

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**METALİK DAMAR STENTLERİNDE  
RESTENOZ RİSKİNİ AZALTICI VE DOĞAL ENDOTELİZASYON  
HIZLANDIRICI YENİLİKÇİ KAPLAMALAR**

**DOKTORA TEZİ**

**Çağatay YELKARASI**

**Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Programı**

**MAYIS 2022**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**METALİK DAMAR STENTLERİNDE  
RESTENOZ RİSKİNİ AZALTICI VE DOĞAL ENDOTELİZASYON  
HIZLANDIRICI YENİLİKÇİ KAPLAMALAR**

**DOKTORA TEZİ**

**Çağatay YELKARASI  
(521142003)**

**Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa ÜRGEN**

**MAYIS 2022**



İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 521142003 numaralı Doktora Öğrencisi Çağatay YELKARASI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "METALİK DAMAR STENTLERİNDE RESTENÖZ RİSKİNİ AZALTICI VE DOĞAL ENDOTELİZASYON HIZLANDIRICI YENİLİKÇİ KAPLAMALAR" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Prof. Dr. Mustafa ÜRGEN** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Prof. Dr. Servet TİMUR** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Prof. Dr. Gökhan ORHAN** .....  
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

**Prof. Dr. Kürşat KAZMANLI** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Doç. Dr. Ergün KELEŞOĞLU** .....  
Türk - Alman Üniversitesi

**Teslim Tarihi** : **22 Nisan 2022**  
**Savunma Tarihi** : **10 Mayıs 2022**



## ÖNSÖZ

İlk olarak eğitim hayatın boyunca maddi ve manevi destekçim olan, her zaman ne kadar şanslı olduğumu hissettiren aileme teşekkür ediyorum, yine en zorunu siz yaptınız.

Bana mesleğimi öğreten, fikirleri bende yeni ufuklar açan, yaptığım akademik çalışmaları en az benim kadar sahiplenen, bilimsel merakına her zaman hayran olduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa ÜRGEN'e destekleri için teşekkür ederim.

Akademik ya da akademi dışında istisnasız her türlü durumda kapısını çalabileceğimi bildiğim sevgili hocalarım Prof. Dr. İbrahim S. TİMUR'a, Dr. Öğr. Üyesi Nuri SOLAK'a, Prof. Dr. Kürşat KAZMANLI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖRNEK'e, Doç. Dr. Reza NOFAR'a ve Prof. Dr. Gültekin GÖLLER'e, Prof. Dr. Hakan Özgür ÖZER'e yardımları, destekleri ve fikirleri için ayrıca teşekkür ederim.

Önce arkadaşım sonra çalışma arkadaşlarım olan sevgili Erkan KAÇAR'a, Burçak AVCI'ya, Eren SEÇKİN'e, Göksel HIZLI'ya, Serdar Sonay ÖZBAY'a, Bilgehan Murat ŞEŞEN'e, Beste PAYAM'a, Cihan ERDEM'e, Seyhan ATİK'e, Burak ve Gökçe EVREN'e, Gizem SOYDAN'a, Emin KONDAKÇI'ya, Doğukan ÇETİNER'e, Kağan BENZEŞİK'e, Nagihan SEZGİN'e, Sinem ERASLAN'a, Burcu EROĞLU'na, Nur Ayça ÖZDEMİR'e, Güney AKDAŞ'a, Pınar AFŞİN'e, Pınar YAVUZ KAYA'ya, Berke KARAMAN'a, Nourhan R. MOHAMED'e, Hüseyin SEZER'e, Sevgin TÜRKELİ'ne, Selim ERTÜRK'e ve Murat UZUN'a, Aykut GÜNGÖR'e, Emrah GÜZELER'e teşekkür ederim.

Tüm bu süreçte yanımda olduğu için kendimi değerli hissettiğim, tezimi okunabilir hâle getiren değerli insan, eşim, Perim YELKARASI'na da çok şey borçlu olduğumun bilinmesini isterim.

216M520 kodlu proje kapsamında tez çalışmamı destekleyen ve tamamlanmasını sağlayan TÜBİTAK'a, proje ortağımız ARRS'ye ve Jozef Stefan Enstitüsü'nden Nina RECEK'e, Ita JUNKAR'a, Janez KOVAČ'a, Eva LEVIČNIK'e ve Miran MOZETIČ'e teşekkür ederim.

Mayıs 2022

Çağatay YELKARASI  
(Metalurji ve Malzeme Mühendisi)



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR .....	ix
SEMBOLLER .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xix
SUMMARY .....	xxi
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>3</b>
2.1 Damar Yapısı, Plak Oluşumu ve Anjiyoplasti .....	3
2.2 Kardiyovasküler Stentlerde Görülen Problemler .....	6
2.2.1 Fiziksel özelliklere bağlı sorunlar .....	6
2.2.2 Biyouyumluluğa bağlı sorunlar (restenoz ve tromboz).....	10
2.3 Kardiyovasküler Stentlere Yapılan Yüzey İşlemleri.....	11
2.3.1 Kardiyovasküler stentlere uygulanan nanoyapılandırma çalışmaları .....	13
<b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>17</b>
3.1 EDB ile Yapılan Kaplamalar.....	17
3.1.1 EDB ile ince film üretimi.....	17
3.1.2 EDB ile üretilen ince filmlerin kimyasal ve morfolojik karakterizasyonu	20
3.1.3 EDB ile üretilen ince filmlerin mekanik karakterizasyonu.....	21
3.1.4 EDB ile üretilen ince filmlerin kan uyumu testleri .....	21
3.2 KAFBB ile Yapılan Kaplamalar .....	24
3.2.1 KAFBB ile ince filmlerin üretimi .....	24
3.2.2 KAFBB ile üretilen ince filmlerin morfolojik karakterizasyonu .....	25
3.3 MAS Yöntemi ile Yapılan Kaplamalar .....	26
3.3.1 MAS yöntemi ile ince filmlerin üretimi.....	26
3.3.2 MAS ile üretilen kaplamaların mekanik karakterizasyonu.....	28
3.3.3 MAS ile üretilen kaplamaların morfolojik ve kimyasal karakterizasyonu	28
3.3.4 MAS ile üretilen filmlerin biyolojik testleri .....	29
3.3.4.1 Hücre büyümesi testleri.....	29
3.3.4.2 MAS ile üretilen filmlerin kan uyumu testleri .....	31
<b>4. DENEY SONUÇLARI VE İRDELEMELER .....</b>	<b>33</b>
4.1 EDB ile Üretilen Titanyum ve Zirkonyum Kaplamalar .....	33
4.1.1 Morfoloji ve mikroyapı sonuçları .....	33
4.1.2 Yüzey enerjisi sonuçları .....	37
4.1.3 Mekanik test sonuçları .....	38
4.1.4 Kan uyumu testleri .....	41
4.1.4.1 Ardıl işlem yapılmamış numunelerin (EDB-Ti) kan uyumluluk testleri	41
.....	41

4.1.4.2 Sadece HT işlemleri yapılmış numunelerin kan uyumluluk testleri .....	43
4.1.4.3 Sadece PL işlemleri yapılmış numunelerin kan uyumluluk testleri .....	44
4.1.4.4 HT ve PL işlemleri yapılmış numunelerin kan uyumluluk testleri ....	46
4.1.5 EDB ile elde edilen kaplamaların genel değerlendirmesi .....	48
4.2 KAFBB Yöntemi ile Yapılan Kaplamalar .....	48
4.2.1 KAFBB-Ti kaplamaların morfolojik incelemeleri ve anodizasyon sonuçları .....	48
4.2.2 KAFBB-Zr kaplamaların morfolojik incelemeleri ve anodizasyon sonuçları .....	50
4.2.3 KAFBB ile elde edilen kaplamaların genel değerlendirmesi.....	57
4.3 MAS ile Kaplanan Numuneler .....	57
4.3.1 MAS-Ti numunelerinin üretimi .....	57
4.3.2 MAS-Ti numunelerinin anodizasyonu .....	58
4.3.3 MAS-Ti-ANO numunelerinin ultrasonikasyonu.....	60
4.3.4 Mekanik test sonuçları .....	62
4.3.5 <i>cTi</i> yüzeyinin PL işlemleri öncesi/sonrası morfolojik ve kimyasal analizleri .....	63
4.3.5.1 Atomik kuvvet mikroskobu (AKM) analizleri.....	63
4.3.5.2 XPS analizleri.....	64
4.3.5.3 Islatma açısı ölçümleri .....	68
4.3.6 Biyolojik testler .....	69
4.3.6.1 <i>cTi</i> yüzeyinde yapılan hücre büyümesi testleri .....	70
4.3.6.2 <i>cTi</i> yüzeyinde yapılan kan uyumu testleri.....	72
4.3.7 <i>cTi</i> ve <i>cTi+PL</i> numunelerinin genel değerlendirmesi.....	74
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>77</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>81</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>89</b>

## KISALTMALAR

<b>316 LVM</b>	: Düşük Karbonlu Vakumda Ergitilmiş 316 Paslanmaz Çelik
<b>EDB</b>	: Elektron Demeti ile Buharlaştırma
<b>DAK</b>	: Düşük Açılı Kaplama
<b>KAFBB</b>	: Katodik Ark Fiziksel Buhar Biriktirme
<b>MAS</b>	: Manyetik Alanda Sıçratma
<b>ANO</b>	: Anodizasyon
<b>US</b>	: Ultrasonikasyon
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>SE</b>	: İkincil Elektron
<b>SEI</b>	: İkincil Elektron Görüntüsü
<b>FIB</b>	: Odaklanmış İyon Demeti
<b>R</b>	: Yuvarlak (Trombosit yayılımı derecesi)
<b>D</b>	: Dentritik (Trombosit yayılımı derecesi)
<b>SD</b>	: Yayılmış Dentritik (Trombosit yayılımı derecesi)
<b>S</b>	: Yayılmış (Trombosit yayılımı derecesi)
<b>FS</b>	: Tamamen Yayılmış (Trombosit yayılımı derecesi)
<b>Ağ.%</b>	: Ağırlıkça Yüzde Bileşim
<b>Hac.%</b>	: Hacimce Yüzde Bileşim
<b>EDX</b>	: Enerji Dağılım X-ışını Spektrometresi
<b>EG</b>	: Etilen Glikol
<b>XPS</b>	: X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi
<b><i>pTi</i></b>	: Düz Kaplanmış 316 LVM
<b><i>cTi</i></b>	: Plazma İşlemi Görmüş, Düz Titanyum Kaplanmış 316 LVM
<b><i>pTi+PL</i></b>	: Düz Kaplanmış 316 LVM
<b><i>cTi+PL</i></b>	: Plazma İşlemi Görmüş, Nanodesenli Titanyum Kaplanmış 316 LVM
<b>SS</b>	: Paslanmaz çelik
<b>FS</b>	: Tamamen Yayılmış (Trombosit yayılımı derecesi)



## SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$	: Selsiyus
$R_a$	: Pürüzlülük
$\omega$	: İnce film XRD giriş açısı





## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 3.1 : DAK için uygulanan kaplama parametreleri.....	19
Çizelge 3.2 : EDB ile yapılan kaplamaların kodları.....	20
Çizelge 3.3 : KAFBB sisteminde uygulanan parametreler.....	24
Çizelge 3.4 : KAFBB ile kaplanan numunelerin anodizasyonu için kullanılan parametreler.....	25
Çizelge 3.5 : Kaplama öncesi iyonlar ile dağlama işlemini parametreleri.....	26
Çizelge 3.6 : Titanyum kaplama parametreleri.....	27
Çizelge 3.7 : Anodizasyon parametreleri.....	27
Çizelge 4.1 : Tüm DAK kaplamaların ıslatma açıları.....	38
Çizelge 4.2 : EDB yöntemi ile kaplanıp kan uyumu testi uygulanan numunelerin trombosit aktifleşme durumları.....	48
Çizelge 4.3 : $pTi$ ve $cTi$ 'nin plazma işlemi öncesi ve sonrası ıslatma açıları.....	68



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Kardiyovasküler damar yapısı.....	3
Şekil 2.2 : Plak oluşumu sebebi ile damarın daralması. ....	4
Şekil 2.3 : Plak oluşumu sebebi ile damar daralmasının aşamaları. ....	5
Şekil 2.4 : Balonlu stent ile damarın genişletilmesi. ....	6
Şekil 2.5 : (a) 316 L ve (b) NiTi stentin gradyan eko görüntüleri. ....	8
Şekil 2.6 : Farklı stent alaşımlarının CT altındaki görünürlük karşılaştırması.....	8
Şekil 2.7 : Farklı malzemelerden üretilen kardiyovasküler stentlere ait kesitlerin şekil ve ölçüleri. ....	9
Şekil 2.8 : Stent yerleştirilen açılmış bir damarın (a) stent yerleştirilmesinden hemen sonra (b) restenoz gelişimi sonrası kesit görüntüsü. ....	10
Şekil 3.1 : DAK mekanizması. ....	18
Şekil 3.2 : Oksijen plazması uygulaması (PL).....	19
Şekil 3.3 : EDB ile üretilen ince filmlerin 3 nokta eğme testi için hazırlanan numune tasarımı.....	21
Şekil 3.4 : Trombosit yayılmasının şematik tasviri. Soldan sağa yuvarlak (R), dentritik (D) yayılmış dentritik (SD), yayılmış (S), tamamen yayılmış (FS).....	23
Şekil 3.5 : MAS-Ti-ANO ve MAS-Ti-ANO-US ile kaplanan numunelerin 3 nokta eğme testi için hazırlanan numune tasarımı.....	28
Şekil 4.1 : Isıl işlem öncesi ve sonrası eğik titanyum kaplamanın SE görüntüleri....	33
Şekil 4.2 : Isıl işlem öncesi ve sonrası şekilli titanyum kaplamanın SE görüntüleri. ....	34
Şekil 4.3 : Isıl işlem öncesi ve sonrası eğik Zr kaplamanın SE görüntüleri. ....	34
Şekil 4.4 : Isıl işlem öncesi ve sonrası şekilli Zr kaplamanın SE görüntüleri. ....	35
Şekil 4.5 : EDB kaplama yüzeylerinin ısıl işlem öncesi ve sonrası SE görüntüleri. .	36
Şekil 4.6 : Şekilli Ti kaplamanın ısıl işlem öncesi ve sonrası ince film XRD desenleri ( $\omega = 1^\circ$ ).....	37
Şekil 4.7 : EDB yöntemi kaplanmış numunelerin eğme testinden önce ve sonraki SE görüntüleri.....	39
Şekil 4.8 : EDB yöntemi kaplanmış numunelerin eğme testinden önce ve sonraki SE görüntüleri.....	40
Şekil 4.9 : EBD ile Ti kaplanmış numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.....	42
Şekil 4.10 : EBD ile Zr kaplanmış numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri. ....	42
Şekil 4.11 : EBD ile Ti kaplamanın ardından ısıl işlem görmüş numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.....	43
Şekil 4.12 : EBD ile Zr kaplamanın ardından ısıl işlem görmüş numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.....	44
Şekil 4.13 : EBD ile Ti kaplamanın ardından plazma işlemi görmüş numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.....	45
Şekil 4.14 : PL işlemi ardından kan uyumu testi uygulanmış Zr kaplı numunelerin SE görüntüleri.....	45

- Şekil 4.15** : Isıl işlem ve takiben plazma işlemi yapılan EBD ile Ti kaplanmış numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri..... **46**
- Şekil 4.16** : HT ardından PL işlemine tabi tutulmuş ve takiben kan uyumu testi uygulanmış Zr kaplı numunelerin SE görüntüleri. .... **47**
- Şekil 4.17** : KAFBB ile kaplanmış titanyum yüzeyinin SE görüntüsü..... **49**
- Şekil 4.18** : KAFBB ile kaplanmış ve farklı sürelerde anodize edilmiş Ti yüzeyinin SE görüntüleri..... **49**
- Şekil 4.19** : KAFBB ile Ti kaplanmış, ardından 20 sn. anodize edilmiş ve takiben ultrasonikasyon yapılmış numunenin SE görüntüsü. .... **50**
- Şekil 4.20** : KAFBB ile kaplanmış, farklı sürelerde anodize edilmiş ve ultrasonikasyon yapılmış Ti yüzeylerinin SE görüntüleri. .... **50**
- Şekil 4.21** : KAFBB ile kaplanmış Zr yüzeyinin SE görüntüsü. .... **51**
- Şekil 4.22** : Ağırlıkça %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hac. %1 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde yapılan anodizasyonun akım - zaman grafiği (40 V, 250 sn.). .... **51**
- Şekil 4.23** : Ağ. %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hac. %1 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde anodize edilen KAFBB-Zr'nin US sonrası BS görüntüsü ve işaretli bölgelerin EDS analizleri (40 V, 250 sn.)..... **52**
- Şekil 4.24** : KAFBB-Zr'nin Ağ. %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hac. %1 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde anodize edilen KAFBB-Zr'nin (a) US uygulanmayan ve (b) US uygulanan bölgelerinin SE görüntüleri (40 V, 100 sn.). .... **53**
- Şekil 4.25** : Ağırlıkça %0,3 NH<sub>4</sub>F ve hac. %5 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde yapılan anodizasyonun akım - zaman grafiği (40 V, 250 sn.). .... **54**
- Şekil 4.26** : Ağ. %0,3 NH<sub>4</sub>F ve hac. %5 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde anodize edilen KAFBB-Zr'nin (a) US uygulanmayan ve (b) US uygulanan bölgelerinin alınan SE görüntüleri (40 V, 250 sn.). .... **54**
- Şekil 4.27** : Ağırlıkça %0,3 NH<sub>4</sub>F ve hac. %5 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde yapılan anodizasyonun akım - zaman grafiği (60 V, 80 sn.). .... **55**
- Şekil 4.28** : Ağ. %0,3 NH<sub>4</sub>F ve hac. %5 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde anodize edilen KAFBB-Zr'nin ultrasonikasyon uygulanan/uygulanmayan bölgenin sınırından alınmış SE görüntüleri (60 V)..... **56**
- Şekil 4.29** : Ağ. %0,3 NH<sub>4</sub>F ve hac. %5 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde (a) 80 sn. ve (b) 40 sn. anodize edilen Zr kaplı 316 LVM'nin US uygulanan/uygulanmayan bölgenin sınırından alınmış SE görüntüleri (60 V, Eğim 60°). .... **57**
- Şekil 4.30** : MAS-Ti numunelerinin FIB'de hazırlanmış ve görüntülenmiş 3,3 kX (a) ve 20 kX (b) büyütmelelerdeki SE görüntüleri (30 kV, Eğim: 40°, SE)... **58**
- Şekil 4.31** : 1 µm kalınlığındaki tüm Ti filminin anodizasyonu sırasında kaydedilen akım – zaman grafiği (40 V, EG içerisinde ağırlıkça %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hacimce 1% H<sub>2</sub>O). .... **59**
- Şekil 4.32** : 1 µm Ti kaplanan numunelerin anodizasyon sırasında kaydedilen süreye bağlı akım yoğunluğu grafikleri (40 V, EG içerisinde ağırlıkça %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hacimce 1% H<sub>2</sub>O). .... **59**
- Şekil 4.33** : 7 dk. Ti kaplanıp 250 sn. anodize edilen numunenin SEM'de çekilmiş SE görüntüsü..... **60**
- Şekil 4.34** : Ultrasonikasyondan etkilenmemiş anodik oksit ve ultrasonikasyon ile anodik oksidin uzaklaştırıldığı alanların SE görüntüsü (Eğim = 30°). . **61**
- Şekil 4.35** : 7 dk. Ti kaplanıp 250 sn. anodize edilen numunenin ultrasonikasyon sonrası SEM'de çekilmiş SE görüntüsü (*cTi*). .... **61**
- Şekil 4.36** : Her bir adımda elde edilen yüzeylerin karşılaştırılması. .... **62**

Şekil 4.37 : $aTiO_2$ ve $cTi$ yüzeylerinin 3 nokta eğme testi sonrasındaki SE görüntüleri. ....	63
Şekil 4.38 : MAS-Ti-ANO-US ile elde edilen $cTi$ yüzeyinin AKM görüntüleri.....	64
Şekil 4.39 : $cTi$ yüzeyinin PL işleminden önce ve sonra çekilen geniş XPS spektrumları. ....	64
Şekil 4.40 : PL işleminden önce ve sonra $cTi$ yapısına ait titanyum bölgesinin XPS spektrumları. ....	66
Şekil 4.41 : $cTi$ yapısının PL işleminden önce ve sonra, flor ve oksijen bölgelerinin XPS spektrumları. ....	67
Şekil 4.42 : $cTi$ yapısının PL işleminden önce ve sonra XPS derinlik profili (kırmızı ve turuncu oklar, sırasıyla plazma işleminden önce ve sonra oksit tabakası kalınlığını temsil etmektedir).....	68
Şekil 4.43 : (a) $aTiO_2$ , (b) $cTi$ ve (c) $cTi+PL$ numunelerin yüzey topolojileri ve kimyası.....	69
Şekil 4.44 : PL işlemi öncesi/sonrası $cTi$ ve $pT$ yüzeylerinde (a) HCAEC ve (b) HCASMC ile gerçekleştirilen MTT sonuçları.....	71
Şekil 4.45 : PL işlemi öncesi/sonrası $cTi$ ve $pTi$ yüzeylerinde (a) HCAEC ve (b) HCASMC ile gerçekleştirilen MTT sonuçları.....	72
Şekil 4.46 : PL işlemi öncesi/sonrası $pTi$ ve $cTi$ numunelerin kan uyumu testi ardından çekilen SE görüntüleri. ....	73
Şekil 5.1 : Tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntem.....	79



## **METALİK DAMAR STENTLERİNDE RESTENOZ RİSKİNİ AZALTICI VE DOĞAL ENDOTELİZASYON HIZLANDIRICI YENİLİKÇİ KAPLAMALAR**

### **ÖZET**

Günümüzde, çıplak (kaplamasız) metalik stentlerin en büyük sorunlarından birisi stentleme yapılan bölgenin tekrardan tıkanmasıdır (restenoz). Bu çalışmada, nano boyutlarda desenlere sahip yüzeylerin canlı hücreler ile etkileşimleri üzerine yapılan son araştırmalara dayanarak, kardiyovasküler stent yüzeyleri üzerinde nanodesenler oluşturularak restenoz risklerinin azaltılabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Buradan hareketle biyouyumluluğu kanıtlanmış titanyum ve zirkonyum metalleri, 316 LVM paslanmaz çelik altlıklar üzerine, elektron demeti ile buharlaştırma (EDB), katodik ark (KAFBB) ve manyetik alanda sıçratma (MAS) temelli fiziksel buhar biriktirme yöntemleri ile çeşitli morfolojilerde kaplanmış ve bu yüzeyler üzerinde nanodesenler oluşturulması amacı ile çeşitli ardıl işlemler yapılmıştır.

Öncelikle, EDB ile eğik ve şekilli titanyum ve zirkonyum filmleri, doğrudan nanoyapılı olarak 316 LVM paslanmaz çelik üzerine kaplanmıştır. Ancak, plastik deformasyona tabii tutulduklarında bu kaplamaların yüzeyden döküldüğü görülmüştür. Nano yapıların tabana yapışma özelliklerinin geliştirilmesi amacı ile yapılan ısı işlemlerin de kaplama stabilitesinin yeterli düzeyde artıramadığını gösterilmiştir. Kaplamaların ısı işlem öncesi ve sonrası kan uyumuna sahip olmadığı, ek olarak yapılan oksijen plazması işleminin de bu durumu değiştirmedeği görülmüştür.

KAFBB yöntemi ile titanyum ve zirkonyum kaplanan 316 LVM numunelerinde ise yüzey homojenliğini bozan makro parçacık oluşumları görülmüştür. Yüzeyde nanoyapıların oluşması ve bu makro parçacıkların dökülmesi için kaplı numuneler farklı parametrelerle anodizasyon işlemlerine tabii tutulmuştur. Anodizasyon sonucunda nanoyapıların oluştuğu görülmüş, ancak makro parçacıkların dökülmediği gözlenmiştir. Takiben yapılan ultrasonikasyon işleminin de bu makro parçacıkların dökülmesinde başarısız olduğu görülmüştür.

Son olarak, MAS yöntemi ile kaplama denemeleri yapılmış ve sonuç olarak oldukça homojen titanyum kaplamalar elde edilmiştir. Titanyum kaplanmış 316 LVM paslanmaz çelikler üzerinde nanoyapıların elde edilmesi amacı ile anodizasyon işlemi yapılmış ve işlem sonucu elde edilen gevrek  $TiO_2$  nanotüp/nanopor yapısının plastik deformasyon altındaki mekanik dayanımlarının oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu sebeple, nanotüplü bölgeler ultrasonikasyon işlemine tabii tutulmuş ve nanotüpler yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Ultrasonikasyon işleminin ardından oksit katmanının yüzeyden uzaklaştırılmasıyla, altta kalan metalik yüzey üzerinde kesik küreler şeklinde, 100 nm çap ve 20 nm derinliğinde sahip desenlerin oluştuğu görülmüştür. 500 nm kalınlığındaki bu nanodesenli metalik kaplamanın en üst yüzeyinde 5 nm kalınlığında  $TiO_2$  ve florlanmış titanyum olduğu tespit edilmiştir. Eğme testi sonucunda, bu nanodesenli yapının mekanik dayanımlarının nanotüplü bölgeden çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Mekanik olarak stabil olduğu kanıtlanmasının

ardından bu nanodesenli numunelere, proje ortağımız Josef Stefan enstitüsü ile ortak olarak, biyouyumluluk testleri (MTT ve kan uyumu deneyleri) uygulanmıştır. Ek olarak, bu numunelere oksijen plazma işlemi yapılarak florlanmış titanyum tabakasının üst yüzeyden uzaklaşması sağlanmış ve bu kimyasal değişimin biyouyumluluk üzerindeki etkisi de ek olarak araştırılmıştır. MTT testleri sonucunda; nanodesenli numuneler üzerinde endotel hücrelerinin çoğalma hızının arttığı, restenoza sebep olan düz kas hücrelerinin çoğalma hızının ise yavaşladığı gözlenmiştir. Oksijen plazma işleminin ise, bu etkileri daha belirgin hale getirdiği gözlenmiştir. Nanodesenli bu numunelerin sadece oksijen plazması işleminin ardından kan uyumuna sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bu yenilikçi yüzey işlemleri ile stentlere uygulanabilecek, ilaç kullanmadan restenoz riskini düşürebilecek, endotelizasyon hızını artırabilecek, pıhtı oluşumunu engelleyen bir kaplama presesi geliştirilmiştir. Aynı zamanda, biyoimplantların biyouyumluluğu artırmak için yapışması yetersiz anodik oksit katmanlarının büyütülmesine gerek olmadığı; benzer boyutlarda nanodesenlere sahip, üzerinde sadece 5 – 10 nm kalınlığında oksit bulunduran yüzeylerin de bu amaç için yeterli olduğu ortaya çıkmıştır.

# **INNOVATIVE COATINGS FOR BARE METALLIC VASCULAR STENTS FOR REDUCTION OF RESTENOSIS AND ACCELERATION OF NATURAL ENDOTHELIALIZATION**

## **SUMMARY**

Relying on recent studies conducted on the positive influence and selectivity of nanostructured surfaces, we aimed to study the role of these structures on avoiding-decreasing the risk of restenosis for cardiovascular stents. For achieving this aim biocompatible titanium and zirconium metals are deposited on 316 LVM stainless steels with different morphologies using e-beam (EBD), cathodic arc (CAPVD) and magnetron sputtering (MS). Titanium and zirconium films deposited as slanted and spiral form by EBD spalled of the surface during application of plastic deformation, which is an integral part of stent application process. Heat treatment of the samples did not bring a substantial improvement. Accordingly we switched to other PVD methods for nanostructuring of the surfaces that consisted of Ti and Zr deposition with CAPVD and MAS on 316 LVM followed by porous anodization of them using ethylene glycol based electrolytes. However, the coatings produced with CAPVD possessed macroparticles that was not possible to remove during the anodization and following ultrasonication process. By using MAS, smooth surfaces without macroparticles are produced that are porous anodized successfully. However, the brittle porous anodic oxides on the surfaces cracked and locally peeled during plastic deformation. This problem is solved with the removal of the top brittle oxide with ultrasonication resulting in a nanopatterned titanium surface. These structures did not lose their integrity upon plastic deformation. Biocompatibility tests consisting of hemocompatibility, and MTT are applied on these samples. Additionally, samples are also subjected to oxygen plasma treatment for determining its contribution to biocompatibility. Samples with nanopatterned titanium surfaces are subjected to biocompatibility tests before and after oxygen plasma treatment. The results revealed that nanopatterned surfaces showed selectivity towards endothelial cells and oxygen plasma treatment further improved their biocompatibility. Plasma treatment also necessary for nanopatterned surface to be hemocompatible.

The nanopatterned surfaces obtained in this study comply with the appropriate features for selective vascular cell attachment. According to the studies, the viability of both HACEC and HCASMC, increases without selectivity for nanopore diameters below 35 nm. However, for those between 70 - 100 nm, selectivity towards HCAEC is obtained. We have observed similar vascular cell response using our nanopatterned surfaces with  $100 \pm 10$  nm pore diameters. The higher cell viability of HCAEC compared to HCASMC can be attributed to the morphology of the obtained nanopattern that resembles the natural nanoarchitecture of the internal vessel wall where endothelial cells attach.

Fluorinated titanium compounds were detected on nanopatterned surfaces after removing nanoporous  $\text{TiO}_2$  with ultrasonication. However, further improvement of

cell viability with oxygen plasma treatment is achieved. This result can be attributed to the restriction of the possible adverse effects of the fluorinated surface that is shielded by the oxide layer formed during oxygen plasma treatment. Our results also showed that the fluorinated Ti-containing nanopatterned surface exhibits better cell viability for HCAEC than those without fluorides, indicating the dominant role of nanopatterning on cell viability even in the presence of a fluorinated layer.

The nanofeatures obtained in this study have significantly lower thicknesses than those in the literature. These results indicate that the main morphological parameter to cell viability is the diameter of the nanofeatures rather than their thickness. Thus, the use of poorly adherent thick coatings, such as TiO<sub>2</sub> nanotubes/nanopores, to improve the cell viability of implants is not mandatory. As proposed, nanopatterned metallic titanium with similar diameters covered by a very thin oxide layer can function similarly.

Attaining desired cell viability is not sufficient for the biocompatibility of stents; they should also show the appropriate hemocompatibility properties for stent applications. During contact with blood, the formation of activated platelets is undesired since they induce a high risk for thrombotic reactions. Among the samples investigated in this study, the desired hemocompatibility properties are only attained for oxygen plasma-treated nanopatterned samples. It is well known that titanium can act as a thrombogenic material depending on its surface properties, the desired property for dental and orthopedic implants contrary to cardiovascular stents. Several studies in the literature indicate the positive role of fluorination on the osseointegration and thrombogenic properties of titanium-based orthopedic and dental implants. Therefore, fluorides may induce undesired hemocompatibility for stent applications because of their thrombogenicity, and achieving hemocompatibility with oxygen plasma treatment can be associated with the lack of contact between the fluorinated layer and blood. We have not come across any studies on the possible role of fluorides on hemocompatibility and cell viability for stent applications, and further work is needed to clarify these effects.

To maintain a healthy blood vessel and avoid ISR, the endothelization of the inner layer of the vessel is very important for cardiovascular stent applications. As the preferred proliferation of HCASMC is one of the main reasons for ISR, providing a surface feature that offers improved cell selectivity towards HCAEC is desired. The proposed nanopatterning method gave promising results in this regard. However, hemocompatibility is also crucial for the proper functioning of the stent material; thus, restricting the contact of thrombogenic species (fluorinated-Ti) on the nanopatterned surfaces with blood is also needed. Oxygen plasma treatment used in this study served successfully for this purpose. An additional benefit of the proposed method is the mechanical integrity of the nanopatterned layer on the stent material under plastic deformation, as cracking and spallation of the oxide layer may lead to undesired biological responses during functioning of the stents.

As a result of this study, a method for synthesizing titanium coatings on stainless steel surfaces with desired morphology and chemistry for stent applications was presented. The method enables the formation of periodical nanopattern thin titanium film on smooth stainless steel substrates. The unique morphology and chemistry are obtained by the four-step procedure, where titanium film is first deposited on the stainless steel surface, followed by anodization, ultrasonication, and oxygen plasma treatment. The anodization enables the formation of nanoporous/nanotubular anodic oxide consisting of titanium oxide and fluorinated titanium. After removing this fragile oxide layer by

ultrasonication, a nanopatterned titanium surface with periodical structures of about 20 nm in depth and about 100 nm in diameter is obtained. The diameter of the nanopatterns is in accordance with the sizes of biocompatible nanoporous titanium oxides reported in the literature. When subjected to plastic deformation, these structures retained their shape and integrity compared to the nanoporous oxide-covered surfaces. The results indicate that our unique surface preparation process substantially decreases the cracking and spalling tendency of the surface layer during the implantation of stents. Such a surface morphology in combination with altered surface chemistry and wettability was also beneficial for the adhesion and proliferation of HCAEC.

On the other hand, the adhesion and proliferation of HCASMC were suppressed mainly due to altered surface nano topography. The rapid endothelialization and suppressing the proliferation of smooth muscle cells are crucial for the performance of vascular stents since they prevent thrombosis and restenosis. Furthermore, the activation of blood platelets on the nanopatterned surface is suppressed significantly after oxygen plasma treatment. This effect indicated the role of additional surface features (chemistry and wettability) induced by oxygen plasma as the nanopatterned surface alone did not show a reduction in the number of adhered platelets.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünyada kardiyovasküler hastalıklar, tüm ölüm sebeplerinin üçte birine karşılık gelerek diğer tüm nedenlerden daha fazla hayat kaybına sebep olmaktadır [1,2]. Bu hastalıklara karşı koroner by-pass uygulamasına başlandığından beri bu oranlarda önemli düşüşler elde edilmiştir; ancak bu konudaki en önemli atılım, açık kalp ameliyatı gerektirmeden tıkalı damarları açmaya yönelik olarak geliştirilen metalik stent uygulamalarıdır. Bu uygulama, son çeyrek yüzyılda hasta kayıplarının azalmasına önemli katkıda bulunmuştur.

Stentler genel olarak, vücut içerisindeki daralan kanalların açık tutulması için kanal içine yerleştirilen ürünlerdir. Stentin üretileceği malzeme, uygulanan bölgenin fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak seçilmektedir. Tıkanan damarlardaki kan akışının tekrar düzene sokulması için ise metalik stentler kullanılmaktadır. Her yıl 2 milyondan fazla kişiye metalik stent uygulaması yapılmaktadır [3]. Bu sayının çok büyük bir bölümünü çıplak (kaplamasız) metalik stentler oluşturmaktadır. Çıplak metalik stentler, vasküler daralmalara karşı etkili bir çözüm gibi gözüke de birtakım başka sorunlara yol açma riskleri barındırmaktadır. Örneğin, stent uygulamasını takiben 6 ay içerisinde damarın uygulama yapılan bölgesinde tekrardan bir daralma görülebilmektedir. Tıp literatüründe restenoz denilen, stentleme sonrasında damar çapının tekrardan %50'den fazla azalması durumu, çıplak metalik stent uygulamalarının en büyük sorunudur. Çeşitli araştırmalarda restenoz görülme sıklığının %22-32 aralığında değiştiği bildirilmektedir [4,5]. Restenozun fizyolojik sebebi, stent olarak kullanılan malzemenin yeterli biyouyumluluğa sahip olmamasından kaynaklı olarak, damar içerisinde bulunan düz kas hücrelerinin damar çapını daraltacak kadar çoğalmasıdır [6]. Restenozu azaltmak için geliştirilen ilk yöntem, ilaçlı stentlerdir. Bu uygulamada; üzerinde herhangi bir kaplama bulunmayan metalik stentler, kontrollü ilaç salınımı yapabilecek, bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanlar ya da kanser ilaçları emdirilmiş biyolojik olarak stabil polimerler ile kaplanmakta, zamanla bu polimerlerden salınan bu ilaçlar sayesinde düz kas hücrelerinin çoğalması baskılanmaktadır. İlk evrede başarılı gözüken ilaçlı stentlerin

ileride çok daha ölümcül ve akut olan stent pıhtı oluşumu (stent trombozu) riskini artırdığı görülmüştür [7–9]. Yapılan istatistikî çalışmalarda, ilaçlı stent uygulamasını takiben 6 ay ile 3 yıl arasında tromboz riskinin kaplamasız stentlere nazaran %32 daha fazla olduğu belirlenmiştir [10]. Bu sebeple, ilaç emdirilmiş biyobozunur polimerlerle kaplı ikinci nesil ilaçlı stentler geliştirilmiştir. Bu stentler üzerinde yapılan çalışmalar umut vadetse de restenoz riskinin bağışıklık sistemi baskılayıcılar ve kanser ilaçları kullanılmadan düşürülebilmesinin, sağlık endüstrisinde önemli bir adım olacağı öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında, restenoz riskinin çıplak metalik stentlere yapılacak yüzey işlemleri sayesinde düşürülmesi amaçlanmıştır. 316 LVM (low-carbon vacuum melt) stent malzemesi üzerinde, nanodesenli titanyum ve zirkonyum esaslı yüzeyler oluşturularak hem biyoyumluluğu yüksek hem de mekanik özellikleri stent açılması sırasında oluşan yüklemelere dayanıklı yüzeylerin elde edilmesi hedeflenmiştir.

