katkılı (Ti, Nb ve Zr) 316L paslanmaz çelik ve bu paslanmaz çeliklerin biyouyumlulukları ile ilgili hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız örnek teşkil edeceği ve yeni, üstün mekanik özelliklere sahip biyomalzemelerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı için büyük bir öneme sahiptir.

En yeni tekniklerle geliştirilmiş bu biyomalzemelerin, biyouyumlu olduğu yapılan birçok analiz ile ortaya konmuştur. Bu çalışma ile biyouyumlu olduğu belirlenen Ti, Nb ve Zr katkılı 316L paslanmaz çeliklerin uygulanacağı bölgelerde uzun dönem kullanım başarısını arttıracığı beklentisi yüksektir. Biyomedikal metaller arasında çok önemli bir yere sahip olan 316L paslanmaz çelik grubu içerisinde yer alan (Ti, Nb ve Zr) katkılı yeni biyomalzemelerin, biyouyumlu olmaları, uygun geliştirilmiş mekanik özelliklere sahip, korozyon dayanımları yüksek ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle tercih edilecekleri muhtemeldir. Bu sayede metalik biyomalzemelere önemli ölçüde katkı yapıldığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Gümüşderelioğlu, M. (2002) Biyomalzemeler.Bilim ve Teknik, Temmuz, 2-11.
- [2] Gür, A.K, Taşkin, M. (2004) Metalik Biyomalzemeler ve Biyouyum. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 106-113.
- [3] Hench Larry, L. (2009) Genetic design of bioactive glass. Journal of the European Ceramic Society, 29, 1257–1265.
- [4] Hench Larry, L., Roki, N., Fenn Michael, B. (2014) Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration.Journal of Molecular Structure, 1073, 24-30.
- [5] Clupper, D.C., Hench L.L., MecholskyJ.J. (2004)Strength and toughness of tape cast bioactive glass 45S5 following heat treatment. Journal of the European Ceramic Society, 24, 2929–2934.
- [6] Gough, J. E., Jones, J.R., Hench, L. L. (2003) Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. Biomaterials, 25, 2039–2046
- [7] Leng, Y.X., Chen, J.Y., Yang, P., Wang, J., Zhao, A.S., Wan, G.J. (2006) The microstructure and mechanical properties of TiN and TiO₂/TiN duplex films synthesized by plasma immersion ion implantation and deposition on artificial heart valve.Surface & Coatings Technology, 201, 1012–1016.
- [8] Smullen, J. L., Thomas, MD., Balkany, J. (2005) Implantation of the Ossified Cochlea (2005). Operative Techniques in Otolaryngology, 16, 117-120.
- [9] Kalkman, R. K., Briaire, J. J., Dekker David, M.T., Frijns Johan, H.M. (2014) Place pitch versus electrode location in a realistic computational model of the implanted human cochlea. Hearing Research.
- [10] Jonn, B.P.,Young, K.K. (2000) Metalic Biomaterials. Biomedical Engineering Handbook, 37.
- [11] Niinomi, M. (2002) Recently Metalic Materials for Biomedical Applications. Metalurgical and Materials Transactions, Warrendale, 477-486.

