

**T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Ti6Al4V ALAŞIMLARI YÜZEYİNDE AG KATKILI TiO₂-BAZLI
NANOTÜP YAPILARININ ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU
VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : MUHARREM SANCAK
ORCID : 0000-0003-2118-3590
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :/...../2020

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : PROF. DR. EMİNE YALÇIN
ORCID : 0000-0002-5280-5375

**Aralık 2020
GİRESUN**

**T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Ti6Al4V ALAŞIMLARI YÜZEYİNDE AG KATKILI TiO₂-BAZLI
NANOTÜP YAPILARININ ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU
VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUHARREM SANCAK

Enstitü Anabilim Dalı

:

BİYOLOJİ

Bu tez 11/12/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Doç. Dr.
Salih DURDU
Jüri Başkanı**

**Dr. Öğretim Üyesi
Dilek ÇAVUŞOĞLU
Üye**

**Prof. Dr.
Emine YALÇIN
Üye**

**Doç. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Muharrem SANCAK

../12/2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilimsel alandaki kıymetli birikimlerini büyük bir fedakarlık ile paylaşan Danışmanım Sayın Prof. Dr. Emine YALÇIN'a,

Engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Doç. Dr. Salih DURDU ve Sayın Prof. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU'na,

Proje çalışmalarını birlikte yürüttüğüm ve yardımlarını esirgemeyen Gizem CİHAN'a,

Eğitimim sırasında ellerini her daim omuzumda hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın yürütülmesinde “TUBİTAK MAG - 118M766” nolu projeyle maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Biyomalzemeler.....	4
2.2. Metalik biyomalzemeler.....	5
2.2.1. Titanyum ve titanyum alaşımları.....	6
2.2.2. Ti6Al4V Alaşımı.....	8
2.3. Yüzey Modifikasyonu.....	10
2.3.1. Yüzey pürüzlülüğü ve topoğrafyası.....	12
2.3.2. Yüzey yükü ve yüzey enerjisi.....	14
2.4. Nanotüp Yüzeyli Malzemeler.....	16
2.5. Antibakteriyel Nanoparçacıklı Yüzeyler.....	18
2.6. Biyouyumluluk	21
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Numune Hazırlama.....	25
3.2. AO Yöntemiyle Nanotüp Kaplamaların Üretimi.....	25
3.3. SEM Analizleri.....	26
3.4. Temas Açısı Ölçümleri	26
3.5. Antibakteriyel Analizler	27

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	28
4.1. SEM Analizleri	28
4.2. Temas açısı ölçümleri	33
4.3. Antibakteriyel Aktivite	37
 BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER	 45
 KAYNAKLAR	 46
ÖZGEÇMİŞ	56



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AO	: Anodik oksidasyon
EB	: Elektrokimyasal biriktirme
Gr (-)	: Gram negatif
Gr (+)	: Gram pozitif
TB	: Termal Buharlaştırma
TiO ₂	: Titanyum oksit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Doku-biyomateryal etkileşimlerini etkileyen temel yüzey özellikleri	11
Şekil 2.2.	Yüzey enerjisini etkileyen faktörler ve gelişen reaksiyonlar	12
Şekil 2.3.	Biyomalzeme yüzeyinde biyofilm oluşum mekanizması	19
Şekil 3.1.	Kaplamaların üretim şematizması	26
Şekil 4.1.	SEM analizleri a.Ti6Al4V, b. Ti6Al4V-20V	29
Şekil 4.2.	SEM analizleri a.Ti6Al4V-1nm, b.Ti6Al4V-3 nm, c.Ti6Al4V-5 nm	31
Şekil 4.3.	SEM analizleri a. Ti6Al4V-30s, b. Ti6Al4V-60s, c. Ti6Al4V-500s	32
Şekil 4.4.	Ti6Al4V ve yüzeyi çeşitli yöntemlerle modifiye edilen Ti6Al4V kaplamaların temas açıları	34
Şekil 4.5.	Ti6Al4V ve yüzeyi çeşitli yöntemlerle modifiye edilen Ti6Al4V kaplamaların temas açısı görüntüleri a.Ti6Al4V, b. Ti6Al4V-20V, c. Ti6Al4V-1nm, d. Ti6Al4V-3 nm, e. Ti6Al4V-5 nm, f. Ti6Al4V-30s, g. Ti6Al4V-60s, h. Ti6Al4V-500s	35
Şekil 4.6.	Re-kültürasyon sonrasında aktif <i>E. coli</i> kolonileri a. Ti6Al4V, b. Ti6Al4V, c. Ti6Al4V-1nm Ag, d. Ti6Al4V-3 nm Ag, e. Ti6Al4V-5 nm Ag, f. Ti6Al4V-30s Ag, g. Ti6Al4V-60s Ag, h. Ti6Al4V-500s	40
Şekil 4.7.	Re-kültürasyon sonrasında aktif <i>S.aureus</i> kolonileri a. Ti6Al4V, b. Ti6Al4V, c. Ti6Al4V-1nm Ag, d. Ti6Al4V-3 nm Ag, e. Ti6Al4V-5 nm Ag, f. Ti6Al4V-30s Ag, g. Ti6Al4V-60s Ag, h. Ti6Al4V-500s	41
Şekil 4.8.	Yüzeye adeze olan <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> bakterilerinin re-kültürasyonu sonrasında aktif koloni sayıları	42

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Canlı sistemlerde kullanılan biyomalzemeler	4
Tablo 2.2. Titanyum ve alaşımlarının kullanım alanları	7
Tablo 2.3. Biyomalzemenin dokularla etkileşimi	22



Ti6Al4V ALAŞIMLARI YÜZEYİNDE AG KATKILI TiO₂-BAZLI NANOTÜP YAPILARININ ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Biyomalzemeler işlevini yitiren organ ya da dokuların görevini üstlenmek amacıyla geliştirilen ve üretilen malzemelerdir. Biyomalzeme olarak yaygın bir şekilde kullanılan titanyum ve titanyum alaşımları, korozyona dirençli ve doku tarafından kabul edilebilirliği yüksek olan biyomalzemelerdir.

Biyomalzemelerin uyumluluğunu arttırmak için çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri uygulanmakta ve yüzey karakteristiği istenilen ölçüde düzenlenebilmektedir. Bu çalışmada, bir titanyum alaşımı olan Ti6Al4V yüzeyi üç farklı yöntem kullanılarak modifiye edilmiş ve yüzey özelliklerindeki değişim SEM analizleri ve temas açısı ölçümleri ile araştırılmıştır. Ayrıca yüzeylerin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* türlerine karşı antibakteriyel aktivitesi de incelenmiştir.

Çalışma kapsamında ilk olarak Ti6Al4V yüzeyine 20 V anodik oksidasyon uygulanmış ve yüzeyde nanotübüler yapıların oluştuğu belirlenmiştir. Bu yapılar antibakteriyel ajanlar gibi çeşitli yapıların yüzeyde birikmesine olanak sağlamaktadır. Anodik oksidasyon uygulaması sonrasında yüzeyin su ile yaptığı temas açısında artış olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın devamında termal buharlaştırma ve elektrokimyasal biriktirme yöntemleri kullanılarak anodize Ti6Al4V yüzeyi antibakteriyel bir ajan olan Ag ile kaplanmıştır. SEM analizleri sonucunda elektrokimyasal biriktirme yöntemi uygulanan yüzeyde nanoparçacık özellikte, termal buharlaştırma uygulanan yüzeyde ise nanotabaka yapıda Ag kaplamaların oluştuğu belirlenmiştir. Her iki modifikasyon sonrasında yüzeylerin temas açılarında önemli değişimler olduğu saptanmıştır. Anodizasyon yöntemi ile modifiye edilerek yüzeyinde nanotübüler yapıların oluşturulduğu Ti6Al4V-20V malzemelerin anodize olmamış yüzeylere kıyasla önemli derecede antibakteriyel özellik kazandığı saptanmıştır. Ag ile kaplanan yüzeylerde ise yüzeyde biriktirilen Ag tabakasının yoğunluğuna bağlı olarak *S.aureus* ve *E. coli* bakterilerinin canlılığında önemli azalmalar gözlenmiştir.

Sonuç olarak teknoloji ve imalat yöntemlerindeki gelişmelere bağlı olarak biyomalzemelere uygulanan yüzey modifikasyon yöntemleri, biyouyumlu ve antibakteriyel özellikte biyomalzemelerin geliştirilmesine imkan sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler: Anodik oksidasyon, biyomalzeme, elektrokimyasal biriktirme, termal buharlaştırma, Ti6Al4V

FABRICATION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION THE ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF AG DOPED TiO₂- BASED NANOTUBES ON Ti6Al4V ALLOYS

SUMMARY

Biomaterials are materials developed and produced to take over the functions of organs or tissues that have lost their function. Titanium and titanium alloys, which are widely used as biomaterials, are biomaterials that are resistant to corrosion and have high tissue acceptance.

Various surface modification methods are applied to increase the compatibility of biomaterials and the surface characteristics can be adjusted to the desired extent. In this study, Ti6Al4V surface, a titanium alloy, was modified using three different methods and the changes in surface properties were investigated by SEM analysis and contact angle measurements. In addition, antibacterial activity of the surfaces against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains was also investigated.

Within the scope of the study, 20 V anodic oxidation was applied to the Ti6Al4V surface and it was determined that nanotubular structures were formed on the surface. These structures allow the accumulation of various chemicals such as antibacterial agents on the surface. After the anodic oxidation application, it was determined that the contact angle of the surface with water was increased. In the continuation of the study, the anodized-Ti6Al4V surface was coated with Ag, an antibacterial agent, using thermal evaporation and electrochemical deposition methods. As a result of the SEM analysis, nanoparticle layer was formed on the surface which the electrochemical deposition method was applied, while a nano-layer Ag coating was formed on the surface which thermal evaporation was applied. Significant changes were found in the contact angle of the surfaces after both modifications. Ti6Al4V-20V materials, on which nanotubular structures are formed by anodization method, have gained significant antibacterial properties compared to non-anodized surfaces. On Ag coated surfaces, significant decreases were observed in the viability of *S.aureus* and *E. coli* strains depending on the density of the Ag layer deposited on the surface.

As a result, depending on the developments in technology and manufacturing methods, surface modification methods applied to biomaterials allow the development of biocompatible and antibacterial biomaterials.

Keywords: Anodic oxidation, biomaterial, electrochemical deposition, thermal evaporation, Ti6Al4V

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Biyomalzemeler, insan vücudundaki organ veya dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek için kullanılan ve vücut sıvılarıyla sürekli veya periyodik olarak temas eden malzemelerdir. Son yıllarda ortaya çıkan hastalıkların sıklığının ve çeşidinin artması da biyomalzemelere olan ihtiyacı arttırmış ve yaygın kullanımını ortaya çıkarmıştır. Biyomalzemeler insan vücudunun farklı bölgelerinde kalpte yapay kapakçıklar, kan damarlarında, omuzlarda, dizlerde, kalçalarda, dirseklerde, kulaklarda ve dental yapılarda yedek implant olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda omurga, kalça ve diz replasmanları için kullanılan biyomalzemelerin sayısı ve çeşidi de gün geçtikçe artmaktadır. Biyomalzemelerin türü, tasarımı ve seçimi amaçlanan tıbbi uygulamaya bağlı olarak da değişmektedir [1-3].

Metaller, polimerler, seramikler ve kompozitler biyomalzeme olarak sıkça kullanılmaktadır. Ortopedik ve diş implantlarında, sert doku yerine metal ve seramikler biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Kalp damar sistemi ve genel plastik cerrahi malzemelerinde ise daha çok yumuşak doku yerine kullanılan seramikler tercih edilmektedir. Metal implantlar biyomalzeme üretiminde ve tasarlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [4]. Yüksek mukavemet, düşük yoğunluk, korozyona karşı direnç, yüksek biyouyumluluk ve inert özellikleri titanyum bazlı malzemelerin implantasyonda kullanımını ön plana çıkarmıştır. Günümüzde titanyum ve titanyum alaşımları cerrahi splint, protez eklem, dental implant, damar stentleri ve parsiyel protez yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Titanyum ve titanyum alaşımlarının mekanik özelliklerini kuvvetlendirmek için alüminyum, demir ve vanadyum gibi çeşitli metallerle alaşımı yapılmaktadır. Bu yolla mekanik özellikleri ve biyouyumluluk özellikleri geliştirilen titanyum bazlı implantların geniş kullanımı da yaygınlaşmaktadır [1,4].