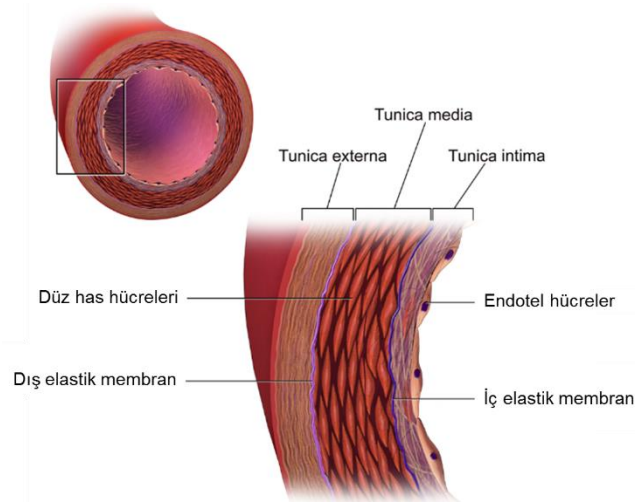
Bu amaca yönelik olarak tez çalışması kapsamında, üç farklı fiziksel buhar biriktirme (FBB) yöntemi (e-demeti ile buharlaştırma, katodik ark ve manyetik alanda sıçratma) kullanılarak titanyum ve zirkonyum kaplamalar gerçekleştirilmiştir. Elektron demeti ile buharlaştırma sisteminde “dar açılı elektron demeti” kullanılarak yapılan kaplamalarla nanodesenlerin doğrudan üretilmesi amaçlanmıştır. Katodik ark ve manyetik alanda yapılan düz kaplamalar üzerinde ise nanodesen oluşturma işlemi için gözenekli anodik oksidasyon yöntemi kullanılmıştır. Her üç yöntemle de elde edilen nanoyapılı yüzeylerin, stent uygulaması sırasında uygulanan plastik deformasyon altındaki davranışları incelenerek amaca en uygun nanodesen oluşturma yöntemi belirlenmiş, daha sonra bu yüzeylere biyoyumluluk deneyleri uygulanmıştır. Ayrıca, oksijen plazmasının biyoyumluluk üzerindeki etkisi de bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bu literatür araştırması bölümünde ilk olarak damar yapısı ve plak oluşumundan bahsedilecektir. İkinci bölümde kardiyovasküler stentlerde görülen sorunlar özetlenirken üçüncü bölümde metalik stentler, malzeme bilimi açısından incelenecektir. Dördüncü bölümde ise farklı malzemelerinin kardiyovasküler stent olarak kullanımının performans üzerindeki etkileri üzerinde durulacak; beşinci ve son bölümde de stent yüzeyini geliştirmeye yönelik literatürdeki çalışmalar özetlenecektir.

### 2.1 Damar Yapısı, Plak Oluşumu ve Anjiyoplasti

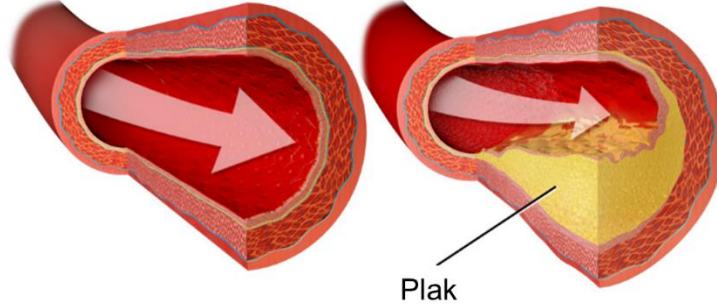
Kardiyovasküler sistem içerisinde bulunan damarlar genel olarak 3 ana katmandan oluşmaktadır (Şekil 2.1 :). Damar tipine bağlı birtakım farklılıklar olmak ile birlikte genel olarak en dış katmanda bağ dokusu (tunica externa), en kalın tabaka olan orta katmanda (tunica media) düz kas hücreleri, iç katmanda (tunica intima) ise tek sıra halinde endotel hücreleri bulunmaktadır. Endotel hücreler damar içerisindeki pıhtılaşmayı önleme işlevini görürler.



**Şekil 2.1** : Kardiyovasküler damar yapısı [11].

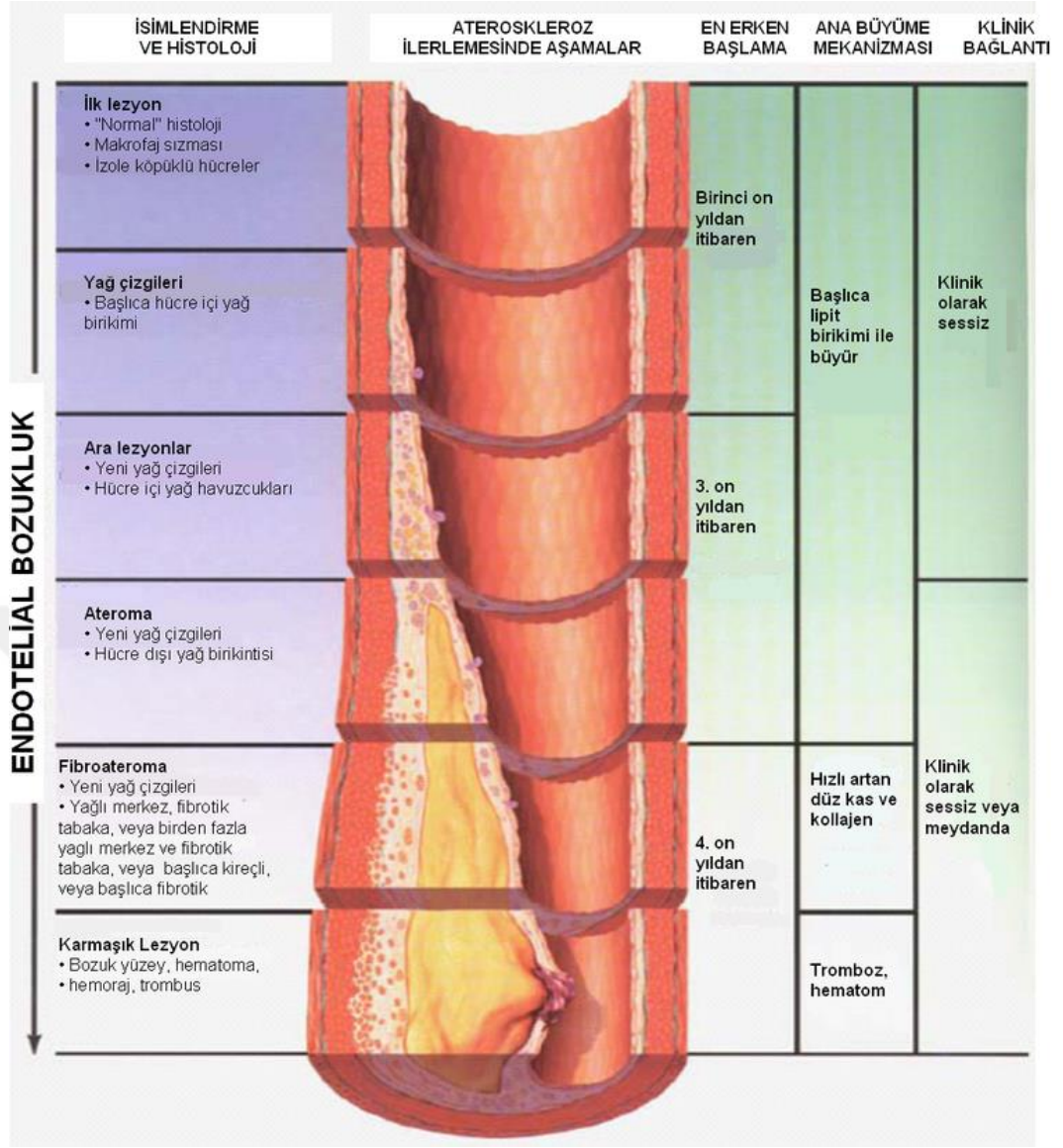
Kanda total kolesterolün yüksek olması, sigara tüketimi, yüksek tansiyon, şeker hastalığı ve obezite, yetersiz fiziksel aktivite, sağlıksız beslenme gibi sebeplerle kardiyovasküler sistemin bazı bölgelerindeki damarların içerisinde yağ bazlı dokuların

birikmesi sonucunda kan akışını engelleyen daralmalar görülebilir (Şekil 2.2 :). Arteroskleroz denilen bu daralmalar, damarın esnekliğini kaybetmesine sebep olur, bu oluşum halk arasında damar sertleşmesi olarak bilinmektedir.



**Şekil 2.2** : Plak oluşumu sebebi ile damarın daralması.

Damarların tıkanma mekanizması Şekil 2.3 :’te özetlenmiştir. Yukarıda bahsedilen dış etkenler, damarın en iç duvarında bulunan endotel hücrelerin bulunduğu tabakayı bozmakta, bu bozukluğun seviyesine göre damar tıkanıklığı ilerlemektedir. İlk aşamalarında hücre içinde yağ birikimleri ile başlayan bu süreç, ilerleyen yıllarda düz kas hücrelerinin çoğalması ile ileri seviye tıkanıklıklar ile devam etmektedir. Son aşamada ise bu durum tromboz, yani pıhtı oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu bölgeden oluşan pıhtı ise vücut içerisindeki hayati önemi olan başka damarları tıkeyabilmektedir. Pıhtı atması, damar tıkanıklığı gibi yıllar içerisinde yavaş yavaş ilerleyen bir süreç olmadığından, tıkadığı damarın işlevine bağlı olarak kalp krizi ve felç riski oluşturmakta, ani ölümlere sebep olabilmektedir. Bu sebeple; özellikle bazı kalp damar hastalıklarına sahip olan kişilere, düzenli olarak antikoagülan, yani kan sulandırıcı ilaçları kullanmaları tavsiye edilebilmektedir. Antikoagülan kullanımı ise fiziksel yaralanmalarda pıhtılaşmayı geciktirdiğinden başka bir hayati sorun yaratmaktadır.



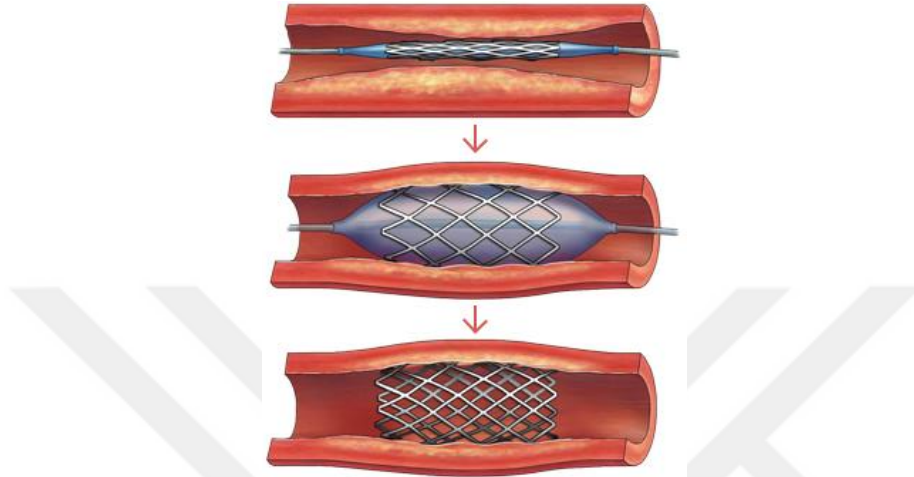
**Şekil 2.3 :** Plak oluşumu sebebi ile damar daralmasının aşamaları [12].

Daralan bölgelerde kan akışının tekrardan sağlanabilmesi için stent uygulamaları veya by-pass ameliyatları yapılması gerekebilir. İlk olarak Palmaz ve ekibinin geliştirdiği kardiyovasküler balonlu stent uygulamaları, son 30 yılda by-pass oranlarında ciddi bir düşüş yaşanmasına sebep olmuştur [13].

Kardiyovasküler stentler, malzemelerin plastik deformasyon ile kalıcı şekil değiştirmesi prensibi ile çalışmaktadır. Stentleme işlemi Şekil 2.4 :’te şekilsel olarak gösterilmiştir. Temel olarak 3 ana adımda gerçekleştirilen bu aşamalar şunlardır:

1. Balon üzerine sarılmış stent, kardiyovasküler sistem içerisinde kateter aracılığı ile ilerletilerek daralmış bölgeye ulaştırılır.

2. Balon içerisindeki gazın basıncı artırılarak stentin akma ve çekme dayanımı arasında bir değerde gerilmeye maruz kalması sağlanır. Plastik deformasyon ile kalıcı şekil değişimine uğrayan stent, tıkanan bölgeyi tekrardan genişletir.
3. Stent içerisindeki balonun söndürülmesi ve sistemden ayrılması ile kan akışı tekrardan sağlanmış olur.



**Şekil 2.4 :** Balonlu stent ile damarın genişletilmesi [14].

Kardiyovasküler stent uygulamaları, damar tıkanıklığı için kalıcı bir çözüm gibi gözüktüğü de bu malzemeler aynı zamanda vücutta çeşitli problemlere sebep olabilmektedir. Bu sorunlar, yetersiz mekanik özellikler ve düşük korozyon dayanımı gibi malzeme kaynaklı olabildiği gibi sadece yüzey özelliklerinin yeterli biyouyumluluğu gösterememesi ile de oluşabilmektedir. Literatür araştırmasının devamında kardiyovasküler stentlerde görülen sorunlar ve bunları engellemek için geliştirilen yüzey işlemlerinden bahsedilecektir.

## **2.2 Kardiyovasküler Stentlerde Görülen Problemler**

Kardiyovasküler stentlerde görülen problemler bu bölümde iki ana başlık altında incelenecektir. İlk kısımda, kullanılan malzemelerin fiziksel özelliklerine bağlı sorunlardan bahsedilirken; daha sonra ise biyouyumluluğa bağlı olarak kaynaklanan sorunlar üzerinde durulacaktır.

### **2.2.1 Fiziksel özelliklere bağlı sorunlar**

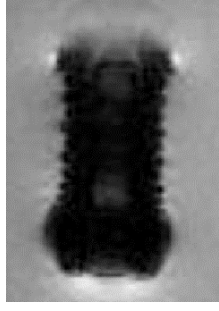
Günümüzde stentlerde genellikle paslanmaz çelik, kobalt-krom, nikel-titanyum ve platin-iridyum gibi metalik stentler kullanılmaktadır. Polimerik stent malzemeleri

mevcut olmakla birlikte bu stentler daha çok safra kanallarını açmak için kullanılmaktadır. Yine de polimerlerin kardiyovasküler sistem içerisinde kullanımı için çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Polimerik malzemeler dışında biyobozunur stentler elde etmek amacı ile demir ve magnezyum gibi metalik malzemeler de kullanılmaya başlanmıştır.

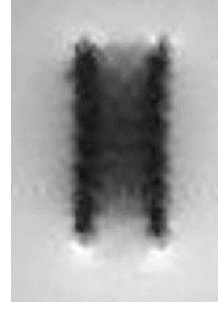
Metalik kardiyovasküler stent malzemeleri seçilirken değerlendirilmesi gereken 7 farklı özellik vardır [15]. İdeal bir kardiyovasküler stent; balon kateter üzerine sarılabilmeli, damarı istenen miktarda açabilecek kadar genişleyebilmelidir (yüksek sünekliliğe sahip olmalıdır). Ayrıca, yerleştirilmesinin ardından damarın yaptığı kapanma yönündeki kuvvete karşılık açık kalabilmeli (düşük recoil oranı), aynı zamanda hedef damara kadar ilerleyebilmesini sağlayacak miktarda da esnek olmalıdır. Manyetik rezonans / bilgisayarlı tomografi (MR / BT) altında da görünebilirliğe (düşük ferromanyetiklik, yüksek radyoopaklık), yüksek kan uyumluluğuna ve düşük restenoz riskine sahip olmalıdır. Bunların dışında, uygulama sırasındaki hata riskini düşürmek için ek özellikler de aranabilmektedir. Örneğin, balonlu stent olarak kullanılacak metal malzemenin akma ve çekme dayanım değerlerinin mümkün olduğu kadar birbirinden farklı olması istenir ki balonla şişirme sırasında stentin boyun vererek hasar alması ihtimali düşsün.

316 LVM paslanmaz çelik, kardiyovasküler stentler özelinde günümüzün en çok kullanılan stent malzemesidir [15]. Stent uygulamaları için mükemmel mekanik özelliklere ve yüksek korozyon direncine sahip olması, daha da önemlisi birçok fiziksel ve kimyasal özelliğinin farklı alanlarda yapılan çalışmalar neticesinde çok iyi biliniyor olması kardiyovasküler stent olarak kullanımının önünü açmıştır.

Paslanmaz çelikler, birçok avantajının yanında önemli sayılabilecek dezavantajlara da sahiplerdir. Örneğin, östenitik yapıda olmalarına rağmen ferromanyetik özelliklerinin tamamını kaybetmediklerinden manyetik rezonans (MR) cihazında net görüntü vermezler (Şekil 2.5 :) [16]. Bu sorunun üstesinden gelmek için alaşım içerisindeki nikel oranı artırılabilir de bu durum, alerjik komplikasyonlara sebep olabileceğinden [17] başka bir dezavantaj doğurmakta, nikel oranının düşürülmesi ise malzeme içerisindeki ferromanyetik malzeme miktarını (ferrit) artırdığından MR görünürlüğüne imkânsız kılmaktadır.



(a) 316 L



(b) NiTi

**Şekil 2.5 :** (a) 316 L ve (b) NiTi stentin gradyan eko görüntüleri (4,1 T; sagital düzlem, 3.9 msn TE, 1000 ms TR ve 12,8 cm görüş alanı) [16].

Benzer bir sorun da paslanmaz çelik stentlerin BT altında görünürlüğüne güç olmasıdır (Şekil 2.6 :). Bu sorunu aşmak için stent uçlarına platin gibi atom ağırlığı yüksek radyoopak işaretleyiciler konulsa da stent şeklinin belli belirsiz gözükmesi paslanmaz çelik stentlerin bir diğer dezavantajıdır.

PtCr	CoCr	CoCr	CoNi	CoCr	CoCr	316L SS	CoCr	316 SS
REBEL™ stent	Multi-link 8™ stent	Multi-link vision™ stent	Integrity™ stent	Coroflex™ blue stent	Prokinetic energy stent	Tsunami™ gold stent	Kaname™ stent	Libeté™ gold stent
0.081 mm (0.0032")	0.081 mm (0.0032")	0.081 mm (0.0032")	0.087 mm (0.0035")	0.065 mm (0.0026")	0.060 mm (0.0024")	0.080 mm (0.0031")	0.080 mm (0.0031")	0.081 mm (0.0032")

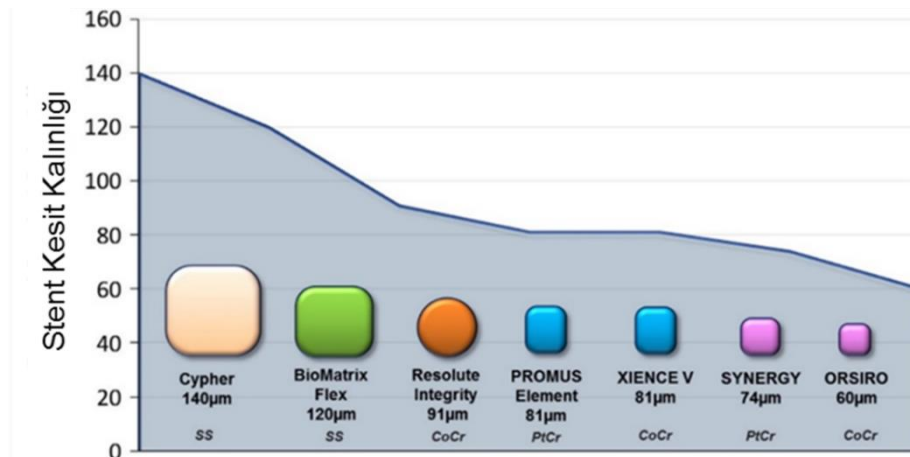
**Şekil 2.6 :** Farklı stent alaşımlarının CT altındaki görünürlük karşılaştırması (alt sıra, stent tel kesiti kalınlıklarını göstermektedir) [18].

BT altında görünürlüğü artırmak için platin gibi atom ağırlığı yüksek alaşımlardan yapılmış stentler de üretilmiştir. Örneğin, %90 platin – % 10 iridyum alaşımları yüksek radyoopasite göstermesine rağmen mekanik özellikleri stent olarak kullanımını sınırlamaktadır. Stent çapı, yerleştirilmesinin ardından %16 azalmaktadır. Paslanmaz çeliklerde ise bu oran %5'tir [19].

Titanyum ve tantal gibi korozyon direnci yüksek ve biyouyumluluğu mükemmel olan malzemeler de stent olarak üretilmektedir. Ancak platin bazlı stentlerde olduğu

gibi bu stentlerin de mekanik özellikleri, gereksinimleri tam olarak karşılamamaktadır. Akma ve çekme dayanımlarının birbirine yakın olması, plastik deformasyon için çalışma aralığını oldukça daraltmakta, çekme dayanımını geçmemek için düşük basınçlarda çalışmayı gerektirmektedir. Bu durum, şekil değişimindeki elastik deformasyon oranının artmasına, dolayısı ile balonun söndürülmesini takiben stent çapında büyük bir düşüş (recoil) görülmesine sebep olmaktadır. Titanyum stentlerin düşük sünekliğe sahip olması, paslanmaz çelik ya da kobalt-krom gibi malzemeleri tercih sebebi yapmaktadır [15].

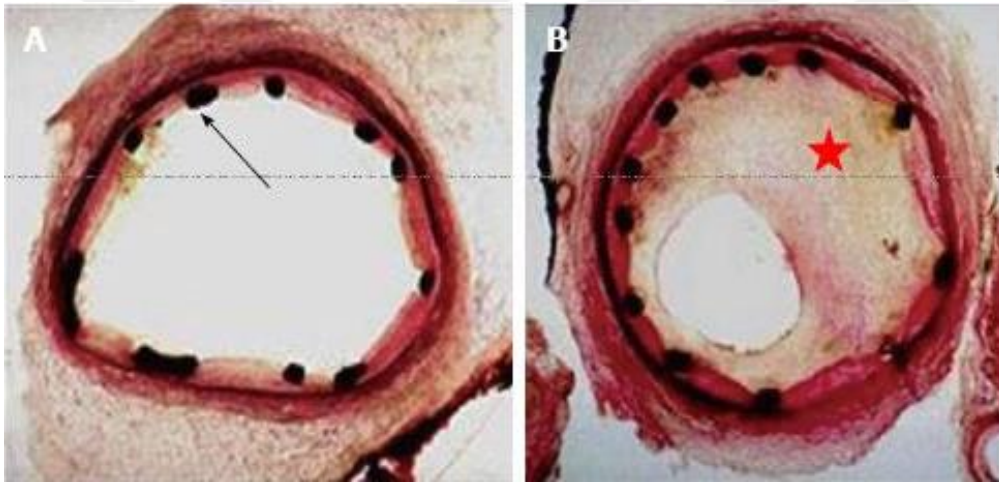
Radyal mukavemeti diğer stent malzemelerine göre yüksek olan kobalt-krom alaşımları, son teknoloji stentlerin gözdesi olmuştur. Yüksek mukavemete sahip olması sebebi ile bu alaşımdan yapılan stentlerin tel kesiti kalınlıkları diğer malzemelerle yapılan stentlere göre oldukça düşüktür. Şekil 2.7 :’de piyasada bulunan çeşitli kardiyovasküler stentlerin tel kesiti şekilleri (strut), ölçüleri ile birlikte gösterilmiştir. Görüldüğü üzere paslanmaz çelik stentlerin tel kesiti boyutları 100  $\mu\text{m}$ ’nin üzerindeyken kobalt-krom alaşımlarının ölçüleri 60  $\mu\text{m}$ ’ye kadar düşmüştür. Bu avantajının yanında kobalt – krom alaşımları, %35 oranında nikel içermektedir. Erden ve Albayrak tarafından yapılan çalışmada nikel alerjisi olan ve CoCr stendi takılmış hastalarda nikel alerjisi olmayan hastalara göre daha yüksek oranda restenoz görüldüğü raporlanmıştır [17]. Bu durumun sebepleri daha sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak açıklanacaktır.



**Şekil 2.7 :** Farklı malzemelerden üretilen kardiyovasküler stentlere ait kesitlerin şekil ve ölçüleri [20].

## 2.2.2 Biyouyumluluğa bağlı sorunlar (restenoz ve tromboz)

Sağlıklı bir damarda endotel hücrelerin herhangi bir şekilde zarar görmesi durumunda bu hücrelerin yeniden oluşması beklenmektedir. Bununla birlikte, damarların daralması sebebi ile yerleştirilen stentler bu endotel tabakasına zarar verebilmekte, bu bölgelerde düz kas hücrelerinin çoğalması ile birlikte stentlenen bölgenin yeniden daralması durumu, yani restenoz görülebilmektedir. Literatürde restenoz, stent uygulaması yapılan bölgenin çapının %50'nin üzerinde tekrardan daralması olarak tanımlanmıştır. Bu daralma vücudun abartılmış bir iyileşme tepkisidir. Neointimal hiperplazi olarak adlandırılan bu tabakanın kalınlaşmasını durdurulmaması halinde ise aynı bölge yeniden tamamen tıkanabilmektedir. Şekil 2.8 :’de restenoz öncesi ve sonrası damar kesiti gösterilmiştir.



**Şekil 2.8 :** Stent yerleştirilen açılmış bir damarın (a) stent yerleştirilmesinden hemen sonra (b) restenoz gelişimi sonrası kesit görüntüsü [21] ( ← ile gösterilen bölge stent kesitini, ★ ile gösterilen bölge neointimal hiperplaziyi göstermektedir).

Aynı şekilde bu bölgelerde damar için pıhtılaşma, yani tromboz görülebilmektedir. Torrado'nun çalışmasında stentleme sebebi ile görülen hasar mekanizmaları, görülme zamanına bağlı olarak özetlenmiştir [22] ve ilaçlı kardiyovasküler restenoz görülmesi bile 12 ay sonrasında tromboz görülme olasılığının mevcudiyeti şekilsel olarak gösterilmiştir.

Kardiyovasküler stentler sebebi ile tromboz oluşma ihtimali stendi oluşturan telin kesiti ve kalınlığı ile de ilintilidir. Jaryl Ng ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmada tel kesiti çevresindeki kan akışı modellenerek bölgesel hemodinamik kuvvetlerin restenozu ve trombosit aktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir [23]. Özellikle damar duvarına doğru yapıştırılmamış stent kısımları gibi bölgeler, çevresinde oluşan

düzensiz kan akışı nedeniyle, tromboz riskinin en çok arttığı bölgelerdir. Bu nedenle de stent gövde (strut) kesitinin incilmesi tromboz ihtimalini düşürmektedir. CoCr gibi yüksek akma ve çekme dayanımına sahip alaşımlardan yapılan stentler daha ince kesitlere sahip olduğundan bu stentlerde tromboz görülmesi ihtimali görece daha düşük olmaktadır. Aynı şekilde, stent üzerinde uygulanması planlanan herhangi bir kaplamanın stent kesit kalınlıklarını artırmaması ve herhangi bir sebeple damar içerisindeki kan akış düzenini bozmaması gerekmektedir. Aksi takdirde, kan akışının bozulacağı bu bölgelerde trombositlerin aktifleşmesi ile pıhtı oluşumu söz konusudur.

Pıhtı atması (tromboz), damar tıkanıklığı gibi yıllar içerisinde yavaş yavaş ilerleyen bir süreç olmadığından, gerçekleşmesi durumunda ölümle sonuçlanma oranı restenozdan çok daha yüksektir. Bu sebeple tromboz görülme ihtimaline karşı stent uygulaması sonrası aylarca antikoagülan ilaçların alınması tavsiye edilebilmektedir.

Kardiyovasküler stent uygulamasının damarda sağladığı verimi düşüren restenoz ve hastaya müdahale fırsatı vermeden ölümüne sebep olabilen tromboz gibi sorunların önüne geçmek için çeşitli yüzey işlemleri önerilmiştir.

### **2.3 Kardiyovasküler Stentlere Yapılan Yüzey İşlemleri**

Üzerinde herhangi bir kaplama olmayan, metalik malzemelerden yapılmış stentlere “çıplak metalik stentler” (bare metallic stents) denilmektedir. Literatürde yapılan farklı çalışmalarda restenoz ve trombozun önüne geçmek, dolayısı ile biyouyumluluğu artırmak için çıplak stentler üzerinde çeşitli metalik, seramik, inorganik ve organik kaplamalar yapılmıştır. Yine yüzey kimyasını, morfolojisini ve potansiyelini değiştirmek için stent yüzeyi üzerine çeşitli desenler yapılmış ve bu desenlerin etkisi incelenmiştir.

Tromboz ve restenoz riskini azaltmak için kardiyovasküler stentler üzerine yapılan kaplamaların en bilineni, ayrı bir stent kategorisinde değerlendirilen, ilaç kaplı stentlerdir. Birinci nesil ilaç kaplı stent adı verilen, “yüzeyi ilaç emdirilmiş kalıcı polimer” kaplı bu stentler genel olarak restenoz riskini düşürdüysen de uzun dönemde tromboz riskini artırdığından [24,25] operasyon sonrası kan sulandırıcı kullanım süresinin iki katına çıkmasına sebep olmuştur [26]. Bu durumun önüne geçmek için çıplak stentlerin biyobozunur polimerler içerisine emdirilmiş ilaçlarla kaplandığı “ikinci nesil ilaç kaplı stentler” geliştirilmiştir. Birinci nesilde görülen stent trombozu

riskini düşürme amaçlı geliştirilen bu ikinci nesil ilaçlı stentler de üzerlerinde bulunan biyobozunur polimer bir tabaka aracılığı ile, damar içerisine ilaç salınımı yapmaktadır. Birinci nesilden farklı olarak ikinci nesilde, damar içerisinde zamanla polimerin tamamı bozunmakta ve takılan stent uzun vadede çıplak metalik stende dönüşmektedir. Zotarolimus ve everolimus gibi bağışıklık sistemini baskılayıcı kanser ilaçlarının kullanıldığı bu stentler, birinci nesil ilaçlı stentlere göre şimdilik daha iyi sonuçlar vermektedir [24]. Buna karşın, ilaçlı stentlerin yerleştirilmesi sırasında bu polimerlerin soyulduğu da bazı araştırmalarda belirtilmiştir [27]. Yeni bir teknoloji sayılabilecek bu ikinci nesil ilaçlı stentler umut vadetse de düşük restenoz oranlarını ilaçsız bir uygulama ile yakalamak günümüz kardiyovasküler stent teknolojisinin öncelikli hedeflerinden birisidir [28,29].

İlaçsız stent uygulamaları için çeşitli metalik, seramik ve organik kaplama uygulamaları önerilmiştir. Bu yüzey işlemleri ile malzemenin biyoyumluluğunu tanımlayan protein ve hücrelerin stent yüzeyinde tutunmalarının kontrol edilmesi amaçlamıştır.

İlaçsız stent uygulamasına yönelik yapılan kaplamalardan birisi, yüksek kan uyumluluğuna sahip olduğu bilinen bir seramik malzeme olan silisyum karbürdür. Buna karşın, bu kaplama ile ilgili olarak yayınlanan raporlar birbirinden farklı sonuçlar içermektedir. Bazı çalışma grupları bu kaplamanın olumlu etkiler gösterdiğini raporlamışken [30], bazıları kayda değer bir fark görememiş [31], bazı çalışma grupları ise olumsuz etkiler raporlamıştır [32]. Benzer sonuçlar elmas benzeri karbon (DLC) kaplamalarla yapılan deneylerde de mevcuttur [33–35]. Tüm bu çalışmalarda dikkate alınmayan husus ise, silisyum karbür ve DLC gibi gevrek malzemelerin, stentin üzerine sarıldığı balonun şişirilmesi sırasında yüzeyde stabil kalıp kalmadığıdır.

Benzer çalışmalar alüminyum anodik oksit kaplama ile de yapılmış ve yüzeyde oluşturulan anodik oksit nanotüplerin ilaç taşıyıcı olarak kullanımı denenmiştir. Kollum ve arkadaşlarının çalışmasında aynı stentin üzerindeki kaplamanın balon ile şişirilme sırasında attığı görülüş ve bu durum ile restenoz riski arasında bağlantı kurulmuştur [36].

Radyoopasiteyi artırmak amacı ile paslanmaz çelik stent üzerine altın kaplama yapılan çalışmalar da mevcut olmakla birlikte, uygulama sonrası bu kaplamanın restenoz riskini artırdığı raporlanmıştır [37,38].

Tantal ile kaplanan paslanmaz çelik malzemenin mekanik kararlılığı Macionczyk ve ekibi tarafından incelenmiş, 4-nokta eğme testi altında yaptıkları ve eğme sebebi ile çatlayan tantalın pasifleşme davranışı raporlanmıştır [39]. Bir başka çalışmada da stendi yerleştirme ya da balonla şişirme sırasında kaplamada gerçekleşen çatlamların kötü sonuçlar doğurabileceğine değinilmiştir [15].

Politetraflorüretilen (PTFE), polietilen tereftalat (PET) ve poliüretan (PU) gibi polimerik kaplamalar üzerinde yapılan çalışmalarda polietilenin görece yüksek tromboz riskine sahip olduğu görülmüştür [40]. Buna karşılık, politetraflorüretilen ve poliüretan gibi hidrofobik yüzeylerin aynı zamanda endotel hücrelerin tutunmasını da engellediği görülmüştür [41]. Paslanmaz çelik ile aynı yüzey enerjisine sahip n-vinilpirrolidin ve potasyum sülfopropil akrilat gibi polimerlerin biyolojik etkilerinin ise paslanmaz çelikten farklı olduğu görülmüştür [42]. Bu durum, yüzey enerjisinin tek başına etkili bir mekanizma olmadığını göstermektedir.

İlaçsız stent uygulamasına yönelik yapılan kaplamalardan bir diğeri iridyum oksittir. Yüksek biyouyumlu olduğu bilinen iridyum oksidin, metalik stentlerin korozyonu sırasında çıktığı iddia edilen hidrojen peroksidi [43], su ve oksijene parçaladığı ve endotel hücrelerinin çoğalmasının üzerinde olumsuz etkisi olan hidrojen peroksidin parçalanmasının ise restenoz riskini düşürdüğü gösterilmiştir [44]. Hidrojen peroksit gibi oksitleme gücü yüksek olan ürünlerin stent korozyonu riskini artırması da muhtemeldir. Özellikle, oyuklanma gibi normal şartlarda görülmeyen korozyon mekanizmalarını tetiklemesi ihtimali de mevcuttur.

### **2.3.1 Kardiyovasküler stentlere uygulanan nanoyapılandırma çalışmaları**

Literatürdeki bazı çalışmalarda stent malzemelerinin biyouyumluluğunu artırmak için; kimyasal olarak kararlı, kan uyumluluğu yüksek olan bazı malzemelerin kaplama olarak stent üzerinde uygulanması önerilmiştir [8,45]. Özellikle TiO<sub>2</sub> gibi metal oksitler bu konuda öne çıkmaktadır [46,47]. Kaplama malzemesinin sahip olduğu kimyasal etkilerin yanında yüzey topografisinin de biyouyumluluk özellikleri açısından etkili olduğu görülmüştür. Literatürde, titanyumdan yapılmış metalik implantların yüzeyinin nano boyutlarda desenlere sahip olmasının avantajları

gösterilmektedir [48]. Kumlama [49], hidrotermal proses [50–53], anodizasyon [4,54] ya da yüzey alaşımlama ardından selektif çözme [9] gibi işlemlerle nano boyutlarda farklı morfolojiye sahip implant yüzeyleri elde edilebilmiş ve biyouyumlulukları farklı gruplar tarafından çalışılmıştır. Hatta, bu yöntemlerle elde edilen yüzeylerden bazıları ile ilaçlı stent uygulamalarında ilaç salınım hızının kontrol edilebilmesi amaçlanmıştır. [4]. Ancak, bu nanodesenlere sahip yüzeylere sahip implantların hastaya uygulanması sırasında, vücut içerisinde deformasyonu söz konusu ise (kardiyovasküler stentler gibi), bu gevrek oksit katmanlarının dökülme ihtimali artmaktadır. Bu sebeple, genel olarak, seramik kaplamaların stent uygulamaları için elverişli olmadığı düşünülebilir. Çünkü bu kaplamalar, stentin balonla şişirilmesi sırasında yüzeyden ayrılabilir, dolayısı ile sahip olduğu morfolojiyi kaybedebilir ya da vücudun başka bir bölgesinde tıkanmalara sebep olabilir. Tüm bunlara ek olarak, literatürde yüzeydeki bazı ayrılmaların restenoz riskini artırdığı not edilmiştir [36]. Sonuç olarak; çıplak metalik stentler üzerinde uygulanması önerilen en ideal kaplama malzemesi, hem seramik malzemeler gibi yüksek biyouyumluluğa sahip olmalı hem de stentin üretildiği malzeme kadar esnek olmalıdır. Bu iki özelliğin ise aynı anda elde edilmesi malzeme bilimi açısından oldukça güçtür.

Titanyum üzerinde yapılan diğer çalışmalarda kan uyumluluğunun düşük olduğu gösterilmiş [55], hatta bu özelliği sebebi ile yüksek kemik uyumuna (osseointegrasyon) sahip olması ile ilgili bağlantılar kurulmuştur [56]. Diğer çalışmalarda, titanyum içerisine belli oranlarda eklenen florun, ortopedik ve dental implant uygulamalarındaki pozitif etkisi gösterilmiş [57–61] ve implantın geri sökülme momentini artırdığı raporlanmışsa da [56,58,59] kardiyovasküler implantlar üzerindeki etkisi incelenmemiştir.