- [12] Gülsoy, H.Ö. (2012) Biyomedikal ve biyomalzeme uygulama amaçlı bor katkı 316L paslanmaz çeliklerin toz enjeksiyon kalıplama metodu ile üretilmesi karakterizasyonu ve *in vitro* ortamda biyouyumluluklarının araştırılması. Bio-Medical and Materials and Engineering, 22, 333-349.
- [13] Gür, A.K. (2004) Ni-Ti Alaşımı Bir Biyomalzemenin Üretimi ve *İn-Vivo* Şartlarda Biyouyumunun Araştırılması. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ, Türkiye.
- [14] Kianersi, D., Mostafaei, A., Amadeh, A. (2014) Resistance spot welding joints of AISI 316L austenitic stainless steel sheets: Phase transformations, mechanical properties and microstructure characterizations. Materials and Design, 61, 251–263.
- [15] Morals, S., Pereira, M. C., (2000) Application of stripping voltammetry and microelectrodes *in vitro* biocompatibility and *in vivo* toxicity tests of AISI 316L corrosion products. Trace Elements Medicine Biology, 14, 48 – 54.
- [16] Parsapour A., Khorasani S., Fathi M. H. (2013) Effect of Surface Treatment and Metallic Coating on Corrosion Behavior and Biocompatibility of Surgical 316L Stainless Steel Implant. Journal of Materials Science and Technology 2012, 28(2), 125–131.
- [17] Wintermantel E., Mayer J. (2001) Composites and Biomedical Applications. Encyclopedia of Materials: Science and Technology, 1371–1376.
- [18] Wataha, J., Hanks, C. (1997) Biocompatibility testing-what can we anticipate. Transactions of the Academy of Dental Materials, 109-120.
- [19] Kenneth, R.S.J. (2007) Biocompatibility of dental materials. Dental Clinics of North America, 51, 747-760.
- [20] Wataha, J.C. (2001) Principles of biocompatibility for dental practitioners. The Journal of Prosthetic Dentistry, 86, 203-209.
- [21] International Standard 7405. “Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-test methods for dental materials.” International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 1997.

- [22] International Standard 10993 “Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods.” International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999.
- [23] Hanks, C.T., Wataha, J.C., Sun, Z., (1996) In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*, 12, 186-193.
- [24] Hensten-Pettersen, A. (1988) Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *International Endontic Journal*, 21, 89-99.
- [25] Schmalz, G. (1997) Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical Oral Investigation*, 1, 154-162.
- [26] Stanford, J.W. (1980) Recommended standard practices for cytotoxicity testing. World Dental Federation in conjunction with International Standards Organization. *Dental Journal*, 30, 141-173.
- [27] Cenni, E., Ciapetti, G., Granchi, D., Arciola, C.R., Savarino, L., Stea, S., Montanaro, L., Pizzoferrato, A. (1999) Established cell lines and primary cultures in testing medical devices in vitro. *Toxicology In Vitro*, 13, 801-810.
- [28] Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammatt A., Zucco, F. (1990) Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. *Concise Encyclopedia of Pragmatics*, 75-97.
- [29] Saw, T.Y., Cao, T., Yap, A.U., Lee, Ng. (2005) Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicology In Vitro*, 19, 145-154.
- [30] Browne, R.M. (1988) The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials does it have a role. *International Endology Journal*, 21, 50-58.
- [31] Wataha, J.C. (2003) *Biocompatibility of Dental Materials*. Phillip's Science Of Dental Materials, Missouri: Elsevier Science, 171-202.
- [32] Dee, K.C., Puelo, D. A., Bizios, R. (2002) *An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions*. John Wiley&Sons, 173-184.
- [33] Edgerton, M., Levine, M.J. (1993) Biocompatibility: Its Future in Prosthodontic Research. *Journal Prosthetic Dentistry*, 69, 406-415.
- [34] Messer, R.L., Doeller, J.E., Kraus, D.W., Lucas, L.C. (2000) An investigation of fibroblast mitochondria enzyme activity and respiration in response to metallic

ions released from dental alloys. Journal Biomedical Materials Research, 50, 598-604.