Ti6Al4V, %4 vanadyum ve %6 alüminyum içeren bir titanyum alaşımdır ve havacılık uygulamaları için geliştirilmiş olmasına rağmen yüksek korozyon direnci ve mükemmel biyouyumluluk özellikleri biyomedikal endüstrisinde kullanımını da yaygınlaştırmıştır. Ti6Al4V ortopedi, dental ve beyin cerrahisi uygulamalarında kullanılan biyomalzemelerin çoğunun ana hammaddesini oluşturmaktadır. Ti6Al4V'ün dayanıklılığı saf titanyumdan %60 daha yüksektir ve daha yüksek akma ve çekme dayanımına, orta derecede iyi süneklik özelliklerine sahiptir [5-7]. Literatürde Ti6Al4V'nin biyouyumluluğu, yüzeydeki oksit tabakasının kararlı ve pasifleştirici özelliği ile ilişkilendirilmektedir. Ti6Al4V, korozyon direnci ve biyouyumluluk açısından yüksek özelliklere sahip olmasına rağmen alaşım yapısında bulunan alüminyum ve vanadyumun iyonlarının yapıdan sızarak dokulara ulaşması ve toksik etki oluşturma ihtimali biyomedikal alanlarda kullanımı açısından endişeleri de beraberinde getirmiştir [8]. Literatürde hem V hem de Al iyonlarının periferik nöropati ve Alzheimer gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olduğu bildirilmiştir. Ti6Al4V implantasyonu sonrasında yapıdan sızan iyonların implant başarısızlığı ile sonuçlanan sistemik dermatit gibi problemlere yol açtığı da bilinmektedir [9]. Bununla birlikte Ti6Al4V alaşımı yüzeyindeki yoğun ve koruyucu TiO₂ oksit film tabakasının yapıdan iyon salınımını engellediği ve muhtemel toksik etkiyi azalttığı da rapor edilmektedir [10,11]. Bu nedenle yüzeydeki koruyucu tabaka oldukça önemlidir. Alaşım elementlerinin çözünmesini ve vücuda difüzyonunu önlemek için yüzey modifikasyonu ile doğal oksit tabakasının kalitesini iyileştirmek ve kalınlığını belirli aralıklarda arttırmak gerekmektedir. Bununla birlikte sürtünme katsayısının değişken ve yüksek olması titanyum alaşımlarının uygulama alanlarını daraltmaktadır. Sürtünme ve aşınma sonucu korozyon direncini arttıran oksit tabakası zarar görmekte ve malzeme kaybı ortaya çıkmaktadır. Aşınma beraberinde korozyonu da başlatmakta ve malzeme kaybı ileri safhalara ulaşmaktadır. Bu güçsüz özellikleri geliştirmek, Ti6Al4V yapısında bulunan Al ve V sızmasını engellemek, aşınma/korozyona bağlı olarak gelişen malzeme kaybını önlemek için çeşitli yüzey modifikasyon tekniklerinin kullanımı zaruri hale gelmiştir [8, 12].

Biyomalzeme ve canlı ortam arasındaki etkileşim çoğunlukla yüzeyde gerçekleştiği için modifikasyon yöntemleri daha çok yüzey özelliklerini geliştirmek amacıyla uygulanmaktadır. Biyomalzemelerin zayıf özelliklerini güçlendirmek ve istenen

özellikleri kazandırmak için çeşitli modifikasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Biyouyumluluk özellikle malzeme yüzeyinin kimyası ile yakından ilişkili olduğundan modifikasyon yöntemleri yaygın olarak yüzey özelliklerini geliştirmek için kullanılmaktadır. Biyomalzemelerin aşınma direncini arttırmak için karbürleştirme, nitrürleme ve sertleştirme işlemleri ile malzeme yüzeyinin sertliği artırılabilir [13]. Biyomalzeme yüzeyinde belirli bir topografya ve pürüzlülük elde etmek için taşlama, patlatma ve zımparalama gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir. Yüzey topoğrafyasında değişim ve oksit tabakasını düzenlemek için anodik oksidasyon ve sol-jel yöntemi gibi uygulamalar yapılabilirken çeşitli ajanlarla yüzeyin kaplanmasında mikrorak oksidasyon, termal buharlaştırma, elektrokimyasal biriktirme gibi yöntemler kullanılabilir. Bunların arasında anodik oksidasyon yöntemi ekonomik oluşu, kontrol edilebilirliği ve yüzeyde oluşan topoğrafik yapıların boyutunun ve şeklinin istenen ölçülerde hazırlanmasına imkan sağlaması ile ön plana çıkmaktadır [14,15].

Bu çalışmada, Ti6Al4V yüzeyi 20 V anodik oksidasyon işlemine tabi tutulmuş ve yüzeyde nanotübüler yapıların oluşumu hedeflenmiştir. İşlem görmemiş ve anodize olmuş Ti6Al4V yüzeyleri SEM analizleri ile karakterize edilmiş ve nanotübüler yapıların oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Çalışmanın devamında iki farklı yöntem kullanarak yüzeyde Ag tabakalarının birikimi sağlanmıştır. Termal buharlaştırma ve elektrokimyasal birikim yoluyla yüzeyde oluşturulan Ag tabakaları ile yüzeyin antibakteriyel özellik kazanması hedeflenmiştir. Bu yöntemlerle Ti6Al4V yüzeyinde anodik oksidasyon, termal buharlaştırma ve elektrokimyasal biriktirme yöntemleri birlikte kullanılarak antibakteriyel Ag tabakalarının oluşturulması literatürde bir ilktir. Nanotübüler yapılar üzerinde biriken Ag tabakalarının oluşturduğu yeni yüzey karakteristiği yine SEM analizleri ile incelenmiştir. İşlem görmemiş, anodize olmuş ve yüzeyi Ag ile kaplanan tüm örneklerin temas açısı ölçümleri alınarak yüzey ıslanabilirliğindeki değişimler de araştırılmıştır. Ag kaplı yüzeylerin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı bakteriyosidal etkileri araştırılarak yüzeylerin antibakteriyel özellikleri de incelenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, temel olarak tıbbi ve biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır. Tıp alanındaki teknolojik ilerlemeler, biyomalzemelerin kullanımını geniş ölçüde yaygınlaştırmıştır. Tıbbi uygulamalarda kullanılan biyomalzemeleri malzeme cinsine göre metalik, seramik, polimerik ve kompozit biyomalzemeler olarak sınıflandırmak mümkündür [1]. Farklı yapıdaki biyomalzemelerin farklı uygulamalarda kullanımları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Canlı sistemlerde kullanılan biyomalzemeler [16]

	UYGULAMA ALANI	MALZEME TÜRÜ
<u>İSKELET SİSTEMİ</u>	Eklem implantı	Titanyum, Ti6Al4V
	Kırık Kemik Fiksatorü	Kobalt-Krom alaşımları
	Kemik Dolgu Malzemesi	Hidroksiapatit
	Yapay Tendon ve Bağlar	Poli (Etilen Teraftalat), Teflon
	Diş İmplantı	Titanyum, Poliüretan, Alümina
<u>KALP DAMAR SİSTEMİ</u>	Kan Damarı Protezleri	Teflon, Poliüretan
	Kalp Kapakçığı	Karbon, Paslanmaz çelik
	Katater	Silikon Kauçuk, Poliüretan
	Yapay kalp kası	Ni-Ti alaşımı
	Yapay kalp	Poliüretan
<u>DUYU ORGANLARI</u>	İç Kulak Kanalı	Platin Elektrot
	Göz İçi Lens	PMMA, Kauçuk, Silikon
	Kontakt Lens	Hidrojel, Silikon-Akrilat
	Kornea Bandajı	Hidrojel, Kolajen

Titanyum, paslanmaz çelik, kobalt-krom alaşımları gibi metalik biyomalzemeler yüksek mukavemet ve yüksek tokluğa ve yoğunluğa sahip olup korozyona uğrayabilen malzemelerdir. Kemik plakaları, diş implantları, kalça ve eklem protezleri genellikle metalik yapıda biyomalzemelerdir. Üretimi oldukça kolay olan teflon, naylon ve silikon gibi polimerik biyomalzemeler düşük mukavemetli, bozulabilir ve deformasyona açık malzemelerdir. Yapay kan damarları, kalça yuvalarında kullanılan malzemeler ve ameliyat iplikleri polimerik yapıdadır. Alüminyumoksit, hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat gibi seramik biyomalzemeler ise yüksek biyouyumlu, inert, tokluğu düşük ve üretimi oldukça zor olan biyomalzemelerdir. Genellikle diş implantları ve kalça yuvalarında biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Cam lifler ve polikarbonatlar gibi kompozitler yüksek mukavemetli, kolay şekil alabilen ve üretimi zor biyomalzemelerdir. Eklem implantlarında ve kalp kapakçığı yapımında kullanılabilirliği yüksektir [16-18].

2.2. Metalik Biyomalzemeler

Metalik biyomalzemeler ortopedik uygulamalarda, diş implantlarında, yüz-çene cerrahisinde, yapay kalp-damar uygulamalarında ve vücuda yerleştirilebilir cihazlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde metalik biyomalzemelerin eklem protezlerinde, kemik yenileme malzemelerinde, kalça plaklarında, kataterde, kalp kapakçığında, fiksator tellerinde, vidalarda ve çivilerde kullanıldığı bilinmektedir. Metalik biyomalzemeler, atomlar arasında güçlü metalik bağların bulunması ve kristal kafes yapılarından dolayı üstün mekanik özelliklere sahiptir [4,19]. Metalik biyomalzemeler teknolojinin ilerlemesi ile birlikte alaşım halinde kullanılmaya başlanmıştır. İnsan vücudunda kullanılan ilk alaşım, kemik kırıklarında vida ve plaka malzemesi olarak kullanılan ve daha sonra korozyona bağlı hasarlara neden olduğu anlaşılan “Sherman- Vanadyum Çeliği” dir (4). Metalik biyomalzemelerin düşük biyouyumluluk özellikleri, korozyona açık olmaları, dokulara kıyasla sert yapıda olmaları, yüksek yoğunlukta ve alerjik reaksiyona sebep olmaları kullanım alanlarını daraltmaktadır [19,20]. Canlı ortamlardaki akışkanlar su, protein, hidroksit, klorür ve çözünmüş oksijen gibi farklı yapıda bileşenler içermektedir. Bu nedenle, metalik biyomalzemeler için insan vücudundaki sıvı

ortamlar korozyon özelliğindedir. Metalik biyomalzemelerde oluşabilecek bir korozyon, çevreye salınan metalin çevredeki doku ile istenmeyen kimyasal bir reaksiyona girmesine ve hasar oluşumuna neden olabilir [21,22]. Wapner [23] protez implantlardan salınan Ni, Co ve Cr gibi metallerin toksik etkileri olduğunu rapor etmiştir. Bu dezavantajlar, yeni metalik malzemelerin biyomateryal olarak kullanımını gündeme getirmiş ve farklı metalik yapıda malzemelerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Platin, zirkon ve tantal gibi metalik malzemelerin mekanik dayanımları oldukça düşük olması bu malzemelerin implant olarak kullanımını sınırlamaktadır. Buna karşın paslanmaz çelikler, kobalt-krom-molibden alaşımları, titanyum ve titanyum alaşımları yüksek mukavemet özellikleri nedeniyle yük taşıyıcı özellikte kullanılan metalik malzemeler [4,19].

2.2.1. Titanyum ve Titanyum Alaşımları

Titanyum, ilk kez 1790 yılında William Gregor tarafından keşfedilmiş fakat Klaproth tarafından 1795'te titanyum olarak adlandırılmıştır. Yüksek mukavemet, düşük yoğunluk, korozyona karşı direnç, yüksek biyouyumluluk ve vücutta inert özellikleri titanyum bazlı malzemelerin implantasyonda kullanımını ön plana çıkarmıştır. Titanyum ve alaşımları ortodontik cerrahide dental implantlarının; kalça, diz, omuz, omurga, dirsek, el bileği eklem protezlerinin; tırnak, vida, somun ve plaka gibi kemik fiksasyon malzemelerinin; kalp pilleri ve yapay kalp kapakçıklarının üretiminde kullanılmaktadır [24,25]. Cp-Ti %0,5'e kadar oksijen içeriğine, yüksek korozyon direncine ve iyi biyouyumluluğa sahiptir. Alerjik reaksiyona da neden olmadığı bilinen Cp-Ti'nin bu uyumlu özellikleri oksijen varlığında implantların yüzeyinde kendiliğinden oluşan koruyucu bir oksit tabakası ile ilişkilendirilmektedir. Titanyumun ve titanyum alaşımlarının kimyasal olarak inert olması, korozyona karşı dirençli ve yüksek biyouyumluluğu tipik olarak sadece birkaç nanometre kalınlığındaki titanyum oksit filmin kimyasal stabilitesinden ve yapısından kaynaklanmaktadır. Cp-Ti farklı saflık derecelerine sahiptir (1'den 4'e kadar derecelendirilir) ve bu saflık oksijen, karbon ve demir içeriği ile karakterizedir. Diş implantlarında diğer derecelere göre daha güçlü olduğu için 4. derece Cp-Ti tercih edilmektedir [26].

Ticari saflıkta Ti ve Ti6Al4V gibi titanyum alaşımları çok çeşitli sektörlerde özellikle implant uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Titanyum ve alaşımlarının kullanım alanları [10,26]

Kullanım Alanı	Malzeme
Gaz türbin motoru malzemesi	Ti-5, Ti-4Al-4Mo-2Sn-0,5Si
Uçak gövdesi	Ti-15V-3Cr-3Sn-3Al
Balistik zırh	Ti-6Al-1,8Fe-0,2Si
Jeotermallerde kullanılan borular	Ti-6,8Mo-4,5Fe-1,5Al
Yüksek dayanımlı spor malzemeleri	Ti-15V-3Cr-3Sn-3Al
Diş ve medikal uygulamalar	Ti-6Al-4V
Kemik fiksatorü	Ti-6Al-4V, Cp-Ti
Omurga ayırıcı	Ti-6Al-7Nb, Ti-6Al-4V
Yapay valf	Ti-6Al-4V
Vasküler stent	Ti-Ni
Implante edilebilir yapay kalp	Cp-Ti
Kalp pili	Ti-6Al-4V, Cp-Ti
Serebral anevrizma klibi	Ti-6Al-4V, Cp-Ti
Dental implant	Ti-6Al-4V, Cp-Ti
Protez tabanı	Ti-6Al-7Nb
Ortodontik tel	Ti-Ni, Ti-Mo
Kateter	Ti-Ni
Cerrahi ekipman	Cp-Ti

Ti6Al4V başlangıçta havacılık uygulamaları için geliştirilmiş fakat yüksek korozyon direnci ve mükemmel biyouyumluluk özellikleri biyomedikal endüstrisinde kullanımına imkan sağlamıştır. İmplant uygulamalarının yanı sıra Ti-4.2Fe-6.9Cr ve Ti-4Fe-6.7Cr-3Al gibi titanyum alaşımlar mükemmel uyumlulukları ve alerjik olmayan yapıları nedeniyle tekerlekli sandalye, yapay uzuv ve özellikle yapay bacak üretiminde de kullanılmıştır [19]. Titanyum alaşımlarının mukavemeti paslanmaz çelik mukavemetine çok yakındır ve yoğunluğu çelikten %55 daha azdır. Bu nedenle spesifik mukavemet (yoğunluk başına mukavemet) ile karşılaştırıldığında titanyum alaşımları diğer implant malzemelerden daha iyi performans göstermektedir.