Sonuç olarak, nanodesenli yapıların kardiyovasküler stent yüzeylerinde hücre canlılığı açısından umut vadeden sonuçları olduğu raporlanmıştır. Ancak yapılan çalışmaların büyük bir bölümü bütüncül olmaktan uzaktır. Kimi çalışmalarda sadece kan uyumu (hemocompatibility), kimi çalışmalarda sadece hücre canlılığı ve tutunma özellikleri incelenmiştir. Her iki özelliği bir arada inceleyen sınırlı sayıda çalışmada ise kardiyovasküler stentlerin uygulanması sırasında maruz kaldığı plastik şekil değiştirmenin önerilen nanoyapılar üzerindeki etkisi incelenmemiştir. Oysa kardiyovasküler stentler üzerine yapılacak işlemler sonucunda elde edilen yüzey hem

biyouyumlu olmalı hem de stendin damar içerisindeki deformasyonu sırasında sorun yaratmamalıdır.





### **3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR**

Bu tez çalışmasında, kardiyovasküler stent üretiminde en çok kullanılan malzeme olan 316 LVM kalite paslanmaz çelik üzerinde yüksek biyouyumlu, plastik deformasyona dayanıklı nanodesenli yapıların elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, paslanmaz çelik numuneler öncelikle 3 farklı fiziksel buhar biriktirme yöntemi ile titanyum ve zirkonyum metalleri ile kaplanmıştır. Bu yöntemler; elektron demeti ile fiziksel buhar biriktirme (EDB), katodik ark fiziksel buhar biriktirme (KAFBB) ve manyetik alanda sıçratma (MAS) yöntemleridir. 316 LVM paslanmaz çelik üzerinde üretilmesi istenen nanodesenli yapılar, EDB yöntemi ile doğrudan üretilirken, KAFBB ve MAS yöntemleri ile kaplanan numunelerde kaplamayı takiben yapılan anodizasyon işlemi ile elde edilmiştir.

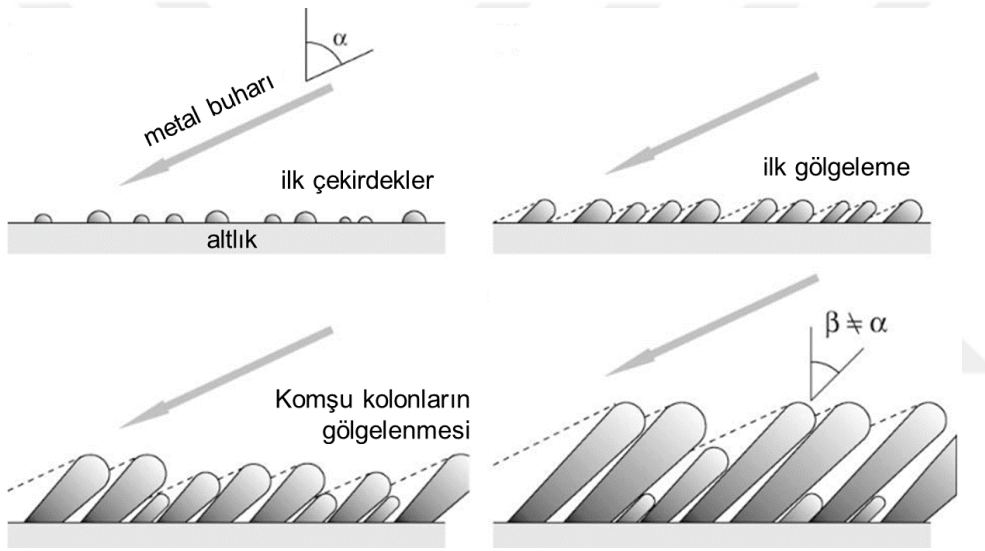
Yapılan çalışmaların sonucunda kardiyovasküler stent kaplaması olarak en uygun olan yöntemin MAS olduğu ortaya çıktığından bu yöntem ile elde edilen kaplamanın üzerine ek işlemler yapılmıştır. Özellikle mekanik kararlılığı artırmak amacı ile sırası ile anodizasyon (ANO) ve ultrasonikasyon (US) işlemine, biyouyumluluğu artırmak için de takiben oksijen plazması (PL) işlemi uygulanmıştır. Elde edilen kaplamanın mekanik özelliklerini incelemek için numunelere 3 nokta eğme deneyleri yapılmış; üretilen nanodesenli yüzeylere ileri morfolojik, kimyasal ve biyolojik testler yapılmıştır.

#### **3.1 EDB ile Yapılan Kaplamalar**

##### **3.1.1 EDB ile ince film üretimi**

Tez çalışması kapsamında; 1 mm kalınlığındaki 316 LVM numuneler, 10 mm x 10 mm boyutlarında kesilmiş ve mekanik olarak sırası ile 240, 320 400, 600, 800, 1200, 2500 numara SiC zımparalar ile parlatılmış, ardından sırasıyla 6 ve 1 µm elmas solüsyonlar ile ayna parlaklığına getirilmiştir. Parlatılmasının ardından numuneler, ultrasonik olarak aseton, etanol ve saf su ile temizlenmiştir. Numunelerin, optik profilometre ile ölçülen  $R_a$  değeri 8 nm'dir.

Bilindiği üzere, EDB sisteminde, buharlaştırılan malzemenin yüzeye geliş açısı değiştirilerek altlık üzerinde farklı eğim ve şekilde kaplamalar edilebilmektedir. Dar açılı kaplama (DAK) (GLAD - glancing angle deposition) olarak adlandırılan uygulanan bu EDB yönteminde buharlaştırılan ilk atomlar, kaplanacak yüzeye dar açıyla ( $1^\circ - 20^\circ$ ) geldiğinden ötürü sonradan gelen atomları gölgelemekte ve atomlarının ulaşamadığı bu bölgelerde kaplama gerçekleşemediğinden eğik kolonlardan oluşan filmlerin büyütülmesine olanak tanımaktadır (Şekil 3.1 :). Bu işlem sırasında, numune tutucunun sabit kalması ya da belli bir hızda sürekli olarak döndürülmesi sayesinde farklı şekillerde filmler de elde edilebilmektedir.



**Şekil 3.1** : DAK mekanizması [62].

Eğik filmlerin üretiminde gerekli açı hesapları için Denklem 3.1'deki bağıntı kullanılır (Şekil 3.1 :) [62,63]. Bu tez çalışmasında, buharın geliş açısı olan  $\alpha$ ,  $80^\circ$  olarak seçildiğinde, DAK uygulamalarında kullanılan Eşitlik 3.1'de verilen bağıntıya uygun olarak, kolonlar ve altlık arasındaki açı olan  $\beta$ 'nin yaklaşık  $35^\circ$  olarak elde edileceği görülmektedir. Bu kapsamda, numune tutucu, buharın geliş yönüne göre  $80^\circ$  olarak ayarlanmıştır.

$$(\beta) = (\alpha) - \arcsin\left[\frac{1-\cos(\alpha)}{2}\right] \quad (3.1)$$

DAK yöntemi ile farklı büyüme morfolojilerinde kaplamalar elde etmek mümkündür [64]. Bu bölümde, titanyum ve zirkonyum eğik kaplamalara ek olarak numune tutucunun döndürülmesi ile şekilli filmler de elde edilmiştir. Bu eğik ve şekilli

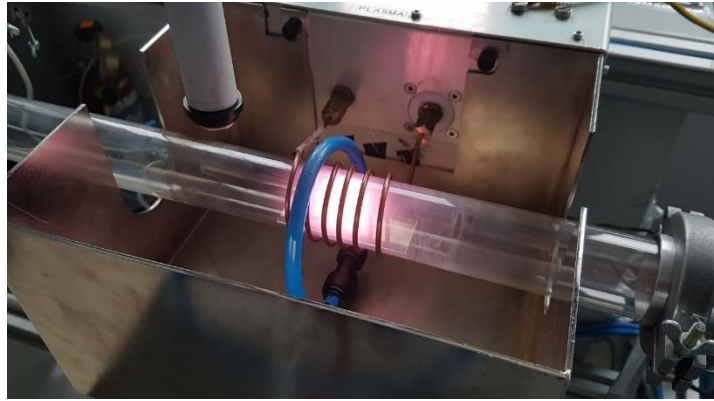
kaplamalar, 316 LVM paslanmaz çelik altlık üzerine Çizelge 3.1 :’de verilen parametreler uygulanarak yapılmıştır. Ergime sıcaklığı titanyumdan çok daha yüksek olduğu için zirkonyum kaplamalar; hızlandırma voltajı ve emisyon akımı değerleri artırılarak yapılmıştır.

**Çizelge 3.1 : DAK için uygulanan kaplama parametreleri.**

	Eğik Ti	Şekilli Ti	Eğik Zr	Şekilli Zr
Vakum Seviyesi (Pa)	$8 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$
Hızlandırma Voltajı (kV)	8,49	8,49	8,58	8,58
Emisyon Akımı (A)	0,65	0,65	2	2
Kaplama Süresi	14,5 dk.	14,5 dk.	14,5 dk.	14,5 dk.
Dönme Hızı (RPM)	0	0,4	0	0,4

Kardiyovasküler stentler, üzerinde sarıldıkları balonun şişirilmesi ile yoğun plastik deformasyona uğratılmaktadır. Bu süreçte, stent yüzeyindeki morfolojinin de bu işlem sırasında zarar görmemesi, altlık malzemeye iyi yapışması gerekmektedir. EDB ile yapılan eğik ve şekilli kaplamaların yüzeye daha iyi yapışmalarını sağlamak için numuneler 800 °C sıcaklığında 90 dakika süreyle vakum ortamında ısıl işleme tabi tutulmuştur.

Ayrıca, EDB ile kaplanan numuneler, biyoyumluluğun artırılması amacı ile Şekil 3.2 :’deki sistem ile 200 W RF güç kullanılarak 60 saniye boyunca 75 Pa basınç altında oksijen plazma işlemine tabi tutulmuştur.



**Şekil 3.2 : Oksijen plazması uygulaması (PL).**

EDB ile yapılan tüm kaplamaların ve ardından yapılan ısıl işlem ve oksijen plazması uygulamaları sonucunda elde edilen numunelerin kodlamaları Çizelge 3.2 :’de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.2 :** EDB ile yapılan kaplamaların kodları.

Numune	Kaplama Sonrası Kod	Sadece Isıl İşlem Sonrası Kod	Sadece Plazma İşlemi Sonrası Kod	Isıl İşlem ve Plazma İşlemi Sonrası Kod
Eğik Ti	<i>EDB-eTi</i>	<i>EDB-eTi-HT</i>	<i>EDB-eTi-PL</i>	<i>EDB-eTi-HT-PL</i>
Şekilli Ti	<i>EDB-sTi</i>	<i>EDB-sTi-HT</i>	<i>EDB-sTi-PL</i>	<i>EDB-sTi-HT-PL</i>
Eğik Zr	<i>EDB-eZr</i>	<i>EDB-eZr-HT</i>	<i>EDB-eZr-PL</i>	<i>EDB-eZr-HT-PL</i>
Şekilli Zr	<i>EDB-sZr</i>	<i>EDB-sZr-HT</i>	<i>EDB-sZr-PL</i>	<i>EDB-sZr-HT-PL</i>

### 3.1.2 EDB ile üretilen ince filmlerin kimyasal ve morfolojik karakterizasyonu

EDB ile üretilen filmlerin yüzey ve kesit görüntüleri JEOL JSM-7000F marka ve model alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobunda ikincil elektron görüntüleri alınarak incelenmiştir.

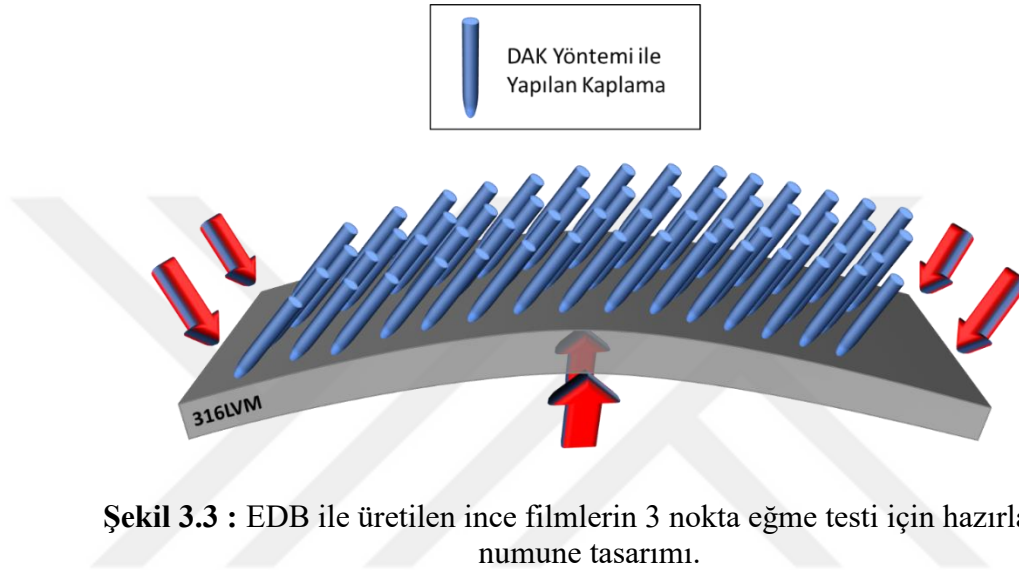
Isıl işlem uygulanmış (HT) numunelerle ısıl işlem uygulanmamış numune arasındaki mikroyapısal farklar Philips PW-3710 ince film XRD cihazı ile incelenmiştir. XRD çekimleri için kullanılan giriş açısı  $1^\circ$ 'dir.

Plazma işleminin yüzey enerjisine ve ıslatma açısına etkisini araştırmak amacıyla ıslatma açısı ölçümleri yapılmıştır. Islatma testiyle yüzey enerjisinin hesaplanması için birçok yaklaşım bulunmaktadır. Literatürde en güvenilir ölçüm metodu olarak Owens ve Wendet (OWRK metodu) geometrik ortalama yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde numunelerin ıslatma açıları bir polar ve bir non-polar 2 sıvı ile ayrı ayrı ölçülmektedir. Çalışmamızda; polar sıvı olarak su, non-polar sıvı olarak da diiodometan seçilmiş, ıslatma açısı sonuçlarına göre yüzey serbest enerjisi cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır.

Stent yüzeylerinin ıslanma kabiliyetinin stentlerin biyoyumluluğunu artırmada ve restenoz riskini belirlemede kritik rol oynadığı bilinmektedir [65]. Bu konuda yapılan bazı çalışmalarda birbirine zıt etkilerin varlığı üzerinde durulmuştur. Örneğin; hidrofilik yüzeylerde endotel hücrelerin daha kolay tutunduğu, ancak bu yüzeylerde tromboz oluşma ihtimalinin de daha yüksek olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [15]. Bu bilgi ışığında, stent yüzeylerinin belirli bir ıslatma açısının tek başına bir anlam ifade etmediği, diğer biyoyumluluk verileri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

### 3.1.3 EDB ile üretilen ince filmlerin mekanik karakterizasyonu

Kardiyovasküler stentler üzerinde yapılan kaplamaların plastik deformasyon altında stabil kalması beklenmektedir. EDB ile üretilen filmlerin plastik deformasyon altındaki davranışını görebilmek için 35 x 10 mm boyunda kesilen ve DAK yöntemi ile kaplanan numunelere 3 nokta eğme testi yapılmıştır (Şekil 3.3 :). Numune 60°'ye ulaşana kadar eğilmiş ve büküm yüzeyi, taramalı elektron mikroskobu altında incelenmiştir.



### 3.1.4 EDB ile üretilen ince filmlerin kan uyumu testleri

Pıhtılaşma; hayati öneme sahip bir mekanizmadır, ancak istenmeyen durumlarda görülmesi de yine hayati sorunlara yol açabilmektedir. Pıhtılaşmanın stent içerisinde gerçekleşmesi durumunda görülen “stent trombozu”, kalp krizi ya da felç gibi durumlara neden olabilmektedir. Bu durumun önüne geçmek için kardiyovasküler stent uygulaması sonrası aylarca, hatta yıllarca antikoagülanların kullanılması gerekebilir. Başka fiziksel yaralanmalarda risk oluşturan antikoagülan kullanımını azaltmak için stent malzemelerinin mümkün olduğunda yüksek kan uyumluluğuna (hemocompatibility) sahip olması istenmektedir.

Kan uyumunun düşük olduğu yüzeylerde veya damarların hasar görmüş bölgelerinde pıhtılaşma, iki ana mekanizmanın arka arkaya çalışması ile gerçekleşmektedir. İlk olarak, aşağıda özetlenen birincil pıhtılaşma mekanizması devreye girmektedir:

1. Kan içerisinde serbestçe dolaşan trombositlerin hasar görmüş endotel hücrelerin üzerinde tutunması

2. Yüzeğe tutunmuş proteinlerle etkileşime girmesi ve aktifleşmesi
3. Trombositlerin stabilleşmesinin ardından şekil değiştirmesi (ince ve uzun ayakların oluşumu)
4. Başkalaşmış trombositlerin; ADP, serotonin, tromboksan A2 gibi ürünlerin oluşumuna sebep olarak dolaşımdaki diğer trombositlerin aynı mekanizmaya dahil etmesi

Yaklaşık 30 saniye içinde gerçekleşen bu mekanizmayı takiben ikinci mekanizmada, kan içerisindeki normal şartlarda pasif halde bulunan protrombin trombine dönüşür. Trombin ise fibrinojeni fibrine dönüştürür. Ağsı yapıdaki fibrin, hasarlı bölgedeki diğer hücreler ve proteinlerin üzerine kaplayarak pıhtıyı oluşturur ve bu yapının iyileşme tamamlanana kadar yerinde kalmasını sağlar.

Dakikalar içinde oluşan bu pıhtının yerinden ayrılması durumunda başka bölgelerdeki damarların tıkanmasına yol açabilir. Bu amaçla, kan ile temas eden implantlara kan uyumluluğu testleri yapılmaktadır. Genel olarak, kan uyumluluğu testine tabi tutulan malzemelerde uyumluluğun yüksek kabul edilmesi için pıhtılaşmanın ilk aşamasında verilen maddelerin gerçekleşmemiş olması istenmektedir. Dolayısı ile, test sonunda yüzeydeki trombosit sayısının düşük ve yapışan bu trombositlerin de inaktif durumda olması beklenmektedir.

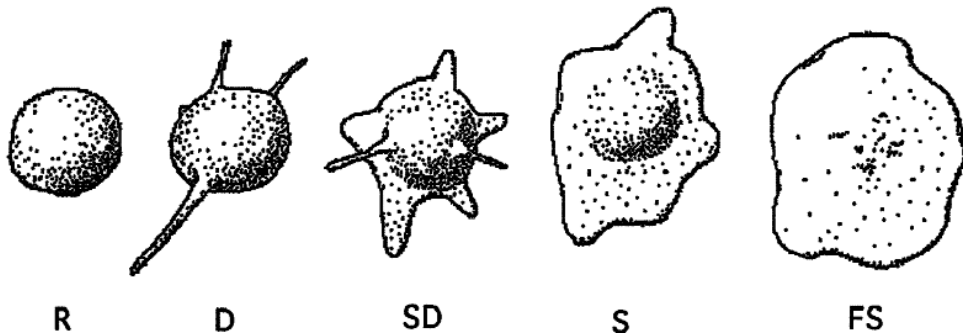
Bu tez çalışması kapsamında, EDB ile üretilen 1 mm x 1 mm boyutlarındaki numunelerinin insan kanı ile uyumu incelenmiştir. Numuneler; aseton ve etanol ile temizlendikten sonra 24'lü mikrolakalara konulmuş (24-well plate) ve aşağıda özetlenen adımlar uygulanarak kan uyumu testi gerçekleştirilmiştir. Farklı morfolojilerde kaplanmış numuneler üzerinde aynı kişiden alınan kan örneği kullanılmıştır. Her bir numune için uygulanan süreç aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. 250 µL kan damlatılmış,
2. Trombositlerin aktifleşip yüzeye yapışmaları için oda sıcaklığında 45 dk. beklenmiş,
3. Bekletilen kan çekilmiş ve takiben numuneler yeni mikrolakalara yerleştirilmiş,

4. Yüzeylerindeki alyuvarlar ve akyuvarları uzaklaştırmak için numuneler 250 µL saf PBS (phosphate buffered saline) ile toplam 3 defa yıkanmış,
5. Yapışan trombositlerin sabitlenmesi (fixation) için 250 µL saf PBS + 250 µL glutar aldehit karışımı damlatılmış, 1 saat beklenmiş ve karışım çekilmiş,
6. Numuneler, hücrelerdeki kalan suyu uzaklaştırmak için sırası ile 1'er ml'lik %50, %70, %80, %90 ve %100'lük etanol çözeltileri içerisinde 5'er dk. bekletilerek yıkanmış,
7. Yıkanan numuneler yeni mikropalakalara koyulmuş ve hücre dondurma için sıvı azotta 5 dk. beklenmiş,
8. Azotun uzaklaşması için tüm gece vakumda bekletilmiş,
9. Platin kaplanıp SEM altında incelenmiştir.

Yukarıdaki maddelerdeki adımların tamamlanmasının ardından numunelerin üzerindeki trombositlerin şekilleri SEM ile incelenmiş ve trombositlerin aktifleşme durumları Şekil 3.4 : 'te verilen Goodman'ın çalışmasındaki örnek görüntülere göre belirlenmiştir [66]. Goodman'ın çalışmasında aktifleşme dereceleri yuvarlak şekil (R) için en düşük, tamamen yayılmış (FS) için en yüksek olarak kabul edilmektedir.

Trombositlerin aktifleşme durumlarına ek olarak, numunelerin üzerindeki alyuvar, akyuvar ve trombosit sayıları da gözlemlenmiştir.



**Şekil 3.4 :** Trombosit yayılmasının şematik tasviri. Soldan sağa yuvarlak (R), dentritik (D) yayılmış dentritik (SD), yayılmış (S), tamamen yayılmış (FS) [66].

### 3.2 KAFBB ile Yapılan Kaplamalar

Kardiyovasküler stent üzerine yapılması önerilen bir kaplamanın plastik deformasyona maruz kaldığında dökülmemesi için altlığa iyi yapışması gerekmektedir. Genel olarak KAFBB ile yapılan kaplamaların, EDB yöntemi ile yapılan kaplamalara göre daha iyi yapışma sergiledikleri bilinmektedir. Buna karşın, makro parçacık (droplet) oluşumu, KAFBB yönteminin önemli bir dezavantajı olarak ortaya çıkmaktadır. Kaplama yüzeyinde makro parçacıkların bulunması, kan akışını bozarak hemodinamik kuvvetleri etkileyecek, sonuç olarak pıhtılaşmanın tetiklenmesi ihtimalini artıracaktır [23]. Dolayısı ile, KAFBB ile üretilen kaplamaların üzerinde nanodesenler oluşturmanın yanında bu makro parçacıkların yüzeyden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, kaplama işleminin ardından anodizasyon ve ultrasonikasyon işlemleri farklı parametrelerle uygulanmış, ancak olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Dolayısı ile KAFBB yöntemi ile kaplanmış numunelere eğme ve kan uyumu testleri yapılma gereği duyulmamıştır.

#### 3.2.1 KAFBB ile ince filmlerin üretimi

Bu tez çalışması kapsamında, 20 mm x 10 mm boyutunda kesilmiş numunelere Bölüm 3.1.1’de verilen numune hazırlama prosedürü aynen uygulanmıştır. Kaplama işlemleri için vakum odasının basınç değeri öncelikle  $3 \times 10^{-5}$  Torr’a indirilmiş, ardından numune yüzeyleri 20 dk. boyunca ile -1000 V DC potansiyel ile  $7,5 \times 10^{-3}$  Torr Ar basıncı altında temizlenmiştir (glow discharge). Bu işlemi takiben numuneler, her biri 30’ar saniye olmak üzere -600, -800 ve -1000 V hızlandırma voltajı ile  $6 \times 10^{-4}$  Torr basınç altında metal iyonları ile dağlanmış (metal ion etching). Ardından, 316 LVM paslanmaz çelik numuneler KAFBB yöntemi ile Çizelge 3.3 :’te verilen parametreler kullanılarak titanyum ve zirkonyum kaplanmıştır.

**Çizelge 3.3 :** KAFBB sisteminde uygulanan parametreler.

	Ti Kaplama	Zr Kaplama
Katot Akımı (A)	80	100
Bias (V)	-150	-100
Süre (dk.)	16	10

KAFBB ile kaplanan titanyum ve zirkonyum üzerinde nano boyutlarda yapılar oluşturmak için kaplama işlemi takiben, farklı parametrelerde anodizasyon işlemleri uygulanmıştır. Anodizasyon işleminin yüzeyde nano yapılar oluşturmasının yanında

KAFBB işleminin önemli bir dezavantajı olan makro parçacıkların dökülmesine de sebep olacağı öngörülmüş ve bu amaçla anodizasyon işlemi farklı süreler boyunca uygulanmıştır. Uygulanan tüm anodizasyon koşulları, Çizelge 3.4 :’te özetlenmiştir. Kaplama ve anodizasyon işlemlerinin takiben yüzeyde olan değişimler SEM altında incelenmiştir.

**Çizelge 3.4 :** KAFBB ile kaplanan numunelerin anodizasyonu için kullanılan parametreler.

Parametre	Ti Kaplama için	Zr Kaplama için		
		1	2	3
Elektrolit	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> + hac.%1 H <sub>2</sub> O + ağ.%0,6 NH <sub>4</sub> F	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> + hac. %1 H <sub>2</sub> O + ağ. %0,6 NH <sub>4</sub> F	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> + hac. %5 H <sub>2</sub> O + ağ. %0,3 NH <sub>4</sub> F	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> + hac. %5 H <sub>2</sub> O + ağ. %0,3 NH <sub>4</sub> F
Katot	316 L levha	316 L levha	316 L levha	316 L levha
Süre	20, 50, 100, 150, 250 sn.	250, 100 sn.	250 sn.	40, 80 sn.
Sıcaklık	27 °C	27 °C	27 °C	27 °C
Potansiyel	40 V sabit	40 V sabit	40 V sabit	60 V sabit
Katot – Anot mesafesi	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm

Anodizasyonun ardından kalan makro parçacıkları yüzeyden uzaklaştırmak için numuneler, ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ultrasonikatör cihazının yüzeyde kaviteasyon balonları oluşturduğu ve bu balonları patlatması ile yüzeyde fiziksel bir darbe etkisi oluşturduğu bilinmektedir. Tez kapsamında uygulanan bu ultrasonikasyon işlemi SONICS Vibra Cell marka/model cihazla 20 kHz frekansında, 45 kW/m<sup>2</sup> güçte, 60 sn. boyunca saf su içerisinde uygulanmıştır. Numune ile uç arasındaki mesafe 500 µm olarak ayarlanmıştır.

### 3.2.2 KAFBB ile üretilen ince filmlerin morfolojik karakterizasyonu

KAFBB ile üretilen nanodesene sahip filmlerin karakterizasyonu için JEOL JSM-7000F marka ve model alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Görüntüler, ikincil elektronlar ile alınmış ve şekil üzerindeki gerekli görülen noktalara EDS analizleri yapılmıştır.

### 3.3 MAS Yöntemi ile Yapılan Kaplamalar

#### 3.3.1 MAS yöntemi ile ince filmlerin üretimi

Bu tez çalışmasında; droplet olarak da tabir edilen makro parçacık olmaksızın, pürüzsüz ve homojen kaplamalar elde edilmesini sağlayan manyetik alanda sıçratma (MAS) yöntemi ile stentlerde kullanılabilecek kaplamaların üretilebileceği düşünülmüştür. MAS cihazımızda kullanılmak üzere için üretilmiş zirkonyum katot mevcut olmadığından bu yöntem ile sadece titanyum kaplama yapılmıştır.

Öncelikle, 20 mm x 10 mm boyutunda kesilmiş numunelere Bölüm 3.1.1’de verilen numune hazırlama prosedürü aynen uygulanmıştır. Kaplama işleminden önce, kaplama ile altlık arasındaki yapışmayı artırmak için özel bir yüzey hazırlama işlemi yapılmıştır. Vakum odası içerisinde yapılan bu işlemde yüzey, doğrusal anotlu iyon kaynağı (anode layer ion source) kullanılarak iyonlar ile dağlanmıştır (ion-etching). İyonla dağlama parametreleri Çizelge 3.5 :’te verilmiştir. Numune ve numune tutucu üzerinden geçen toplam akım, uygulanan hızlandırma voltajına (HV) bağlı olarak doğru orantılı şekilde değişmektedir.

**Çizelge 3.5 :** Kaplama öncesi iyonlar ile dağlama işlemi parametreleri.

Parametre	Değer
Gaz	1,5 Pa – Argon – 900 sccm
İyon kaynağının gücü	1200 V – 2 A
Hızlandırma Voltajı (HV)	-600 V (4 dk.), -800 V (2 dk.), -1000 V (1 dk.)
Numune akımı	0.3 – 0.5 A (HV ile değişiyor)
Numune tutucu	Döner tip
Gaz	1,5 Pa – Argon – 900 sccm

İyonlarla dağlama işleminden sonra numuneler vakumdan çıkarılmadan titanyum kaplama işlemine geçilmiştir. İkiz manyetik alanda sıçratma (dual-beam magnetron) yöntemi kullanılarak yapılan titanyum kaplama işleminin parametreleri Çizelge 3.6 :’da verilmiştir. Manyetik alanda sıçratma yöntemi ile titanyum kaplama işlemi MAS-Ti olarak, bu yöntem ile elde edilen yüzey de *pTi* olarak adlandırılacaktır.

**Çizelge 3.6 :** Titanyum kaplama parametreleri.

Parametre	Değer
Gaz	0,5 Pa Argon – 200 sccm
Magnetron Tipi	40 kHz ikiz magnetron
Magnetron Gücü	550 V – 18 A (akım kontrollü)
Kaplama Süresi	7 dk.
Bias (Hızlandırma Voltajı)	-150 V
Numune akımı	1,2 A (tutucu ile birlikte)
Numune tutucu	Ti hedef (target) önünde sabit
Gaz	0,5 Pa Argon – 200 sccm

MAS-Ti numunelerine, yüzeylerinde nano boyutlarda desenler oluşturmak için, anodik oksidasyon işlemi uygulanmıştır. Anodik oksidasyon işlemlerinin parametreleri Çizelge 3.7 :’de özetlenmiştir. MAS ile titanyumun kaplamayı takiben anodizasyon işlemine maruz bırakılmış numuneleri kısaca MAS-Ti-ANO olarak adlandırılacaktır, bu yöntem ile elde edilen yüzey de *aTiO<sub>2</sub>* olarak adlandırılacaktır.

**Çizelge 3.7 :** Anodizasyon parametreleri.

Parametre	Değer
Elektrolit	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> + hac. %1 H <sub>2</sub> O + ağı. %0,6 NH <sub>4</sub> F
Katot	316 LVM paslanmaz çelik levha
Süre	20, 50, 100, 150, 250 sn.
Sıcaklık	27 °C
Potansiyel	40 V sabit
Katot – Anot mesafesi	2 cm

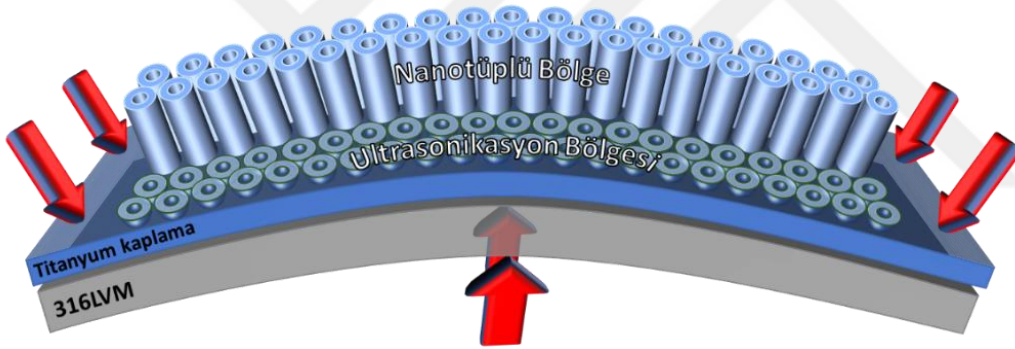
Anodizasyon işleminin ardından numune yüzeyinde oluşan anodik oksit tabakası gevrek yapısından dolayı plastik deformasyona dayanıksızdır. Bölüm 3.2.1’de KAFBB sebebi ile oluşan makro parçacıkların yüzeyden uzaklaştırılması amacı ile kullanılan ultrasonikasyon parametreleri, MAS-Ti-ANO yüzeyindeki stent uygulamaları için uygun olmadığını düşündüğümüz kırılğan oksit katmanını uzaklaştırmak amacıyla da kullanılmıştır. MAS ile titanyum kaplama ve anodizasyon işlemlerinin ardından ultrasonikasyon işlemine maruz bırakılmış numuneler kısaca MAS-Ti-ANO-US olarak adlandırılacaktır. Bu yöntem ile elde edilmiş yüzey ise *cTi* yüzeyi olarak adlandırılacaktır.

Biyouyumluluğu artırmak amacıyla numunelere Şekil 3.2 :’deki sistem ile 400 W RF güç kaynağı 13,56 MHz frekansında 600 V (peak to peak voltage) ile çalıştırılarak 10 saniye boyunca 50 Pa basınç altında oksijen plazma işlemi uygulanmıştır. Bu yöntem ile elde edilmiş yüzey ise *cTi+PL* yüzeyi olarak adlandırılacaktır. Kontrol numunesi

olması amacı ile oksijen plazması uygulanan *pTi* numunesi de *pTi+PL* olarak adlandırılacaktır.

### 3.3.2 MAS ile üretilen kaplamaların mekanik karakterizasyonu

MAS-Ti-ANO ve MAS-Ti-ANO-US işlemlerine tabi tutulmuş bölgelerin plastik deformasyon altındaki davranışını görebilmek için EDB ile yapılan kaplamalara benzer şekilde 3 nokta eğme testi yapılmıştır. Şekil 3.5 :’teki şematik gösterimde tarif edildiği gibi sadece numunenin yarısına ultrasonikasyon uygulanmış özel bir numune hazırlanmıştır. Böylece nanotüplü ve ultrasonikasyon uygulanmış yapıların aynı gerilme değerleri altındaki davranışı incelenmiştir. Bu test için hazırlanan özel numuneler önce 45° eğilmiş, ardından nanotüplü ve ultrasonikasyon uygulanmış yapıların taramalı elektron mikroskopunda ikincil elektron görüntüleri alınmıştır. Takriben eğim 90°’ye kadar ulaşana kadar artırılmış ve aynı incelemeler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5 : MAS-Ti-ANO ve MAS-Ti-ANO-US ile kaplanan numunelerin 3 nokta eğme testi için hazırlanan numune tasarımı.

### 3.3.3 MAS ile üretilen kaplamaların morfolojik ve kimyasal karakterizasyonu

MAS-Ti, MAS-Ti-ANO, MAS-Ti-ANO-US ile üretilen filmler her aşamada JEOL JSM-7000F ve Thermo Scientific Quattro S FEG ESEM marka ve model, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskoplarında ikincil elektron görüntüleri alınarak incelenmiştir. Titanyum kaplamanın kesit görüntülerini elde etmek için JEOL JEM-9320 marka ve model odaklanmış iyon demeti cihazı (FIB) kullanılmış, galyum iyonları ile gerçekleştirilen kesme işlemi sırasında titanyum kaplamayı koruması için ise kesme işleminden önce bölgesel karbon kaplama yapılmıştır.

Yapılan kaplamaların anodizasyon öncesi kalınlık kontrolünün daha pratik yapılabilmesi amacı ile X-ışınları floresans yöntemi ile çalışan kaplama kalınlık ölçüm cihazı (XRF Fischerscope) kalibre edilmiş ve tüm numune kalınlıkları bu cihaz ile ölçülmüştür. Her numuneden en az 10 ölçüm alınmış ve bu ölçümlerin ortalama değeri, kaplama kalınlığı olarak esas alınmıştır.

*cTi* ve *cTi+PL* numuneleri üzerinde XPS incelemeleri yapılmıştır. XPS analizleri PHI marka cihazda, Al K $\alpha$  kaynak ve 250 W güç kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Numunelerin kompozisyonel derinlik profilleri, Ar<sup>+</sup> iyon kaynağı kullanılarak Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> referansına göre, dakikada 1 nm olacak şekilde sıçratılarak elde edilmiştir. Ayrıntılı XPS analizleri 0,6 eV enerji çözünürlüğünde, geçiş enerjisi (pass energy) 29 eV olacak şekilde alınmıştır. XPS derinlik analizleri ise numunelerin 4 keV enerjisindeki Ar iyonlarının 3 x 3 mm'lik bir bölgeyi sıçratması ile elde edilmiştir. Ortalama sıçratma verimi (sputter rate) 1 nm/dk.dır.

*cTi* yüzeyinin topografik özellikleri ise atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Ankara, Türkiye) ile dokunuşlu görüntüleme (tapping) modunda 22 N/m sabit kuvvet ve 325 kHz rezonans frekansı ile silisyum manivela ucu kullanılarak incelenmiştir (10 nm uç yarıçapı, 95 nm uç uzunluğu).

Plazma işleminin yüzey enerjisine ve ıslatma açısına etkisini araştırmak amacıyla ıslatma açısı ölçümleri yapılmıştır. Islatma testiyle yüzey enerjisinin hesaplanması için EDB ile kaplama bölümünde uygulanan yöntemin aynısı uygulanmıştır.