- [35] Khattak, SF., Spataro, M., Roberts, L., Roberts, SC. (2006) Application of colorimetric assays to assess viability, growth and metabolism of hydrogel-encapsulated cells. Biotechnological Letters, 28, 1361-1370.
- [36] Putnam, KP., Bombick, DW., Doolittle, DJ. (2002) Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicology In Vitro, 16, 599-607.
- [37] Tyas, MJ. (1977) A method for the *in vitro* toxicity testing of dental restorative materials. Journal Dental Research, 56, 1285-1290.
- [38] Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A. (2005) A practical note on the use of cytotoxicity assays. The International Journal of Pharmaceutics, 288, 369-376.
- [39] Yaka, E., Eğrilmez, MY., Keskinoglu, P., Cavdar, Z., Genc, Ş., Genc, K., İyilikci, L., Yener, GG. (2006) Biochemical markers in cerebrospinal fluid (CSF) and evaluation of effect of CSF on PC12 cell line viability in alzheimer's disease Turk Journal Geriarty, 9, 1-7.
- [40] Freshney, RI. (1992) Animal Cell Culture: A Practical Approach. Oxford University Press, New York, 17, 168.
- [41] Issa, Y., Watts, DC., Brunton, PA., Waters, CM., Duxbury, AJ. (2004) Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts *in vitro*. Dental Materials, 20, 12-20.
- [42] Sjogren, G., Sletten, G., Dahl, JE. (2000) Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. Journal Prosthetic Dental, 84, 229-236.
- [43] Murray, PE., Garcia Godoy C., Garcia Godoy, F. (2007) How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated. Medicinal Oral Pathology, 12, 258-266.
- [44] Schweikl H., Schmalz G. (1996) Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. European Journal of Oral Sciences, 104, 292-299.
- [45] Korzeniewski C., Callewaert DM. (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. Journal Immunological Methods, 64, 313-320.

- [46] Kukubo T., Takadama H. (2006) How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity. *Biomaterials*, 27, 2907–2915.
- [47] Bilir, A., Solakoğlu, S.(2004)Uygulamalı flow sitometri –pcr ve hücre kültürü kursu kitapçığı, İstanbul.
- [48] *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304, 619 (2003).
- [49] Zhang, J., Guo, J., Zhang, J., Ding, F., Li, L. (2010) Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Letters*,199, 389–397
- [50] Bayraktaroglu, E., Gulsoy, N., Gulsoy, H.O. (2012) Effect of boron addition on injection molded 316L stainless steel: Mechanical, corrosion properties and *in vitro* bioactivity. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 22, 33-349.
- [51] Ponti, J., Sabbioni, E., Munaro, B., Broggi, F., Marmorato, P., Franchini, F., Colognato, R., Rossi, F. (2009) Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: an *in vitro* study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutagenesis*,24, 5, 439-445.
- [52] Ekvall B., Silano V., Paganuzzi A., Zucco F. (1990)Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures.Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects, 75-97.
- [53] Oktar N.(2009)K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin MTT ile araştırılması. Çukurova Üniversitesi,Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye.
- [54] Ovalı, E., Uçar. F. (2003) Hematolojide Uygulamalı Hücre Teknikleri kursu. 217, 7-16 Trabzon, Türkiye.
- [55] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.(2002) Isolating cells and growing them in culture. In: *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition.
- [56] Todaro. GJ., Green, H. (1936) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal Cell Biology*, 17, 299-313.
- [57] Çelik, Ö., Kayalı, E.S., Çimenoglu, H.(2009) Ortopedik Uygulamalar İçin Osenitik Çeliklerin Nitasyonu. 5. Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumu (IATS'09), Karabük, Türkiye, 13-15.