Korozyon direnci ve biyouyumluluk açısından önemli bir özelliğe sahip titanyum ve alaşımlarının kullanımı yapıdan canlı ortama metal iyonu salınımı nedeniyle endişeleri de beraberinde getirmiştir. Ti6Al4V alaşımından salınan alüminyum ve vanadyum iyonlarının Alzheimer, nöropati ve osteomalazi gibi uzun vadeli sağlık sorunları ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yüksek sürtünme katsayısına sahip titanyum bazlı alaşımlar, enflamatuar reaksiyona, ağrı oluşumuna neden olmakta ve implantta gevşemeye yol açan osteoliz gelişebilmektedir [9,11].

2.2.2. Ti6Al4V Alaşımı

Biyomedikal uygulamalarda titanyum, saf titanyum ve Ti6Al4V olmak üzere iki farklı şekilde kullanılmaktadır. Saf titanyum, mekanik özelliklerindeki zayıflık nedeniyle genellikle protezler üzerinde gözenekli kaplama malzemesi olarak kullanılırken Ti6Al4V alaşımları ise daha çok yapay bağlantı implantlarında kullanılmaktadır. Ti6Al4V, %4 vanadyum ve %6 alüminyum ile içeren bir alfa-beta alaşımıdır. Ti6Al4V yapısındaki titanyum korozyon direncini sağlamakta; alüminyum, yoğunluğu azaltırken alfa fazın stabilitesini ve dayanıklılığını arttırmakta; vanadyum ise beta fazının miktarını arttırmakta aynı zamanda alüminyumun korozyona uğramasını önlemektedir. Alüminyum ile vanadyum eklenmesi sonucunda oluşan alaşımın dayanıklılığı saf titanyumdan %60 daha yüksektir. Cp-Ti ile karşılaştırıldığında, Ti6Al4V çok daha yüksek bir akma dayanımına, nihai çekme dayanımına ve orta derecede iyi süneklik ile daha iyi tribolojik özelliklere sahiptir. Ti6Al4V alaşımları yüksek biyouyumluluğa ve elastik bir modüle sahiptir. Elastisite modülü implantın bir kuvvet uygulandığında şekil değiştirmesinin bir ölçüsüdür ve kemik (kortikal) için hesaplanan elastisite modülü 15-30 GPa iken bu değer Ti6Al4V için 120 GPa'dır [5-7].

Ti6Al4V'nin yüksek dayanıklılıkta ve hafif olması, sıcaklık farklılıklarına ve korozyona dirençli olması, kırılmadan esneyebilme özelliği çok çeşitli sektörlerde kullanılmasına da imkan tanımaktadır [27]. Yüksek biyouyumluluk özelliği Ti6Al4V'nin medikal uygulamalarda da yoğun bir şekilde kullanımına izin vermektedir. Ti6Al4V'nin sergilediği biyouyumluluk özelliği yüzeyde oluşan kararlı

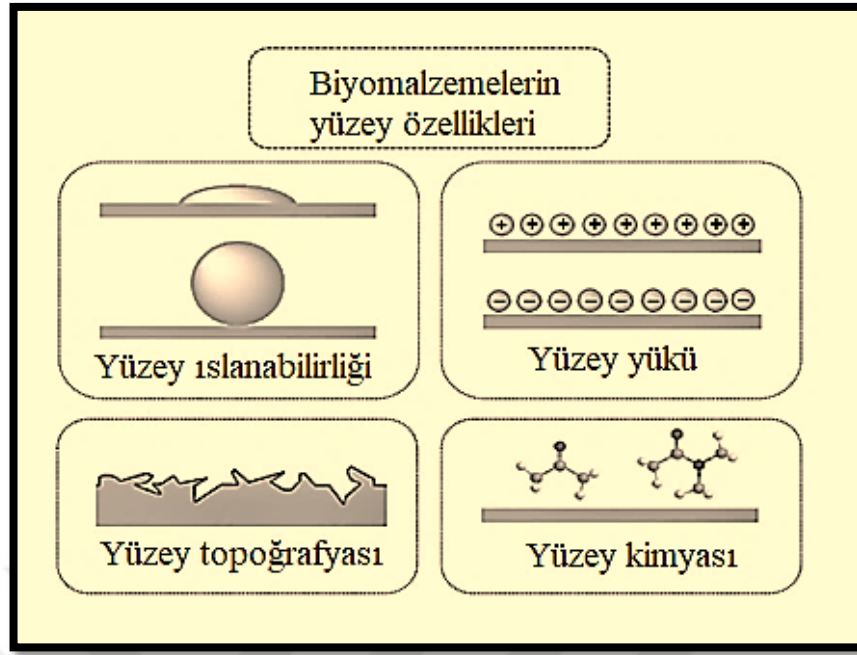
oksit tabakasından kaynaklanmaktadır. Ask ve ark. [5] anodizasyon işlemi sonrasında Ti6Al4V alaşımının, cp-Ti ile karşılaştırıldığında hem kimyasal bileşim hem de mikroyapı ve morfoloji açısından artan bir heterojenlik gösterdiğini, alaşımın yüzeyindeki oksit tabakasının Al ve V içerdiğini de rapor etmişlerdir. Ti6Al4V yapısında bulunan alüminyum ve vanadyumun iyonlarının korozyon sonucu yapıdan sızma ihtimali implant olarak kullanımı açısından ciddi endişelere neden olmuştur [8]. Literatürde Al ve V'a maruz kalan canlı sistemlerde periferik nöropati ve Alzheimer gibi ciddi problemler olduğu, Ti6Al4V implantasyonu sonrasında sistemik dermatit geliştiği de rapor edilmektedir [9].

Ti6Al4V yüzeyinde bulunan TiO₂ oksit film tabakası yapıdaki iyonların salınımını için bir bariyer oluşturmakta ve oluşabilecek toksik etkiyi de azaltma potansiyeline de sahiptir [9,10]. Bu nedenle Ti6Al4V'nin biyomedikal uygulamalarda kullanımında yüzeydeki koruyucu TiO₂ oksit tabakasının iyileştirilmesi oldukça önemlidir. Sürtünme ve aşınmanın yüksek oranda oluşabileceği kalça, diz, omuz, omurga, dirsek, el bileği eklem implantlarında oksit tabakası zarar görmekte ve malzeme kaybı ortaya çıkmaktadır. Bu durumda yapıdan sızan iyonlar da toksik etkiye neden olmaktadır. İmplant yapısında aşınma/korozyona bağlı olarak gelişen iyon salınımını engellemek için yüzeydeki oksit tabakasının modifikasyonu gündeme gelmiş ve bu konuda çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir [7, 12]. Güleriyüz ve Çimenoglu [28] termal oksidasyon yöntemi ile Ti6Al4V yüzeyini modifiye etmişler ve yüzeyde sert oksit tabakası ve oksijen difüzyon bölgelerinin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Günyüz ve ark. [27] mikroark oksidasyon işlemi uyguladıkları Ti6Al4V yüzeyinde oluşan oksit tabakasının daha pürüzlü bir yapıya sahip olduğunu, bu pürüzlülüğün ise biyouyumluluğu arttırdığını rapor etmişlerdir. Chudinova ve ark. [29] Ti6Al4V yüzeyinin elektrokimyasal biriktirme yöntemi ile modifikasyonu sonrasında nanopartiküler bir yüzey elde edildiğini ve yüksek biyouyumluluk sergilediğini belirtmişlerdir. Sarraf ve ark. [30] Ti6Al4V yüzeyinin termal buharlaştırma ile modifikasyonu sonrasında antibakteriyel kaplamalı pürüzlü bir özelliğe sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Biyouyumluluk biyomalzeme yüzeyi ile canlı ortam arasındaki etkileşimde önemli bir unsurdur ve yüzey kimyası ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle biyouyumluluğun iyileştirilmesinde kullanılan modifikasyon yöntemlerinde genellikle yüzey özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Yüzeyin korozyon direncini arttırmak için anodik polarizasyon ve daldırma, aşınma direncini arttırmak için nitrasyon, sert doku uyumluluğunu arttırmak için elektrokimyasal kaplama ve plazma sprey, kanla uyumluluğu arttırmak için ise polimer ya da biyomolekül kaplama literatürde rapor edilen modifikasyon yöntemleridir [31]. Literatürde farklı yöntemlerle oluşturulan Ag kaplı yüzeylerin antibakteriyel özelliğinden bahsedilmektedir fakat elektrokimyasal biriktirme ve termal buharlaştırma ile oluşturulan Ag kaplı Ti6Al4V yüzeylerin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Örneğin Zhang ve ark. [32] mikroark oksidasyonu ve iyon implantasyonu kullanılarak Ag ile kaplanan TiO₂ yüzeyinin *S. aureus* şusuna karşı antibakteriyel özellikte olduğunu rapor etmişlerdir. Surmeneva ve ark. [33] elektron ışınli ergitme yöntemi ile Ag kaplı Ti6Al4V yüzeyinin hidrofilik özelliğinin arttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise Ti6Al4V yüzeyleri anodik oksidasyonla modifiye edilmiş ve sonrasında yüzeylerde elektrokimyasal biriktirme ve termal buharlaştırma yöntemleri kullanılarak Ag biriktirilmiş ve antibakteriyel yüzeyler elde edilmiştir.

2.3. Yüzey Modifikasyonu

Doku mühendisliğinde yüzey kimyası ve topografyası, yüzeyin mezoporozitesi hücre yapışmasında önemli bir role sahiptir. Biyomateryallerin makro yapısı daha çok vaskülarizasyon süreci ve kemik büyümesinde rol oynamaktadır. Biyomalzemeye karşı geliştirilen hücresel tepki tek bir özellikten değil, bir dizi yüzey özelliğinden etkilenmektedir. Şekil 2.1’de doku-biyomateryal etkileşimlerini etkileyen temel yüzey özellikleri özetlenmiştir [34].



Şekil 2.1. Doku-biyomateryal etkileşimlerini etkileyen temel yüzey özellikleri [34]

Biyomalzemelerin tasarımında yüzeyin kimyasal bileşimi oldukça önemlidir. Biyomalzeme ile canlı dokuların etkileşimi biyomalzeme yüzeyinde gerçekleşmektedir. Yüzeydeki etkileşim biyomalzeme türüne, maruziyete ve biyomolekülün afinitesine göre değişmektedir. Malzemenin yüzey kimyasının sitokinlerin/fibrojenik faktörlerin salgılanmasını, enfeksiyon ve alerjik reaksiyonların gelişmesini tetikleyebileceği rapor edilmektedir [35].

Biyomalzeme yüzeyinin kimyasının modifikasyonu, yüzeyin canlı ortamdaki protein ve hücrelerle etkileşimini düzenlemenin en doğrudan yoludur. Malzeme yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar modifiye edilerek yüzey ıslanabilirliği, yüzey elektrik yükleri ve serbest enerji de değiştirilebilmektedir. Yüzey kimyasındaki bu tür modifikasyonlar ile biyomalzeme yüzeyinin kan uyumluluğunun artırılabilceği, yüzeye protein adsorpsiyonun ve trombosit yapışmasının kontrol edilebileceği rapor edilmektedir [34,36]. Biyomalzeme yüzeyinde gerçekleşen modifikasyon ile implantın yığın özellikleri korunmaktadır. Bir malzemenin yüzey kimyası, topografyası, enerjisi ve yükündeki değişiklikler yoluyla malzeme yüzeyinde gerçekleşecek olan biyolojik etkileşimler iyileştirilebilmektedir. Yüzey modifikasyonları uygulama amacına göre üç kategoriye ayrılabilir: (i) yüzeye

istenilen fonksiyonların eklenmesi, (ii) mevcut yüzeyin farklı bileşimlere ve/veya topografyalara dönüştürülmesi, (iii) istenilen bir topografya oluşturmak için belirli malzemelerin mevcut yüzeyden çıkarılması [37]. Yüzey modifikasyonu ile bir yüzey tabakasının kimyasal ve mekanik dayanıklılığı ve doku uyumluluğu iyileştirilebilmektedir. Yüzey modifikasyonu ekonomik açıdan ucuz bir süreç olarak kabul edilebilir çünkü sadece yüzey tabakasının değiştirilmesi gerekmektedir. Kısaca yüzey modifikasyonu ile bir biyomalzemenin temel fiziksel özellikleri korunabilirken, sadece en dış yüzey biyo-etkileşimlere uyarlanacak şekilde modifiye edilmektedir. Yüzey modifikasyonunun ana amacı, korozyon direncini, aşınma direncini, antibakteriyel özelliği ve biyouyumluluğu geliştirmektir. İmplant vücuda sabitlendiğinde, çeşitli biyolojik reaksiyonlar meydana gelmektedir. İlk olarak su molekülleri ve proteinlerinin adsorpsiyonu gerçekleşmektedir. Oluşacak biyolojik reaksiyonlar, yüzey kimyası, yüzey topografyası, yüzey pürüzlülüğü ve yüzey enerjisi gibi özelliklere bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir [34] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Yüzey enerjisini etkileyen faktörler ve gelişen reaksiyonlar

2.3.1. Yüzey Pürüzlülüğü ve Topoğrafyası

İmplant yüzeyinin topografisi, hücrel morfolojiyi, proliferasyonu ve farklılaşmayı etkileyen önemli bir faktördür ve yüzeye adeze olan hücrenin hücrel sinyali üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Biyomalzeme yüzeylerinin topografik modifikasyonu, mikro gözenekler ve nanoporlar, ızgaralar, kolonlar, mikro oluk, noktalar, çukurlar ve rastgele yüzey pürüzlülüğü şeklinde üç boyutlu özellikler yaratmayı amaçlamaktadır. Biyoaktif uygulamalar için tasarlanan tüm implant materyalleri karmaşık topografik özellikler içermektedir. Pürüzlü, dokulu ve gözenekli yüzeylerin hücre bağlanmasını ve ekstrasellüler matriks oluşumunu

uyardığı bilinmektedir [38,39]. Örneğin, Le Guéhennec ve ark. [40], benzer hidrofililik karakter ve pürüzlülüğe sahip olmasına rağmen, daha pürüzsüz titanyum üzerinde plastik yüzeye kıyasla daha düşük hücre canlılığı gözlemlemişlerdir, Düşük hücre canlılığı biyomalzeme yüzeyinin kimyasal bileşimi ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte daha fazla topografik özelliklere sahip malzemeler, proteinlerle olası etkileşim için daha fazla yüzey alanını açığa çıkarmaktadır. Örneğin, oluklu veya gözenekli yüzeyler, pürüzsüz yüzeylere kıyasla daha büyük yüzey alanına sahiptir [41]. Malzeme yüzeyinin düzensizlik ölçeğine bağlı olarak, yüzey pürüzlülüğü makroluklu (100 μm -mm), mikroluklu (100 nm-100 μm) ve nano-pürüzlü (<100 nm) olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır [42]. İnsan damar endotel hücreleri gibi daha küçük hücreler için nanometre ölçeğinde (≤ 100 nm) yüzey pürüzlülüğü, hücre yapışmasını ve büyümesini arttırmaktadır. Bununla birlikte, proteinler hücrelerden daha küçük varlıklar olduğu için, mikro ölçekli topografik yapılar çok büyüktür ve proteinler tarafından algılanamazlar [43,44].