### **3.3.4 MAS ile üretilen filmlerin biyolojik testleri**

#### **3.3.4.1 Hücre büyümesi testleri**

Eğme testi sonuçlarında mekanik olarak kararlı olduğu görülen nanodesenli MAS-ANO-US numunelerine oksijen plazması işlemi öncesi (*cTi*) ve sonrası (*cTi+PL*) hücre büyümesi testleri uygulanmıştır.

Referans olarak ise düz titanyum kaplanmış numuneler (*pTi*) kullanılmıştır. Bu testler çalışma ortağımız Jožef Stefan Enstitüsü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Hipotezimize göre, paslanmaz çeliğin üzerindeki titanyum kaplamanın deseni, hücrelerin yüzey üzerine yapışması ve sonrasında bu yüzey üzerinde çoğalması ile ilgili farklılıklar yaratacaktır. Bu etkiyi gözlemlemek için söz konusu numuneler üzerinde, İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri (HCAEC) ve İnsan Koroner Arter

Düz Kas Hücreleri (HCASMC) kullanılarak hücre yapışması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu testlerde kullanılan HCAEC, Lifeline Cell Technology'den (Frederick, MD, ABD); HCASMC ise ProVitro AG'den (Berlin, Almanya) temin edilmiştir. 3000 hücre/cm<sup>2</sup> yoğunluktaki HCAEC ve HCASMC hücreleri 75 cl'lik jöjelere koyulmuş ve bu hücreler 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş bir atmosfer içerisinde, üreticinin talimatlarına uygun olarak yetiştirilmiştir. Endotel besiyeri kiti olarak VascuLife EnGS (Frederick, MD, ABD) ve düz kas besiyeri için de FCS-kit (ProVitro AG, Berlin, Almanya) kullanılmıştır. İlgili hücreler 4 ile 6 defa pasajlanmıştır. İçerisinde 2,55 × 10<sup>4</sup> hücre/cm<sup>2</sup> yoğunluğunda hücre bulunan 100 µL'lik damlalar numunelerin üstüne ekilmiştir. Ekimin ardından numuneler 3 saat, 24 saat ve 72 saat süreyle 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş atmosferde bekletilmiştir. İnkübasyondan sonraki hücre canlılığı 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) testi ile değerlendirilmiştir.

Numune üzerinde canlılığın belirlenmesi için üreticinin talimatlarında da belirtildiği üzere, MTT renk ölçümü testi (EZ4U; Biomedica, Avusturya) yapılmıştır. Bu testte canlı hücreler, daha az renkli tetrazolyum tuzlarını koyu renkli formazan türevlerine indirgeyebildiğinden ortamı zamanla koyulaştırırlar. Bu indirgenme, hücre içerisindeki mitokondrilerde gerçekleşir. Hücre, canlı olduğu sürece formazan tuzları sürekli olarak üretilecek ve ortam koyulaşmaya olmaya devam edecektir. Hücrenin ölmesi halinde mitokondri işlevini birkaç dakika içerisinde kaybedeceğinden renk değişiminin de durması beklenmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında farklı şekilde kaplanmış paslanmaz çelik yüzeyler 3, 24 ve 72 saatlik kültürlenme işlemini takiben PBS ile yıkanmış, yüzeye tutunmayan hücreler ise numune yüzeylerinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, numunelerin üzerine tetrazolyum ajanı ile karıştırılmış 200 µL taze Hanks Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS) eklenmiştir. 3, 24 ve 72 saatin ardından numune üzerindeki çözeltiler, 96'lık hücre kültürü plakalarına koyulmuş ve Synergy™ HT Microplate Reader (Bio-Tech Instruments, Inc., A.B.D) cihazı ile 492 nm dalga boyundaki OD (optical density) değerleri ölçülmüştür. Kontrol çözeltisi olarak hazırlanan hücresiz çözeltinin OD değeri ise 690 nm ile ölçülmüştür.

Yukarıdaki her bir deney 3'er defa tekrarlanmıştır. MTT verilerinin istatistiksel incelemeleri için açık kaynaklı JASP 0.9.2 programı kullanılmıştır. İstatistiksel

ortalamaları almak için ANOVA kullanılmış, ardından Tukey's range testi uygulanmıştır. Anlamlı fark değeri olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

#### **3.3.4.2 MAS ile üretilen filmlerin kan uyumu testleri**

MAS temelli üretilen filmlere, Bölüm 3.1.4'de EDB ile üretilen filmlere uygulanan kan uyumu prosedürünün aynısı uygulanmıştır. Trombositlerin aktifleşme seviyesinin ölçüldüğü bu testte JEOL JSM-7000F marka ve model emisyonlu taramalı elektron mikroskobu kullanılmış ve numuneler, ikincil elektron görüntüleri alınarak incelenmiştir.

Kan uyumu testi, elde edilen nanodesenli yapının biyoyumuluğu etkisini anlayabilmek için hem düz titanyum kaplanmış numunelere hem de nanodesenli numunelere eş zamanlı olarak uygulanmıştır.

Yüzey kimyasının kan uyumu üzerindeki etkisini anlayabilmek için ise düz titanyum kaplanmış numuneler ile nanodesenli numuneler, oksijen plazma işlemi öncesi ve sonrasında aynı kan uyumuluğu testine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

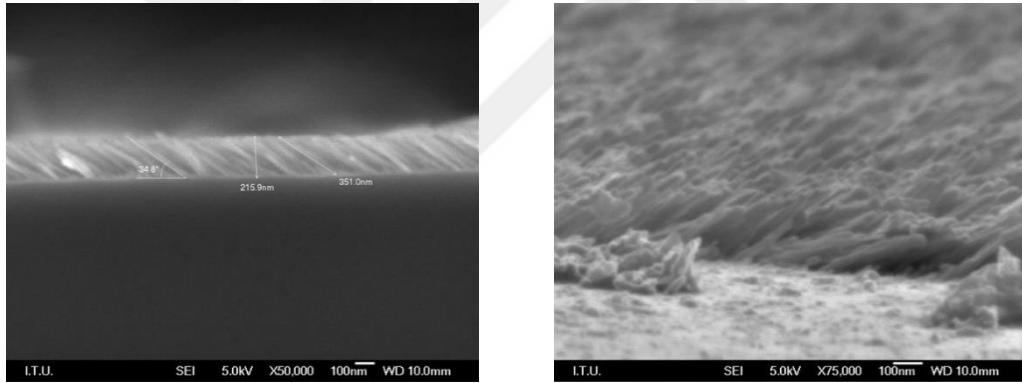


## 4. DENEY SONUÇLARI VE İRDELEMELER

### 4.1 EDB ile Üretilen Titanyum ve Zirkonyum Kaplamalar

#### 4.1.1 Morfoloji ve mikroyapı sonuçları

EDB fiziksel buhar biriktirme yöntemi ile yapılan titanyum kaplama işlemi sonucunda Şekil 4.1 :a'da kesit görüntüsü verilen eğik kaplamalar elde edilmiştir. 216 nm kalınlığındaki kaplamanın altlık üzerinde  $34,8^\circ$  açıyla büyüdüğü görülmüştür. Eşitlik 1'deki hesaplamalarda  $35^\circ$  olacağı öngörülen veri ile elde edilen bu sonuç örtüşmektedir. Kaplama yapışmasının artırılması için yapılan ısıl işlem sonunda da kolonsal yapının korunduğu görülmektedir.

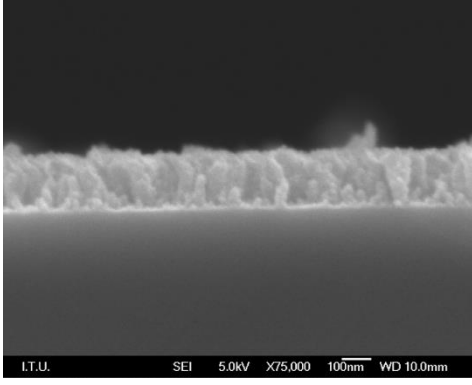


(a) Isıl işlem öncesi (EDB-eTi)

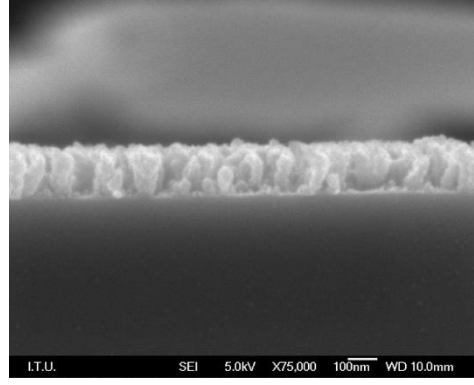
(b) Isıl işlem sonrası (EDB-eTi-HT)

**Şekil 4.1** : Isıl işlem öncesi ve sonrası eğik titanyum kaplamanın SE görüntüleri.

EDB fiziksel buhar biriktirme yöntemi ile altlıklar döndürülerek yapılan şekilli titanyum kaplamaların SEM görüntüleri ise Şekil 4.2 :'de verilmiştir. Şekilli titanyum kaplamaların başarılı bir şekilde 316 LVM paslanmaz çelik üzerinde büyüdüğü, kalınlığının ise yaklaşık 200 nm olduğu görülmüştür. Kaplama yapışmasının artırılması için yapılan ısıl işlem sonunda da kaplama morfolojisinin korunduğu kesit görüntülerinde görülmektedir.



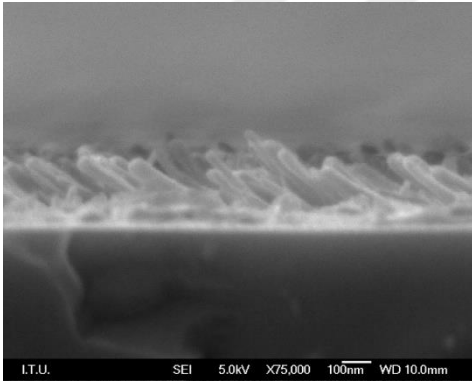
(a) Isıl işlem öncesi (EDB-sTi)



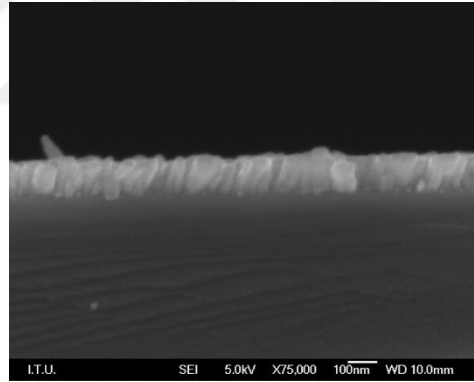
(b) Isıl işlem sonrası (EDB-sTi-HT)

**Şekil 4.2 :** Isıl işlem öncesi ve sonrası şekilli titanyum kaplamanın SE görüntüleri.

EDB fiziksel buhar biriktirme yöntemi ile yapılan eğik zirkonyum kaplama işlemi sonucunda, Şekil 4.3 :’te görülen, yaklaşık 200 nm kalınlığında kaplamaların elde edildiği görülmektedir. Ayrıca, eğik titanyum numunelerden farklı olarak bu kaplamaların önceki konumlarından daha dik konuma geldikleri gözlemlenmiştir. Bu durum, eğik zirkonyum kaplamanın titanyuma göre daha yüksek stres ile kaplandığını göstermektedir.



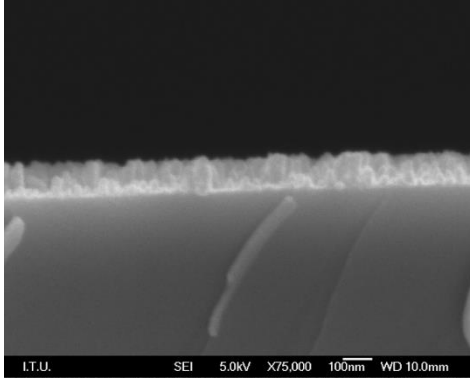
(a) Isıl işlem öncesi (EDB-eZr)



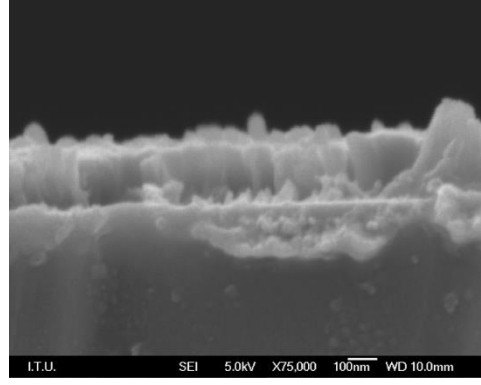
(b) Isıl işlem sonrası (EDB-eZr-HT)

**Şekil 4.3 :** Isıl işlem öncesi ve sonrası eğik Zr kaplamanın SE görüntüleri.

EDB fiziksel buhar biriktirme yöntemi ile altlıklar döndürülerek yapılan şekilli zirkonyum kaplamaların SEM görüntüleri ise Şekil 4.4 :’te verilmiştir. Bu yöntem ile yaklaşık 140 nm kalınlığında kaplamalar elde edilmiş, ısıl işlemin ardından ise kaplama kalınlığının yaklaşık 200 nm’ye çıktığı görülmüştür. Eğik zirkonyumda görülen dikleşme durumunun bir benzeri şekilli zirkonyum kaplamada görülmüş, şekillerin açılması ile kaplama kalınlığı artmıştır.



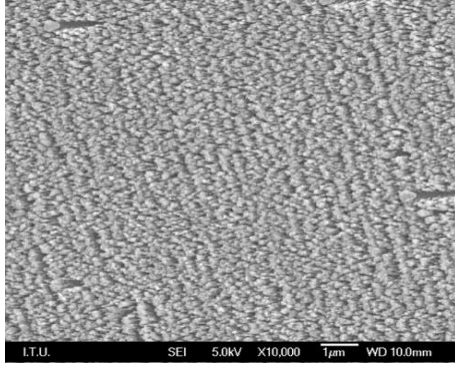
(a) Isıl işlem öncesi (EDB-sZr)



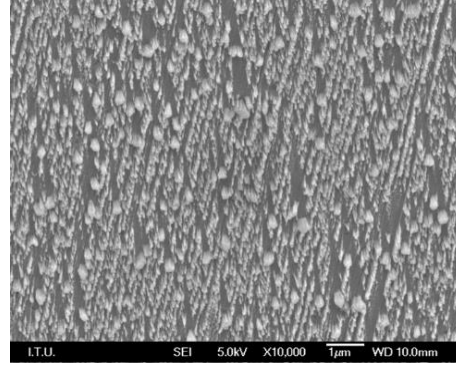
(b) Isıl işlem sonrası (EDB-sZr-HT)

**Şekil 4.4 :** Isıl işlem öncesi ve sonrası şekilli Zr kaplamanın SE görüntüleri.

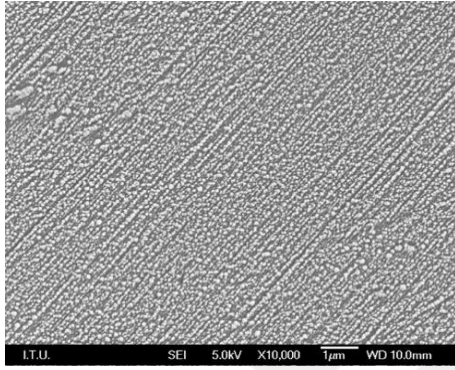
Kesit görüntülerinin ardından EDB numunelerinin taramalı elektron mikroskopunda yüzey görüntüleri çekilmiştir. Numunelerin yüzeyinden alınan SEM görüntülerinde ısıl işlemin en belirgin etkisinin kaplamaları oluşturan nano boyutlardaki kolonların birleşmesi olduğu görülmektedir (Şekil 4.5 :). Isıl işlemin ardından kaplama üzerindeki boşluk miktarı artmıştır.



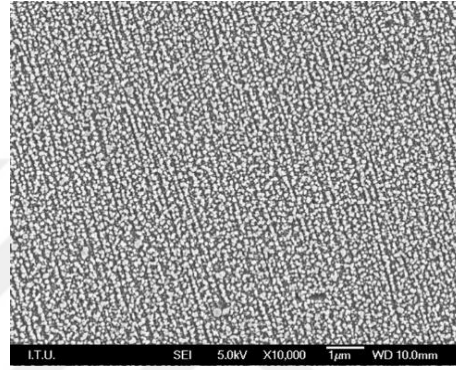
(a) EDB-eTi



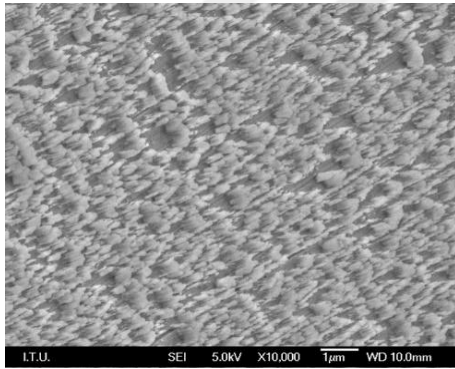
(b) EDB-eTi-HT



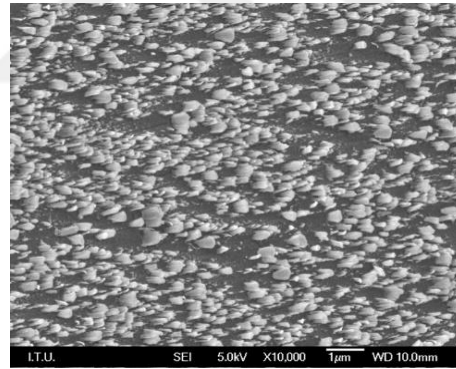
(c) EDB-sTi



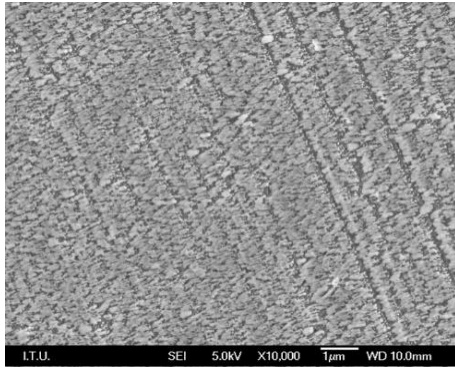
(d) EDB-sTi-HT



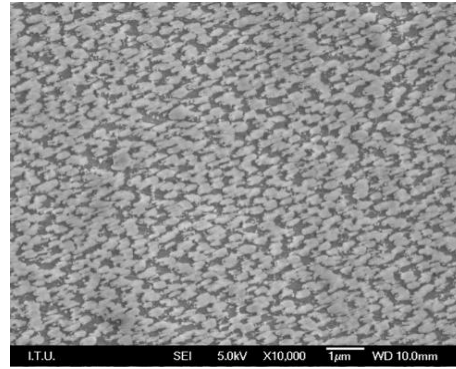
(e) EDB-eZr



(f) EDB-eZr-HT



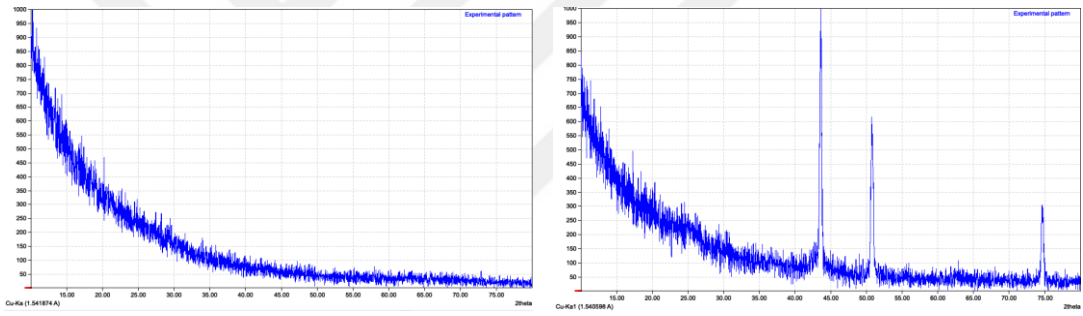
(g) EDB-sZr



(h) EDB-sZr-HT

Şekil 4.5 : EDB kaplama yüzeylerinin ısıl işlem öncesi ve sonrası SE görüntüleri.

Isıl işlemin etkisi, XRD (ince film – glancing angle) paterninde de net bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Isıl işlem öncesinde elde edilen eğik titanyumun XRD paterninde kaplamanın pikleri görülmemekte, sadece geniş bir arka plan gözlenmektedir (Şekil 4.6 :a). Bu durumun sebebi, EDB ile elde edilen ince filmlerin tane boyutlarının  $\text{nm}^3$  mertebesinde olmasından dolayı bu tanelerden gelen sinyallerin yeterli şiddete ulaşmamasıdır. SEM görüntülerinde de anlaşıldığı üzere ısıl işlem sonrasında kaplama topaklanmış, boşluklu bir yapı ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla ile, ısıl işlem sonrasında elde edilen XRD deseninde altlığın pikleri belirgin ve şiddetli hale gelmiştir (Şekil 4.6 :b). Şekil 4.6 :a’da elde edilen pikler paslanmaz çeliğe ait olduğundan titanyum kolonları pik verecek şiddette taneler oluşturamamıştır. Böylece topaklanma olsa bile ısıl işlem sonrasında kolonsal yapının hâlâ korunduğu anlaşılmaktadır. Isıl işlem öncesi ve sonrası bu farklar, tüm numune setlerinde aynı olduğundan EDB ile elde edilen diğer kaplamaların XRD desenleri tez çalışmasına koyulmamıştır.



(a) Isıl işlem öncesi

(b) Isıl işlem sonrası

**Şekil 4.6 :** Şekli Ti kaplamanın ısıl işlem öncesi ve sonrası ince film XRD desenleri ( $\omega = 1^\circ$ ). Pikler, SS’e aittir.

#### 4.1.2 Yüzeysel enerji sonuçları

Elde edilen bu yüzeylerin ısıl işlem öncesi/sonrası ve plazma işlemi öncesi/sonrası ıslatma açıları ve hesaplanan yüzey enerji değerleri Çizelge 4.1 :’de verilmiştir. (\*) ile işaretli numunelerin serbest yüzey enerjileri cihazda meydana gelen bir sorun nedeni ile hesaplanamamıştır.

Ölçümlerde, plazma işleminin yüzey serbest enerjisini büyük oranda artırdığı ve ıslatma açılarını kayda değer bir şekilde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Isıl işleme tabi tutulmuş numuneler incelendiğinde genel olarak ıslatma açılarının arttığı ve yüzey serbest enerjilerinin düştüğü gözlenmektedir. Isıl işlem numunelerine plazma işlemi uygulandığında ise ısıl işlemle elde edilmiş hidrofobik yüzeyin tamamen hidrofilik yüzeye dönüştüğü gözlemlenmiştir. Dolayısıyla ısıl işlemin; yüzeyi daha hidrofobik,

plazma işleminin ise yüzeyi daha hidrofilik yapmak için kullanılabilir birer araç olduğu anlaşılmıştır.

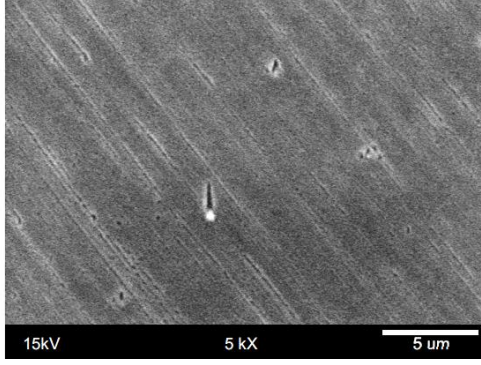
**Çizelge 4.1 :** Tüm DAK kaplamaların ıslatma açıları.

Yüzey Şekli	Ortalama Islatma Açısı [°] (Su)	Ortalama Islatma Açısı [°] (Diiodometan)	YSE [mN/m]
316 LVM	48,25 (± 3,93)	37,54 (± 3,25)	59,43 (± 3,93)
EDB-eTi	51,93 (± 1,43)	27,19 (± 1,49)	60,07 (± 1,36)
EDB-eTi-PL	13,14 (± 4,91)	13,49 (± 2,50)	*
EDB-eTi-HT	90,73 (± 3,00)	43,64 (± 4,32)	38,76 (± 2,87)
EDB-eTi-HT-PL	12,47 (± 0,38)	20,77 (± 1,20)	78,52 (± 0,57)
EDB-sTi	42,79 (± 3,20)	23,02 (± 1,56)	*
EDB-sTi-PL	13,76 (± 0,27)	15,46 (± 0,99)	78,92 (± 0,36)
EDB-sTi-HT	67,36 (± 0,60)	41,74 (± 1,38)	47,67 (± 1,08)
EDB-sTi-HT-PL	10,14 (± 0,30)	23,94 (± 1,56)	78,50 (± 0,83)
EDB-eZr	91,27 (± 7,86)	29,69 (± 1,59)	44,75 (± 1,53)
EDB-eZr-PL	17,96 (± 1,01)	12,39 (± 2,80)	78,14 (± 0,92)
EDB-eZr-HT	45,45 (± 3,19)	25,42 (± 3,00)	*
EDB-eZr-HT-PL	9,35 (± 1,76)	15,61 (± 2,13)	*
EDB-sZr	35,88	27,02	*
EDB-sZr-PL	20,90 (± 0,77)	13,81 (± 1,65)	*
EDB-sZr-HT	46,90	23,66	63,56
EDB-sZr-HT-PL	15,48 (± 0,69)	15,50 (± 1,25)	78,50 (± 0,52)

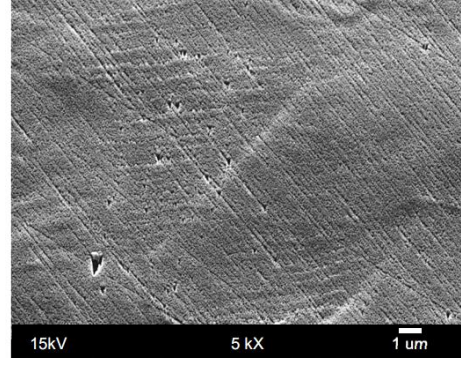
#### 4.1.3 Mekanik test sonuçları

Damarların daralan bölgelerine yerleştirilmeleri sırasında kardiyovasküler stentlerin %25 gibi şekil değiştirme mertebelerinde deforme oldukları bilinmektedir [67]. Bu sebeple, stentlere uygulanacak kaplamaların deformasyon altındaki davranışlarının da bilinmesi gereklidir. Bu amaçla, EDB ile elde edilen kaplamalara eğme testi uygulanmış ve eğme yüzeyleri SEM ile incelenmiştir. Yapışmanın artması için yapılan ısı işleminin etkisi de eğme testi ile belirlenmiştir.

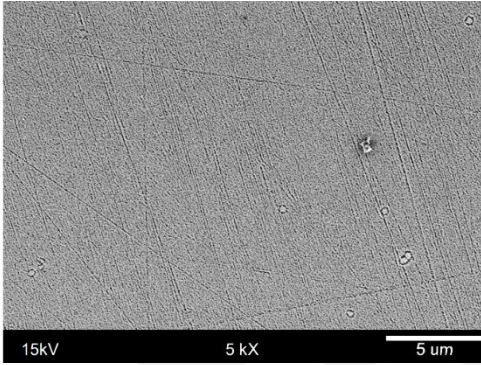
Eğme testine tabi tutulan eğik/şekilli titanyum ve eğik zirkonyum kaplı numuneler SEM ile incelenmiştir (Şekil 4.7 :). İncelemeler sonucunda, numunelerin deforme edilen kısımlarındaki kaplamaların yüzeyinde çatlaklar ve boşluklar tespit edilmiştir. Buna karşın, şekilli olarak titanyum kaplanmış numunelerde, eğik numunelere göre daha az çatlak ve deformasyon görülmüştür. Eğik zirkonyum numuneler üzerinde ise kayma bantları üzerinde çatlaklar oluşmuştur.



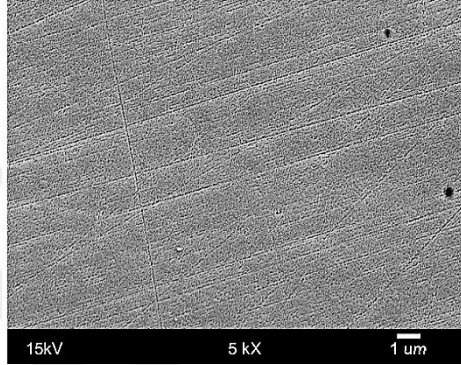
(a) Eğme öncesi EDB-eTi



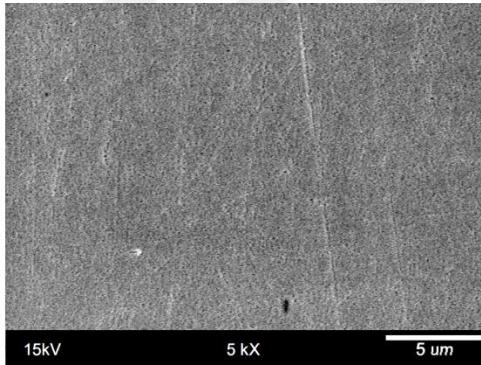
(b) Eğme sonrası EDB-eTi



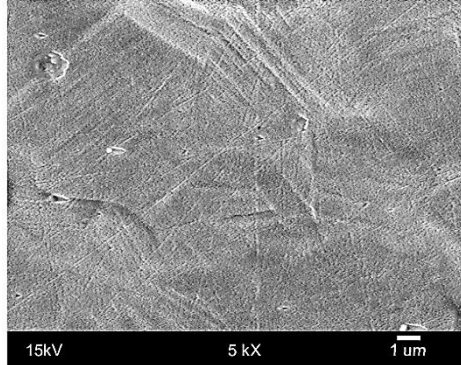
(c) Eğme öncesi EDB-sTi



(d) Eğme sonrası EDB-sTi



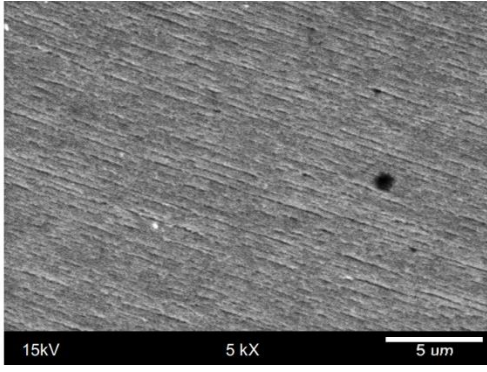
(e) Eğme öncesi EDB-eZr



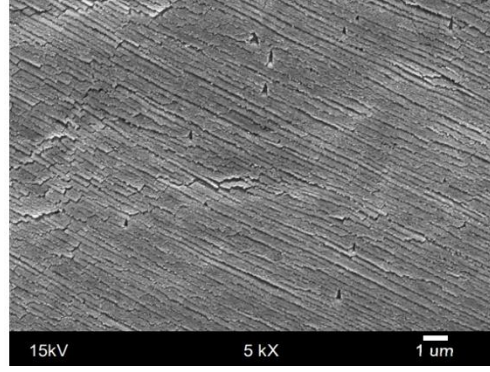
(f) Eğme sonrası EDB-eZr

**Şekil 4.7 :** EDB yöntemi kaplanmış numunelerin eğme testinden önce ve sonraki SE görüntüleri.

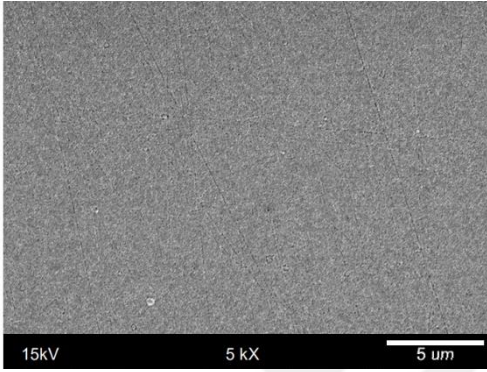
Kaplamaların yapışmasını artırmak için uygulanan ısıtıl işlem sonrası eğik titanyum, şekilli titanyum ve eğik zirkonyum kaplı numunelere 3 nokta eğme testleri yapılmış ve deformasyon yüzeyleri taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 4.8 :). İncelemeler sonucunda, ısıtıl işlem uygulanmış numunelerde çatlak ve ayrılmaların ısıtıl işlem uygulanmamışlara göre daha az olduğu, hatta şekilli olarak büyütülen titanyum filmlerde çatlamanın olmadığı gözlemlenmiştir.



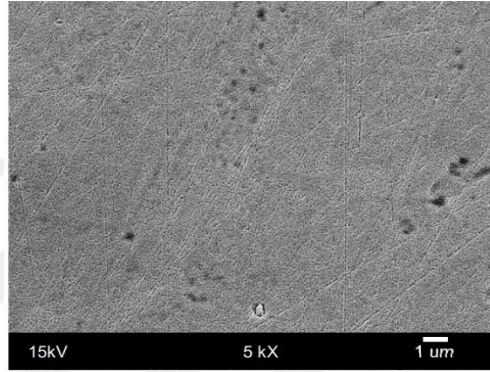
(a) Eğme öncesi EDB-eTi-HT



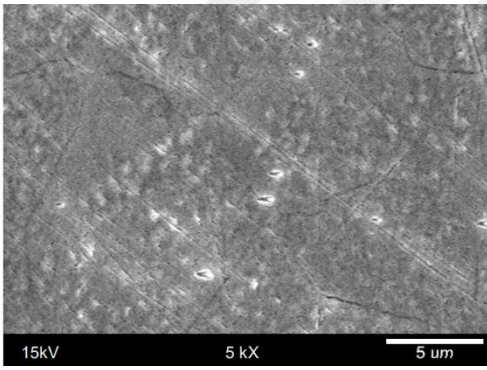
(b) Eğme sonrası EDB-eTi-HT



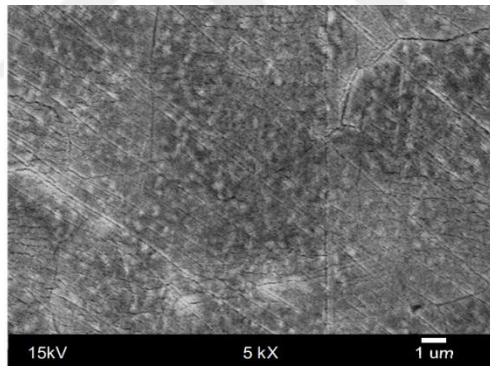
(c) Eğme öncesi EDB-sTi-HT



(d) Eğme sonrası EDB-sTi-HT



(e) Eğme öncesi EDB-eZr-HT



(f) Eğme sonrası EDB-eZr-HT

**Şekil 4.8** : EDB yöntemi kaplanmış numunelerin eğme testinden önce ve sonraki SE görüntüleri.

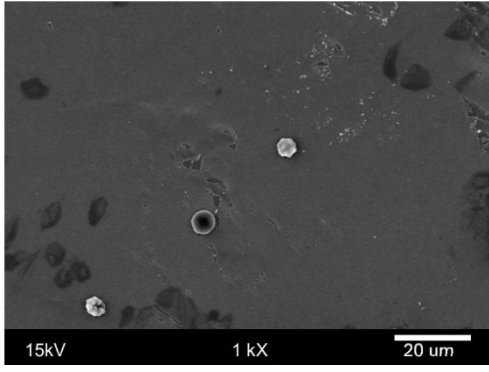
Sonuç olarak; eğme testi sonuçları, şekilli büyütülen titanyum filmler dışında, tam olarak istenen sonuçları vermemiş, uygulanan eğme işlemi sonucunda bazı çatlaklar ve kusurlar oluşmuştur. Çatlak büyüklükleri çok büyük olmadığından dolayı EDB ile üretilen filmlere kan uyumu testi yapılmıştır.

#### **4.1.4 Kan uyumu testleri**

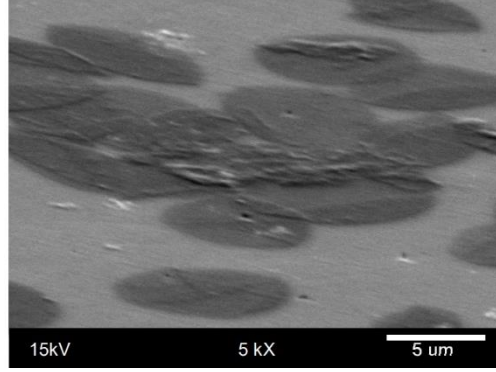
Kardiyovasküler stent üzerinde oluşması muhtemel bir pıhtının yerinden ayrılması durumunda başka bölgelerdeki damarların tıkanmasına yol açabilir. Bu durumun önüne geçmek için; kardiyovasküler sistemde kullanılan implantların, kan uyumlu olması gerekmektedir. Kan uyumu testi sonucunda yüzeydeki trombosit sayısının düşük, yüzeye yapışmış bu trombositlerin de yayılmamış, yani küresel şekilli olması beklenmektedir. Bu bölümde; EDB eğik titanyum, şekilli titanyum ve eğik zirkonyum kaplı numunelere kan uyumu testleri yapılarak bu yüzeyler üzerinde trombositlerin aktifleşme dereceleri belirlenmiştir. Aynı zamanda, ısı işleminin ve oksijen plazması işleminin kan uyumu üzerindeki etkileri ayrı başlıklar altında incelenmiştir.