- [58] Yalçın B., Temiz D. (2012) Implant Malzemesi Olarak Kullanılan AISI 316L Osenitik Paslanmaz Çeliğin Kuru Tornalanabilirliğinin Araştırılması. 3. Ulusal Talaşlı İmalat Sempozyumu, 4-5 Ekim, Ankara, Türkiye.
- [59] Güzel, E., Atilla P., Dağdeviren A.(2006) Fibroblast ve Fibroblast Benzeri Hücreler.Türkiye Klinikleri 26/4, 421-9.
- [60] Kashi, A.M., Tahermanesh, K., Chaichian, S., Mohammad, T. J.,Moradi, F., Tavangar, S., Najafabadi, A., Lotfibakhshaiesh, N. (2014) How to prepare biological samples and live tissues for scanning electron microscopy(SEM). Galen Medical Journal, 3(2), 63-80.
- [61] Habermehl J., Skopinska, J., Boccafroschi, F., Sionkowska, A., Kaczmarek, H. (2005) Preparation of ready to use, Storable and Reconstituted Collagen. Macromolecular Bioscience, 5, 821–828.
- [62] Yu, X., Wals, J., Wei, M. (2014) Covalent immobilization of collagen on titanium through polydopamine coating to improve cellular performances of MC3T3-E1 cells. The Royal Society of Chemistry, 4, 7185–7192.
- [63] Camean, A. M., Jos, A., Calleja, A., Gil, F., Linares A., Solano, E.(2014) Development and validation of an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for the determination of cobalt, chromium, copper and nickel in oral mucosa cells. Microchemical Journal, 114, 73-79.
- [64] Krebs, Robert E. (2006) The History and Use of Our Earth's Chemical Elements: A Reference Guide (2nd edition). Westport, CT: Greenwood Press.
- [65] Taş, Z. (2012) Metallurgical mechanisms for increasing the strength of high-strength-low-alloy-steelsFen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Erciyes Üniversitesi, 28 (2), 97-101.
- [66] Koçak, A., Türker, Ş.B. (2006) Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi, Atatürk Üniversitesi, 16, 1, 41-45.
- [67] Fathi, M.H., Salehi, M., Saatchi, A., Mortazavi, V. (2003) Moosavi S.B. *In vitro* corrosion behavior of bioceramic, metallic and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants. Dental Materials, 19, 188-198.
- [68] Toz, T. (2011) Güncel Adesiv Restoratif Sistemlerin *in vitro* ve *in vivo* İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 25-169.

- [69] Bühler, M., Harris, L., Zinger, O., Landolt, D. (2003) Characterization of Fibroblast Adhesion on Titanium Model Surfaces. *European Cells and Materials* 5, 24-25.
- [70] Cui, Z.D., Chen, M.F., Zhang, L.Y., Hu, R.X., Zhu, S.L., Yang, X.J. (2008) Improving the biocompatibility of NiTi alloy by chemical treatments: An in vitro evaluation in 3T3 human fibroblast cell. *Materials Science and Engineering*, 28, 1117–1122.
- [71] Papageorgiou, I., Brown, C., Schins, R., Singh, S., Newson, R., Davis, S., Fisher, J., Ingham, E., Case, C.P. (2009) The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 28, 2946–2958.
- [72] Akagawa, Y., Ichikawa, Y., Nikai, H., Tsuru H. (1993) Interface Histology of Unloaded and Early Loaded Partially Stabilized Zirconia Endosseous Implant in Initial Bone Healing. *Prosthetic Dentistry*, 69, 599-604.
- [73] Cimpean, A., Mitran, V., Cristina, M., Ciofrangeanu, A., Galateanu, B. (2012) Osteoblast cell behavior on the new beta-type Ti–25Ta–25Nb alloy. *Materials Science and Engineering*, 32, 1554–1563.
- [74] Hamzeh, M., Sunahara, G. I. (2013) In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicology in Vitro*, 27, 864–873.
- [75] Issa, Y., Brunton, P., Waters, C.M., Watts, D.C. (2008) Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. *Dental Materials*, 2, 281–287.
- [76] Sjögren, G., Sletten, G. (2000) Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *Prosthetic Dentistry*, 84, 36-229.
- [77] Möller, B., Terheyden, H., Açil, Y., Purcz, N. M., Hertrampf, K., Tabakov, A., Behrens, E., Wiltfang, J. (2012) A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 41, 638-645.
- [78] Györgyey, A., Ungvári, K., Kecskeméti, G., Kopniczky, J., Hopp, B., Oszkó, A. (2013) Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63) on

laser-ablated titanium implant material. *Materials Science and Engineering*, 33, 4251–4259.