Mikrotopografik yapı, mineralize kemik ile implant yüzeyi arasındaki kenetlemeyi maksimuma çıkartmaktadır. Nanometre aralığındaki yüzey profilleri, proteinlerin adsorpsiyonunda, osteoblastik hücrelerin yapışmasında ve dolayısıyla osseointegrasyon oranında önemli bir rol oynamaktadır [45, 46]. Kemik hücreleri ve implant temasını arttırmak için mikro ve nano özellikli yüzeyler oluşturmada patlatma, asitle dağlama, anodizasyon ve plazma püskürtme gibi yöntemler kullanılmaktadır [40,47]. Cerrahi implantların uzun süreli performansı genellikle yüzey özellikleri ile kısıtlanmaktadır. Titanyumun ve alaşımlarının düşük aşınma direnci gibi zayıf tribolojik özelliği, implantların ömrünün azalması sorununa yol açmaktadır. Bu problem, uygun yüzey kaplamaları ile büyük ölçüde aşılabilmektedir. Yüzey modifikasyonu uygulayarak titanyum bazlı ortopedik implantların performansının doğal kapasitesini birkaç katından daha fazla arttırmak mümkündür. Titanyum yüzeylerde, yüzey kimyasının biyolojik etkileri esas olarak titanyum oksit tabakasının yapısıyla ilişkilidir. Doğal titanyum oksid yüzeyleri kalsiyum, sülfür, fosfor veya magnezyum gibi iyonlarla elektrokimyasal oksidasyon yöntemleri kullanılarak kaplanabilmektedir [48,49]. Bununla birlikte literatürde titanyum ve alaşımlarının tribolojik özelliklerini geliştirmek için çeşitli yüzey işlemleri

gerçekleştirilmiştir. İyon implantasyonu ve plazma sprej kaplama gibi fiziksel biriktirme yöntemleri, nitrüleme gibi termo kimyasal yüzey işlemleri, karbürizasyon ve borlama gibi yüzey modifikasyon teknikleri titanyum alaşımlarının yüzey sertliğini arttırmak için kullanılmıştır [34]. Deligianni ve ark. [50] pürüzlü Ti6Al4V yüzeylerinin daha hidrofilik bir karaktere sahip olduğunu, hidrofilik karakterdeki artışın ise düşük albumin adsorpsiyonuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. Albüminin serumdaki yüksek konsantrasyonu ve düşük moleküler ağırlığı nedeniyle biyomateryal yüzeyine ulaşan ilk protein olduğu, titanyum alaşımları yüzeyinde albümin adsorpsiyonunun hücre bağlanmasını kısmen inhibe ettiği bilinmektedir [51]. Bu durum da yüzey pürüzlülüğünde artışa neden olan bir yüzey modifikasyonunun aynı zamanda hücre bağlanmasını da düzenleyici bir işlem olacaktır.

2.3.2. Yüzey Yükü ve Yüzey Enerjisi

Biyomalzeme yüzeyinin sahip olduğu yük, çevre dokularla etkileşimde önemli bir role sahiptir. Birçok biyolojik olayda elektrostatik etkileşimlerin rolü göz önüne alındığında, arayüzdeki yüzey yükünün varlığı, hem protein adsorpsiyonunu hem de hücre yapışmasını modüle eden başlıca metalik özelliklerden biridir [52,53]. Genel olarak pozitif yüklü yüzeyler hücre yapışmasını artırırken negatif yüklü yüzeyler yapışmayı azaltmaktadır [54]. Elektrostatik kuvvet aralığı uzun olduğunda, negatif yüklü yüzeylerde hücre yapışmasının düşük iyonik güçte ihmal edilebilir düzeyde olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca ihmal edilebilir düzeyde elektrostatik itme halinde ve van der Waals etkileşiminin baskın olduğu durumlarda hücre yapışması yüksek iyonik güçte daha fazladır [55]. Albüminin metal oksitlere adsorpsiyonunu araştıran bir çalışmada TiO_2 , ZrO_2 ve Al_2O_3 gibi pozitif yüklü metal oksitler yüzeyine adsorpsiyonun yüzey yük yoğunluğuna bağlı olduğu bildirilmiştir [56]. Genel olarak proteinlerin pozitif yüklü yüzeylere adsorbe olduğu ve bu durumda osteoblast gibi hücrelerin bağlanmasının ve yüzeye yayılmasının uyarıldığı rapor edilmektedir [57]. Pürüzlü ve daha yüksek yüzey enerjili titanyum yüzeyler üzerindeki OH grupları, hücre bağlanması ve proliferasyonunu destekleyen pozitif yükler vermek üzere ayrılmaktadır [58].

Yüzey enerjisi terimi, ıslanabilirlik ile de yakından bağlantılıdır. Yüzey enerjisi bir dizi malzeme ile etkileşimleri açıklarken, yüzey ıslanabilirliği (yani hidrofiliklik ve hidrofobiklik) sadece sıvı ile olan etkileşimleri tarif etmektedir. Islanabilirlik katı bir yüzeyin genellikle ıslatma açısı olarak ifade edilen bir sıvı tarafından ıslanma ölçüsüdür [59]. Cam gibi hidrofilik yüzeyler yüksek yüzey enerjilerine sahipken, politetrafloroetilen veya polistiren gibi hidrofobik yüzeyler düşük yüzey enerjilerine sahiptir. Aslında, bir malzeme yüzeyinin hidrofilikliği veya hidrofobikliği, yüzey enerjisinin bir sonucudur ve bu sonuç elektrik yüklerinin dağılımı ile ilişkilidir. Aynı zamanda, elektrik yüklerinin dağılımı, yüzey kimyası ve kristalliğin bir sonucudur ve tüm bu özellikler yüzey topografyasından etkilenmektedir [60]. Temas açısı ölçümleri, bir yüzeyin ortalama ıslanabilirliğini ölçmek için en sık kullanılan tekniktir. Sıfır derece (0°) ıslatma açısı tam ıslatmaya karşılık gelirken, 70° veya 80° 'den yüksek açılar zayıf ıslatmaya karşılık gelmektedir [59]. Titanyum implant yüzeyleri için 0° (hidrofilik) ile 140° (hidrofobik) arasında temas açısı ölçümleri rapor edilmektedir [40]. Bir malzemenin yüzeyinin ıslanabilirliği, proteinlerin adsorpsiyonu ve hücre yapışması için hayati önem taşımaktadır. Bir implant materyali bir insan vücudunun içine yerleştirildiğinde, implant materyalinin ıslatılması, fizyolojik sıvılar tarafından gerçekleşen olayların ilk ve en önde gelenleri arasındadır. Bu reaksiyon proteinlerin adsorpsiyonunu ve ardından hücrelerin implant yüzeyine bağlanmasını kontrol etmektedir. Bu nedenle, yüzey ıslanabilirliği, implant materyalinin biyouyumluluğunu belirleyebilecek önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir [61].

Bir yüzeyin ıslanabilirliğini etkileyen en önemli üç faktör kimyasal bileşimi, mikroyapısal topografyası ve yüzey yüküdür. Düşük enerjili (hidrofobik) yüzeyler daha fazla proteini adsorbe etme eğilimindeyken, yüksek enerjili (hidrofilik) yüzeyler protein adsorpsiyonuna direnme eğilimindedir [62]. Genel olarak protein molekülleri, hidrofobik yüzeyler üzerindeki konformasyonlarını hidrofilik yüzeylere göre daha büyük ölçüde değiştirmektedir. Proteinler genellikle içe gömülü hidrofobik kalıntılar ile proteinin yüzeyini kaplayan hidrofilik kalıntılardan (yükli ve polar) oluşmaktadır. Biyomalzeme yüzeyi hidrofobik ise, proteinin amfipatik yapısında

bulunan çeşitli hidrofobik gruplar yüzey ile etkileşime girerek protein yüzeye yapışmakta ve yayılma hareketi sergilemektedir. Hidrofilik yüzeylerde, proteinin yüzeyle etkileşimi polar fonksiyonel gruplar vasıtasıyla gerçekleşmekte fakat yayılma eğilimi daha düşük düzeyde kalmaktadır [63,64]. Literatürde bazı araştırmalarda yüzey enerjisinin ve ıslanabilirliğinin hücre yapışmasını önemli derecede etkilediği belirtilmektedir. Hidrofilik yüzeylerin hücre bağlanması, yayılması, çoğalması ve farklılaşmasında önemli bir indükleyici etken olduğu rapor edilmektedir [42,65]. Titanyum bazlı yüzeyler ile osteoblastlar arasındaki etkileşimin araştırıldığı çalışmada Feng ve ark. [58] daha yüksek yüzey enerjisine (hidrofilik) ve daha fazla hidroksil grubuna sahip yüzeylerde yüksek oranda osteoblast aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir.

2.4. Nanotüp Yüzeyli Malzemeler

Nanotüp yapıdaki titanyum oksit malzemeler geniş yüzey alanı, düşük elektron rekombinasyonu ve yük taşıma özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Fotokataliz, su fotolizi, organik kirleticilerin iyileştirilmesi, gaz sensörleri, güneş enerjisi hücreleri ve biyomateryal uygulamalarında oldukça ümit vericidir. Titanyum oksit nanotüplerinin üretiminde sol-jel yöntemleri, hidrotermal sentez, buharlaşma, iyon ışını sentezi ve anodik oksidasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [15,66]. Bunların arasında anodik oksidasyon basitliği, uygun maliyetli oluşu, kontrol edilebilirliği ve tekrarlanabilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle yüzeyde oluşan nanotüplerin boyutu ve şekli de istenen ölçülerde hazırlanabilmektedir. Ayrıca nanotüp yapıda titanyum oksit yüzeyler, substrata güçlü bir şekilde yapışmakta ve bu özellik pek çok uygulamada önemli avantaj sunmaktadır. Anodik oksidasyon yönteminde HF elektrolitleri, kromik asit-HF karışımları, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-NH}_4\text{F}$ karışımları, $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HF}$ karışımları ve $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaF}$ karışımları gibi florür içeren elektrolitler kullanılmaktadır. Anodizasyon işleminde uygulanan voltaj, anodizasyon süresi, çözelti bileşimi (elektrolit bileşimi ve florür iyonları konsantrasyonu) ve çözelti pH'sı değiştirilerek nanotüp yapının boyutu ve morfolojisi istenilen ölçülerde ve özellikte ayarlanabilmektedir [15,67-68]. Son yıllarda anodizasyon uygulaması ile 10 ila 250 nm arasında geniş çap aralığında ve

100 nm ile birkaç yüz nm uzunluğunda nanotüp yapılar üretilmektedir. Sulu elektrolitlerde, 1–20 V aralığında anodik potansiyellerin uygulanması ile 15 ile 100 nm arası çaplara sahip tüplerin üretimi de literatürde rapor edilmektedir. Bununla birlikte, elektrolitin anodizasyon süresi ve pH'ı değiştirilerek nanotüp katmanlarının kalınlığı da değiştirilebilmektedir [15,69]. Yu ve ark. [70] 20 V uygulanan anodizasyon işlemi ile üretilen titanyumoksit nanotüp yapılarının 80 nm çapında, 400 nm kalınlığında ve yüksek derecede korozyona karşı dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Mohan ve ark. [71] 20 V anodizasyon uygulaması ile elde edilen Ti6Al4V yüzeyinde elde edilen 80 nm çapında ve 250 nm kalınlığındaki nanotübüler yapının iyileştirilmiş korozyon resistansı ve daha iyi pasivasyon davranışı sergilediğini rapor etmişlerdir.