##### **4.1.4.1 Ardıl işlem yapılmamış numunelerin (EDB-Ti) kan uyumluluk testleri**

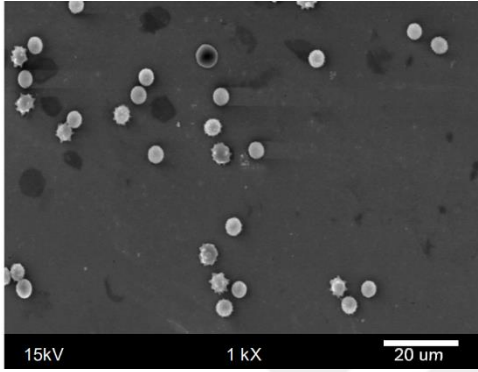
SEM incelemeleri sonucunda EDB ile titanyum kaplanmış numunelerin yüzeyinde trombosit, alyuvar (eritrosit) ve akyuvarlar (lökosit) gözlemlenmiştir (Şekil 4.9 :a ve c). Eğik Ti kaplı numuneler SEM ile 60° eğilerek incelenmiş ve yüzeyde tamamen yayılmış (FS) trombositler belirlenmiştir (Şekil 4.9 :b). Şekilli titanyum kaplanmış numunedeki trombositlerin de tamamen yayılmış (FS) olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9 :d). İki numune arasındaki tek fark; eğik titanyum kaplanmış numunelerde, şekilli titanyum kaplanmış numunelere kıyasla çok daha az alyuvar ve akyuvar hücresi gözlemlenmesidir. PBS ile temizleme adımında uzaklaştırılması gereken bu hücrelerin numune yüzeyinde hâlâ görülmesi, temizlemenin yeterince yapılmamasından kaynaklanmaktadır.



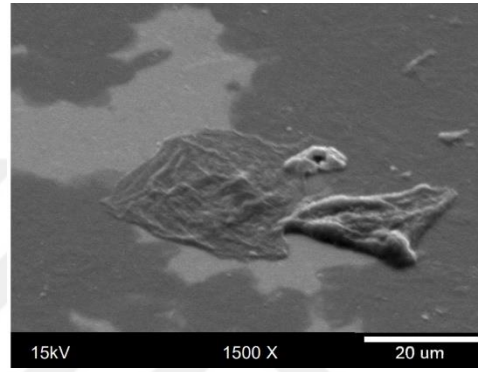
(a) EDB-eTi



(b) EDB-eTi



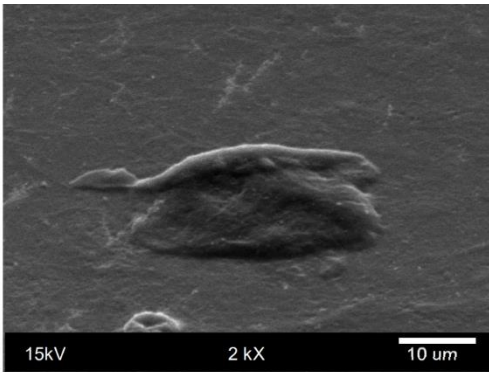
(c) EDB-sTi



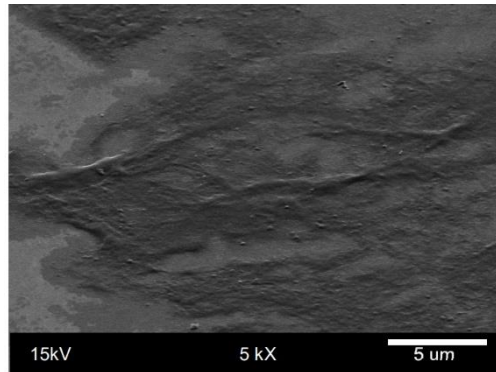
(d) EDB-sTi

**Şekil 4.9** : EBD ile Ti kaplanmış numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.

SEM incelemeleri sonucunda EDB ile eğik olarak zirkonyum kaplanmış numunelerin yüzeyine tutunan trombositlerin ise iki farklı durumda olduğu görülmüştür (Şekil 4.10 :a). Yüzeylerde, hem yayılmış (S) hem de tamamen yayılmış (FS) trombositlerin olduğu belirlenmiştir.



(a) EDB-eZr

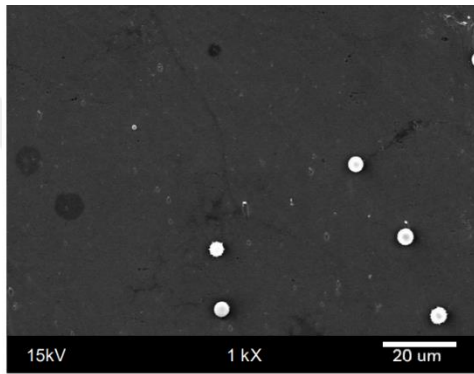


(b) EDB-eZr

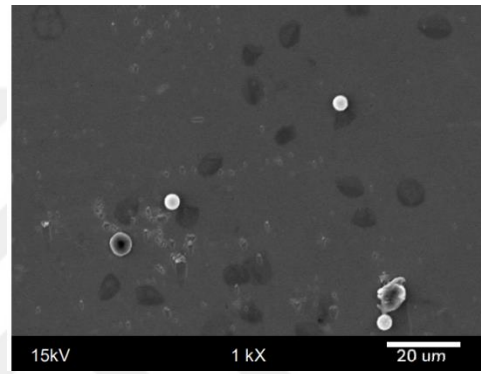
**Şekil 4.10** : EBD ile Zr kaplanmış numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.

#### 4.1.4.2 Sadece HT işleminin yapılmış numunelerin kan uyumluluk testleri

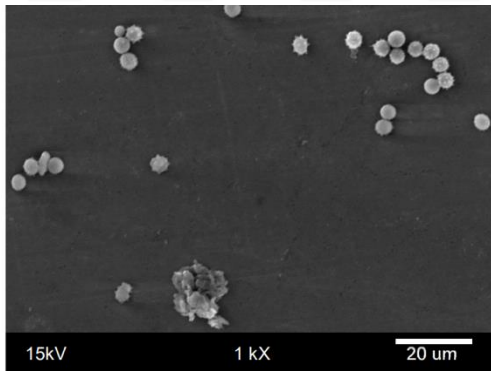
Vakum altında 800 °C’de 90 dakika ısıtılma işlemi yapılan numuneler de aynı yöntem ile kan uyumu testine tabi tutulmuştur. EDB ile titanyum kaplanmış ve ısıtılma işlemi görmüş numunelerin her ikisinde de trombosit, alyuvar ve akyuvarlar gözlemlenmiştir. Eğik kaplanmış numunelerde şekilli numuneye kıyasla çok daha az alyuvar ve akyuvar hücresi gözlemlenmiştir (Şekil 4.11 :a ve c). Ayrıca; EDB ile eğik titanyum kaplı, ısıtılma işlemi uygulanmış numunelerde tamamen yayılmış (FS) trombositlere rastlanırken (Şekil 4.11 :b), EDB ile şekilli titanyum kaplı, ısıtılma işlemi uygulanmış numunelerde ise yayılmış dentritik (SD) formdaki trombositlere rastlanmıştır (Şekil 4.11 :d).



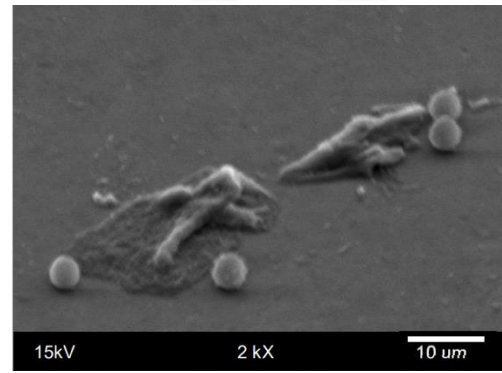
(a) EDB-eTi-HT



(b) EDB-eTi-HT



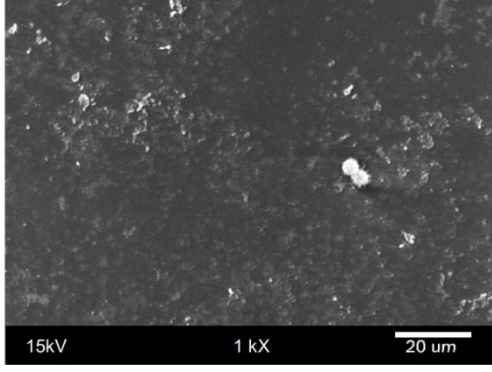
(c) EDB-sTi-HT



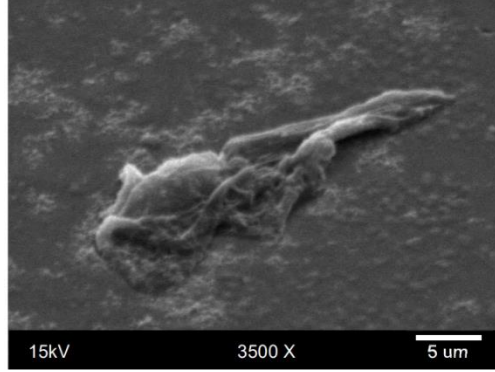
(d) EDB-sTi-HT

**Şekil 4.11** : EDB ile Ti kaplamanın ardından ısıtılma işlemi görmüş numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.

SEM incelemeleri sonucunda EDB ile eğik zirkonyum kaplanmış, ısıtılma işlemi tabi tutulmuş numunelerde de trombosit, alyuvar ve akyuvarlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.12 :a). Yapıdaki trombositler ise yayılmış dentritik (SD) formdadır (Şekil 4.12 :b).



(a) EDB-eZr-HT



(b) EDB-eZr-HT

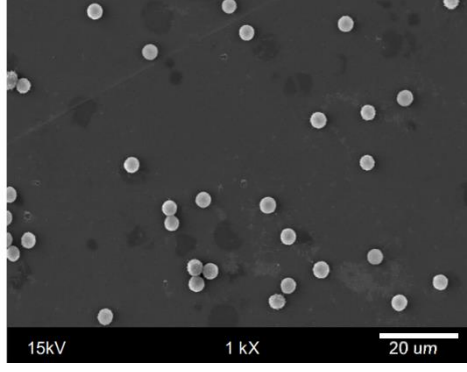
**Şekil 4.12** : EDB ile Zr kaplamanın ardından ısıl işlem görmüş numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.

Sonuç olarak, EDB yöntemi ile kaplanan tüm numunelerde (ısıl işlemli veya ısıl işlemsiz) trombosit tutunmaları ve aktifleşme dereceleri gözlenmiş; ısıl işleme tabi tutulan numunelerde, ısıl işleme tabi tutulmayan numunelere göre, trombositlerin daha az aktifleştiği görülmüştür.

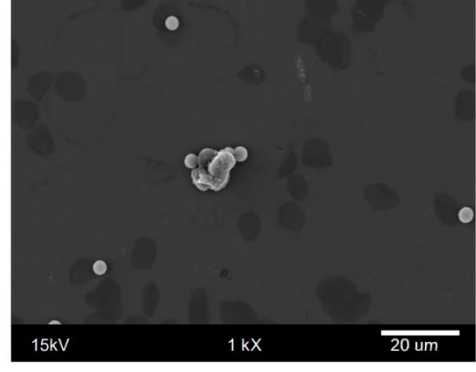
#### **4.1.4.3 Sadece PL işlemi yapılmış numunelerin kan uyumluluk testleri**

Oksijen plazması işleminin kan uyumu üzerindeki etkisini anlayabilmek için EDB ile titanyum ve zirkonyum kaplanmış numuneler, plazma işlemi uygulanmasının ardından (EDB-eTi-PL, EDB-sTi-PL ve EDB-eZr-PL) kan uyumu testine tabi tutulmuştur.

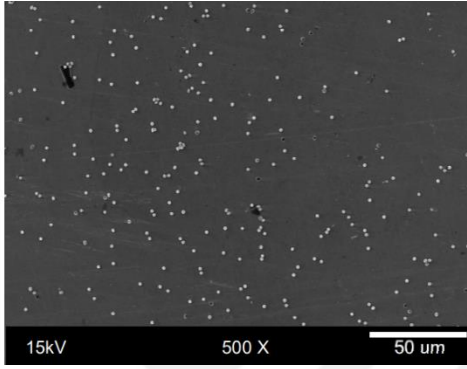
SEM incelemeleri sonucunda, titanyum ile kaplanmış numunelerde trombosit, alyuvar ve akyuvarların bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.13 :a ve c). EDB-eTi-PL numunelerinde trombositlerin dentritik yayılmış (SD) formda olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.13 :b). EDB-sTi-PL numunelerinde de dentritik yayılmış (SD) formda trombositler gözlemlenmiştir (Şekil 4.13 :d).



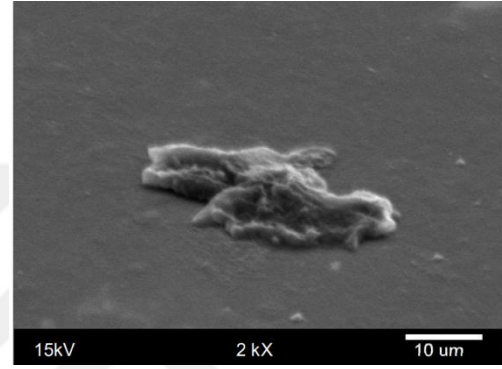
(a) EDB-eTi-PL



(b) EDB-eTi-PL



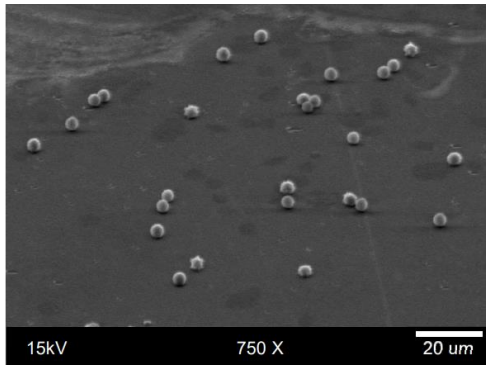
(c) EDB-sTi-PL



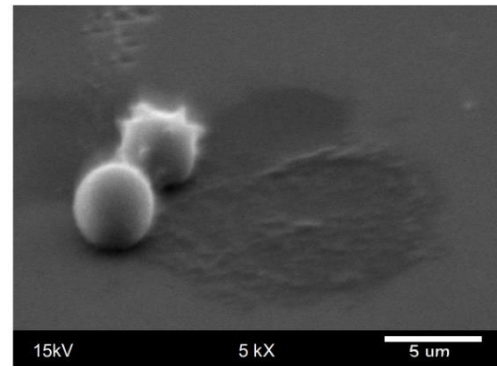
(d) EDB-sTi-PL

**Şekil 4.13 :** EBD ile Ti kaplamanın ardından plazma işlemi görmüş numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.

EDB ile zirkonyum kaplanmış, plazma işlemine tabi tutulmuş numunelerde (EDB-eZr-PL) trombosit, alyuvar ve akyuvarlar gözlemlenmiştir. Numunede; trombosit, alyuvar ve akyuvarın titanyum numunelere göre sayıca çok daha az olduğu, ancak trombositlerin tamamen yayılmış (FS) olduğu görülmüştür (Şekil 4.14 :).



(a) EDB-eZr-PL



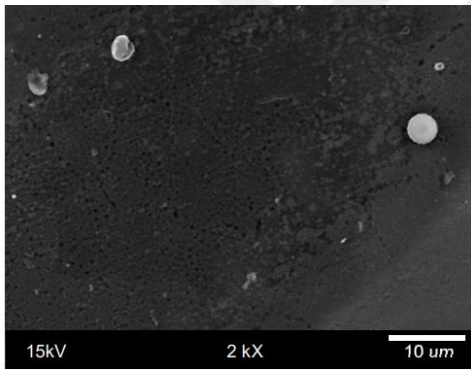
(b) EDB-eZr-PL

**Şekil 4.14 :** PL işlemi ardından kan uyumu testi uygulanmış Zr kaplı numunelerin SE görüntüleri.

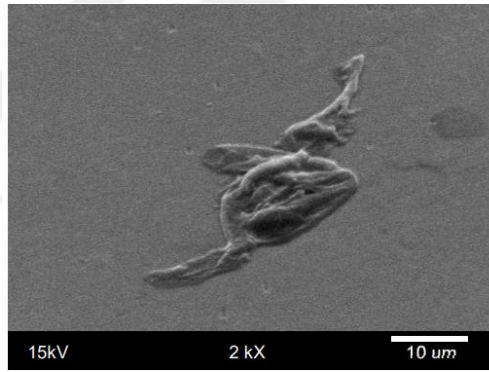
#### 4.1.4.4 HT ve PL işlemleri yapılmış numunelerin kan uyumluluk testleri

“Isıl işlemin ardından yapılan oksijen plazması işlemi”nin kan uyumu üzerindeki etkisini anlayabilmek için EDB ile titanyum ve zirkonyum kaplanmış numuneler, öncelikle ısıl işleme ardından plazma işlemine tabi tutulmuş; elde edilen numuneler (EDB-eTi-HT-PL, EDB-sTi-HT-PL ve EDB-eZr-HT-PL) üzerinde kan uyumu deneyleri gerçekleştirilmiştir.

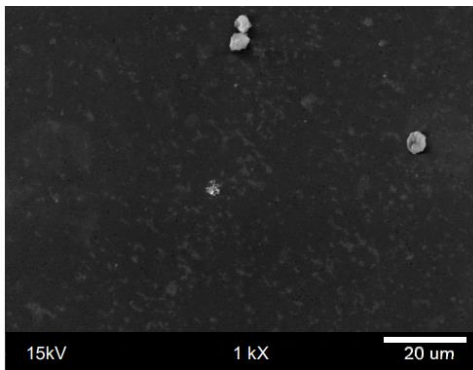
SEM incelemeleri sonucunda EDB ile titanyum kaplanmış, ardından ısıl işlem ve plazma işlemi uygulanmış numunelerde de trombosit, alyuvar ve akyuvarlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.15 :a ve c). Eğik titanyum kaplı, ısıl işlem ve plazma işlemine tabi tutulmuş numunelerde trombositlerin dentritik yayılmış (SD) safhasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.15 :b). Şekli titanyum kaplı plazma ve ısıl işlem uygulanmış numunede de trombositlerin dentritik (D) safhasında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15 :d).



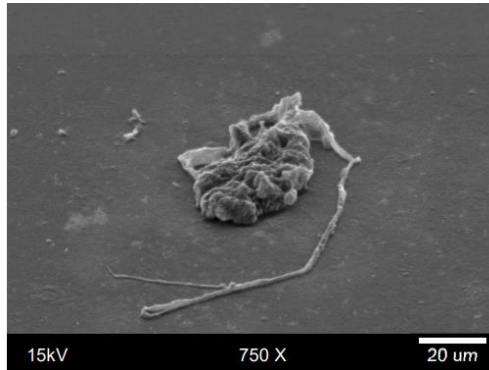
(a) EDB-eTi-HT-PL



(b) EDB-eTi-HT-PL



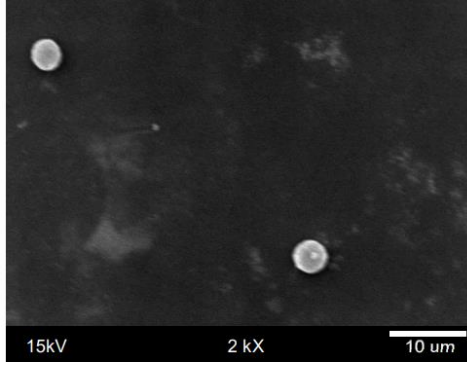
(c) EDB-sTi-HT-PL



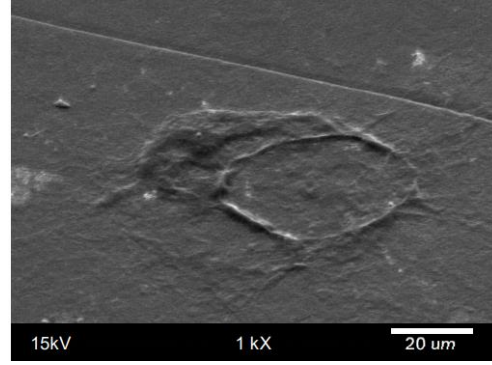
(d) EDB-sTi-HT-PL

**Şekil 4.15** : Isıl işlem ve takiben plazma işlemi yapılan EDB ile Ti kaplanmış numunelerin kan uyumu testinin ardından çekilen SE görüntüleri.

EDB ile zirkonyum kaplanmış, ısıl işlem ve plazma işlemine tabi tutulmuş numunelerde trombosit, alyuvar ve akyuvarlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.16 :a). Numunede, trombositlerin birçoğunun tamamen yayılmış (FS) olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.16 :b).



(a) EDB-eZr-HT-PL



(b) EDB-eZr-HT-PL

**Şekil 4.16 :** HT ardından PL işleme tabi tutulmuş ve takiben kan uyumu testi uygulanmış Zr kaplı numunelerin SE görüntüleri.

EDB yöntemi ile kaplanan 316 LVM numuneler üzerinde yapılan kan testlerinde numunelerin yüzeylerinde alyuvar, akyuvarlar ve yayılmış/tamamen yayılmış trombositlerin olduğu görülmektedir. Kan uyumu testi uygulanan numunelerin trombosit aktifleşme durumları Çizelge 4.2 :’de özetlenmiştir. Numuneler arasında hücre tutunma sayılarında farklılaşmalar olmakla birlikte trombosit yayılmalarının gözlenmesi, bu numunelerde kan uyumunun iyi olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, EDB ile titanyum ve zirkonyum kaplanan numunelere ayrı ayrı ve birlikte yapılan “ısıl işlem” ve “oksijen plazması” uygulamalarının trombosit tutunması ve yayılması üzerinde kısmen etkili olduğunu görmekteyiz, ancak farklı derecelerde de olsa trombosit yayılmasının gözlenmesi nedeni ile bu kaplamaların kan uyumlu olarak değerlendirilemeyeceği sonucuna varılmıştır.

**Çizelge 4.2 :** EDB yöntemi ile kaplanıp kan uyumu testi uygulanan numunelerin trombosit aktifleşme durumları.

<b>Yüzey Şekli</b>	<b>Trombosit Aktifleşme Durumu</b>
EDB-eTi	FS
EDB-eTi-HT	FS
EDB-eTi-PL	SD
EDB-eTi-HT-PL	SD
EDB-sTi	FS
EDB-sTi-HT	SD
EDB-sTi-PL	SD
EDB-sTi-HT-PL	D
EDB-eZr	S
EDB-eZr-HT	SD
EDB-eZr-PL	FS
EDB-eZr-HT-PL	FS

#### **4.1.5 EDB ile elde edilen kaplamaların genel değerlendirmesi**

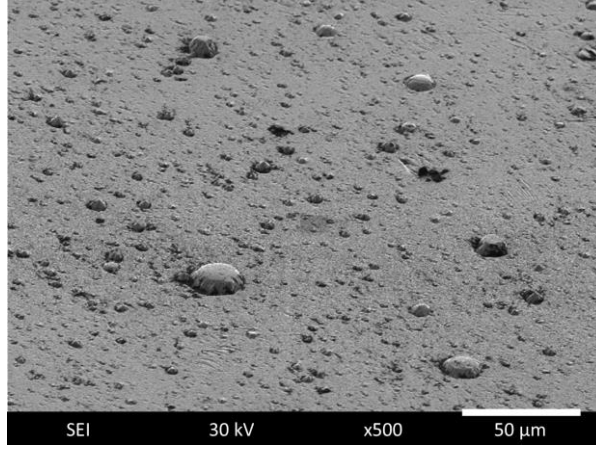
Gerek düşük kan uyumu göstermesi gerekse mekanik olarak kaplama dayanımının düşük olması sebebi ile EDB ile elde edilen eğik ve şekilli titanyum ve zirkonyum kaplamaların stent uygulamaları için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

## **4.2 KAFBB Yöntemi ile Yapılan Kaplamalar**

### **4.2.1 KAFBB-Ti kaplamaların morfolojik incelemeleri ve anodizasyon sonuçları**

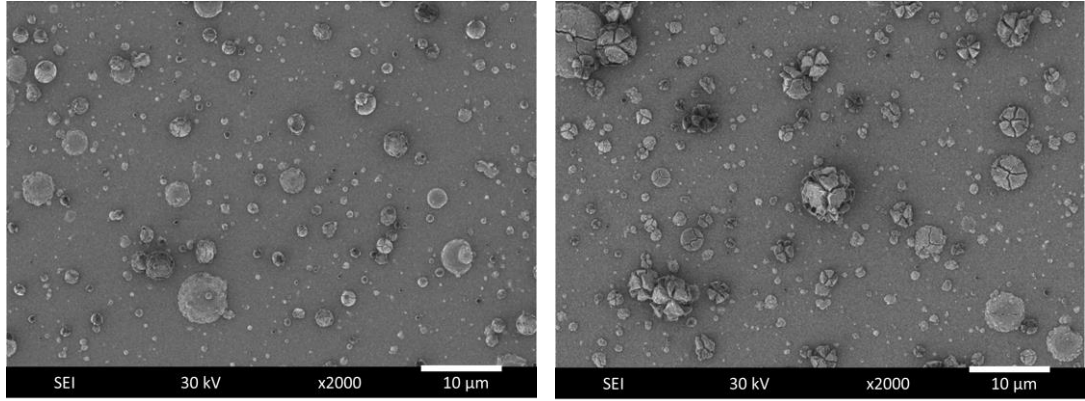
KAFBB yöntemi ile 316 LVM üzerine titanyum kaplanan numunelerin (KAFBB-Ti) kaplama sonrasında elde edilen görüntüsü Şekil 4.17 :’de verilmiştir. KAFBB işleminin dezavantajlarından sayılabilecek makro parçacık oluşumunun bu kaplamada da mevcut olduğu görülmektedir. Makro parçacıkların stent uygulamalarında 2 ana soruna sebep olabileceği düşünülmektedir:

1. Makro parçacıkların, stent içerisine yerleştirilen balonun şişirilmesi ile gerçekleşen plastik deformasyon sırasında dökülmesi (vücudun başka bir bölgesinde tıkanıklığa sebep olması)
2. Makro parçacıkların trombosit aktivasyonu (dolayısıyla pıhtılaşma) için elverişli olması [23].



**Şekil 4.17** : KAFBB ile kaplanmış titanyum yüzeyinin SE görüntüsü.

Bunun yanında, anodizasyon işlemi ile de makro parçacıkların döküleceği öngörülmüştür. Anodizasyon işlemleri, 27 °C’de ağırlıkça %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hacimce %1 H<sub>2</sub>O içeren etilen glikol (EG) çözeltisi içerisinde 40 V potansiyel altında farklı süreler boyunca gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.18 :’de en kısa ve en uzun sürelerde yapılan anodizasyon işlemi sonrasında çekilen ikincil elektron görüntüleri verilmiştir. Görüldüğü üzere, anodizasyon sonrasında, makro parçacıkların çatladığı, ama beklendiğinin aksine, sayılarında belirgin bir düşüş olmadığı gözlemlenmiştir.

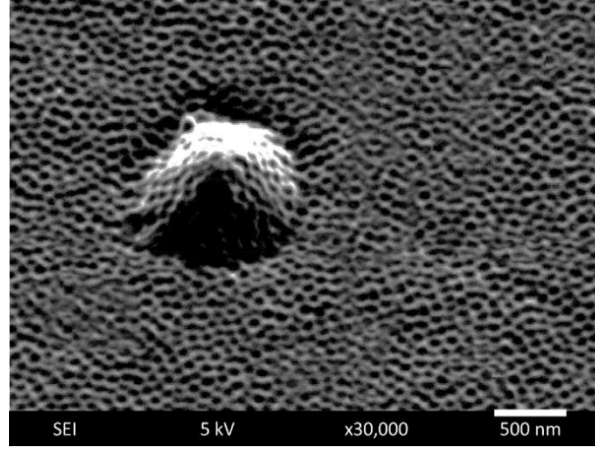


**(a)** 20 sn.

**(b)** 250 sn.

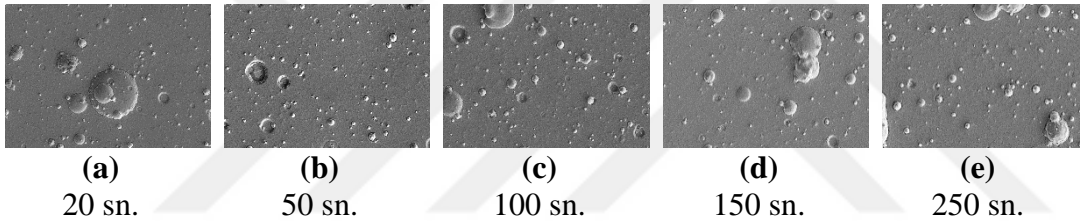
**Şekil 4.18** : KAFBB ile kaplanmış ve farklı sürelerde anodize edilmiş Ti yüzeyinin SE görüntüleri.

Makro parçacıklardan kurtulmak ve aynı zamanda yüzeyde nanodesenli yapılar oluşturma amacı ile numuneler, anodizasyon işlemi takiben, ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. 20 sn.lik anodizasyonu takiben yapılan ultrasonikasyon işlemi sonucunda yüzeyde nanodesenlerin oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.19 :). Makro parçacıklar üzerinde de aynı desenler oluştuğu görülmektedir.



**Şekil 4.19 :** KAFBB ile Ti kaplanmış, ardından 20 sn. anodize edilmiş ve takiben ultrasonikasyon yapılmış numunenin SE görüntüsü.

Makro parçacıkların dökülmesi için anodizasyon süresi artırılmış ve takiben numuneler ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Şekil 4.20 :’de ultrasonikasyon sonrasında da makro parçacıkların mevcudiyetini koruduğu görülmektedir.



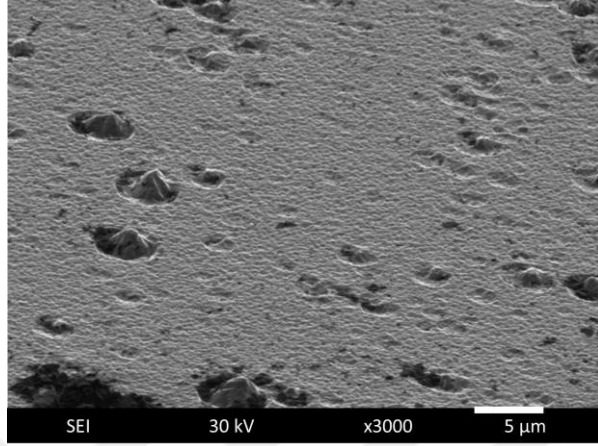
**Şekil 4.20 :** KAFBB ile kaplanmış, farklı sürelerde anodize edilmiş ve ultrasonikasyon yapılmış Ti yüzeylerinin SE görüntüleri.

Özetle; KAFBB yöntemi ile titanyum kaplama işlemi sonucunda elde edilen numunelerin üzerinde nanodesenler oluşturulabilmiş, ancak makro parçacıkların yüzeyden uzaklaştırılamaması sebebi ile bu yöntem ile yapılan kaplamaların kardiyovasküler stent uygulamaları için riskli olduğu düşünülmüş ve bu yöntemden vazgeçilmiştir. Dolayısı ile mekanik dayanım ve biyouyumluluk testlerinin yapılmasına gerek duyulmamıştır.

#### **4.2.2 KAFBB-Zr kaplamaların morfolojik incelemeleri ve anodizasyon sonuçları**

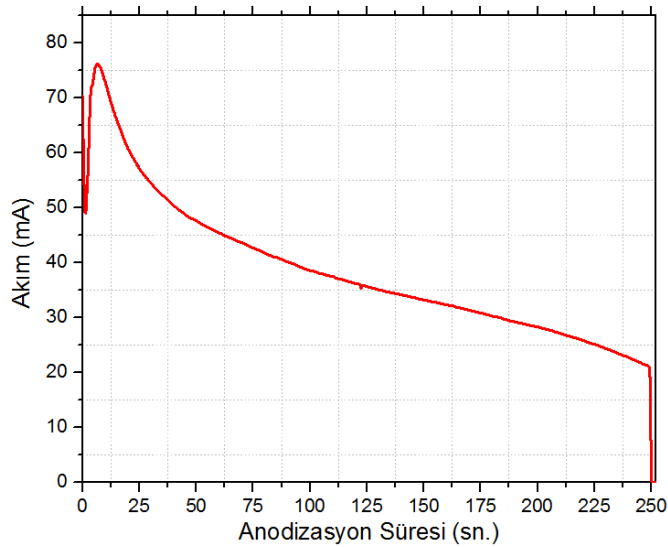
KAFBB yönteminde oluşan makro parçacık miktarına etki eden faktörlerden birinin katot malzemesi olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, titanyum metalinden farklı olarak zirkonyum üzerine de deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, zirkonyum metali de 316 LVM paslanmaz çelik üzerinde büyütülmüştür (KAFBB-Zr). Ancak, titanyum kaplamalarda karşılaşılan makro parçacık sorunu zirkonyum kaplamalarda da

görülmüştür. (Şekil 4.21 :). Yine de zirkonyum kaplamada görülen makro parçacık sayısı titanyum kaplamadan daha azdır. Hem bu makro parçacıklardan kurtulmak için hem de zirkonyum metali üzerinde nanodesen elde edebilmek için kaplamalara farklı koşullarda anodizasyon işlemleri yapılmıştır.



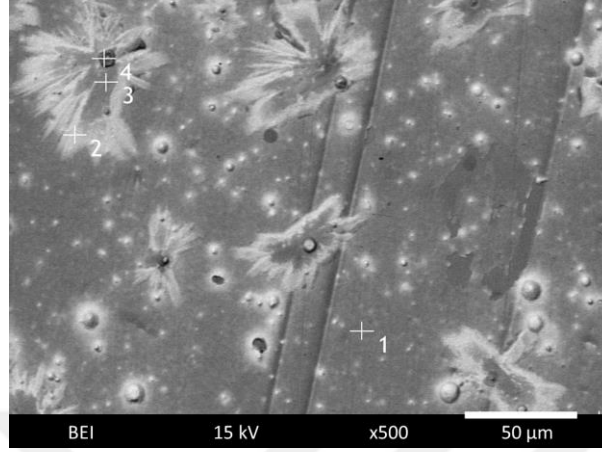
Şekil 4.21 : KAFBB ile kaplanmış Zr yüzeyinin SE görüntüsü.

Anodizasyon çalışmalarında; genellikle titanyum anodizasyonu için kullanılan elektrolit ve potansiyel, zirkonyum anodizasyonu için de kullanılmıştır. Ağırlıkça %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hacimce %1 H<sub>2</sub>O içeren etilen glikol (EG) çözeltisi içerisinde 40 V anodizasyon potansiyeli uygulayarak 250 sn. boyunca anodizasyon yapılmıştır. Bu sürecin akım – zaman grafiği Şekil 4.22 :’de verilmiştir. Akımın 15 sn.den sonra sürekli düştüğü, özellikle 200 sn.den sonra daha yüksek bir hızda düştüğü görülmektedir.



Şekil 4.22 : Ağırlıkça %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hac. %1 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde yapılan anodizasyonun akım - zaman grafiği (40 V, 250 sn.).

Yapılan anodizasyonun ardından, kırılğan oksit tabakasını yüzeyden uzaklaştırmak için ultrasonikasyon işlemi yapılmıştır. Bu bölgeden elde edilen geri saçılan elektron (BS) görüntüsü ve bazı bölgelerden alınan EDS analizleri Şekil 4.23 :’te gösterilmiştir.



Ele.	Atomik %
F	7,765
Cr	18,225
Fe	63,446
Ni	6,205
Zr	4,359

1 numaralı bölge

Ele.	Atomik %
F	0,000
Cr	3,660
Fe	7,368
Ni	3,347
Zr	85,624

2 numaralı bölge

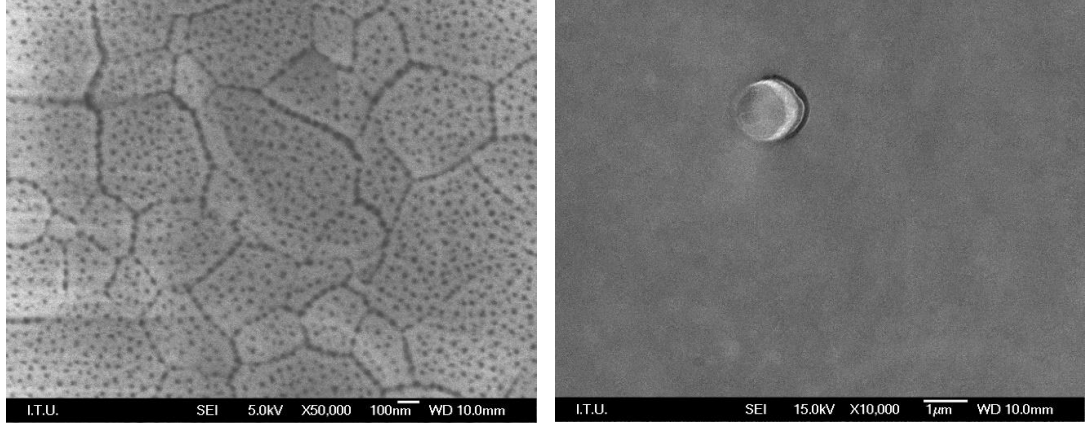
Ele.	Atomik %
O	38,258
F	29,205
Zr	32,537

3 numaralı bölge

**Şekil 4.23 :** Ağ. %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hac. %1 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde anodize edilen KAFBB-Zr’nin US sonrası BS görüntüsü ve işaretli bölgelerin EDS analizleri (40 V, 250 sn.).

SEM incelemelerine göre zirkonyum tabakasının büyük bölümünün tabana kadar tamamen anodize olduğu ve bu anodize olmuş bölümün ultrasonikasyon ile yüzeyden ayrılmış olduğu yapılan analiz sonucunda (Şekil 4.23 :’te 1 ile işaretlenmiş nokta) belirlenmiştir. Numunenin bazı bölgelerinde ise (2 ve 3 ile işaretli bölgeler) zirkonyum metalinin halen varlığını sürdürdüğü ve zirkonyum metali üzerinde oluşması istenen nanodesenli yapının da oluşmadığı görülmüştür.