- [79] Subramania, B., Yugeswaran, S., Kobayashi, A., Fabrication, M. of amorphous $Zr_{48}Cu_{36}Al_8Ag_8$ thin films by ion beam sputtering and their corrosion behavior in SBF for bio implants. *Journal of Alloys and Compounds*, 572, 163–169.
- [80] Mansoorianfar, M., Shokrgozar, M., Mehrjoo, M., Tamjid, E., Simchi, A. (2013) Nanodiamonds for surface engineering of orthopedic implants: Enhanced biocompatibility in human osteosarcoma cell culture. *Diamond Related Materials*, 40, 107–114.
- [81] Milena, K., Joachim, R., Schreckenbach, P., Graf, H. L. (2014) Zirconia coated titanium for implants and their interactions with osteoblast cells. *Materials Science and Engineering*, 44, 254–261.
- [82] Ion, R., Gordin, D.M., Mitran, V., Osiceanu, P., Dinescu, S., Gloriant, T., Cimpean, A. (2014) In vitro bio-functional performances of the novel superelastic beta-type Ti–23Nb–0.7Ta–2Zr–0.5N alloy. *Materials Science and Engineering*, 35, 411–419.
- [83] Shi, L., Wang, L., Duan, Y., Lei, W., Wang, Z., Li, J., Fan, X. (2013) The Improved Biological Performance of a Novel Low Elastic Modulus Implant. *PLoS ONE* 8(2): e55015.
- [84] Antunes, R.A., Rodas, A.C.D., Lima, N.B., Higa, O.Z., Costa, I. (2010) Study of the corrosion resistance and in vitro biocompatibility of PVD TiCN-coated AISI 316 L austenitic stainless steel for orthopedic applications. *Surface & Coatings Technology*, 205, 2074–2081.
- [85] Saquib, Q., Abdulaziz, A., Khedhairi, A., Maqsood, A., Siddiqui, B., Faisal, M., Tarboush, A. (2012) Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology in Vitro*, 26, 351–361.
- [86] Hamzeh, M., Sunahara, G. I. (2013) In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicology in Vitro*, 27, 864–873.

- [87] Habermehl, J., Skopinska, J., Boccafoschi, F., Sionkowska, A., Kaczmarek, H. Preparation of Ready-to-use, Stockable and Reconstituted Collagen. *Macromolecular Bioscience*, 5, 821-828.
- [88] Faghihi, S., Zia, S., Masoumeh, F. T. (2012) Adipose tissue-derived stem cell response to the differently processed 316L. *Tissue and Cell*, 44, 365– 372.
- [89] Li, J., Shi, L., Zhu, Z., He, Q., Xu, J. (2013) $Zr_{61}Ti_2Cu_{25}Al_{12}$ metallic glass for potential use in dental implants: Biocompatibility assessment by in vitro cellular responses. *Materials Science and Engineering*, 33, 2113–2121.
- [90] Cameán, A. M., Jos, A., Calleja, A., Gil, F., Linares, I. A. (2014) Development and validation of an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for the determination of cobalt, chromium, copper and nickel in oral mucosa cells. *Microchemical Journal*, 114, 73–79.
- [91] Sharifnabi, A., Fathi, M.H., Yekta, B. E., Hossainipour, M. (2014) The structural and bio-corrosion barrier performance of Mg- substituted fluorapatite coating on 316L stainless steel human body implant. *Applied Surface Science*, 288, 331– 340.
- [92] Fathi, M.H., Salehi, M., Saatchi, A., Mortazavi, V., Moosavi, S.V. (2003) *In vitro* corrosion behavior of bioceramic, metallic and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants. *Dental Materials*, 19, 188-198.
- [93] Subramanian, B., Jayachandran, M. (2008) Electrochemical corrosion behavior of magnetron sputtered TiN coated steel in simulated bodily fluid and its hemocompatibility. *Materials Letters*, 62, 1727–1730.
- [94] Lihe, M., Yulin, W., Yizao, W., Fang, H., Yuan, H. (2010) Corrosion Resistance of Ag-ion Implanted Mg-Ca-Zn Alloys in SBF. *Rare Metal Materials and Engineering*, 39(12): 2075-2078.
- [95] T. Kukubo, (1991) Protocol for Preparation of Simulated Body Fluid (SBF), Department of Materials Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Japan.
- [96] Amaravathy, P., Sathyanarayanan, S., Sowndharya, S., Rajendran, N. (2013) Bioactive HA/TiO₂ coating on magnesium alloy for biomedical applications. *Ceramics International*, 13, 117-120.