Literatür çalışmaları nanotüp yapıların boyutunun korozyon davranışını belirlemede kilit bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Küçük çaplı nanotüp yapıları ile daha düşük bir korozyon oranı rapor elde edilmektedir. Nanotüp yapılarda çap arttıkça elektrokimyasal stabilite artmakta ancak çapın 86 nm'yi geçtiği durumlarda bu stabilite azalmaktadır. Büyük çaplı oksit nanotüpler, elektrolit ile temas için yüksek bir özgül yüzey alanına sahiptir, bu nedenle korozif iyonların ve korozyon ürünlerinin difüzyonunu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca çapı yüksek olan nanotüpler, elektrolitin bariyer katmanına ulaşması için daha fazla kanal sağlamakta ve sonuç olarak korozif iyonlar ile titanyum oksit arasındaki reaksiyon olasılığı da artmaktadır. Titanyum oksit nanotüp yapılarının proinflatuar düzeylerini düşürdüğü ve yumuşak dokularda olumlu bir yanıt ortaya çıkardığı bilinmektedir. Bu sonuç TiO₂ nanotüplerin artan katalitik oksit yüzey alanı ile ilişkilendirilmektedir [72]. TiO₂ nanotüpler biyoaktif yapıların yerleşebileceği boş bir hacme sahiptir ve bağ dokusunu sabitlemek için uygun bir arayüz sağlamaktadır. TiO₂ nanotüpleri doğal oksit tabakasına kıyasla biyomalzemelerde apatit oluşum sürecini geliştirmekte ve canlı kemiğe bağlanma özelliğini de iyileştirmektedir. Nanotüplere kalsiyum fosfat kristallerinin dahil edilmesi ile biyomalzemenin bulunduğu ortama daha iyi yapışması ve daha fazla osseointegrasyonu da sağlanabilmektedir [73].

Bu çalışmada 20 V'luk anodizasyon yöntemi ile nanotübüler yapıya sahip Ti6Al4V malzemeleri sentezlenmiş, termal buharlaştırma ve elektrokimyasal biriktirme

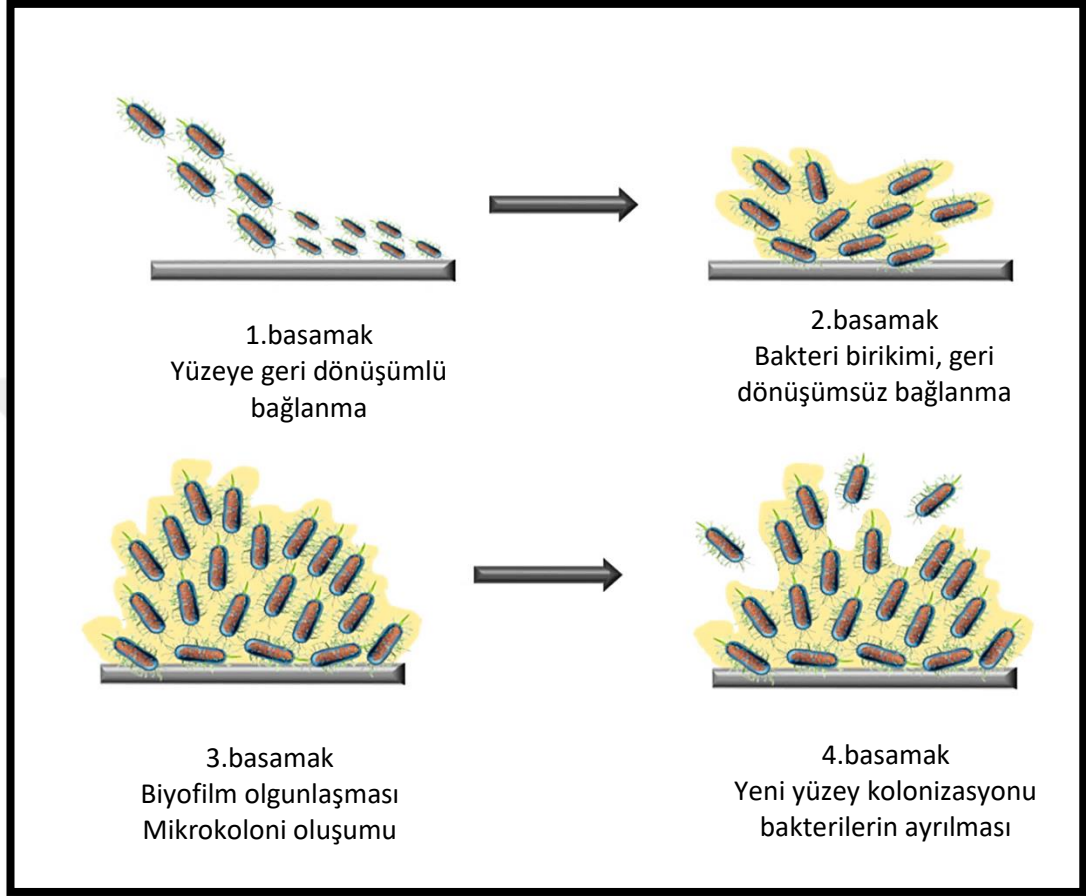
yöntemi ile nanotübüler yüzeylerde Ag birikimi sağlanarak antibakteriyel yüzeyler oluşturulmuştur.

2.5. Antibakteriyel Nanoparçacıklı Yüzeyler

Bakterilerin pili ve flagella gibi ipliksi protein yapıdaki uzantıları sayesinde bakteriler katı ve sert yüzeylere kolaylıkla yapışabilmektedir. Nano ölçekte olan pili ve flagellalar yaklaşık 10 nm çapında ve 100 nm uzunluğundadır. Ayrıca bakteriler yapıştığı yüzeylerde biyofilm oluşturarak implante edilmiş yüzeylerin kalıcı kontaminasyonuna neden olmaktadır. Biyofilm, polisakkaritler ve çeşitli makromoleküllerden oluşan polimerik bir yapıdır. Bir biyofilm, yüzeylere yapışan bakterileri uygulanacak farmakolojik tedaviden ve ortamdaki doğal vücut sıvıların etkisinden korumaktadır. Biyofilm oluşumu ve gelişimi dört basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta hücrel Brownian hareketi ve mikrop-yüzey etkileşimlerine bağlı olarak gelişen biyomalzeme yüzeyine geri dönüşümlü bağlanma gerçekleşmektedir. Bu bağlanmada elektrostatik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler, biyomalzemenin pürüzlülüğü ve yüzey topografyası büyük bir etkiye sahiptir. İkinci basamakta adezyon molekülleri, protein yapıdaki uzantılar ve ekzopolisakkarit (EPS) gibi spesifik moleküler ve hücrel etkileşimlerin aracılık ettiği bakteri birikimi ve geri dönüşümsüz bağlanma gerçekleşmektedir. Üçüncü aşamada biyofilm olgunlaşması gerçekleşmekte ve bakteriyel mikrokoloniler oluşmakta, EPS'ye planktonik hücreler de yapışabilmektedir. Dördüncü aşamada ise yeni yüzeylerdeki kolonizasyon için bazı bakteriler biyofilm yapıdan kopmaktadır [74-76] (Şekil 2.3).

Biyomalzeme yüzeylerinin özellikleri, kimyasal bileşimleri, yükleri, ıslanabilirlikleri ve pürüzlülükleri bakterilerle etkileşimi etkileyen faktörlerdir. Mikron aralığındaki pürüzlülük bakteriyel yapışmayı önemli ölçüde arttırmakta, 0,2 µm'den daha düşük Ra değerlerindeki yapılar ve nano ölçütlerdeki yüzey dokuları biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca, pürüzlü ve hidrofobik yüzeyler daha yüksek bakteri kolonizasyonuna yol açmaktadır. Malzeme yüzeyine biyolojik sıvılardan protein adezyonu biyomalzemelerin orijinal yüzey özelliklerinde değişikliklere yol açarak bakteriyel yapışmayı tetiklemektedir. Özellikle biyomalzeme yüzeyinin kanla temasında albümin, fibrinojen ve fibronektin gibi proteinler yüzeye adsorbe

olmaktadır. Bu adezyon, bakterilerin o bölgede film oluşturmalarını kolaylaştırmaktır ve bu nedenle antimikrobiyal bir yüzey tasarlarken protein adezyonu dikkate alınması gereken önemli bir parametredir [74].



Şekil 2.3. Biyomalzeme yüzeyinde biyofilm oluşum mekanizması [76]

Tıbbi implantların yüzeylerinde biyofilm oluşumunun engellenmesi çok zordur. Hijyenik kullanım, implantın doğası ve doğru uygulama gibi implantla ilişkili enfeksiyonların çok sayıda farklı nedeni vardır. Bu nedenle, mikrobiyal kolonizasyonu önleyen ve mikropları etkili bir şekilde öldüren bir yüzey oluşturmak için implantın modifiye edilmesi önemli çözüm yollarından biridir. Antibakteriyel özelliklere sahip titanyum yüzeyler etmek için Ag gibi antibakteriyel ajanlar ile yüzeylerin kaplanması alternatif bir yöntemdir. Ag kaplama yöntemi son zamanlarda biyomalzemeler ve tıbbi cihazlara antibakteriyel özellikler kazandırmak için uygulanan yöntemlerden biridir. Gümüşün güçlü inhibe edici ve bakterisidal etkilerinin yanı sıra geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir.

Ayrıca memeli hücrelerine karşı yüksek termal stabilite ve düşük toksisite sergilemektedir. Cu ve Zn gibi diğer metallere kıyasla Ag iyonları mikroorganizmalara karşı yüksek toksisite ve memeli hücrelerinde ise düşük toksisite sergilemektedir. Diğer metallere göre ön plana çıkmasını sağlayan bu özelliği ile Ag'nin biyomedikal alanlarda kullanımını da yaygınlaştırmaktadır [77] .

Biyomalzeme yüzeyini Ag ile kaplamak için plazma püskürtme, iyon ışını destekli biriktirme, magnetron püskürtme, mikro ark oksidasyonu ve sol-jel teknolojisi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Plazma püskürtme, iyon ışını destekli biriktirme, magnetron püskürtme karmaşık bir şekle sahip tıbbi cihazlara uygulanamazken, mikro ark oksidasyonu ve sol-jel teknolojisi yöntemlerinde ise kaplamalarda Ag dağılımının kontrolünde zorluk yaşatmaktadır. Elektrokimyasal biriktirme (EB) yöntemi Ag kaplamaların hazırlanmasında umut verici yöntemlerden biridir. Bu yöntemde elektrolit içerisinde askıda bulunan taneler uygulanan elektrik akım ile altlık malzeme üzerinde biriktirilir. Bu yöntemle metal, polimer, seramik, cam, karbür, oksit, nitrür, karbon nano tüp yüzeyler kaplanabilir. Bu teknikle pil, sensör, transdüktör, solar hücre, dekoratif film ve biyomalzemeler gibi çok çeşitli malzemeler de üretilebilmektedir. EB, kaplama bileşiminin değişkenliğinin kontrolü, karmaşık implant yapılarına uygulayabilme ve kolay uygulanabilir olması ile popüler bir kaplama yöntemi haline gelmiştir. Bu yöntemle karmaşık şekilli ve gözenekli yapılar üzerinde kontrollü özelliklere sahip tek tip kaplamalar, ortam sıcaklığında rahatlıkla üretilebilir. EB yönteminde bir süspansiyondaki Ag gibi yüzey yüklü parçacıklar, uygulanan bir elektrik alanı malzeme yüzeyine doğru hareket ederek bir kaplama oluşturmaktadır [78,79]. EB yönteminde kullanılan cihazların basitliği ve maliyetinin düşük olması, mikro ve nano boyutta partiküllerle kaplamaya imkan sağlaması, üç boyutlu gözenekli yapıların ve kompozit malzemelerin üretilebilmesi bu yöntemin önemli avantajlarından. Bununla birlikte bu kaplama işlemi kısa sürede yapılabilirken düz ve silindirik yüzeylerde de rahatlıkla kaplama yapılabilmektedir. Oda sıcaklığında uygulanabilme, elektrolit değişimi ve elektrokimyasal potansiyelin değiştirilerek yüzey morfolojisini kontrol etme elektrokimyasal biriktirme yönteminin önemli avantajlarından. Bununla birlikte ekonomik, basit ve hızlı bir yöntem olması; birikme hızının ve film kalınlığının kontrol edilebilirliği yüzey kaplama işlemleri arasında EB'yi ön plana çıkarmaktadır

[80,81]. Antibakteriyel kaplama işlemi için kullanılan diğer bir yöntem olan termal buharlaştırma (TB), EB'den farklı olarak vakum altında buharlaştırma işlemi ile atomların kaplanacak olan malzeme yüzeyinde biriktirilmesi esasına dayanmaktadır. Biriktirme hız aralığı geniş olduğu için bu yöntem yüksek hızda üretime olanak sağlamaktadır. Buharlaştırma işlemi genellikle 10^{-5} - 10^{-6} torr vakum altında gerçekleştirilmektedir. Kullanılan buhar fazı elektron bombardımanı ile, indüksiyonla veya rezistansla elde edilebilir. TB ile üretilen malzemelerde elde edilen yoğun kaplama yapısı yüzeyin aşınma ve sürtünmeye karşı dirençli olmasını sağlamaktadır [82].

2.6. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk bir biyomalzemenin dokularla etkileştiğinde biyolojik, kimyasal ve fiziksel olarak uyumlu olması ve canlı ortamlardaki reaksiyonlara karşı uygun cevap oluşturma özelliğidir. Bir biyomalzemenin mekanik özellikleri ve dayanımı yanında biyouyumlu olması da aranan en önemli özelliklerdendir. Biyomalzeme vücutla etkileştiğinde enfeksiyon, iltihaplanma, pıhtılaşma yada immün reaksiyon oluşturmamalıdır. Bununla birlikte alerjik etkilere yol açmaması, toksik etki göstermemesi, kolay şekil alabilmesi ve sterilizasyon koşullarına karşı dayanıklı olması aranan diğer biyouyumluluk özelliklerindendir [22].