Bu şekilde yapılan anodizasyon işleminin sonucunda tabana varılması sebebi ile işlem süresi 100 sn.ye düşürülmüş ve ultrasonikasyon sonrası Şekil 4.24 :’te verilen görüntüler elde edilmiştir.



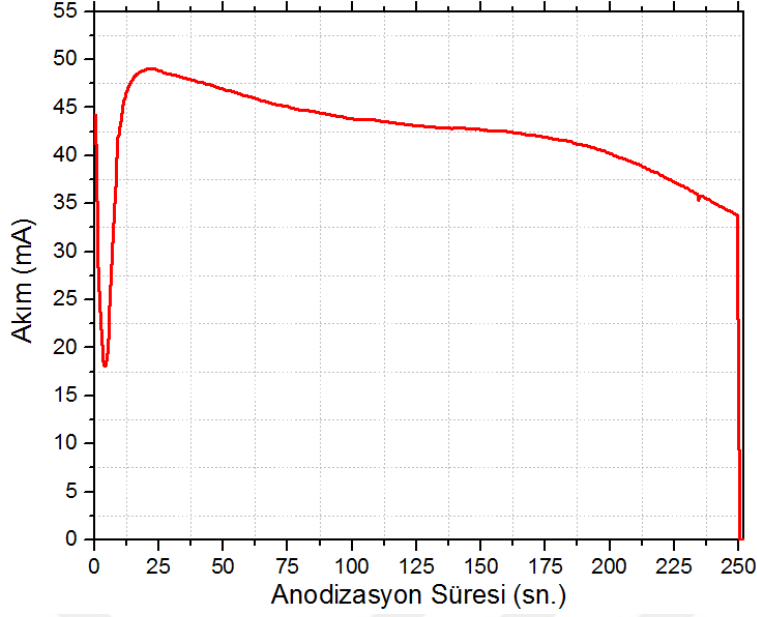
(a)

(b)

**Şekil 4.24 :** KAFBB-Zr'nin Ağ. %0,6 NH<sub>4</sub>F ve hac. %1 H<sub>2</sub>O içeren EG çözeltisinde anodize edilen KAFBB-Zr'nin (a) US uygulanmayan ve (b) US uygulanan bölgelerinin SE görüntüleri (40 V, 100 sn.).

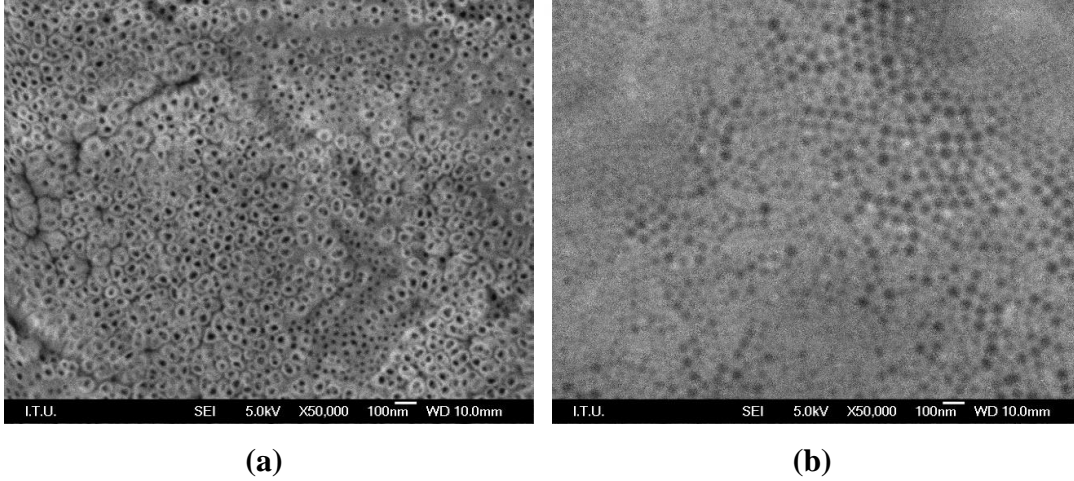
Şekil 4.24 :a'da görüldüğü üzere, numune üzerinde nanoporoz bir yapı oluşmuştur. Anodize olmuş bu bölgenin ultrasonikasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılması sonucu, altından herhangi bir desene sahip olmayan bir yapı (Şekil 4.24 :b) ortaya çıkmıştır. EDS analizlerine göre de yapının sadece zirkonyum içerdiği görülmüş; aynı zamanda, yüzeydeki makro parçacıkların da uzaklaşmadığı anlaşılmıştır.

Ultrasonikasyon sonrası nanodesen elde edilememesi sebebi ile florür içeriği daha düşük ve su içeriği daha yüksek bir çözeltide deneyler tekrarlanmıştır. Bu tür elektrolitlerde su miktarı artışının, elektrolitin iletkenliğini artırıp viskoziteyi düşürdüğü bilinmektedir [68]. KAFBB-Zr numuneleri, ağırlıkça %0,3 NH<sub>4</sub>F ve hacimce %5 H<sub>2</sub>O içeren yeni bir etilen glikol çözeltisi oluşturularak bu çözeltide anodize edilmiştir. Numuneler bu çözelti içerisinde 40 V anodizasyon potansiyelinde 250 sn. boyunca anodize edilmiştir. Bu işlemin akım – zaman grafiği Şekil 4.25 :’te verilmiştir.



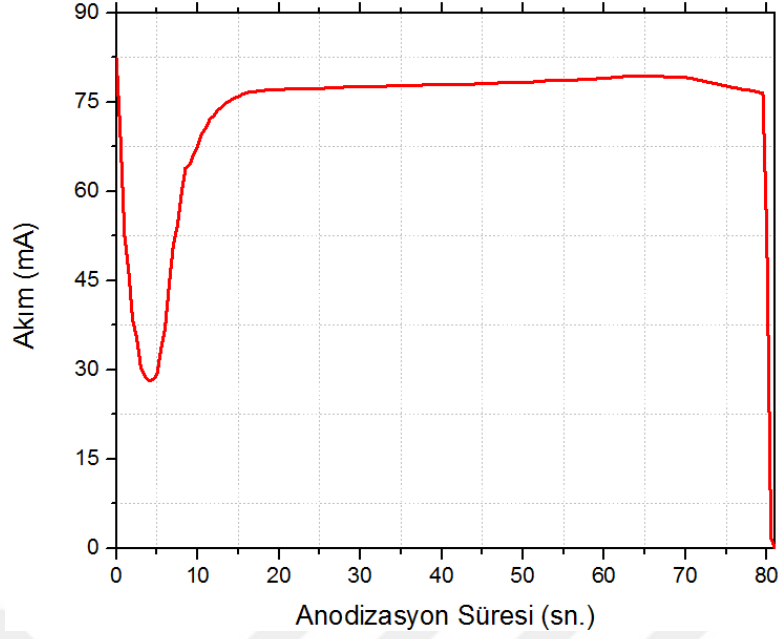
**Şekil 4.25 :** Ağırlıkça %0,3  $\text{NH}_4\text{F}$  ve hac. %5  $\text{H}_2\text{O}$  içeren EG çözeltisinde yapılan anodizasyonun akım - zaman grafiği (40 V, 250 sn.).

Anodize edilmiş numunelerin SEM incelemelerinde Şekil 4.26 :a ve b’de görüldüğü üzere yüzeyde ağzı açık nanotüp yapısının oluştuğu, ultrasonikasyon sonrasında ise kalkan bölgenin altında nanodesenli yapının oluştuğu net bir şekilde görülmektedir. Buna karşın nanodesenli yapının yeterince homojen dağılmadığı görülmektedir.



**Şekil 4.26 :** Ağ. %0,3  $\text{NH}_4\text{F}$  ve hac. %5  $\text{H}_2\text{O}$  içeren EG çözeltisinde anodize edilen KAFBB-Zr’nin (a) US uygulanmayan ve (b) US uygulanan bölgelerinin alınan SE görüntüleri (40 V, 250 sn.).

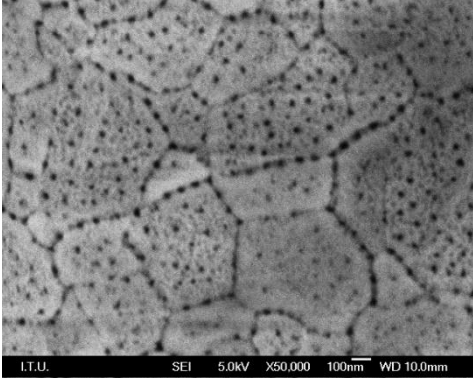
Desenlerin derinliğinin artırılması ve morfolojilerinin değiştirilmesi amacı ile 60V anodizasyon potansiyeli uygulanarak aynı elektrolitte tekrardan anodizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyin akım – zaman grafiği Şekil 4.27 :’de verilmiştir.



**Şekil 4.27 :** Ağırlıkça %0,3  $\text{NH}_4\text{F}$  ve hac. %5  $\text{H}_2\text{O}$  içeren EG çözeltisinde yapılan anodizasyonun akım - zaman grafiği (60 V, 80 sn.).

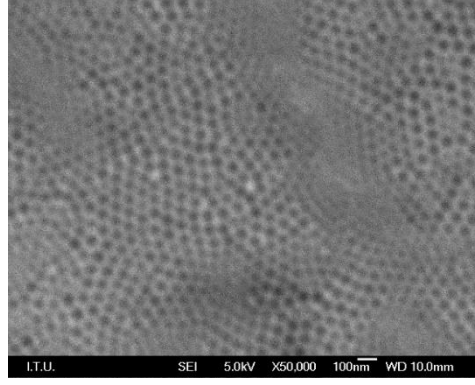
Şekil 4.27 :’de görüldüğü üzere akım, 15. sn.den işlem sonuna kadar sabit kalmıştır. İşlem sonlarına doğru akımda düşüş görülmesi üzerine işlem 80. sn.de kesilmiştir. Hem anodizasyon hızını belirlemek hem de anodizasyon süresinin nanodesenlerin sahip olacağı morfolojiye olan etkisini belirlemek amacı ile bir diğer numune 40 sn. anodize edilmiştir. Bu numunelerin ultrasonikasyon yapılan ve yapılmayan bölgelerin ikincil elektron görüntüleri Şekil 4.28 :’de verilmiştir. Numunelerin ultrasonikasyon öncesi yapıları birbirine benzer bulunmuştur (Şekil 4.28 :a ve c).

Ayrıca, her iki numunenin de ultrasonikasyon ile kaldırılan bölgelerinde nanodesenlerin oluştuğu ve 40 sn. anodize edilen numunenin görece daha homojen dağıldığı saptanmıştır (Şekil 4.28 :b ve d). Bu duruma, katodik ark ile elde edilen kaplamaların sahip olduğu morfolojilerin derinliğe bağlı olarak değişmesinin sebep olması muhtemeldir.



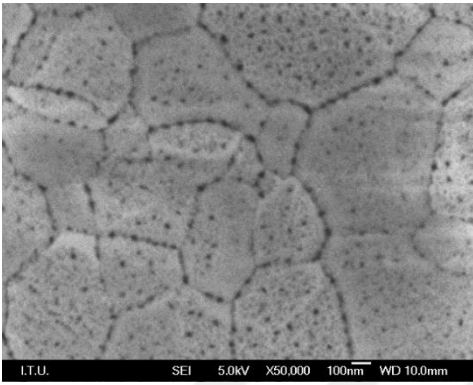
(a)

80 sn. anodizasyon  
Ultrasonikasyon yapılmayan bölge



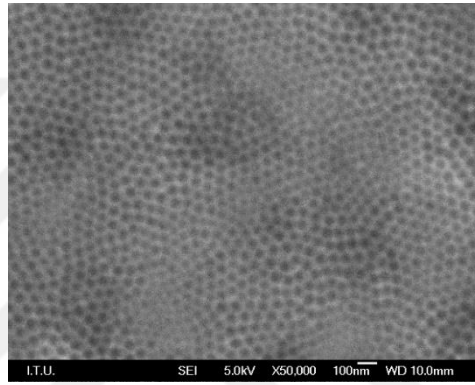
(b)

80 sn. anodizasyon  
Ultrasonikasyon yapılan bölge



(c)

40 sn. anodizasyon  
Ultrasonikasyon yapılmayan bölge

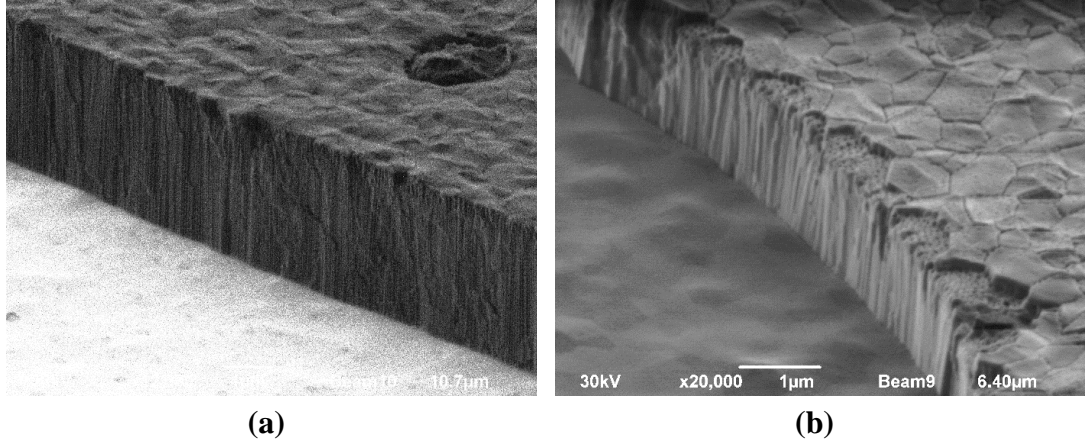


(d)

40 sn. anodizasyon  
Ultrasonikasyon yapılan bölge

**Şekil 4.28** : Ağ. %0,3  $\text{NH}_4\text{F}$  ve hac. %5  $\text{H}_2\text{O}$  içeren EG çözeltilisinde anodize edilen KAFBB-Zr'nin ultrasonikasyon uygulanan/uygulanmayan bölgenin sınırından alınmış SE görüntüleri (60 V).

Numunelerin ultrasonikasyona tabi tutulan ve tutulmayan bölgelerini ortak olarak gösteren kesit görüntüleri nanotüp yapısının oluştuğunu net bir biçimde göstermektedir (Şekil 4.29 :). Her iki numunenin tüp yapıları, üstleri kapalı ve daha ince ve seyrek gözenekli yapıda iken altta oluşan tüplerin yapıları daha net ve belirgindir. Anodizasyon süresinin ise oluşan anodik oksit yapısının kalınlığı üzerindeki etkisi net olarak gözlenmektedir (Şekil 4.29 :a ve b). Anodizasyon süresinin 2 katına çıkarılması ile oksit katman kalınlığı 2,65 mikrondan 5,93 mikrona yükselmiş yani beklendiği üzere iki katına çıkmıştır. Her iki numunenin de ultrasonikasyon ile kaldırılmış bölgelerinde nanodesen olduğu daha önce verilen SEM fotoğraflarında belirlenmişti (Şekil 4.28 :b ve d).



**Şekil 4.29 :** Ağ. %0,3  $\text{NH}_4\text{F}$  ve hac. %5  $\text{H}_2\text{O}$  içeren EG çözeltisinde (a) 80 sn. ve (b) 40 sn. anodize edilen Zr kaplı 316 LVM'nin US uygulanan/uygulanmayan bölgenin sınırından alınmış SE görüntüleri (60 V, Eğim  $60^\circ$ ).

#### 4.2.3 KAFBB ile elde edilen kaplamaların genel değerlendirilmesi

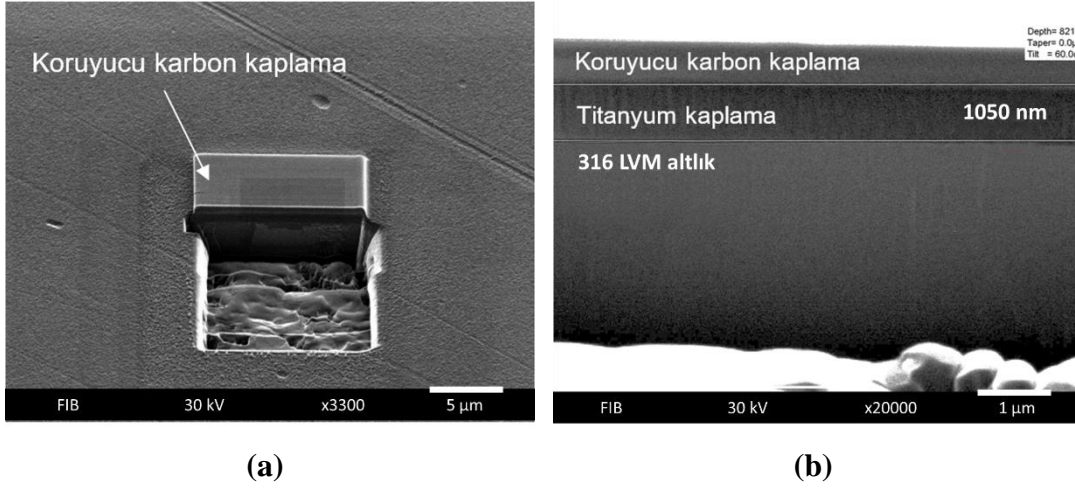
Sonuç olarak, titanyum ve zirkonyum kaplı 316 LVM paslanmaz çelik numuneler üzerinde yapılan anodizasyon çalışmaları sonucunda nanodesenli yapılar edilmiştir. Buna rağmen; bu yöntem ile elde edilen kaplamalara, makro parçacık oluşması sebebi ile, mekanik dayanım ve ileri biyolojik testler yapmaya gerek duyulmamıştır.

#### 4.3 MAS ile Kaplanan Numuneler

KAFBB ile elde edilen kaplamaların, makro parçacık içermesi sebebi ile stent uygulamaları için uygun olmadığı düşünüldüğünden, bundan sonraki çalışmalarda daha homojen bir kaplamaya olanak veren manyetik alanda sıçratma (MAS) kullanılmış ve çalışmalar bu yöntem üzerine odaklanarak devam etmiştir.

##### 4.3.1 MAS-Ti numunelerinin üretimi

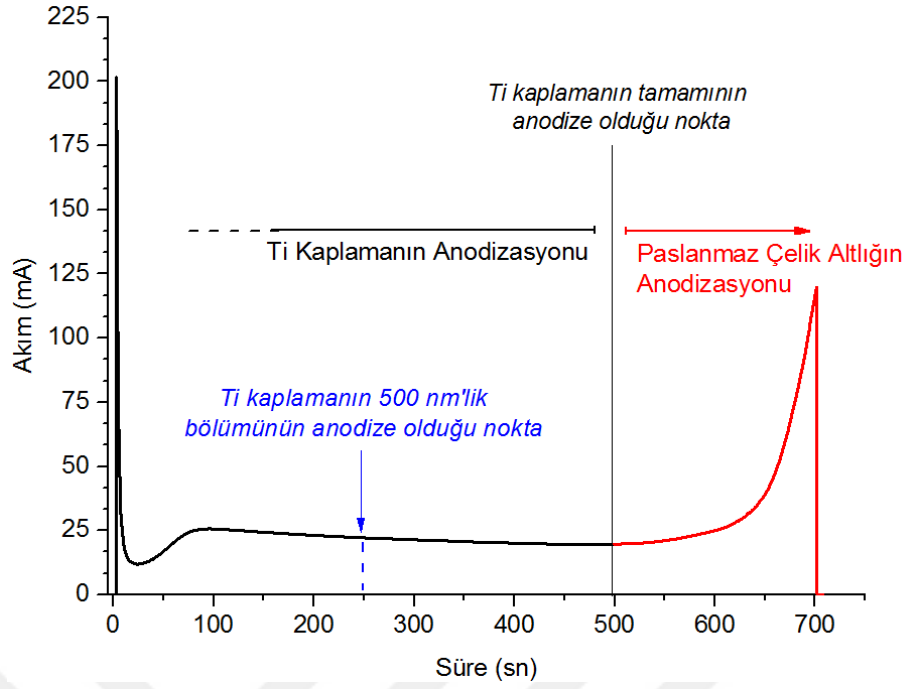
MAS yöntemi ile 7 dk. boyunca kaplanan 316 LVM paslanmaz çeliğin,  $1047 \pm 71\text{nm}$  kalınlığında titanyum kaplandığı, XRF kalınlık analizi cihazında ölçümü ile saptanmıştır. XRF ile alınan tüm kalınlık değerleri en az 10 ölçümün ortalamasıdır. Kaplama kalınlığı, odaklamalı iyon demeti cihazı ile hazırlanan yüzey üzerinden de kontrol edilmiştir (Şekil 4.30 :) ve elde edilen bu değerlerin XRF ile ölçülen değerlerle uyumlu olduğu saptanmıştır. MAS yöntemi ile titanyum kaplama işlemi MAS-Ti olarak, bu işlem ile elde edilmiş düz titanyum yüzey ise  $pTi$  olarak kodlanmıştır.



**Şekil 4.30 :** MAS-Ti numunelerinin FIB’de hazırlanmış ve görüntülenmiş 3,3 kX (a) ve 20 kX (b) büyütmelerdeki SE görüntüleri (30 kV, Eğim: 40°, SE).

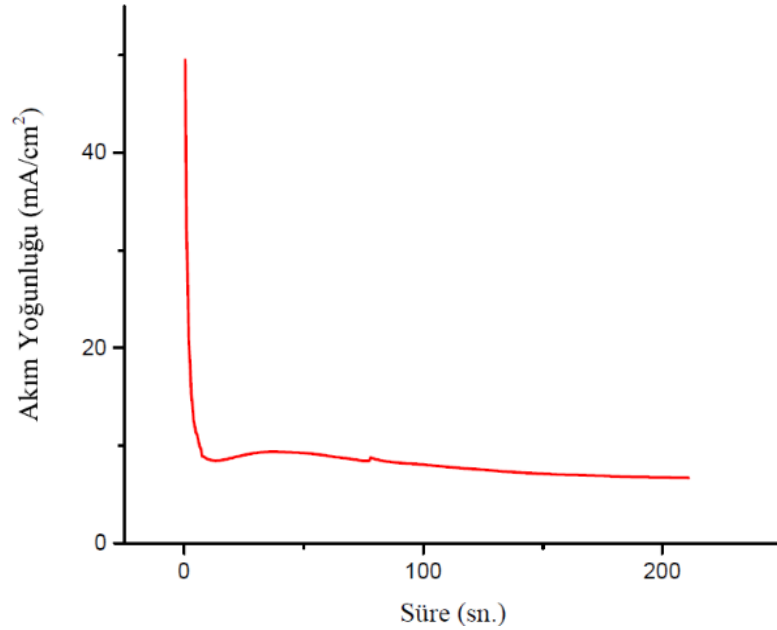
#### 4.3.2 MAS-Ti numunelerinin anodizasyonu

Yüzeyde nanodesenli bir yapı oluşturmak için titanyum kaplamanın tamamının anodize edilmekten kaçınılması gerekmektedir. Bu sebeple, anodizasyonun paslanmaz çelik altlığa ulaşip ulaşmadığı bir ön çalışma ile belirlenmiştir. Anodizasyon işleminden sonra, “anodize olmadan kalan metalik titanyum tabakası”nın kalınlığını ayarlamak için, ilk olarak 1 µm kalınlığındaki titanyum kaplamanın tamamının anodize olması için gereken zaman belirlenmiştir. Bu amaçla, anodizasyon sırasında kaydedilen akım ve zaman davranışı kullanılmıştır. Şekil 4.31 :’de görüldüğü üzere; anodizasyonun başlamasıyla birlikte, bariyer titanyum oksit tabakasının oluşumunu gösteren, akımdaki keskin azalma net bir şekilde belirmiştir. Ardından, gözeneklerin oluşumu ile akımda hafif bir artış görülmekte ve gözeneklerin oluşumunu takiben, anodik oksit kalınlığının da artmasıyla birlikte akım yavaş bir şekilde azalmaktadır. Bu düşüşün ardından, akımın ani bir şekilde artması titanyum tabakasının anodizasyonunun tamamlandığını ve paslanmaz çelik yüzeye ulaşıldığını göstermektedir. Bu bilgi ışığında, 1 µm kalınlığındaki titanyum tabakasının tamamının anodize olması için gereken süre 500 sn. olarak belirlenmiştir. Anodizasyon hızının uygulanan deney süresi içerisinde doğrusal olduğu varsayılırsa, paslanmaz çelik altlık üzerinde 250 sn.de yaklaşık olarak 500 nm metalik titanyumun anodize edilebileceği ortaya çıkmaktadır. Dolayısı ile 250 sn. sonunda anodik oksit tabakasının altında anodize olmamış 500 nm kalınlığında bir metalik titanyum katmanının mevcut olması gerekir.



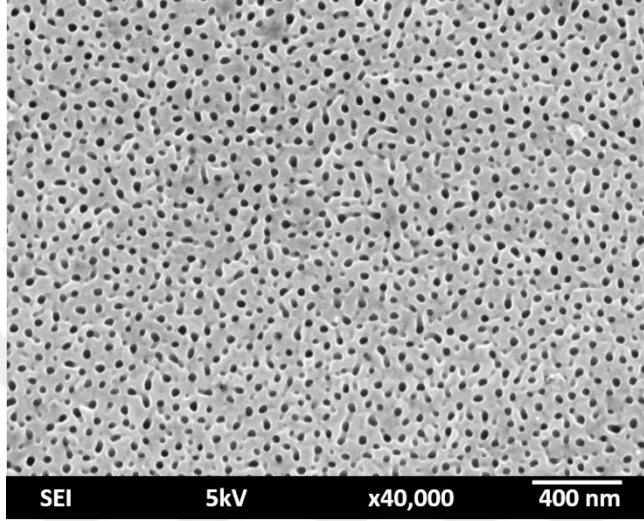
**Şekil 4.31 :** 1  $\mu\text{m}$  kalınlığındaki tüm Ti filminin anodizasyonu sırasında kaydedilen akım – zaman grafiği (40 V, EG içerisinde ağırlıkça %0,6  $\text{NH}_4\text{F}$  ve hacimce 1%  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Bu bilgiler ışığında, üzerinde 1  $\mu\text{m}$  kalınlığında Ti bulunan numune de 250 sn. süresince anodize edilmiştir. Bu numunelerin akım – zaman grafikleri Şekil 4.32 :’de verilmiştir. Görüldüğü üzere anodizasyon normal seyindedir. Grafik, herhangi bir dökülmeye ya da tabana ulaşıldığına dair bir bilgi içermemektedir.



**Şekil 4.32 :** 1  $\mu\text{m}$  Ti kaplanan numunelerin anodizasyon sırasında kaydedilen süreye bağlı akım yoğunluğu grafikleri (40 V, EG içerisinde ağırlıkça %0,6  $\text{NH}_4\text{F}$  ve hacimce 1%  $\text{H}_2\text{O}$ ).

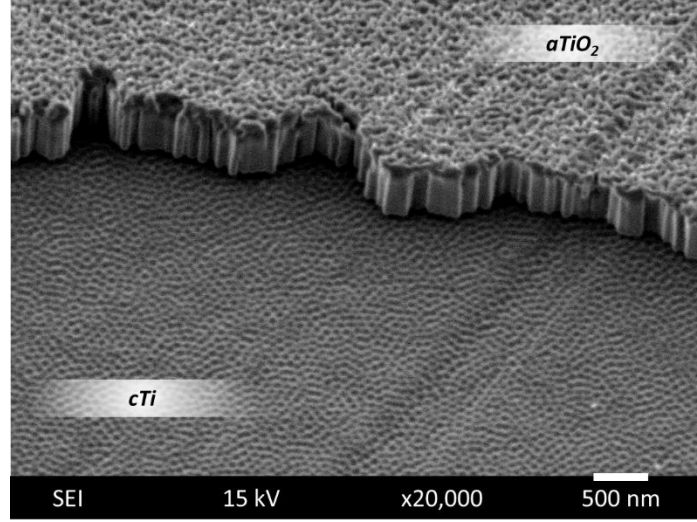
MAS-Ti numuneler üzerine 250 sn. süresince yapılan anodizasyonu takiben numunelerin taramalı elektron mikroskopunda ikincil elektron görüntüleri alınarak Şekil 4.33 :’te görülen iç çapı 50 - 70 nm olan nanoporlar tespit edilmiştir. MAS yöntemi ile titanyum kaplamanın ardından anodizasyon işlemi uygulanmış numuneler MAS-Ti-ANO olarak, bu işlem ile elde edilmiş anodik oksit yüzeyi  $aTiO_2$  olarak kodlanmıştır.



Şekil 4.33 : 7 dk. Ti kaplanıp 250 sn. anodize edilen numunenin SEM’de çekilmiş SE görüntüsü.

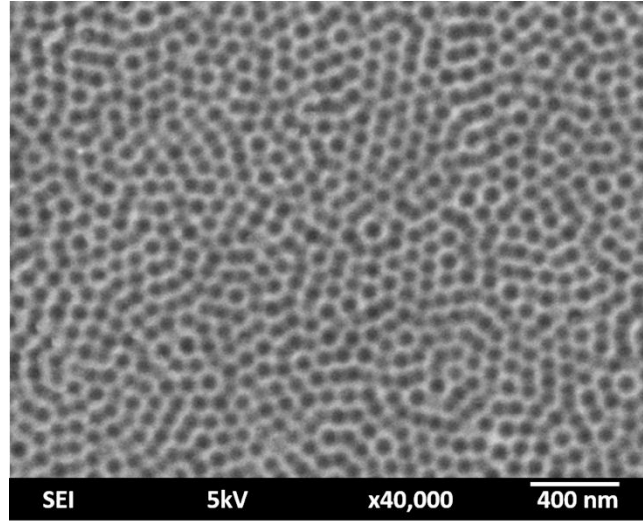
#### 4.3.3 MAS-Ti-ANO numunelerinin ultrasonikasyonu

Balonlu kardiyovasküler stentlerin uygulanması, stentin plastik deformasyonu ile mümkün olmaktadır. Yüksek deformasyona maruz kalacak olan bir stent üzerine yapılan kaplamanın da uygulama sırasında yüzeyden atmaması/dökülmemesi gerekmektedir. Bu sebeple, paslanmaz çelik üzerindeki  $TiO_2$  nanotüplü yapıların, stentlerin balonla genişletme işlemi sırasında çatlama/dökülme olasılığı vardır. Dolayısı ile elde edilen bu kırılğan anodik oksit kaplamanın yüzeyden uzaklaştırılması gerekmektedir. Tez çalışmasında bu amaç için ultrasonikasyon uygulanmıştır. Şekil 4.34 :’te, ultrasonikasyon işleminden etkilenmeyen bölge ve belli bir alanı ultrasonikasyon ile uzaklaştırılmış bölgenin sınırı görülmektedir. Kırılğan oksit tabakasının uzaklaştırılması ile aynı bölgede nano boyutta desenler içeren bir yapının ortaya çıktığı net bir şekilde görülmektedir.



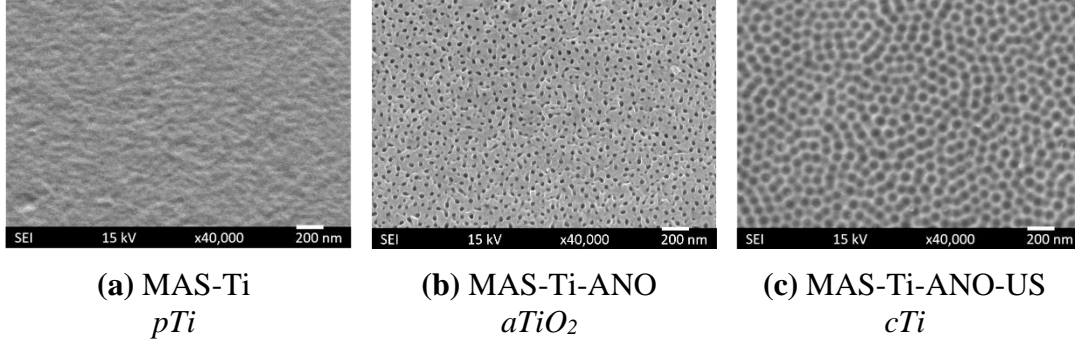
**Şekil 4.34 :** Ultrasonikasyondan etkilenmemiş anodik oksit ve ultrasonikasyon ile anodik oksidin uzaklaştırıldığı alanların SE görüntüsü (Eğim = 30°).

1 µm Ti kaplanıp 250 sn. anodize edilmiş ve ardından ultrasonikasyon ile oksit tabakası uzaklaştırılmış numunenin yüzeyinde kalan anodize olmamış titanyumun kalınlığı XRF ile ölçülmüş ve bu nanodesenli metalik titanyum kalınlığının  $504 \pm 41$  nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon uygulanan bu bölgenin yüzey görüntüsü de Şekil 4.35 :’te gösterilmektedir. MAS yöntemi ile titanyum kaplamayı takiben anodizasyon ve ultrasonikasyon işlemi MAS-Ti-ANO-US olarak, bu işlem ile elde edilmiş nanodesenli titanyum yüzeyi ise *cTi* olarak kodlanmıştır.



**Şekil 4.35 :** 7 dk. Ti kaplanıp 250 sn. anodize edilen numunenin ultrasonikasyon sonrası SEM’de çekilmiş SE görüntüsü (*cTi*).

*cTi* yapısını elde etmek için yapılan işlemler ve bu işlemler sonunda elde edilen yüzey görüntüleri sırasıyla Şekil 4.36 :’da özetlenmiştir.

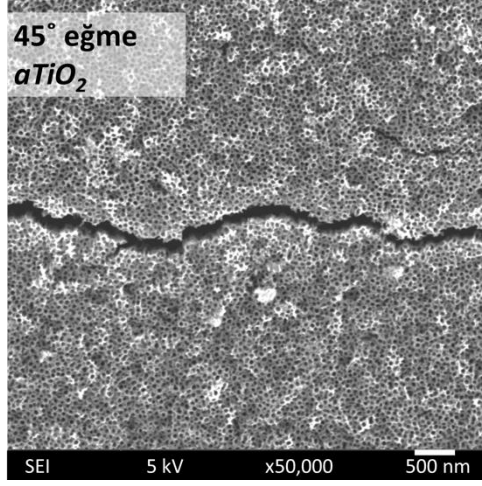


Şekil 4.36 : Her bir adımda elde edilen yüzeylerin karşılaştırılması.

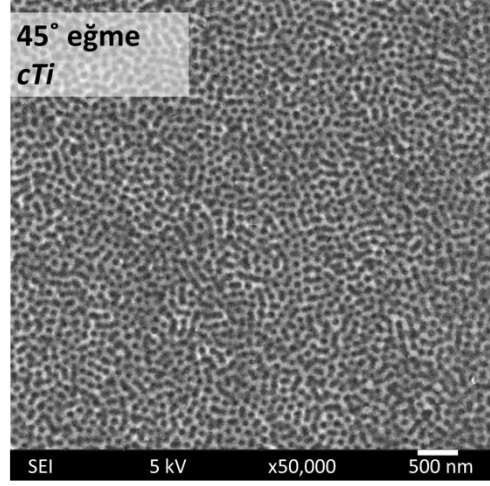
#### 4.3.4 Mekanik test sonuçları

1 µm titanyum kaplanmış, ardından anodize edilmiş ve sadece belli bir bölgesi ultrasonikasyona maruz bırakılmış numuneye uygulanan 3 nokta eğme testi sonucunda ultrasonikasyona uğramamış anodik oksit bölgesi yüzeyinde (*aTiO<sub>2</sub>*) çatlaklar oluşmuştur (Şekil 4.37 :a ve b). Bu bölgedeki TiO<sub>2</sub> nanotüp/nanopor yapısının yer yer döküldüğü gözükmemektedir. Elde edilen bu sonuç, stendin şişirilmesi sırasında anodik oksit yapısının yüzeyde hasarsız olarak kalmasının mümkün olmadığını göstermektedir. Bu tür yapılar, istenilen biyouyumluluk özelliklerini göstermeleri halinde dahi, işlem sırasında tahrip olabileceklerinden, uygulama açısından anlam taşımamaktadır. Tüm bunların ışığında; biyouyumluluğu nanotüp yapısına benzer, aynı zamanda sünek bir kaplama üretilmesi gerektiği aşikârdır.

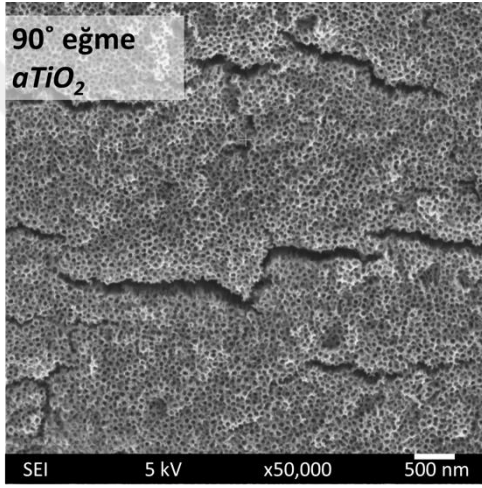
Ultrasonikasyona maruz kalan bölge (*cTi*) 3 nokta eğme testine tabi tutulduğunda ise, *aTiO<sub>2</sub>* bölgesi ile aynı yük altında olmasına rağmen üzerinde herhangi bir kırılma/deformasyon göstermemektedir (Şekil 4.37 :b ve d). Sonuç olarak, bu mekanik etkiler düşünüldüğünde, kardiyovasküler stentlere uygulanabilirliği açısından MAS-Ti-ANO-US ile üretilen kaplamaların, önceki bölümlerde bahsedilen EDB ve KAFBB ile üretilen tüm kaplamalardan daha uygun olduğu görülmektedir.