- [97] Subramanian, B., Yugeswaran, S., Kobayashi, A., Jayachandran, M.(2013) Fabrication of amorphous Zr₄₈Cu₃₆Al₈Ag₈ thin films by ion beam sputtering and their corrosion behavior in SBF for bio implants. *Journal of Alloys and Compounds*, 572, 163–169.
- [98] Junping, Y., Wei1, Li. (2013) Antibacterial 316L Stainless Steel Containing Silver and Niobium. *Rare Metal Materials and Engineering* 42(10): 2004-2008.
- [99] Lui Y., Hunag B., Ruan J., He Y. (1998)Behaviour of composite Ca/P bioceramics in simulated body fluid, *Journal of Materials Science and Technology* 14, 256–261.
- [100] Thian ES., Loh NH., Khor KA., Tor SB., *In vitro* behavior of sintered powder injection molded Ti-6Al-4V/HA, *Journal of Biomedical Materials Research* **63**, 79-85, (2002)
- [101] Morais S., Pereira MC.(2000) Application of stripping voltammetry and microelectrodes *in vitro* biocompatibility and *in vivo* toxicity tests of AISI 316L corrosion products, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*14, 48–54.
- [102] Lina FH., Hsu YS., Lin SH., Sun JS.(2002)The effect of Ca/P concentration and temperature of simulated body fluid on the growth of hydroxyapatite coating on alkali treated 316L stainless steel, *Biomaterials*23, 4029-4038.
- [103] <http://www.icp.hacettepe.edu.tr/nedir.shtml> Erişim tarihi 04.05.2015
- [104] http://icpmslab.mersin.edu.tr/icp_ms_nedir.php Erişim tarihi 04.05.2015
- [105] Ashar, B.V. (1987) Characterization and Testing of Biomaterials and Medical Devices.MD&DI January, s.57-63.
- [106] Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Immunological Methods*; 65, 55-63.
- [107] Oktar, N. (2009) K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin MTT (3-[4,5dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 3-25.
- [108] Catauro,M., Bollino, F., Papale F., Gallicchio, M., Pacifico, S. (2015) Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO₂/PEG hybrid materials synthesized by sol–gel technique. *Materials Science and Engineering*. (48), 548–555.