İyi bir biyouyumluluk için implantın sadece çevre dokularla uyumlu olması değil aynı zamanda canlı ortamdaki tüm dokularla da uyumlu olması ve toksik özellikte olmaması gerekmektedir. Biyouyumluluk için doku ile uyum ve klinik olarak yüksek performans önemli bir şart olarak görülmektedir. Bununla birlikte sitotoksik, genotoksik, mutajenik, karsinojenik ve immünojenik etkilerin oluşmaması da biyouyumluluğu oluşturan önemli etmenlerdir [83]. Bir biyomalzemenin sert dokularla etkileşimi uyumsuz, biyotolerant, biyoinert ve biyoaktif olarak sınıflandırılabilir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Biyomalzemenin dokularla etkileşimi [47]

Özellik	Reaksiyon
Uyumsuz	İmplantın reddine neden olabilecek canlı organizma ile uyumsuz etkilere yol açan toksik konsantrasyonlarda madde salınımı
Biyotolerant	Bağ dokusu içinde kapsüllenmeye yol açabilecek ancak toksik konsantrasyonlarda olmayan maddelerin salınımı
Biyoinert	Toksik madde salınımı yok
Bioaktif	İmplant ve doku arayüzü boyunca yapışma, ara bağlantıya yol açan doku farklılaşması ve pozitif etkileşim

Biyomalzemelerin biyouyumluluğunda korozyona karşı dirençlilik önemli bir yer tutmaktadır. Normal vücut sıvısı, pH 7,4 civarında 37°C sıcaklıkta, klorür iyonları, çözülmüş oksijen, proteinler ve hücre kaynaklı oksitleyiciler içermektedir. Hücresel reaksiyonlar sonucunda oluşan asidik ürünler, pH değerlerinde önemli azalmalara da neden olmaktadır. Tüm bu etmenler implantlarda aşınmaya neden olmakta ve özellikle azalan pH korozyonu hızlandırmaktadır. Fizyolojik ortamda proteinlerin varlığı, yüzeydeki korozyon reaksiyonlarının mekaniğini ve kinetiğini değiştirerek implantların korozyonunu önemli derecede etkilemektedir. Ek olarak, inflamasyonda yabancı bir cisme yanıt verirken makrofajlar gibi immünolojik hücreler tarafından salınan aktif oksijen türleri, korozyonu hızlandırıcı diğer bir etmendir. Korozyon implant yüzeyinde değişimlere, implantın barındırdığı elementlerin ayrışmasına ve yapıdan kopmasına neden olmaktadır. Böyle bir ayrışma sonrasında implant zayıflamakta ve korozyonla açığa çıkan ürünler dokulara difüze olarak toksisiteye neden olmaktadır [21]. Ti6Al4V yüksek biyouyumluğa, mekanik güce ve korozyona karşı dirence sahiptir. Biyomalzeme olarak kullanımında korozyona bağlı gelişebilecek bir çözülmede, Ti6Al4V yapısından canlı ortama Al ve V iyonlarının geçişi ciddi toksik etkilere neden olabilecektir. Bu nedenle Ti6Al4V biyouyumluluğunda korozyona karşı direnç oldukça önemlidir. Çeşitli modifikasyon yöntemleri kullanılarak Ti6Al4V'nin mevcut korozyona karşı direnç özelliğini daha yüksek derecelere çıkarabilmek mümkündür. Sarao ve ark. [84] modifikasyon işlemlerinin korozyon direncini arttırdığını, yüzeyi modifiye edilmiş Ti6Al4V'nin korozyon oranının 0.0014mm/yıl, modifiye edilmemiş yüzeylerde bu oranın

0.0102mm/yıl olduğunu rapor etmişlerdir. Ferraris ve ark. [85] termo-kimyasal yöntemle modifiye edilen Ti6Al4V yüzeylerden metalik iyon salınımının modifikasyon sonrasında azaldığını ve biyouyumluluğunun arttığını rapor etmişlerdir. Modifikasyon sonrasında yüzeyden iyon salınımındaki azalmayı ise kalın oksit tabakası ile ilişkilendirmişlerdir.

Biyomateriyaller, çeşitli proteinlere karşı büyük bir afiniteye sahiptir ve bu nedenle, in vivo ortamda albümin, fibrinojen, IgG, fibronectin ve von Willebrand faktörü gibi pek çok plazma proteini ile etkileşmektedir. Dokuyla ilk temastan sonra, kandan gelen proteinler malzeme yüzeyine adeze olmakta ve yüzeyde bir protein tabakası oluşmaktadır. Bu protein tabakası, implanta verilen doku reaksiyonunu belirler ve adezyon sonrası geçici bir matris oluşumuna ve lökositlerin cerrahi bölgeye göçüne neden olur [86]. Protein etkileşimi ve yüzeye adsorpsiyon süreci, biyomateriyalin yapısında değişime neden olmaktadır. Özellikle fibrinojenin yüzeyde yapışkan özelliğinin artışı ile biyomalzemelerin denatürasyonu gerçekleşmektedir. Proteinlerin yüzeye yapışması özellikle polimorfonükleer nötrofillerin, monositlerin, makrofajların ve yabancı cisim dev hücrelerinin implant bölgesine göçünü başlatır ve immünojenik reaksiyonlar gelişir [87,88]. Ayrıca proteinlerin yapışması implant yüzeyinde kan koagülasyonunu tetikleyen önemli bir reaksiyondur ve fibrinojen yapışması trombosit aktivasyonunu indükler ve malzeme yüzeyinde pıhtılaşma sonucu inflamasyon oluşur. İnflamasyon başlangıcı ise immün reaksiyonları aktive ederek nötrofil, monosit ve makrofaj gibi hücrelerin implant bölgesine göçünü başlatır ve tüm bu zincir reaksiyonlar implantın başarısızlığı ile sonuçlanır [89]. Bu nedenle bir biyomateriyalin biyouyumluluğunu arttırmak için ilk olarak yüzey özellikleri olumlu yönde modifiye edilmelidir. Hücrelerin yerleşmesini ve çoğalmasını indükleyen fibronectin gibi proteinlerin yüzeye yapışması; immünojenik cevap oluşturan, pıhtılaşmayı tetikleyen proteinlerin ise yüzeye yapışmaması biyouyumluluğun artırılmasında oldukça önemlidir.

Çeşitli modifikasyon yöntemleri ile yüzeylerin ıslanabilirlik özelliği ve yüzey topoğrafyası istenilen ölçülerde değiştirilebilmekte ve protein adezyonu da istenilen aralıkta tutulabilmektedir. Yüzeylerin hidrofilik özelliği, Arg-Gly-Asp sekansı taşıyan fibronectin gibi hücre adezyon proteinlerinin yüzeye yapışmasını indüklemekte ve bu fibronectin bağlı yüzeylere osteoblast öncü hücrelerinin

bağlanması kolaylaşmaktadır [90]. Hücrelerin yerleşmesine imkan tanıyan bu tür yüzeyler yüksek biyouyumluluk sergilemekte ve başarılı implant uygulamasına imkan sağlamaktadır. Hasan ve ark. [91] yüzey modifikasyonu ile elde ettikleri tek tabakalı Ti6Al4V yüzeylerinde modifikasyon sonrasında ıslanabilirliğin azaldığını ve buna bağlı olarak albümin ve fibrinojen proteinlerinin yüzeye adezyonunda da azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Ferraris ve ark. [85] termo-kimyasal yöntem ile modifiye edilen Ti6Al4V yüzeylerin ıslanabilirliğinin arttığını ve bu artışın biomineralizasyonu, osteoblastik hücrelerin farklılaşmasını düzenlediğini ve biyouyumluluğunda arttığını rapor etmişlerdir.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

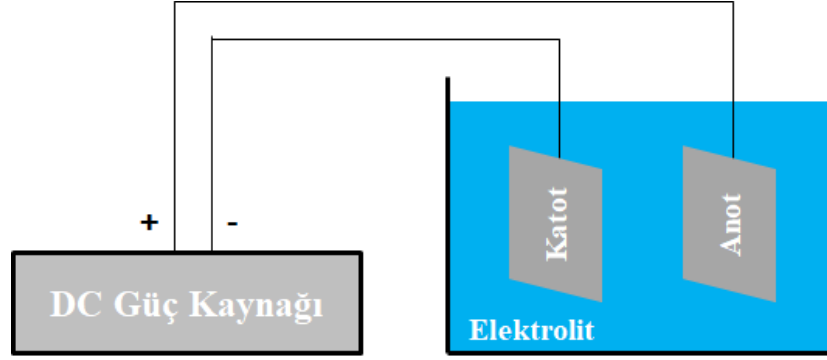
3.1. Numune Hazırlama

Anodik oksidasyon (AO) kaplamaların üretimi için sertifikalı olarak temin edilen 1mm kalınlığındaki Ti6Al4V alaşımı levhalar 1cmx1cm boyutlarında hazırlanmıştır. Numuneler 1 saat süreyle ısıtılma işlemine tabi tutulup mikro yapısal olarak homojenize edilmiştir.

AO kaplamaların üretimine başlamadan önce uygun boyutlara küçültülen Ti6Al4V levhaların tüm yüzeyleri zımpara/parlatma makinesiyle sırasıyla 180, 240, 400, 800, 1000 ve 2000 nolu zımparalar ile hazırlanmış ve sonrasında saf su ile yıkanıp, ultrasonik banyoda etanol/aseton karışımı ile temizlenerek ılık hava altında kurutulmuş ve desikatörde kaplanıncaya kadar bekletilmiştir.

3.2. AO Yöntemiyle Nanotüp Kaplamaların Üretimi

Nanotüp kaplamalar GW-Instek PSU 400 model DC güç kaynağı kullanılarak AO yöntemiyle üretilmiştir. Numuneler etilen glikol-bazlı NH_4F çözeltisi içerisine daldırılarak akım ve süre değerleri sabitlenerek 20V potansiyel değeri 1 saat süreyle uygulanarak nanotüp kaplamalar üretilmiştir. AO prosesi boyunca Ti alaşımı numuneler anot ve Pt elektrot katot olarak görev almaktadır (Şekil 3.1). AO sonrası yüzeyler amorf yapıda olduğu için kristalinite ve mukavemeti arttırmak için morfolojiyi değiştirmeden 450 °C’de 1 saatlik ısıtılma işlemine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.1. AO Kaplamaların üretim şematizması

AO uygulanmış yüzeylerin antibakteriyel özellik kazanması amacıyla elektrokimyasal biriktirme (EB) ve termal buharlaştırma (TB) yöntemleriyle yüzeyde Ag tabakaları oluşturulmuştur.

3.3. SEM Analizleri

AO yöntemiyle üretilen kaplamaların, TB ve EB yöntemleriyle yüzeyi Ag ile kaplanan örneklerin yüzey morfolojilerini gözlemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Her numunenin SEM analizi Hitachi SU1510 cihazı kullanılarak Ordu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.4. Temas Açısı Ölçümleri

Yüzeylerin ortalama temas açıları ve ıslanabilirlik özellikleri, temas açısı gonyometresi (Dataphysics OCA 15EC) aracılığıyla oda sıcaklığında sabit damla tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Ortalama temas ölçümleri, bir video kamera ve görüntü analiz yazılımına bağlı bir ışık mikroskobu aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri, 1µL damıtılmış su damlacıklarının yüzeylere temas etmesini takiben bir dakika sonra tüm kaplamalar için ölçülmüştür.

3.5. Antibakteriyel Analizler

Bakteri adezyon deneyleri Gr(+) *Staphylococcus aureus* ve Gr(-) *Escherichia coli* bakterileri ile gerçekleştirilmiştir. Bakteri stok kültürlerinden 5 ml steril besiyeri kullanılarak bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonun bulanıklığı densitometre cihazı yardımıyla 0.5 McFarland standartlarına göre ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonun 100 µl'si kanlı agar yüzeyine homojen bir şekilde yayılmış, hazırlanan kaplama yüzeyleri (0,5 cm²) besiyeri ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Petriler 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmış, süre sonunda besi yeri yüzeyinden alınan kaplamalar, yapışmayan bakterilerin uzaklaştırılması için 15 ml serum fizyolojik ile nazıkçe yıkanmış ve her bir örnek 2 ml serum fizyolojik içeren cam tüp içerisine aktarılmıştır. Örnek yüzeyine yapışan bakterilerin sıvı içerisine geçmesini sağlamak için 35 kHz frekansında ultrasonik titreşim 5 dakika boyunca uygulanmıştır. Sonrasında tüp içerisinden alınan 100 µl sıvı, katı besiyeri (Mueller hinton agar) plakları yüzeyine yayılmış ve 37°C'de mikro aerobik ortamda gerçekleştirilen 48 saatlik inkübasyonun ardından besiyerinde oluşan koloniler sayılarak (Koloni sayıcı/Stuart) ve toplam aktif koloni sayısı belirlenmiştir.