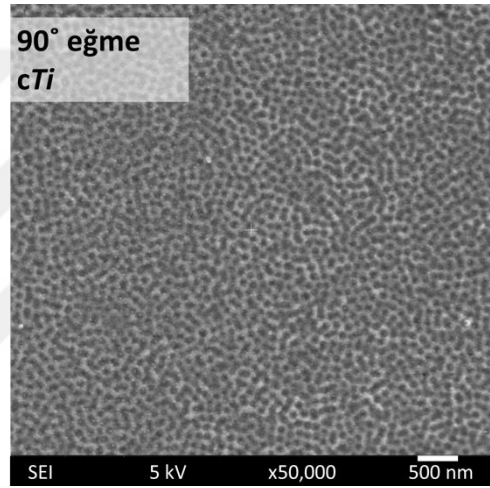
(a)



(b)



(c)



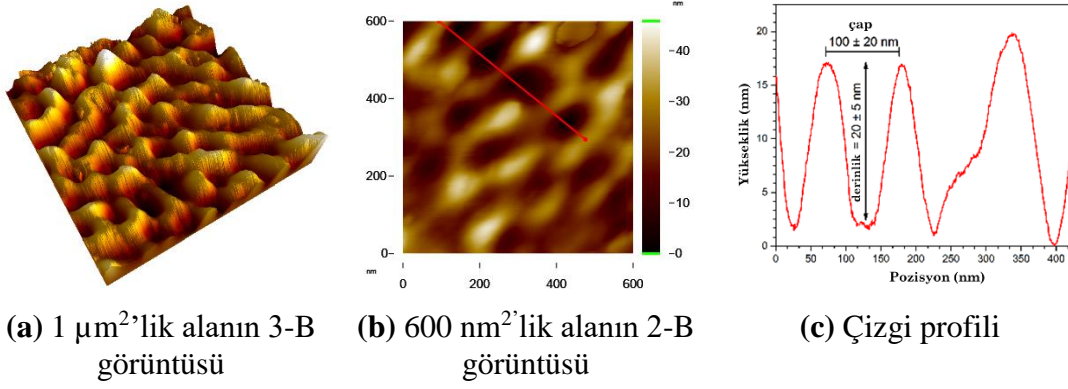
(d)

Şekil 4.37 :  $aTiO_2$  ve  $cTi$  yüzeylerinin 3 nokta eğme testi sonrasındaki SE görüntüleri.

#### 4.3.5 $cTi$ yüzeyinin PL işlemi öncesi/sonrası morfolojik ve kimyasal analizleri

##### 4.3.5.1 Atomik kuvvet mikroskobu (AKM) analizleri

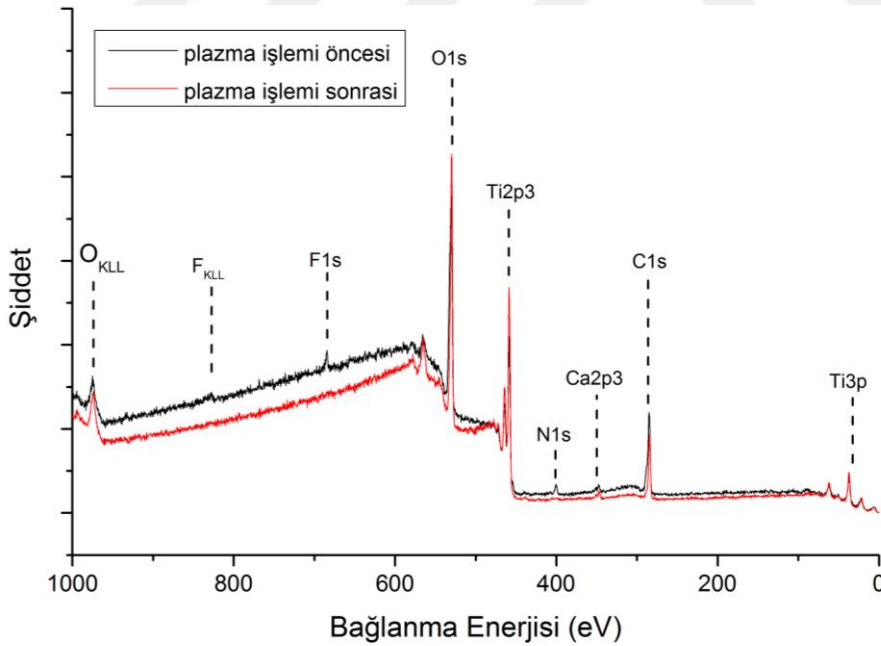
Ultrasonikasyon ardından elde edilen nanoyapıların derinliği ve çapı AKM ile ölçülmüştür. Şekil 4.38 :a ve b'de, anodik oksidin ultrasonikasyon ile uzaklaştırılmasından sonra elde edilen yüzeylerin ( $cTi$ ) AKM görüntüleri verilmiştir. Şekilde, kırmızı renkte bir çizgi ile belli edilen çizgisel analiz sonuçlarına göre, nano boyutlu desenler  $20 \pm 5$  nm derinliğe ve  $100 \pm 20$  nm genişliğe sahiptir (Şekil 4.38 :c).



Şekil 4.38 : MAS-Ti-ANO-US ile elde edilen *cTi* yüzeyinin AKM görüntüleri.

#### 4.3.5.2 XPS analizleri

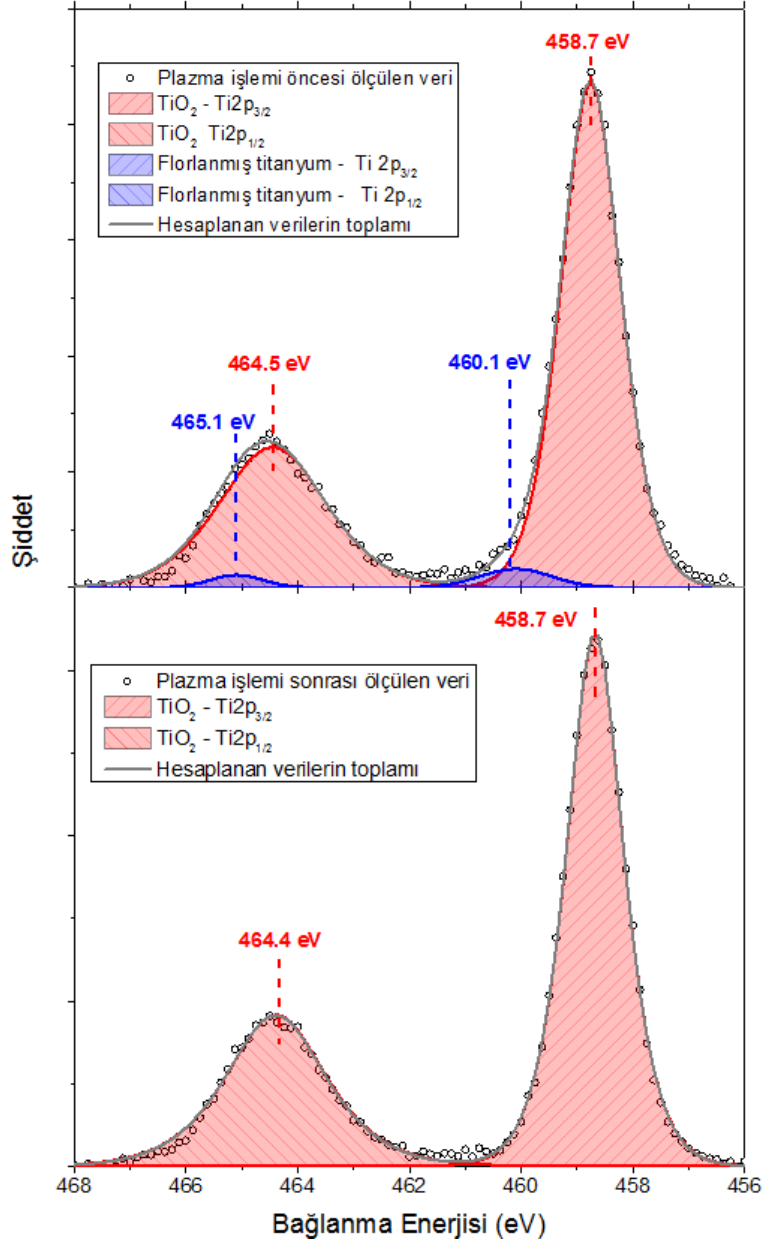
Nanodesenli yüzeyin kimyasal özelliklerini belirlemek ve oksijen plazma işleminin yüzey kimyası üzerindeki etkisini anlamak için, *cTi* numunelerine plazma işleminden önce ve sonra XPS karakterizasyonu uygulanmıştır. Geniş spektrum ölçümlerine göre, beklendiği gibi her iki film de büyük oranda titanyum ve oksijenden oluşmaktadır (Şekil 4.39 :).  $\text{F}^{2-}$  varlığına karşılık gelen düşük şiddetteki flor piki, plazma işleminden sonra spektrumda gözükmemektedir.



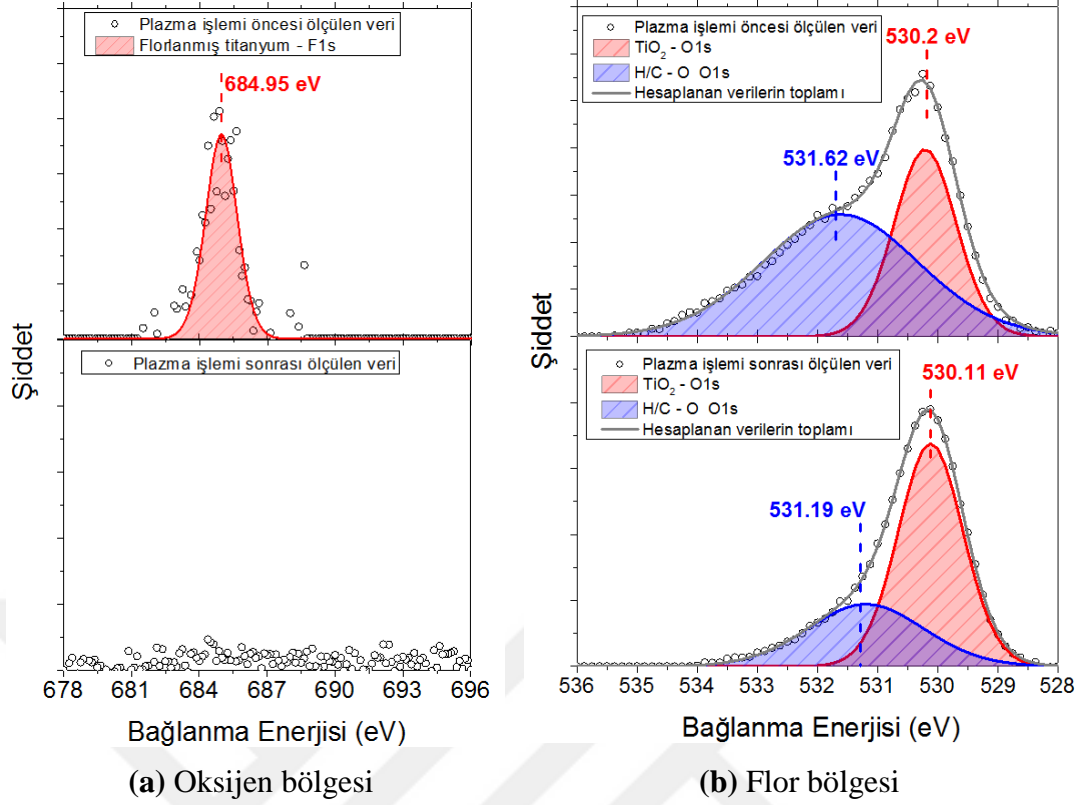
Oksijen plazma işleminin katkısını anlamak için Ti2p, O1s ve F1s pikleri üzerinde ayrıntılı çekimler yapılmıştır. Oksijen plazma işleminden önce, Ti2p piki Şekil 4.40 :'ta gösterildiği gibi iki pik içermektedir. Bu piklerin en şiddetlisi, beklendiği gibi,

TiO<sub>2</sub> içerisindeki Ti<sup>4+</sup> (458,7 eV  $\Delta$ = 5,8 eV ) iken diğeri flora bağı olan titanyuma ait piktir [69] (460,1 eV ( $\Delta$ = 5 eV)). Küçük pikin “florlanmış titanyum”a ait olduğu Şekil 4.41 :a’da verilen F1s pikinin varlığı ile ayrıca doğrulanmıştır. Ayrıntılı çekilen O1s spektrumunun da 2 ana pikten oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.41 :b). Büyük pik TiO<sub>2</sub> içerisindeki O1s’e karşılık gelmekteyken (530,2 eV) diğeri pik O–H veya O–C bağlarına (531,6 eV) karşılık gelmektedir [70]. Sonuç olarak, plazma işleminden önce numune yüzeyi TiO<sub>2</sub>, florlanmış titanyum bileşiklerinden ve karbon/hidrojen bazlı bir kontaminasyon tabakasından oluşmaktadır.

Oksijen plazma işleminden sonra florlanmış titanyuma ait pik, Ti2p spektrumundan çıkmıştır ve yüzey sadece TiO<sub>2</sub> bileşiğinden oluşmaktadır (Şekil 4.40 :). Bu durumla uyumlu olarak, F1s piki de yok olmuştur (Şekil 4.41 :a). O1s spektrumunda TiO<sub>2</sub>’ye ait oksijen piki de yükselmişken (Şekil 4.41 :b), O–H veya O–C’ye bağı piklerin şiddetinde azalma görülmüştür. Bu durum, oksijen plazmasının yüzeyi oksitlemesinin yanında kontaminasyon tabakasını uzaklaştırmadaki pozitif rolünü de göstermektedir.

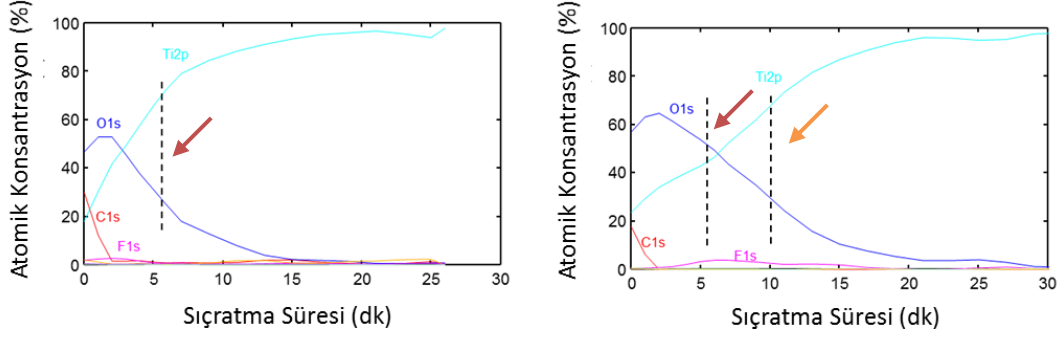


Şekil 4.40 : PL işleminden önce ve sonra *cTi* yapısına ait titanyum bölgesinin XPS spektrumları.



**Şekil 4.41 :** *cTi* yapısının PL işleminden önce ve sonra, flor ve oksijen bölgelerinin XPS spektrumları.

Yüzeyde bulunan elementlerin kalınlıklarındaki değişimi anlayabilmek için *cTi* numunelerinin plazma işleminden önce ve sonra derinlik profilleri XPS ile incelenmiştir. Şekil 4.42 :de gösterilen XPS derinlik profillerine göre, plazma işlemi, oksit tabakasının kalınlığını 5 nm'den 10 nm'ye çıkarmıştır (kırmızı ve turuncu oklar). Ek olarak, plazma işleminden sonra, flor pikinin yüzeyin 5 nm'nin altında görülmeye başlaması, oksijen plazması ile oluşan filmin, yüzeydeki floru alt katmanlara doğru ilerlettiğini veya yeni oluşan oksit filminin halihazırdaki bu florlanmış titanyum katmanının üzerinde büyüdüğünü göstermektedir. Ek olarak; geniş spektrumda görülen kalsiyuma ait kontaminasyon pikinin, derinlik profiline bakıldığında hemen hemen uzaklaştığı görülmüştür.



(a) oksijen plazma işlemi öncesi *cTi* (b) oksijen plazma işlemi sonrası *cTi*

**Şekil 4.42 :** *cTi* yapısının PL işleminden önce ve sonra XPS derinlik profili (kırmızı ve turuncu oklar, sırasıyla plazma işleminden önce ve sonra oksit tabakası kalınlığını temsil etmektedir).

#### 4.3.5.3 İslatma açısı ölçümleri

İslatma özellikleri, hücre yapışması gibi implantın biyolojik tepkilerinde önemli bir rol oynayabileceğinden, biyomalzemeler özelinde önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir. Tez çalışması kapsamında hem nanodesenlerin hem de plazma işleminin ıslatma özelliklerine katkılarını belirlemek için *pTi* ve *cTi* numunelerinin plazma işleminden önce ve sonraki su temas açıları (WCA) ölçülmüştür (Çizelge 4.3 :).

**Çizelge 4.3 :** *pTi* ve *cTi*'nin plazma işlemi öncesi ve sonrası ıslatma açıları.

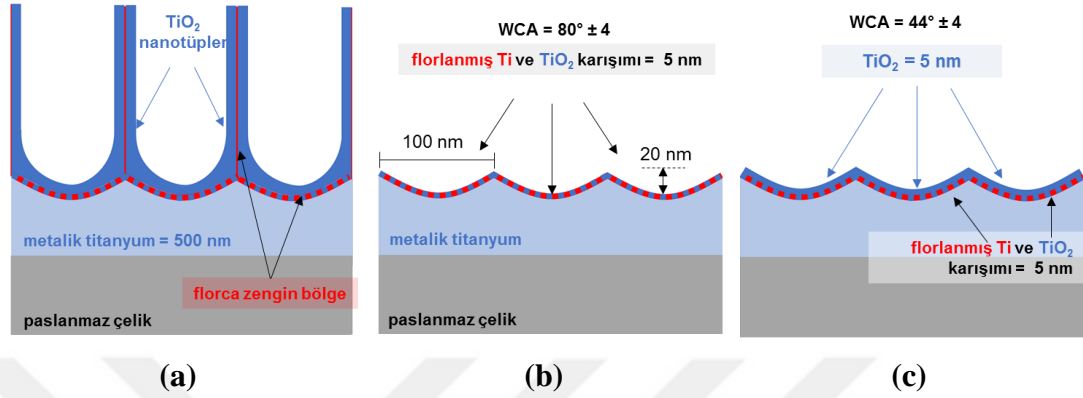
<i>pTi</i>	<i>cTi</i>	<i>pTi+PL</i>	<i>cTi+PL</i>
$85 \pm 3^\circ$	$80 \pm 4^\circ$	$28 \pm 2^\circ$	$44 \pm 3^\circ$

İslatma açısı sonuçları, *pTi* ve *cTi* yüzeylerinin nispeten hidrofobik olduğunu göstermektedir. Plazma işleminin, yüzey kontaminasyonunu uzaklaştırılması ve titanyumu oksitlemesi nedeniyle her iki numunenin ıslanabilirliğini artırmıştır. Bu durum, *cTi*'nin XPS analizi ile doğrulanmaktadır (Şekil 4.41 :). Bununla birlikte, plazma işleminin *pTi* yüzeyi üzerinde daha belirgin bir etki yarattığı görülmektedir.

Artan ıslatma açıları, bir biyomalzemenin mutlaka daha iyi bir biyolojik tepkiye sahip olacağı anlamına gelmemektedir [44]. İslatma özelliği; yüzey morfolojisi, yüzey kimyası ve implant yüzeyi ile etkileşime giren hücrelerin doğası ile birlikte değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

### 4.3.6 Biyolojik testler

Sonuç olarak, tüm karakterizasyon çalışmaları (SEM, AKM, WCA, XPS) ile elde edilen veriler ışığında farklı adımlarda elde edilen nanoyapılı yüzeylerin modelleri Şekil 4.43 :’te özetlenmiştir.



Şekil 4.43 : (a)  $aTiO_2$ , (b)  $cTi$  ve (c)  $cTi+PL$  numunelerin yüzey topolojileri ve kimyası.

Literatürde HF,  $NH_4F$  gibi florürlü elektrolitlerde gerçekleştirilen titanyum anodizasyonunun mekanizması çokça çalışılmıştır [71,72]. Anodizasyon sırasında,  $TiO_2$  nanotüp tabanlarında ve aralarında suda çözünebilen, florca zengin bir bariyer tabakası oluşmakta [73] ve anodizasyon devam ettikçe bu tabaka malzeme içerisine doğru ilerlemektedir (Şekil 4.43 :a). Nanotüpler, tüp aralarındaki bu bileşiğin suda çözünüp uzaklaşması ile oluşmaktayken tüp tabanlarında kalan kısım su ile doğrudan temas etmediği için yapıdan uzaklaşmamaktadır. Anodizasyonun tamamlanmasının ardından yapılan ultrasonikasyon işlemi, en üst katmandaki gevrek  $TiO_2$  nanotüp yapılarını kırıp uzaklaştırdığından bu işlem sonunda yüzeyde sadece bu bariyer tabakası kalmaktadır. XPS sonuçlarına göre 5 nm kalınlığındaki bu bariyer tabakası, beklendiği gibi içerisinde az miktarda “florlanmış titanyum” içeren  $TiO_2$ ’den oluşmaktadır (Şekil 4.43 :b). Ultrasonikasyon işlemi, florlanmış titanyum içeren bu oksit tabakasını yüzeyden uzaklaştıramamıştır. Bu yapının ıslatma açısı  $80^\circ \pm 4$  olarak ölçülmüştür.

Oksijen plazma işlemi ise metalik titanyum üzerindeki oksit tabakasının kalınlığını 5 nm’den 10 nm’ye çıkarmıştır. XPS derinlik profillerinden görüldüğü üzere plazma işlemi ardından kalınlaşan oksit filmi, florlanmış titanyum içeren  $TiO_2$  tabakasının üzerinde büyümüştür (Şekil 4.42 :). Bu sebeple,  $cTi+PL$  numunelerinin en üst yüzeyinde herhangi bir flor içeren bileşik mevcut değildir (Şekil 4.43 :c). Yüzey

kimyası değişen bu numunelerin plazma işlemini takiben ölçülen ıslatma açısı  $44^{\circ} \pm 4'$ e düşürmüştür.

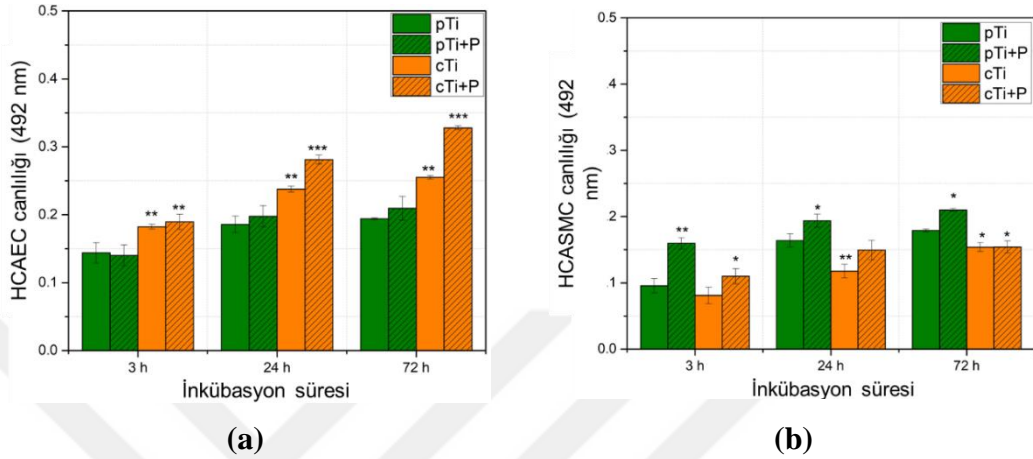
#### 4.3.6.1 *cTi* yüzeyinde yapılan hücre büyümesi testleri

Paslanmaz çeliğin üzerine kaplanan titanyumunun sahip olduğu morfolojiler, farklı biyolojik tepkimeleri tetiklemektedir. Dolayısı ile de yüzey morfolojisinin hücrelerin yapışması ve çoğalması üzerindeki etkilerinin de birbirinden farklı olması beklenmektedir. Tez çalışması kapsamında elde edilen *cTi* numunelerinin sahip olduğu nanodesenli yapının biyolojik yanıt üzerindeki etkisini ortaya çıkarmak için İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri (HCAEC – Human Coronary Artery Endothelial Cells) ve İnsan Koroner Arter Düz Kas Hücreleri (HCASMC - Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells) ile MTT in-vitro (laboratuvar ortamında) biyouyumluluk çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Damar yapısında bulunan bu hücreler, laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen kardiyovasküler çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Literatür özetinde detaylıca bahsedildiği gibi HCAEC, kan damarlarının iç tarafında (tunica intima) tek sıra halinde bir tabaka oluşturur ve kan damarlarının oluşumunda (anjyogenez) önemli bir role sahiptir. Bu hücrelerin mümkün olan en yüksek canlılığına sahip olması, stentin kan damarını taklit edebilmesi açısından oldukça önemlidir. HCASMC ise damarların orta bölümünde (tunica media) kalın bir tabaka halinde bulunmakta ve damar bütünlüğünü korumaktadır. Arterioskleroz ve restenoz gibi damar tıkanıklığı durumlarında bu hücreler, arter duvarının yeniden şekillenmesinde etkilidir. Stent içerisinde HCASMC'nin çoğalması ise genellikle durdurulamaz. Bu durum, damar içerisindeki normal kan akışını engelleyerek restenoza neden olabilir. Bu sebeple, HCASMC'nin stent üzerinde mümkün olan en düşük miktarlarda bulunması istenir. Sonuç olarak, sağlıklı bir uygulama sonrasında endotel hücrelerinin kardiyovasküler stent yüzeyine tutunması ve çoğalması istenirken, restenoz riskini önlemek için düz kas hücrelerinin büyümesinin bir şekilde engellenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında üretilen yüzeylere, üzerine tutunan hücrelerin metabolik aktivitesini belirlemek için numunelere oksijen plazma işlemi önce ve sonrasında MTT testleri uygulanmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde referans değeri olarak ise *pTi* üzerindeki büyüme değerleri kullanılmıştır.

Şekil 4.44 :a'da görüldüğü üzere *cTi* numuneleri üzerindeki HCAEC'lerin canlılığı, *pTi* referans numunelerine kıyasla önemli ölçüde yüksektir. Nanodesenli titanyum dioksit ve florlanmış-Ti karışımından oluşan *cTi* numunesinin HCAEC canlılığını artırdığı gözlenmiştir. Oksijen plazması işleminin ardından (*cTi+PL* numunesi) metabolik aktivite daha da artmıştır.



**Şekil 4.44 :** PL işlemi öncesi/sonrası *cTi* ve *pTi* yüzeylerinde (a) HCAEC ve (b) HCASMC ile gerçekleştirilen MTT sonuçları (standart sapmalar bar üzerinde gösterilmiştir. \* sembolü, *pTi*'ye göre hücre canlılığındaki anlamlı değişimi ifade etmektedir: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

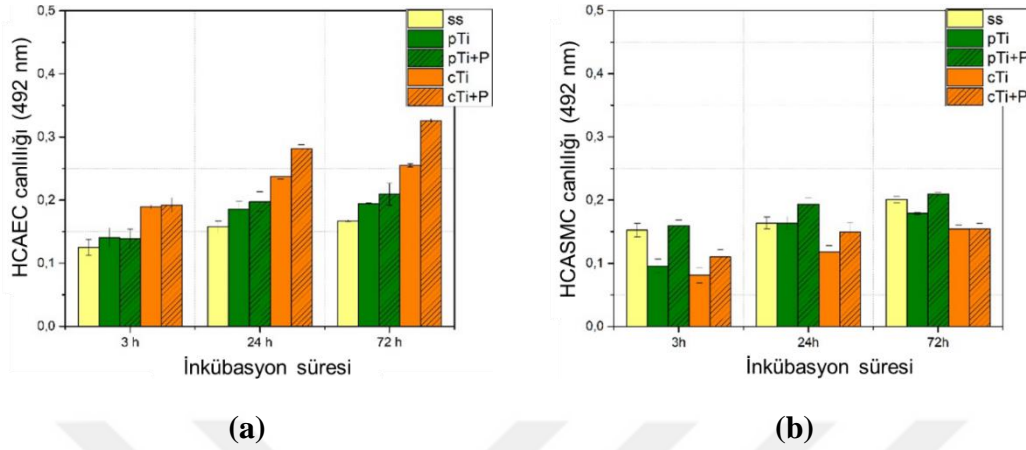
Öte yandan, HCASMC'lerin ise *pTi* üzerine tutunma ve çoğalma eğiliminde olduğu görülmüştür (Şekil 4.44 :b). *cTi* üzerindeki canlılıkları ise önemli ölçüde düşüktür. Nanodesenli titanyum dioksit ve florlanmış Ti karışımından oluşan *cTi* yüzeyinin HCASMC'lerin yaşayabilirlikleri için görece elverişsiz olduğu görülmektedir.

HCASMC ekiminin ilk aşamalarında, oksijen plazması işlemi görmüş nanodesenli yüzeylerdeki (*cTi+PL*) canlılık, nanoyapılı yüzeylere (*cTi*) kıyasla daha yüksektir. Bununla birlikte, 24 saatlik inkübasyondan sonra bu iki yüzey üzerindeki hücre canlılığında önemli bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca, HCASMC canlılığı, nanopaternli yüzeyler için (*cTi* ve *cTi+PL*) düz numuneye (*pTi*) göre kıyasla düşüktür. Bu sonuç ile, tez çalışmasında elde edilen nanotopografinin hücre yapışmasını ve yaşayabilirliğini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir.

HCASMC ile yapılan deneyde uzun inkübasyon sürelerinde gözlemlenen canlılığın sabitlenmesi HCAEC ile yapılan deneylerde görülmemiştir. Özellikle oksijen plazması işleminin ardından canlılığın sürekli olarak arttığı gözlenmiştir.

Elde edilen yüzeylerin 316 LVM çıplak paslanmaz çelik numune ile karşılaştırıldığında HCAEC'lerin *cTi* ve *cTi+PL* yüzeylerini, HCASMC'lerin ise

paslanmaz çelik yüzeyini tercih ettiği görülmektedir (Şekil 4.45 :). Tüm bu işlemler sonucunda, hali hazırda kullanılan 316 LVM malzemesi üzerinde, hücre seçiciliği paslanmaz çelikten çok daha yüksek bir yüzey elde edildiği ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.45 : PL işlemi öncesi/sonrası cTi ve pTi yüzeylerinde (a) HCAEC ve (b) HCASMC ile gerçekleştirilen MTT sonuçları.

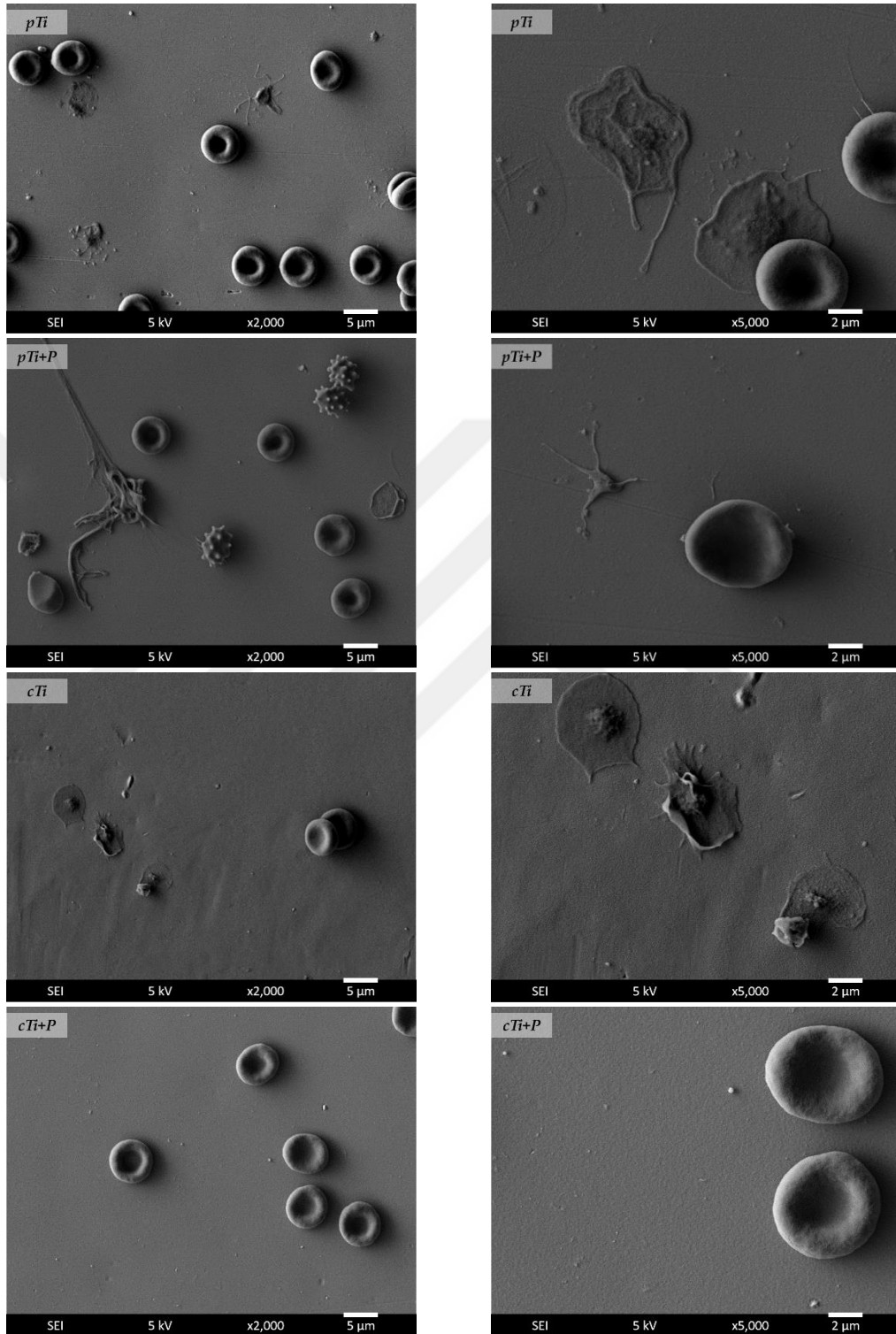
#### 4.3.6.2 cTi yüzeyinde yapılan kan uyumu testleri

Stent gibi vücut içerisinde kan ile etkileşimde bulunan implantların, pıhtılaşmayı tetiklememesi istenir. Bu sebeple, implant yüzeyleri yüksek kan uyumuna sahip olmalıdır. Bu tez çalışması kapsamında, cTi morfolojisine sahip numunelerin herhangi bir desene sahip olmayan titanyuma (pTi) göre bir avantajı olup olmadığını anlayabilmek için bu iki morfolojiye sahip numuneler, plazma işlemi öncesi ve sonrası kan uyumu testine tabi tutulmuştur. Şekil 4.46 :’da kan uyumu testi sonrası iki numunenin de SEM görüntüleri verilmiştir.

pTi yüzeyinde trombositlerin tamamen yayılmış (FS) olduğu, dolayısı ile bu yüzey üzerinde istenmeyen pıhtılaşma riskinin yüksek olduğu görülmektedir. Trombositlere ek olarak, bu yüzeyde bazı alyuvarların da mevcut olduğu görülmektedir. Numune yıkama safhasında giderilmesi gereken bu durum, esasen bir olumsuzluk teşkil etmemektedir; pıhtılaşma ile doğrudan bir bağlantısı da bulunmamaktadır. Plazma işlemine tabi tutulmuş pTi üzerindeki trombositlerin çoğunlukla dentritik (D) ve yayılmış dentritik (FS) formda olduğu görülmektedir. Bu işlem ile aynı zamanda trombosit miktarında düşüş görülmüştür.

cTi kaplı numunede ise yüksek sayıda trombosit gözlenmiştir. Trombosit morfolojileri de yayılmış (S) ve tamamen yayılmış (FS) formunda olduğundan bu yüzeyin de pıhtılaşma açısından riskli olduğu anlaşılmaktadır. Bunun yanında, plazma işlemi

sonrasında trombosit miktarının önemli ölçüde azaldığı görülmüş, çoğu bölgede hiçbir trombosit rastlanmamıştır. Bu yüzey üzerinde sadece birkaç alyuvar mevcuttur.



Şekil 4.46 : PL işlemi öncesi/sonrası *pTi* ve *cTi* numunelerin kan uyumu testi ardından çekilen SE görüntüleri.

#### 4.3.7 *cTi* ve *cTi+PL* numunelerinin genel değerlendirmesi

Yüzeydeki nanoyapıların malzemelerin biyoyumluluğu üzerindeki faydalı rolü iyi bilinmektedir ve bu özellikler halihazırda birçok çalışmaya konu olmuştur [74–82]. Çalışmaların çoğu, ortopedik implantların osseointegrasyon özellikleri ile ilgilenirken, bazıları da kardiyovasküler stent uygulamaları için kullanılan yüzey ile endotel hücrelerin etkileşimini içermektedir [74,76,77]. Bazı çalışmalarda da hücre ve proteinlerin benzer yüzey kimyasına sahip, ancak farklı nanotopografiye sahip yüzeylerle farklı etkileşimleri olduğu gözlemlenmiş ve yüzey geometrisinin biyolojik tepkilerde oldukça baskın bir etken olduğu ortaya çıkarılmıştır [48,76,83,84]. Bu sonuca göre, uygun yüzey kimyasına sahip bir implantın biyoyumluluğu sadece nanoyapılandırma ile de artırılabilir. Literatürde nanomalzemelerin hücreler ile etkileşimini açıklayabilmek için 3 farklı mekanizma önerilmiştir: (1) nanoyapıya bağlı olarak en üst yüzeyde gerçekleşen bölgesel elektronik modifikasyonlar, (2) artan yüzey kusurları alanlar (nanotopografi ile oluşan kenarlar, köşeler vb.), (3) vasküler duvarların doğal mimarisinin taklit edilmesi [78]. Bu mekanizmaların biri ya da birkaçı, ilgili hücrelerin uyarılmasını ve hücrelerin proteine tutunma mekanizmalarını etkileyerek implantın çevre dokularla entegrasyonunu etkilemekte, sonuç olarak tıbbi cihazın vücuttaki ömrünü belirlemektedir.