- [109] Stockert , J., Blázquez –Castro, A., Cañete, M., Richard, W. H., Vilanueva, Á. (2012) MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* (114) 785– 796.
- [110] Yun, Y.H., Dong, Z., Yang, D., Schulz, M.J., Shanov, V.N., Yarmolenko, S., Xu, Z., Kumta, P., Sfeir, C. (2009) Biodegradable Mg corrosion and osteoblast cell culture studies. *Materials Science and Engineering* (29) 1814–1821.
- [111] Chen, X., Li, Y., Hodgson, P. D., Wen, C. (2011) In vitro behavior of human osteoblast-like cells (SaOS₂) cultured on surface modified titanium and titanium–zirconium alloy. *Materials Science and Engineering* (31)1545–1552.
- [112] Zhou, C., Deng, C., Chen, X., Zhao, X., Chen, Y., Fan, Y., Zhang, X. (2015) Mechanical and biological properties of the micro-/nano-grain functionally graded hydroxyapatite bioceramics for bone tissue engineering. *Journal Of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (48) 1–11.
- [113] Fagali, N., Grillo, C. A., Puntarulo, S., Fernández Lorenzo de Mele, M. (2015) Cytotoxicity of corrosion products of degradable Fe-based stents: Relevance of pH and insoluble products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (128) 480–488.
- [114] Karakaş, D. (2013) Kültür Ortamında Fibroblastların Varlığında A-549 Akciğer Kanseri Hücre Hattının Farklı Kemoterapi İlaçlarına Verdiği Yanıtın Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye, 33-39.
- [115] Sylvester, P.W. (2011)Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Molecular Biology*, (716) 157-168.
- [116] Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* (11) 127-152.
- [117] Şaybak, A. (2013) Farklı İçerikli Ağız Çalkalama Solüsyonlarının İnsan Gingival Fibroblast Hücre Kültürleri Üzerindeki Toksik Etkilerinin İncelenmesi Ve Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 29-32.

- [118] Kapanen, A., Ilvesaro, J., Danilov, A., Ryhanen, J., Lehenkari, P., Tuukkanen, J. (2002). Behaviour of Nitinol in osteoblast-like ROS-17 cell cultures. *Biomaterials* (23) 645–650.
- [119] Tsaousi, A., Jones, E., Case, C.P. (2010) The *in vitro* genotoxicity of orthopaedic ceramic (Al₂O₃) and metal (CoCr alloy) particles. *Mutation Research*. (697) 1–9.
- [120] Alinovi, R., Goldoni, M., Pinelli, S., Campanini, M., Aliatis, I., Bersani, D., Lottici, P., Iavicoli, S., Petyx, M. (2015) Oxidative and pro-inflammatory effects of cobalt and titanium oxide nanoparticles on aortic and venous endothelial cells. *Toxicology in Vitro* (29) 426–437.
- [121] Alarifi, S., Ali, D., Suliman, A.O.(2013) Oxidative stress contributes to cobalt oxide nanoparticles-induced cytotoxicity and DNA damage in human hepatocarcinoma cells. *Internaitonal Journal Nanomedical* (8) 189-199.
- [122] Al-Nazhan, S.(2004) SEM observations of the attachment of human periodontal ligament fibroblasts to non-demineralized dentin surface in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* (97) 393-7.
- [123] Ye, X., Tse, Z., Tang, G., Song, G. (2015) The effect of electropulsing induced gradient topographic oxide coating of Ti–Al–V alloy strips on the fibroblast adhesion and growth. *Surface & Coatings Technology* (261) 213–218.
- [124] Díaz1,C., Mändl, S., Pereiro, R., Fernández, B. (2015) Nanomodificated Surface CoCr Alloy for Corrosion Protection of MoM Prosthesis. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, (6) 91-99.
- [125] Puskar, T., Jevremovic, D., Williams, R. J., Eggbeer, D., Vukelic, D., Budak, I. (2014) A Comparative Analysis of the Corrosive Effect of Artificial Saliva of Variable pH on DMLS and Cast Co-Cr-Mo Dental Alloy. *Materials* (7), 6486-6501.
- [126] Shen, W., Cai,K., Yang, Z., Yan, Y., Yang, W., Liu, P. (2012) Improved endothelialization of NiTi alloy by VEGF functionalized nanocoating. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (94) 347– 353.
- [127] González – Sarmiento, A., Encinar, J. R., Marchante-Gayón, J. M., Sanz-Medel, A. (2009) Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS Analytical and Bioanalytical Chemistry (393) 335–343.