Mueller hinton agar içeriği:

Et infüzyonu	: 2,0 g/l
Kazein hidrolizat	: 17,5 g/l
Nişasta	: 1,5 g/l
Agar-agar	:13,0 g/l

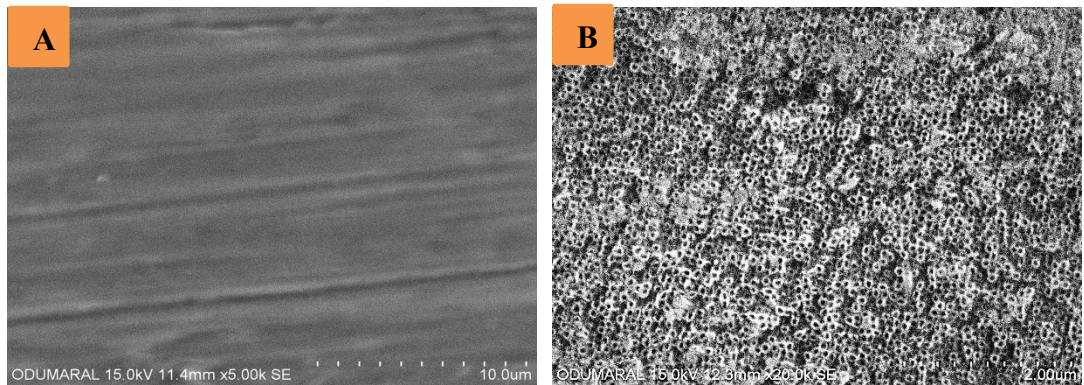
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Ti6Al4V yüzeyi farklı yöntemlerle modifiye edilmiş, yüzey özellikleri ve yüzeyin antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Yüzey modifikasyonu için AO, TB ve EB olmak üzere üç farklı yöntem kullanılmıştır. 20 V anodik oksidasyon uygulama sonrasında elde edilen yüzey Ti6Al4V-20V olarak kodlanmıştır. Termal buharlaştırma yöntemi uygulanan yüzeyler, oluşan Ag tabakası kalınlığına göre Ti6Al4V-1nm, Ti6Al4V-3 nm ve Ti6Al4V-5 nm olarak kodlanmıştır. Elektrokimyasal biriktirme yöntemi ile üretilen yüzeyler ise uygulama süresine göre Ti6Al4V-30s, Ti6Al4V-60s ve Ti6Al4V-500s olarak kodlanmıştır. Her bir modifikasyon sonrasında SEM analizleri ile yüzey özellikleri karakterize edilmiştir. Temas açısı ölçümleri alınarak her bir modifikasyon sonrasında yüzeylerin ıslanabilirliğindeki değişim araştırılmıştır. Kaplama yüzeylerinin antibakteriyel etkisi *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri kullanılarak belirlenmiş ve yüzeylerin Gr (+) ve Gr (-) bakterilere karşı seçici özellikte olup olmadığı da değerlendirilmiştir.

4.1. SEM Analizleri

Ti6Al4V ve anodik oksidasyonla üretilen Ti6Al4V-20V kaplamaların SEM analizleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Anotlanmamış Ti6Al4V yüzeyi ile karşılaştırıldığında, anodik oksidasyonla üretilen yüzeylerde belirgin nanotübüler yapının olduğu gözlenmektedir. Ayrıca nanotübüler yapının düzenli bir şekilde bütün yüzeye yayıldığı belirlenmiştir. Normal şartlarda, titanyumun oksijene maruz kalması ile yüzey üzerinde düz bir oksit tabakası oluşmaktadır. Anodik oksidasyonda HF ve NH₄F gibi flor (F) içeren elektrolitler kullanıldığı zaman kompakt titanyum dioksit tabakasının yerine titanyum dioksit nanotüpleri oluşmaktadır. Titanyumun flor içeren bir elektrolit çözeltisi içerisinde oksitlenmesi sırasında, flor iyonları O²⁻ ile yarışmakta ve yüzeyde TiF₆²⁻ kompleksi oluşumu ile yüzey üzerinde çözülme

başlamaktadır. Uygulanan gerilim ile düşük iyonik çapa sahip olan flor iyonu, TiO_2 tabakası içine girerek ilerlemektedir. Böylece titanyum yüzeyinin üzerinde içe doğru büyüyen gözenekler meydana gelmektedir. Nanotübüler yapının oluşum mekanizması bu gözeneklerle ilişkilidir [92]. Nanotübüler yapı uygulanan elektrolitin konsantrasyonu, elektrolitin cinsi, akım yoğunluğu, sıcaklık ve voltaj gibi parametrelere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [93,94]. Nanotübüler yapı, anodize olmamış yüzeylere kıyasla daha yüksek yüzey alanı sağlamaktadır. Biyomalzeme yüzeyindeki böyle bir artış adeziv bağlanmalar için önemli avantajlar sağlamaktadır. Literatürde de anodizasyon sonrası titanyum oksit nanotüplerinin oluşumu pek çok çalışmada rapor edilmektedir. Sarıca [95], 20 °C'de 45 dakika boyunca 20V'luk anodizasyon işlemi sonunda 55-85 nm arasında değişen iç yarıçapa sahip titanyum oksit nanotüplerinin oluşumunu rapor etmiştir. Schultze ve ark. [96] 20V'dan daha düşük gerilim uygulanan anotlama işleminde yüzey üzerinde amorf yapıda TiO_2 oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Zhitomirsky ve ark. [97] anodizasyon işleminde uygulanan gerilimin artması ile yüzeyde hızlı bir birikim olduğunu ve yüksek gözenekli tübüler yapı oluşumunu rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise 10 V'luk anodizasyon işleminde nanotübüler yapının oluşum aşamasında olduğu, 20 V'luk uygulamada sıkı ve düzenli tübüler yapıların elde edildiğini, 30 V'da ise dağınık yapıda nanotüplerin oluştuğu rapor edilmiştir [98]. Benzer bulgular saptayan bu literatür çalışmalarında elde edilen nanotübüler yapının geniş yüzey alanı sağladığı ve yüzey üzerinde hücre adezyonu için potansiyel bölgeler oluştuğu bildirilmiştir.

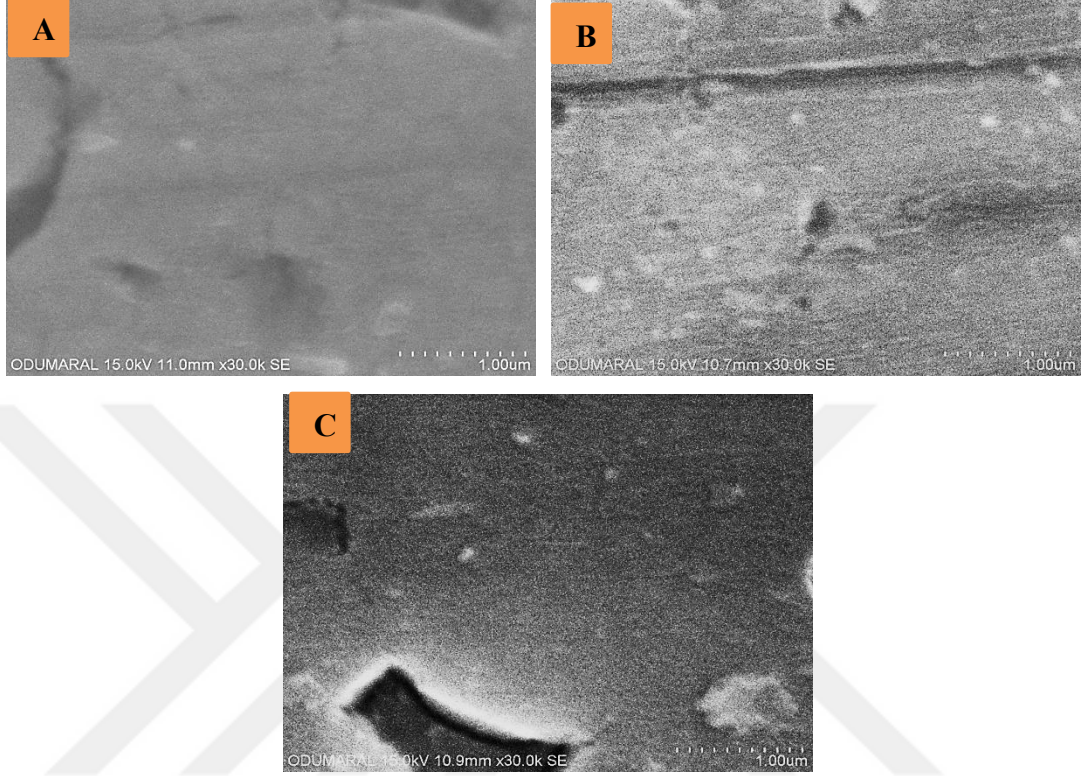


Şekil 4.1. SEM analizleri a. Ti6Al4V, b. Ti6Al4V-20V

Çalışmanın devamında anodik oksidasyonla üretilen nanotübüler yüzeyler TB yöntemi kullanılarak Ag ile kaplanmıştır. TB sonrasında elde edilen Ag kaplanmış Ti6Al4V yüzeylerin SEM analizleri Şekil 4.2’de verilmiştir. Uygulanan TB koşullarına göre yüzeyin farklı kalınlıklarda Ag ile kaplandığı belirlenmiştir. TB yöntemi kullanılarak Ag ile kaplanan yüzeylerde pürüzlü nanotabakalar oluştuğu gözlenmiştir. Oluşan nano-tabakaların kalınlığının uygulama süresine bağlı olarak 1nm, 3 nm ve 5 nm olarak değiştiği de belirlenmiştir. SEM analizlerinden Ag ile kaplanan tüm yüzeylerin homojen ve pürüzlü bir yapıda olduğu görülmektedir. Ayrıca Ag ile kaplama sonrası anodize yüzeylerde açıkça gözlenen nanotüp yapıların net olarak ayırt edilemediği de gözlenmiştir. Bu durum TB yöntemi ile kaplanan yüzeylerde Ag metalinin nanotübüler yapıları kapatması ile açıklanabilir. TB yöntemi ince filmlerin ve yüzey kaplamalarının üretiminde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. TB kullanılarak Ti6Al4V-20V yüzeyinin Ag ile kaplanması sonrasında anodizasyonla oluşturulan nanotübüler yapı, aratabaka olarak kalmış ve Ag kaplı yüzey canlı ortamla temas edecek ilk tabaka olarak oluşmuştur. AO yöntemi ile Ti6Al4V yüzeyinde oluşturulan nanotübüler ara yapı Ag bağlanma bölgeleri için geniş yüzey alanı sağlamaktadır [99].

TB yöntemi ile üretilen kaplamalarda yüzey özelliklerinin önemli ölçüde geliştiği bilinmektedir. TB kaplamalarda sürtünme, aşınma ve sertlik gibi mekanik özelliklerin başarılı bir şekilde iyileştirilmesi sağlanmıştır. Literatürde TB yöntemi kullanılarak Ag ile kaplanmış Ti6Al4V üretimi ya da karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar kısıtlı olmasına rağmen TB yöntemi kullanılarak farklı malzemelerle kaplanmış Ti6Al4V yüzeylerinin özellikleri bazı çalışmalarda araştırılmıştır. Trivedi ve ark. [100] Ti6Al4V alaşımı üzerinde TB yöntemi kullanarak ürettikleri Ti-Si-N kaplamalarının sütünlü bir morfolojiye sahip olduğunu ve iyi biyouyumluluk sergilediğini rapor etmişlerdir. Zalilah ve ark. [101] Ti6Al4V yüzeyinin TB yöntemi kullanarak Ag+SiN ile kaplanması sonrasında yoğun, kompakt, küçük granüler boyutlar sergileyen homojen tek tabakalı bir yapıya dönüştüğünü ifade etmişlerdir. Sarraf ve ark. [30] nanotübüler yüzeye sahip Ti6Al4V alaşımını TB yöntemi kullanarak Ag₂O ile kaplamış ve TB uygulama süresinin artması ile yüzeyde biriken

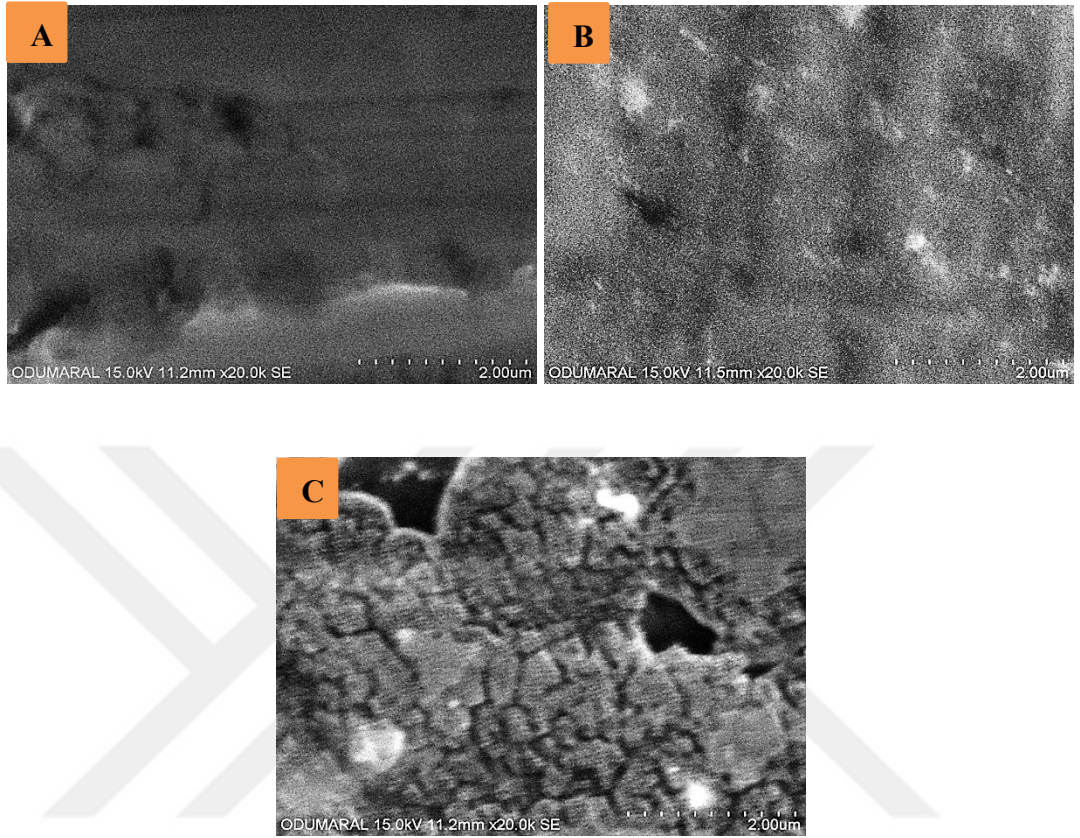
Ag konsantrasyonunun arttığını ve pürüzlü bir yüzey elde edildiğini rapor etmişlerdir.