Bu çalışmada elde edilen nanotopografik yüzeylerin çapları da daha önceki çalışmalarda gösterilmiş vasküler hücrelerin seçicilik özelliklerinin ön plana çıktığı mertebelerdedir. Literatürdeki diğer çalışmalarda, 35 nm'nin altındaki çaplar için HCAEC ve HCASMC'nin seçicilik göstermediği [46], ancak 70 ile 100 nm arasındakiler için HCAEC'ye yönelik seçicilik elde edildiği raporlanmıştır [46,85]. Bu tez çalışmasında ise  $100 \pm 10$  nm çaplarındaki nanodesenli yüzeylerin de seçici vasküler hücre tepkilerine sahip olduğu görülmüştür. HCASMC ile karşılaştırıldığında HCAEC'de daha yüksek hücre canlılığı görülmüş (Şekil 4.44 :), bu durumun geliştirilen yüzey topografisinin endotel hücrelerinin damar içerisinde tutunduğu iç damar duvarının mimarisine benzemesi sebebi ile olduğu düşünülmektedir [86].

Bu çalışmanın bir diğer önemli sonucu ise; oksijen plazma işleminin, yüzey kimyasına ve hücre canlılığı üzerine etkisini göstermesidir. Nanoporlu  $TiO_2$ 'nin ultrasonikasyon ile yüzeyden uzaklaştırılması sonucu elde edilen nanodesenli yapıda (*cTi*) florlanmış titanyum bileşikler tespit edilmiştir (Şekil 4.40 : ve Şekil 4.41 :). Sonuçlarımız, florlanmış titanyum bileşikler içeren bir yüzeyin, hücre canlılığı üzerinde önemli bir

olumsuz etkiye sebep olmadığını göstermektedir. Yine de oksijen plazma işleminden sonra, HCAEC'nin proliferasyonu ve canlılığında bir miktar iyileşme görüldüğünden florürlerin bu hücreler üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, oksijen plazma işlemi ile HCAEC canlılığında iyileştirme sağlanırken, HCASMC için önemli bir fark gözlenmemiştir. Buradan hareketle, HCAEC'nin yüzey kimyasındaki değişime daha duyarlı olduğu görülmektedir. Ayrıca, florlanmış titanyum içeren nanodesenli *cTi* yüzeyinin, florür içermeyen *pTi* ve *pTi+PL*'den daha iyi HCAEC canlılığı sergilediği görülmektedir. Bu önemli sonuç, florürlerin varlığında bile nanotopografinin hücre canlılığı üzerindeki baskın rolünü göstermektedir. Yine de florürlerin vasküler hücrelerin canlılığına etkisini netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada elde edilen nanoyapılar ile literatürdekiler arasındaki temel fark, bu yapıların kalınlıkları ve plastik deformasyon altındaki mekanik dayanımlarıdır. Bu sonuçlar, hücre canlılığına önemli katkı sağlayan morfolojik parametrenin “kalınlıklarından ziyade nanodesenlerin çapı” olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, implantların hücre canlılığını iyileştirmek için  $TiO_2$  nanotüpleri/nanoporlar gibi zayıf yapışmaya sahip kaplamaların kullanılmasının zorunlu olmadığı ortaya çıkmaktadır; ince bir oksitle kaplanmış benzer çaplara sahip nanodesenli metalik titanyum da benzer etkiler sergilemektedir.

Kardiyovasküler stentlerin aynı zamanda iyi bir kan uyumluluğuna sahip olması gerektiğinden, istenen hücre canlılığına sahip bir yüzey elde edilmesi tek başına bir anlam ifade etmemektedir. Stent yüzeyine yapılacak desenin, trombositlerin yüzeye yapışmasını ve aktivasyonunu önlemesi, sonuç olarak tromboz riskini önemli ölçüde azaltması beklenmektedir [87]. Seçici hücre canlılığı gösteren *cTi* yüzeyi, şaşırtıcı bir şekilde kan uyumu göstermemiştir. Bu çalışmada incelenen numunelerden sadece oksijen plazma işlemi görmüş nanodesenli numuneler (*cTi+PL*) mükemmel kan uyumu göstermiştir (Şekil 4.46 :). Literatürde, yüzey özelliklerine bağlı olarak titanyumun trombojenik (pıhtılaşmaya elverişli) bir malzeme olduğu bilinmektedir [55]. Diğer birçok çalışma, titanyum bazlı ortopedik ve dental implantların osseointegrasyon ve trombojenik özellikleri üzerinde florürlerin olumlu rolünü göstermektedir [88]. Bu çalışmalar, florürlerin yüzeyde trombojenik reaksiyonlara neden olduğunu ve bu sebeple osseointegrasyonunun iyi olduğunu raporlamıştır. Kardiyovasküler stent yüzeylerinde trombojenik aktivite istenmediğinden florürlerin

yüzeyde bulunması bir dezavantaj olmaktadır. Oksijen plazma işlemi, bu florürleri yüzeyden uzaklaştırdığı ve yüzeydeki oksijen konsantrasyonunu artırdığı için *cTi* yüzeyini kan uyumlu hale getirmiştir. Florürlerin stent uygulamalarındaki kan uyumluluğu üzerine bir literatür bilgisine rastlamadığımızdan bu etkileri netleştirmek ve desteklemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, stentleme sonrası sağlıklı bir kan damarını oluşturmak ve restenozdan kaçınmak için damarın iç tabakasının endotelizasyonu çok önemlidir. HCASMC'nin tercih edilen proliferasyonu restenozun ana nedenlerinden biri olduğundan, bu hücrelere karşı HCAEC'lere hücre seçiciliği sunan bir yüzey elde edilmesi arzulanmaktadır. Bu çalışmada önerilen nanodesen oluşturma yöntemi ile bu konuda umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Kardiyovasküler stentlerin doğru çalışabilmesi için yüzeylerinin kan uyumlu olması gerektiğinden yüzey kimyası da önemli bir parametre olarak önümüze çıkmaktadır (kanın florürler ile temasın kesilmesi, yüzeyde oksit içeriğinin artırılması vb.). Tez çalışmasında kullanılan oksijen plazma işleminin bu amaçla başarılı olduğu görülmüştür. Ayrıca, oksit tabakasının çatlaması ve parçalanması, stentin uzun süreli kullanımında istenmeyen biyolojik tepkilere yol açabileceğinden, plastik deformasyon altında mekanik bütünlüğün sağlanması gereklidir. Bu çalışmada önerilen yöntemin ek bir faydası, tavsiye edilen yöntem ile elde edilen kaplamanın mekanik dayanımıdır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında; kardiyovasküler stentlerin yüzeylerinde nanodesenler oluşturarak hücre seçiciliği sağlayabilecek, kan uyumuna sahip ve stent uygulamaları sırasında gerçekleşen plastik deformasyona dayanabilen yüzeyler oluşturulabilmiştir.

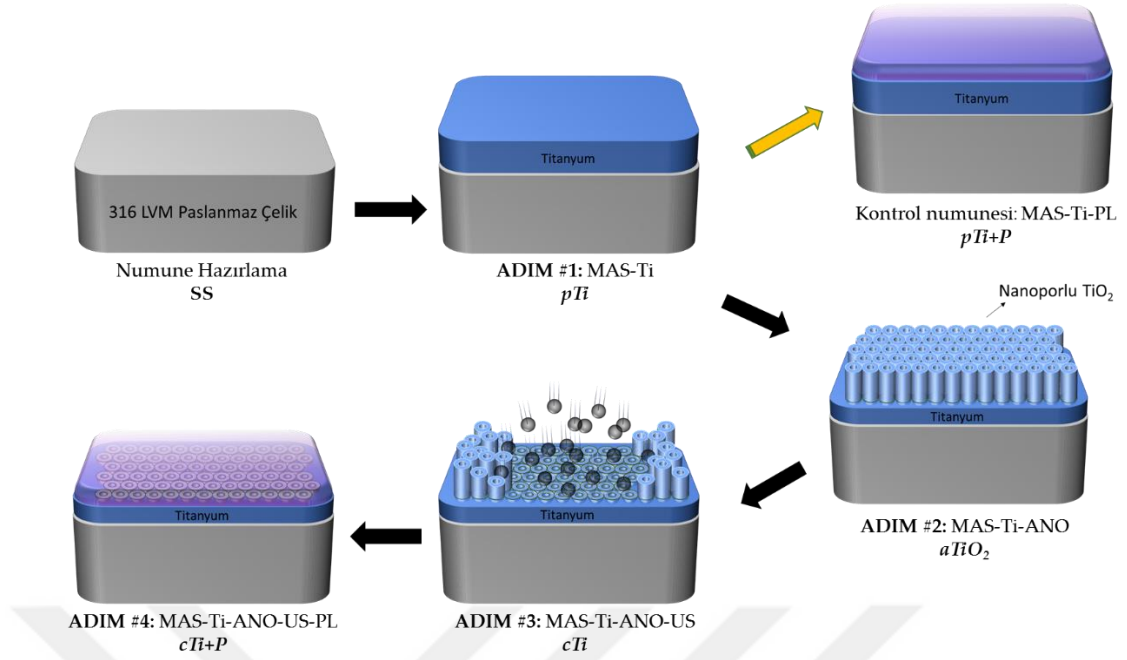
Stent malzemesi olarak halihazırda yaygın olarak kullanılan 316 LVM kalite paslanmaz çelikler üzerinde nanoyapıların oluşturulması için iki temel yaklaşım kullanılmıştır. Bunlardan ilki, fiziksel buhar biriktirme ile doğrudan nanodesenlere sahip kaplamaların üretilmesi, diğeri ise kaplama ardından yapılan anodizasyon işlemi ile nanoyapıların elde edilmesidir.

Bu amaçla öncelikle EDB fiziksel buhar biriktirme sisteminde düşük açılı kaplama (DAK) yöntemi kullanılarak titanyum ve zirkonyum metalleri doğrudan nanoyapılara sahip olacak şekilde kaplanmıştır. DAK ile 316 LVM üzerinde oluşturulmuş eğik ve şekilli titanyum ve zirkonyum filmlerin, taban malzemenin deformasyonu sırasında yüzeyden döküldükleri gözlemlenmiş; bu sorunu aşmak için filmlere ısı işlem uygulanarak yapışma sorunları bir ölçüde aşılmıştır. Buna karşın, bu filmlere yapılan kan uyumluluğu testleri başarılı olmamıştır. Oksijen plazması işlemi uygulanan yüzeylerin de istenilen kan uyumunu göstermemesi sebebi ile bu seçenek üzerinde hücre büyüme deneyleri yapılmamıştır. Buna rağmen, nanoboyutta sivriliklere sahip yüzeyler, üzerine gelen hücrelerin zarlarını delmesi sebebi ile ölümlerine sebep olmaktadır. Stent malzemesi olarak kullanılması mümkün gözükmeyen DAK yöntemi ile elde edilen bu kaplamalar, nanoboyutlarda ince kolonlardan oluşması sebebi ile antibakteriyel özellikte olması mümkündür. Bu yönde çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Tez çalışmasının devamında ise katodik ark yöntemleri ile 316 LVM üzerine titanyum ve zirkonyum biriktirildikten sonra bu kaplamalar anodizasyon işlemine tabi tutulmuş ve nanoyapıların oluşması sağlanmıştır. Kaplama sırasında yüzeyde makro parçacıkların varlığı tespit edilmiştir. Bu filmler amonyum florür, su ve organik çözücülerin kullanıldığı elektrolitlerde başarı anodize edilmiş ve nanodesenli yapılar elde edilmiştir. Bunun yanında, beklentilerin aksine bu süreçte yüzeyde tutunan makro

parçacıklar giderilememiş, daha sonra yapılan ultrasonikasyonla da bu parçacıkları tamamen yüzeyden uzaklaştırmak mümkün olmamıştır. Bu tür yüzeylerin kardiyovasküler stentler için uygun olmadığına karar verilerek yüzeyde bu tür makro pürüzlülükler yaratmayacak manyetik alanda sıçratma yöntemi uygulamasına geçilmiştir. Alternatif olarak, KAFBB sistemine takılacak bir filtre aracılığı ile makro parçacıkların yüzeye gelmesi engellenebilir.

Manyetik alanda sıçratma yöntemi kullanılarak nanodesen elde etmek için geliştirilen yöntem Şekil 5.1 :’de görsel olarak özetlenmiştir. Bu yöntemde 316 LVM, manyetik alanda sıçratma ile 1 mikron kalınlığında düz metalik titanyum kaplanmıştır. Kaplanan filmlerin yaklaşık olarak yarısı, yüzeylerinde nanodesenlerin oluşması için etilen glükol esaslı elektrolit içerisinde başarı ile anodize edilmiştir. Bu filmlerin stent uygulaması sırasında oluşan plastik deformasyon altında nasıl davranacaklarını anlamak amacı ile 3 nokta eğme deneyine tabi tutulduklarında, gözenekli anodik oksit filminin çatladığı ve yer yer döküldüğü görülmüştür. Bu problem ise, yüzeydeki oksit filminin ultrasonikasyon ile kaldırılması sonrasında çözülmüştür. Ultrasonikasyon sonrası yüzeyde yaklaşık 500 nm kalınlığında nanoyapılı bir desen elde edildiği görülmüştür. Bu yöntem ile elde edilen nanodesenlerin; 100 nm çapında, 20 nm derinliğinde kesik küre şekline sahip olduğu, kaplamanın metalik olması ile birlikte üst yüzeylerinde 5 nm kalınlığında titanyum oksit ve florlanmış titanyum bulunduğu belirlenmiştir. Bu yüzeyin oksijen plazmasına tabi tutulması ile en üst yüzeyde flor içermeyen 5 nm’lik titanyum oksit tabakasının bulunduğu, florürlerin ise bu tabakanın altına itildiği görülmüştür. Oksijen plazması işlemi öncesi yapılan biyolojik testler sonucunda bu nanodesenli numunelerin, selektif olarak, endotel hücrelerinin yaşaması için elverişli yüzeyler olduğu, düz kas hücrelerinin ise endotel hücreleri kadar etkilenmediği tespit edilmiştir. Nanoyapıların endotel hücrelerinin canlılığına pozitif etkisi gösterilmiştir. Oksijen plazma işlemi sonrasında yapılan MTT deneylerinde florürlerin, hücre canlılığı üzerinde bir miktar negatif etkisi olduğu ortaya çıkarılmıştır. MTT ardından yapılan kan uyumu testlerinde ise nanodesenli kaplamanın oksijen plazması işlemi öncesinde kan uyumuna sahip olmadığı, ancak oksijen plazması işlemi sonrası yüzeylerin kan uyumlu halde geldiği tespit edilmiştir.



**Şekil 5.1** : Tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntem.

Elde edilen umut verici sonuçların in-vivo (canlı üzerinde yapılan) deneylerle doğrulanması, geliştirilen yöntemin uygulanabilirliği konusunda önemli katkılar sağlayabilir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, aynı işlemlerin titanyum dışında gözenekli olarak anodize edilebilen Zr, Nb ve Ta gibi biyouyumluluğu yüksek metallere ve/veya alaşımlarına da uygulanabilme potansiyelinin olduğunu göstermiştir. İlerideki çalışmalar nitinol veya CoCr gibi diğer stent malzemeleri üzerinde de yürütülebilir. Ek olarak, florlanmış yüzeylerin osseointegrasyon üzerinde pozitif etkilerinin olduğu bilindiğinden, flor içeren bu nanodesenli yüzeylerin ortopedik ve dental implantlar özelinde çalışmalar yapılabilir. Suda çözündüğü bilenen bu florürlerin yapı içerisindeki miktarını artırmak için ultrasonikasyon işlemi su yerine bu yapının çözünmediği sıvılar içerisinde yapılabilir.



## KAYNAKLAR

- [1] Lee, J.H., Kim, E. Do, Jun, E.J., Yoo, H.S. ve Lee, J.W. (2018) Analysis of trends and prospects regarding stents for human blood vessels. *Biomater. Res.*, 22 (1).
- [2] World Health Organization (2017) Fact Sheet - Cardiovascular diseases (CVDs).
- [3] Walimbe, S. (2010) Innovations in Cardiovascular Disease Treatment and the Rising Demand for Stents. *Diagnostic Interv. Cardiol. - DAIC*.
- [4] Saleh, Y.E., Gepreel, M.A. ve Allam, N.K. (2017) Functional Nanoarchitectures For Enhanced Drug Eluting Stents. *Sci. Rep.*, 7 (40291), 1–12.
- [5] Duckers, H.J., Nabel, E.G. ve Serruys, P.W. (2007) *Essentials of Restenosis*.
- [6] Zain, M., Jamil, R. ve Siddiqui, W. (2019) Neointimal hyperplasia. *Curr. Opin. Lipidol.*, 30 (5), 377–382.
- [7] Soares, J.S. ve Moore, J.E. (2016) Biomechanical Challenges to Polymeric Biodegradable Stents. *Ann. Biomed. Eng.*, 44 (2), 560–579.
- [8] Sojitra, P. (2018) Chemical vapor deposition of cardiac stents, in *Functionalised Cardiovascular Stents*, Elsevier, pp. 149–154.
- [9] Tsujino, I., Ako, J., Honda, Y. ve Fitzgerald, P.J. (2007) Drug delivery via nano-, micro and macroporous coronary stent surfaces. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 4 (3), 287–295.
- [10] Lagerqvist, B., James, S.K., Stenestrand, U., Lindbäck, J., Nilsson, T. ve Wallentin, L. (2007) Long-Term Outcomes With Drug-Eluting Stents Versus Bare-Metal Stents in Sweden. *N. Engl. J. Med.*, 356 (10), 1009–1019.
- [11] Adsız (2014) Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal Med.*, 1 (2).
- [12] Wikimedia Commons (2020) File:Aterojenez tr.png - Wikimedia Commons. *Wikimedia Commons, Free media Repos.*
- [13] Adsız (2015) Angina module 7: revascularisation in stable coronary artery disease.
- [14] Deng, Y., Zhao, Y., Zhao, G., Gao, Y., Liu, G. ve Wang, K. (2022) Study on magnetic abrasive finishing of the inner surface of Ni–Ti alloy cardiovascular stents tube. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, 118 (7–8), 2299–2309.
- [15] Mani, G., Feldman, M.D., Patel, D. ve Agrawal, C.M. (2007) Coronary stents: A materials perspective. *Biomaterials*, 28 (9), 1689–1710.
- [16] Holton, A., Walsh, E., Anayiotos, A., Pohost, G. ve Venugopalan, R. (2002) Comparative MRI compatibility of 316L stainless steel alloy and nickel-titanium alloy stents. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.*, 4 (4), 423–430.

- [17] **Aliagaoglu, C., Turan, H., Erden, I., Albayrak, H., Ozhan, H., Basar, C... Alcelik, A.** (2012) Relation of nickel allergy with in-stent restenosis in patients treated with cobalt chromium stents. *Ann. Dermatol.*, 24 (4), 426–429.
- [18] **Jorge, C. ve Dubois, C.** (2015) Clinical utility of platinum chromium bare-metal stents in coronary heart disease. *Med. Devices Evid. Res.*, 8, 359–367.
- [19] **Bhargava, B., De Scheerder, I., Ping, Q.B., Yanming, H., Chan, R., Kim, H.S... Leon, M.B.** (2000) A novel platinum-iridium, potentially gamma radioactive stent: Evaluation in a porcine model. *Catheter. Cardiovasc. Interv.*, 51 (3), 364–368.
- [20] **Foin, N., Lee, R.D., Torii, R., Guitierrez-Chico, J.L., Mattesini, A., Nijjer, S... Wong, P.** (2014) Impact of stent strut design in metallic stents and biodegradable scaffolds. *Int. J. Cardiol.*, 177 (3), 800–808.
- [21] **Alraies, M.C., Darmoch, F., Ramyashree, T. ve Waksman, R.** (2017) Diagnosis and management challenges of in-stent restenosis in coronary arteries. *World J. Cardiol.*, 9 (8), 640–651.
- [22] **Torrado, J., Buckley, L., Durán, A., Trujillo, P., Toldo, S., Valle Raleigh, J... Guzmán, L.A.** (2018) Restenosis, Stent Thrombosis, and Bleeding Complications: Navigating Between Scylla and Charybdis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 71 (15), 1676–1695.
- [23] **Ng, J., Bourantas, C. V., Torii, R., Ang, H.Y., Tenekecioglu, E., Serruys, P.W. ve Foin, N.** (2017) Local hemodynamic forces after stenting: Implications on restenosis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 37 (12), 2231–2242.
- [24] **Khan, W., Farah, S. ve Domb, A.J.** (2012) Drug eluting stents: Developments and current status. *J. Control. Release*, 161 (2), 703–712.
- [25] **Tada, T., Byrne, R.A., Simunovic, I., King, L.A., Cassese, S., Joner, M... Kastrati, A.** (2013) Risk of stent thrombosis among bare-metal stents, first-generation drug-eluting stents, and second-generation drug-eluting stents: Results from a registry of 18,334 patients. *JACC Cardiovasc. Interv.*, 6 (12), 1267–1274.
- [26] **Grines, C.L., Bonow, R.O., Casey, D.E., Gardner, T.J., Lockhart, P.B., Moliterno... Whitlow, P.** (2007) Prevention of premature discontinuation of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery stents: A science advisory from the American Heart Association, American College of Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *Circulation*, 115 (6), 813–818.
- [27] **Wiemer, M., Butz, T., Schmidt, W., Schmitz, K.P., Horstkotte, D. ve Langer, C.** (2010) Scanning electron microscopic analysis of different drug eluting stents after failed implantation: From nearly undamaged to major damaged polymers. *Catheter. Cardiovasc. Interv.*, 75 (6), 905–911.
- [28] **Cassese, S., Byrne, R.A., Tada, T., Pinieck, S., Joner, M., Ibrahim, T... Kastrati, A.** (2014) Incidence and predictors of restenosis after coronary stenting in 10 004 patients with surveillance angiography.

*Heart*, 100 (2), 153–159.

- [29] **Torii, S., Jinnouchi, H., Sakamoto, A., Kutyna, M., Cornelissen, A., Kuntz, S... Finn, A. V.** (2020) Drug-eluting coronary stents: insights from preclinical and pathology studies. *Nat. Rev. Cardiol.*, 17 (1), 37–51.
- [30] **Kalnins, U., Erglis, A., Dinne, I., Kumsars, I. ve Jegere, S.** (2002) Clinical outcomes of silicon carbide coated stents in patients with coronary artery disease. *Med. Sci. Monit.*, 8 (2), 16–21.
- [31] **Unverdorben, M., Sattler, K., Degenhardt, R., Fries, R., Abt, B., Wagner, E... Vallbracht, C.** (2003) Comparison of a silicon-carbide coated stent versus a noncoated stent in humans: The Tenax<sup>TM</sup>- versus Nir<sup>TM</sup>-stent study (TENISS). *J. Interv. Cardiol.*, 16 (4), 325–333.
- [32] **Tanajura, L.F., Abizaid, A.A., Feres, F., Pinto, L., Mattes, L., St&co, R... Sousa, J.E.M.** (2003) Randomized Intravascular Ultrasound Comparison Between Patients That Underwent Amorphous Hydrogenated Silicon-Carbide Coated Stent Deployment Versus Uncoated Stents. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41 (58), 115–185.
- [33] **Gutensohn, K., Beythien, C., Bau, J., Fenner, T., Grewe, P., Koester, R... Kuehnl, P.** (2000) In vitro analyses of diamond-like carbon coated stents: Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity. *Thromb. Res.*, 99 (6), 577–585.
- [34] **Antoniucci, D., Bartorelli, A., Valenti, R., Montorsi, P., Santoro, G.M., Fabbiochi, F... Galli, S.** (2000) Clinical and angiographic outcome after coronary arterial stenting with the carbostent. *Am. J. Cardiol.*, 85 (7), 821–825.
- [35] **Paul, R.** (2017) Diamond-Like-Carbon Coatings for Advanced Biomedical Applications. 2 (5).
- [36] **Kollum, M., Farb, A., Schreiber, R., Terfera, K., Arab, A., Geist, A... Hehrlein, C.** (2005) Particle debris from a nanoporous stent coating obscures potential antiproliferative effects of tacrolimus-eluting stents in a porcine model of restenosis. *Catheter. Cardiovasc. Interv.*, 64 (1), 85–90.
- [37] **Vom Dahl, J., Haager, P.K., Grube, E., Gross, M., Beythien, C., Kromer, P... Klues, H.G.** (2002) Effects of gold coating of coronary stents on neointimal proliferation following stent implantation. *Am. J. Cardiol.*, 89 (7), 801–805.
- [38] **Edelman, E.R., Seifert, P., Groothuis, A., Morss, A., Bornstein, D. ve Rogers, C.** (2001) Gold-coated NIR stents in porcine coronary arteries. *Circulation*, 103 (3), 429–434.
- [39] **Macionczyk, F., Gerold, B. ve Thull, R.** (2001) Repassivating tantalum/tantalum oxide surface modification on stainless steel implants. *Surf. Coatings Technol.*, 142–144, 1084–1087.
- [40] **Fontaine, A.B., Koelling, K., Clay, J., Spigos, D.G., Passos, S. Dos, Christoforidis... Pozderac, R.** (1994) Decreased Platelet Adherence of Polymer-coated Tantalum Stents. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 5 (4), 567–572.

- [41] Wachem, P.B., Vreriks, C.M., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J.P. ve Aken, W.G. (1987) The influence of protein adsorption on interactions of cultured human endothelial cells with polymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, 21 (6), 701–718.
- [42] Seeger, J.M., Ingegno, M.D., Bigatan, E., Klingman, N., Amery, D., Widenhouse, C. ve Goldberg, E.P. (1995) Hydrophilic surface modification of metallic endoluminal stents. *J. Vasc. Surg.*, 22 (3), 327–336.
- [43] Zhao, Z.H., Sakagami, Y. ve Osaka, T. (1998) Toxicity of hydrogen peroxide produced by electroplated coatings to pathogenic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 44 (5), 441–447.
- [44] Di Mario, C., Grube, E., Nisanci, Y., Reifart, N., Colombo, A., Rodermann, J... Alt, E. (2004) MOONLIGHT: A controlled registry of an iridium oxide-coated stent with angiographic follow-up. *Int. J. Cardiol.*, 95 (2–3), 329–331.
- [45] Borhani, S., Hassanajili, S., Ahmadi Tafti, S.H. ve Rabbani, S. (2018) Cardiovascular stents: overview, evolution, and next generation. *Prog. Biomater.*, 7 (3), 175–205.
- [46] Nuhn, H., Blanco, C.E. ve Desai, T.A. (2017) Nanoengineered Stent Surface to Reduce In-Stent Restenosis in Vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9 (23), 19677–19686.
- [47] Rani, V. V.D., Manzoor, K., Menon, D., Selvamurugan, N. ve Nair, S. V. (2009) The design of novel nanostructures on titanium by solution chemistry for an improved osteoblast response. *Nanotechnology*, 20 (19).
- [48] Choudhary, S., Haberstroh, K.M. ve Webster, T.J. (2007) Enhanced functions of vascular cells on nanostructured Ti for improved stent applications. *Tissue Eng.*, 13 (7), 1421–1430.
- [49] Dibra, A., Kastrati, A., Mehilli, J., Pache, J., von Oepen, R., Dirschinger, J. ve Schömig, A. (2005) Influence of stent surface topography on the outcomes of patients undergoing coronary stenting: A randomized double-blind controlled trial. *Catheter. Cardiovasc. Interv.*, 65 (3), 374–380.
- [50] Mohan, C.C., Cherian, A.M., Kurup, S., Joseph, J., Nair, M.B., Vijayakumar, M... Menon, D. (2017) Stable Titania Nanostructures on Stainless Steel Coronary Stent Surface for Enhanced Corrosion Resistance and Endothelialization. *Adv. Healthc. Mater.*, 6 (11), 1–11.
- [51] Lorenzetti, M., Dogša, I., Stošicki, T., Stopar, D., Kalin, M., Kobe, S. ve Novak, S. (2015) The influence of surface modification on bacterial adhesion to titanium-based substrates. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7 (3), 1644–1651.
- [52] Jaggessar, A., Mathew, A., Wang, H., Tesfamichael, T., Yan, C. ve Yarlagaadda, P.K. (2018) Mechanical, bactericidal and osteogenic behaviours of hydrothermally synthesised TiO<sub>2</sub> nanowire arrays. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 80 (2017), 311–319.

- [53] Jaggessar, A., Mathew, A., Tesfamichael, T., Wang, H., Yan, C. ve Yarlagadda, P.K.D.V. (2019) Bacteria death and osteoblast metabolic activity correlated to hydrothermally synthesised TiO<sub>2</sub> surface properties. *Molecules*, 24 (1201), 1–18.
- [54] Junkar, I., Kulkarni, M., Drašler, B., Rugelj, N., Recek, N., Drobne, D... Mozetič, M. (2016) Enhanced biocompatibility of TiO<sub>2</sub> surfaces by highly reactive plasma. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 49 (24), 244002.
- [55] Hong, J., Andersson, J., Ekdahl, K.N., Elgue, G., Axén, N., Larsson, R. ve Nilsson, B. (1999) Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: Possible implications for osteogenesis. *Thromb. Haemost.*, 82 (1), 58–64.
- [56] Thor, A., Rasmusson, L., Wennerberg, A., Thomsen, P., Hirsch, J.M., Nilsson, B. ve Hong, J. (2007) The role of whole blood in thrombin generation in contact with various titanium surfaces. *Biomaterials*, 28 (6), 966–974.
- [57] Turner, R.T., Francis, R., Hannon, K.S., Brown, D., Garand, J. ve Bell, N.H. (1989) The effects of fluoride on bone and implant histomorphometry in growing rats. *J. Bone Miner. Res.*, 4 (4), 477–484.
- [58] Ellingsen, J.E., Johansson, C.B., Wennerberg, A. ve Holmén, A. (2004) Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 19 (5), 659–66.
- [59] Ellingsen, J.E. (1995) Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 6 (12), 749–753.
- [60] Liu, H.Y., Wang, X.J., Wang, L.P., Lei, F.Y., Wang, X.F. ve Ai, H.J. (2008) Effect of fluoride-ion implantation on the biocompatibility of titanium for dental applications. *Appl. Surf. Sci.*, 254 (20), 6305–6312.
- [61] Venkateswarlu, K., Rameshbabu, N., Sreekanth, D., Bose, A.C., Muthupandi, V. ve Subramanian, S. (2013) Fabrication and characterization of micro-arc oxidized fluoride containing titania films on Cp Ti. *Ceram. Int.*, 39 (1), 801–812.
- [62] Taschuk, M.T., Hawkeye, M.M. ve Brett, M.J. (2010) *Glancing Angle Deposition*, Elsevier Ltd.
- [63] Hawkeye, M.M. ve Brett, M.J. (2007) Glancing angle deposition: Fabrication, properties, and applications of micro- and nanostructured thin films. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, 25 (5), 1317.
- [64] Robbie, K. ve Brett, M.J. (1997) Sculptured thin films and glancing angle deposition: Growth mechanics and applications. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, 15 (3), 1460–1465.
- [65] Menzies, K.L. ve Jones, L. (2010) The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optom. Vis. Sci.*, 87 (6), 387–399.
- [66] Goodman, S.L. (1999) Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.*, 45 (3), 240–250.
- [67] Murphy, B.P., Savage, P., McHugh, P.E. ve Quinn, D.F. (2003) The stress-

strain behavior of coronary stent struts is size dependent. *Ann. Biomed. Eng.*, 31 (6), 686–691.

- [68] Yin, H., Liu, H. ve Shen, W.Z. (2010) The large diameter and fast growth of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotube arrays achieved via electrochemical anodization. *Nanotechnology*, 21 (3).
- [69] Wang, S., Liu, X., Wang, L., Wen, Q., Du, N. ve Huang, J. (2017) Formation mechanism and properties of fluoride-phosphate conversion coating on titanium alloy. *RSC Adv.*, 7 (26), 16078–16086.
- [70] Biesinger, M.C., Lau, L.W.M.W., Gerson, A.R., StC Smart, R. ve Smart, R.S.C. (2010) Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn. *Appl. Surf. Sci.*, 257 (3), 887–898.
- [71] Seçkin, E. ve Ürgen, M. (2021) A kinetic model for determining morphology transitions and growth kinetics of titania nanotubes during anodization of titanium in ethylene glycol based electrolytes. *Surf. Coatings Technol.*, 409, 126840.
- [72] Sulka, G.D. (ed.) (2020) *Nanostructured Anodic Metal Oxides: Synthesis and Applications*, Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands.
- [73] Yoo, H., Seong, M. ve Choi, J. (2019) RuO<sub>2</sub>-Doped TiO<sub>2</sub> Nanotube Membranes Prepared via a Single-Step/Potential Shock Sequence. *J. Electrochem. Sci. Technol.*, 10 (3), 271–275.
- [74] Lu, J., Rao, M.P., MacDonald, N.C., Khang, D. ve Webster, T.J. (2008) Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features. *Acta Biomater.*, 4 (1), 192–201.
- [75] Yao, C., Slamovich, E.B. ve Webster, T.J. (2008) Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 85 (1), 157–166.
- [76] Choudhary, S., Berhe, M., Haberstroh, K.M. ve Webster, T.J. (2006) Increased endothelial and vascular smooth muscle cell adhesion on nanostructured titanium and CoCrMo. *Int. J. Nanomedicine*, 1 (1), 41–49.
- [77] Llopis-Grimalt, M.A., Forteza-Genestra, M.A., Alcolea-Rodriguez, V., Ramis, J.M. ve Monjo, M. (2020) Nanostructured titanium for improved endothelial biocompatibility and reduced platelet adhesion in stent applications. *Coatings*, 10 (9).
- [78] Webster, T.J. ve Ejiófor, J.U. (2004) Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*, 25 (19), 4731–4739.
- [79] Alpaslan, E., Ercan, B. ve Webster, T.J. (2011) Anodized 20 nm diameter nanotubular titanium for improved bladder stent applications. *Int. J. Nanomedicine*, 6, 219–225.
- [80] Su, E.P., Justin, D.F., Pratt, C.R., Sarin, V.K., Nguyen, V.S., Oh, S. ve Jin, S. (2018) Effects of titanium nanotubes on the osseointegration, cell differentiation, mineralisation and antibacterial properties of

orthopaedic implant surfaces. *Bone Jt. J.*, 100B (1), 9–16.

- [81] **Wójciak-Stothard, B., Curtis, A., Monaghan, W., Macdonald, K. ve Wilkinson, C.** (1996) Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography. *Exp. Cell Res.*, 223 (2), 426–435.
- [82] **Tambasco De Oliveira, P. ve Nanci, A.** (2004) Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*, 25 (3), 403–413.
- [83] **Das, K., Bose, S. ve Bandyopadhyay, A.** (2009) TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 90 (1), 225–237.
- [84] **Junkar, I., Kulkarni, M., Benčina, M., Kovač, J., Mrak-Poljšak, K., Lakota, K... Iglič, A.** (2020) Titanium Dioxide Nanotube Arrays for Cardiovascular Stent Applications. *ACS Omega*, 5 (13), 7280–7289.
- [85] **Oh, S., Brammer, K.S., Li, Y.S.J., Teng, D., Engler, A.J., Chien, S. ve Jin, S.** (2009) Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *PNAS*, 106 (7), 2130–2135.
- [86] **Flemming, R.G., Murphy, C.J., Abrams, G.A., Goodman, S.L. ve Nealey, P.F.** (1999) Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*, 20 (6), 573–588.
- [87] **Schettini, N., Jaroszeski, M.J., West, L. ve Sadow, S.E.** (2012) Hemocompatibility Assessment of 3C-SiC for Cardiovascular Applications, in *Silicon Carbide Biotechnology*, Elsevier Inc., pp. 153–208.
- [88] **Pham, M.H., Reseland, H.J. ve Reseland, J.E.** (2020) Fluoride Modification of Titanium Surfaces Enhance Complement Activation. *Materials (Basel)*, 13 (684), 1–13.



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Çağatay Yelkarası

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** 2012, İTÜ, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği  
2013, İTÜ, Fizik Mühendisliği (yandal)
- **Yüksek lisans** 2014, İTÜ, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2013 – 2021 yılları arasında İstanbul Teknik Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalıştı.
- 2018'de "A Method of Improved Corrosion Resistance for Aluminum: Artificial Superhydrophobic Surfaces Produced by Anodic Oxidation and Stearic Acid Treatment" çalışması ile 27. Annual Anodizing Conference'da en iyi poster ödülünü aldı.

### DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Yelkarası, C.**, Recek, N., Kazmanli, K., Kovac, J., Mozetic, M., Urgan, M. ve Junkar, I. (2022) Biocompatibility and Mechanical Stability of Nanopatterned Titanium Films on Stainless Steel Vascular Stents. *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (4595), 1–19.
- Doktora tezinden geliştirilen yöntem için patent başvurusunda bulunulmuştur.