- [128] Wang, L., Zhao, X., Ding, M.H., Zheng, H., Zhang, H.S., Zhang, B., Li, X.Q., Wu, G.Y. (2015) Surface modification of biomedical AISI 316L stainless steel with zirconium carbonitride coatings. *Applied Surface Science* (340) 113–119.
- [129] Yazıcı, M., Çomaklı, O., Yetim, T., Yetim, A.F., Çelik, A. (2015) The effect of plasma nitriding temperature on the electrochemical and semiconducting properties of thin passive films formed on 316 L stainless steel implant material in SBF solution. *Surface & Coatings Technology* (261) 181–188.
- [130] Antunes, R.A., Rodas, A.C.D., Lima, N.B., Higa, O.Z., Costa, I. (2010) Study of the corrosion resistance and in vitro biocompatibility of PVD TiCN-coated AISI 316 L austenitic stainless steel for orthopedic applications. *Surface & Coatings Technology* (205) 2074–2081.
- [131] Hiromoto, S. Inoue, M., Taguchi, T., Yamane, M., Ohtsu, N. (2015) In vitro and in vivo biocompatibility and corrosion behaviour of a bioabsorbable magnesium alloy coated with octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia* (11) 520–530.
- [132] Xue, P., Li, Y., Li, K., Zhang, D., Zhou, C. (2015) Superelasticity, corrosion resistance and biocompatibility of the Ti–19Zr–10Nb–1Fe alloy. *Materials Science and Engineering* (50) 179–186.
- [133] Talbot, J., Weiss, A. (1994) Laboratory Methods for ICP-MS Analysis of Trace Metals in Precipitation. Hazardous Waste Research and Information Center 3-8.
- [134] Amini, F., Borzabadi Farahani, A., Jafari, A., Rabbani, M., (2008) *In vivo* study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthodontic Craniofacial Research*. 11:51–56
- [135] Fernández-Miñano, E., Ortiz, C., Vicente, C., Calvo, J., Ortiz, A.J. (2011) Metallic ion content and damage to the DNA in oral mucosa cells of children with fixed orthodontic appliances. *BioMetals* 24: 5, 935-941.
- [136] Hafez, H. S., Selim E. M., Eid, F.H., Tawfik, W. A., Al-Ashkar, E. A., Mostafa, Y. A. (2010) Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: A longitudinal in-vivo study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 140:3, 298-308.

- [137] Staffolani, N. , Damiani, F., Lilli, C., Guerra, M., Staffolani, N.J, Belcastro, S., Locci, P. (1999) Ion release from orthodontic appliances. *Journal of Dentistry* 27:6, 449-458.

ÖZGEÇMİŞ

İLETİŞİM VE KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı: Büşra Öztürk

Doğum Tarihi: 29.07.1990

Doğum Yeri: Çankırı\Orta

Email: busragundede@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2012-2015: Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji

Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)

2008-2012: Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyet Fakültesi,

Biyoloji(İngilizce) Bölümü (Lisans)

2004-2008: Halide Edip Adıvar Anadolu Lisesi

1997-2004: İhsan Kurşunoğlu İlköğretim Okulu

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

B. Gündede, Ö.Mutlu and N. Gülsoy(2015) Effect of Ti, Nb and Zr Additives on Biocompatibility of Injection Molded 316L Stainless Steel for Biomedical Applications. XIII International Conference on Medical Informatics and Biomedical Engineering, ICMIBE 2015. Dubai, UAE.

Gulsoy, H.O., Pazarlioglu, S., **Gundede, B.**, Mutlu, O., Gulsoy,N. (2015) Effect of Zr, Nb and Ti Addition on Injection Molded 316L Stainless Steel for Bio-applications: Mechanical, Electrochemical and Biocompatibility Properties. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical (İncelemede).

Gulsoy, H.O., Pazarlioglu, S., **Gundede, B.**, Mutlu, O., Gulsoy,N.(2015) Enhancing corrosion resistance and biocompatibility of injection molded 316L stainless steel for bio-applications. 16 Congreso Científico Internacional del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Küba. 22-26 Haziran.