Şekil 4.2. SEM analizleri a. Ti6Al4V-1nm, b. Ti6Al4V-3 nm, c. Ti6Al4V-5 nm

Anotlanmış Ti6Al4V yüzeyi TB yönteminden farklı olarak EB yöntemi kullanılarak da Ag ile kaplanmış ve yüzey özelliklerindeki değişim SEM analizleri ile incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.3'te verilmiştir. 30, 60 ve 500 saniye boyunca uygulanan EB yöntemi yüzeyin nanopartikül yapıda Ag ile kaplanmasını sağlamıştır. EB uygulaması ile anotlanmış Ti6Al4V yüzeyindeki nanotübüler yapı, Ag ile kaplanmakta ve nanopartiküler yapılar ortaya çıkmaktadır. Biyomalzeme yüzeyinde nanopartiküler bir yapının oluşumu yüzey alanını genişleterek ve pürüzlü bir yapı sağlayarak hücrelerin canlılığını sürdürmesi için önemli bir avantaj sunmaktadır. EB yöntemi Ag kaplamaların hazırlanmasında oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemde bir süspansiyondaki Ag gibi yüklü parçacıklar, uygulanan bir elektrik alanı ile malzeme yüzeyinde biriktirilerek kaplanmış yüzey oluşturulmaktadır. Bu

yöntemle nanotübüler yapı gibi karmaşık şekilli yapılar üzerinde kontrollü ve istenilen özelliklere sahip tek tip kaplamalar üretmek mümkündür [79].



Şekil 4.3. SEM analizleri a. Ti6Al4V-30s, b. Ti6Al4V-60s, c. Ti6Al4V-500s

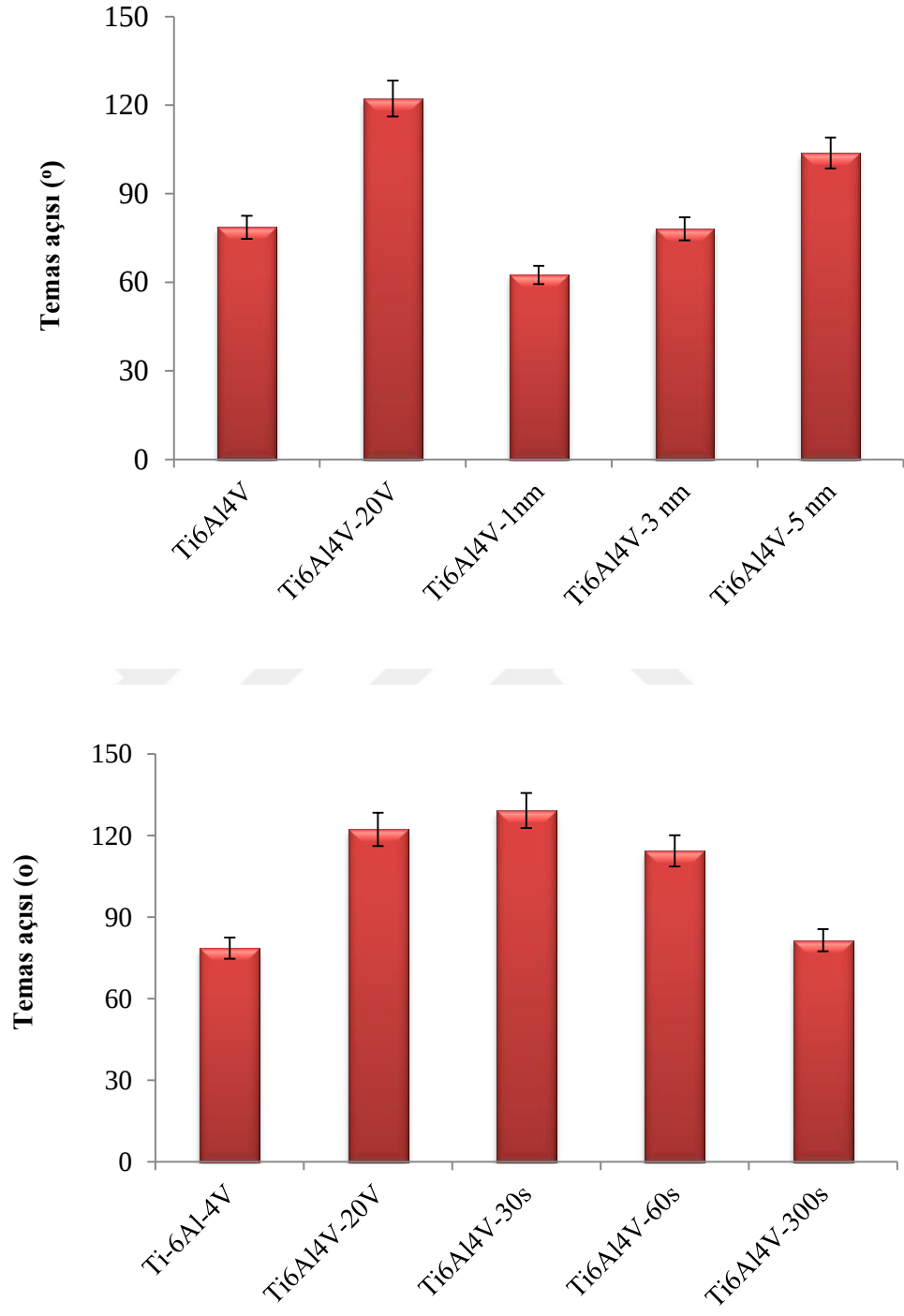
Literatürde EB yöntemi ile kaplanan pek çok biyomalzemenin yüzey özelliklerinin iyileştiği rapor edilmektedir. Lu ve ark. [78] hidroksiapatit-titanyum yüzeyini EB yöntemi kullanarak Ag ile kaplamış ve elde edilen yüzeyin SEM analizleri ile nanopartikül özellikte olduğunu ve yüzeylerin iyi biyouyumluluk, güçlü antibakteriyel özellik sergilediğini belirtmişlerdir. Chudinova ve ark. [29] Ti6Al4V alaşımının EB yöntemi kullanarak kalsiyum fosfat ile kaplanması sonucunda SEM analizlerinden yüzeyin nanopartikül özellikte olduğunu belirlemiş ve bu yüzeyin mezenşimal hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada Surmeneva ve ark. [33] Ti6Al4V yüzeyinin Ag ile kaplanması sonrasında yüzeyde partiküler bir yapının oluştuğunu, yüzey pürüzlülüğünün ve hidrofilik özelliğinin arttığını rapor etmişlerdir. Sonuç olarak literatürdeki bulgular bu çalışmada elde edilen sonuçları destekler niteliktedir ve EB yöntemi ile yüzeyde

oluşturulan nanopartikül yapıdaki Ag kaplamaları yüzey özelliğini önemli derecede iyileştirmektedir.

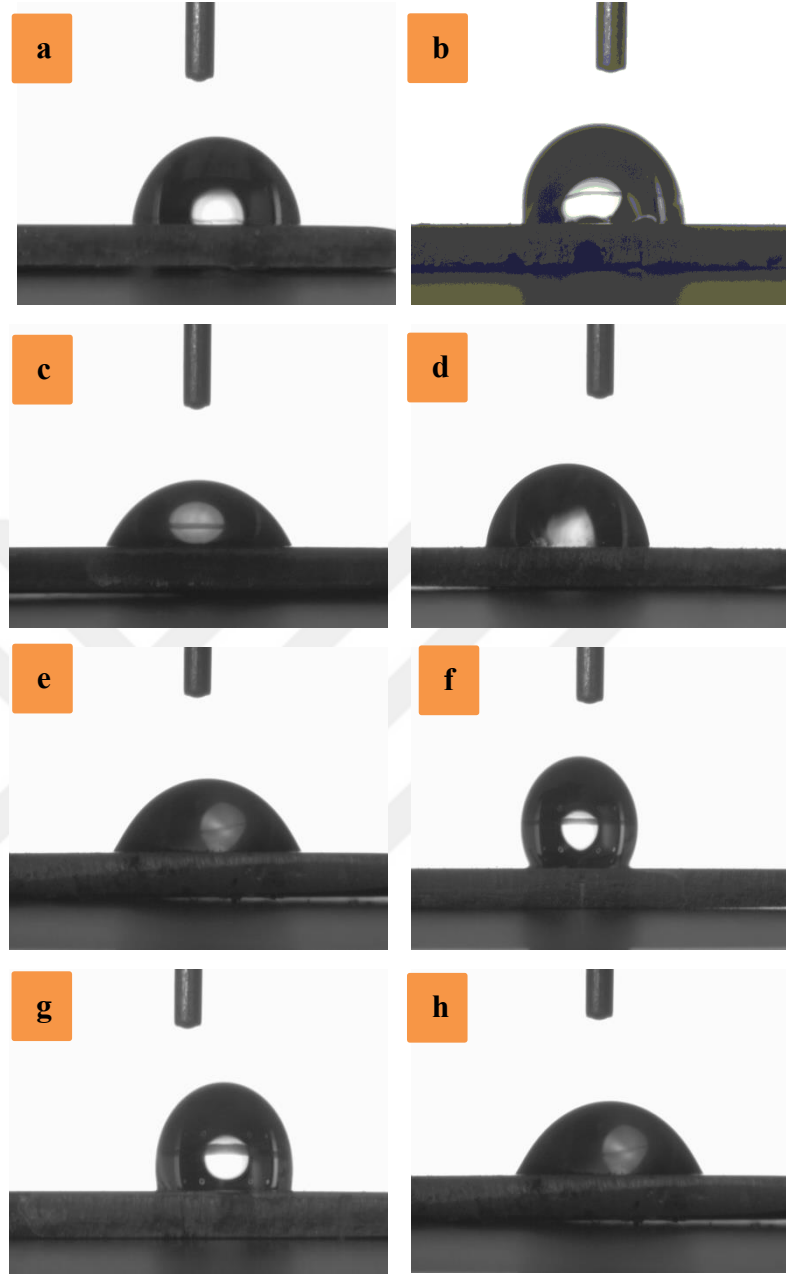
4.2. Temas Açısı Ölçümleri

Ti6Al4V ve yüzeyi çeşitli yöntemlerle modifiye edilen Ti6Al4V kaplamaların temas açıları Şekil 4.4 ve 4.5'te verilmiştir. Temas açısı ölçümleri sonrasında Ti6Al4V yüzeylerinin su ile temas açısının $78,6^\circ$, anodik oksidasyonla üretilen Ti6Al4V-20V örneklerinde ise $122,25^\circ$ olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç 20V'luk anodik oksidasyon uygulamasının su ile temas açısında 1,55 katlık bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Termal buharlaştırma yöntemi kullanılarak 1nm, 3 nm ve 5 nm Ag kaplı Ti6Al4V yüzeylerin temas açılarının hem Ti6Al4V hemde Ti6Al4V-20V yüzeylerine kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. En düşük temas açısı Ti6Al4V-1 nm yüzeyleri ile elde edilmiştir ve Ag kaplama kalınlığının artması ile suya karşı ölçülen temas açılarının arttığı belirlenmiştir. 1nm, 3nm ve 5 nm Ag kaplı Ti6Al4V yüzeyler için su ile temas açısı sırasıyla $62,45^\circ$, $78,13^\circ$ ve $103,81^\circ$ olarak bulunmuştur. EB yöntemi ile hazırlanan yüzeylerde uygulama süresine bağlı olarak temas açılarında değişimler gözlenmiştir. Uygulama süresi arttıkça temas açılarının azaldığı tespit edilmiştir. EB yöntemi ile 30 saniye süresince Ag ile kaplanan Ti6Al4V yüzeylerin temas açılarında 500 saniye uygulama yapılan yüzeylere kıyasla 1,58 katlık bir azalma tespit edilmiştir. Suyu karşı elde edilen temas açılarındaki bu değişimler TB ve EB yöntemi ile yüzeylerde oluşan nanotabaka ve nanopartiküler yapıların oluşumu ile ilişkilendirilebilir.

Bu çalışmada elde edilen temas açısı ölçümleri ve SEM analizleri birlikte değerlendirildiğinde yüzey morfolojisinin temas açısını önemli derecede etkilediği gözlenmiştir. EB uygulaması ile üretilen Ag kaplı Ti6Al4V örneklerinin yüzeyinde nanopartikül yapıların olduğu SEM analizleri ile ortaya konmuş ve yüzeyin pürüzlü bir yapıya sahip olduğu da belirlenmiştir. Temas açıları incelendiğinde Ag kaplama sonrasında temas açılarının azaldığı ve uygulama süresi arttıkça temas açısındaki azalmanın da devam ettiği belirlenmiştir. Bu sonuç yüzey pürüzlülüğünün temas açısı üzerinde önemli bir etkisi olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.4. Ti6Al4V ve yüzeyi çeşitli yöntemlerle modifiye edilen Ti6Al4V kaplamaların temas açıları



Şekil 4.5. Ti6Al4V ve yüzeyi çeşitli yöntemlerle modifiye edilen Ti6Al4V kaplamaların temas açısı görüntüleri a.Ti6Al4V, b. Ti6Al4V-20V, c. Ti6Al4V-1nm, d. Ti6Al4V-3 nm, e. Ti6Al4V-5 nm, f. Ti6Al4V-30s, g. Ti6Al4V-60s, h. Ti6Al4V-500s

Yüzey pürüzlülüğü ve temas açısı arasındaki ilişki literatürdeki pek çok çalışmanın da konusunu oluşturmaktadır. Surmeneva ve ark. [33] Ag ile kaplanan Ti6Al4V yüzeylerini profilometre ile analiz etmiş ve girintili çıkıntılı ve oldukça pürüzlü bir yüzeye sahip olduğunu ve Ag kaplama sonrasında temas açılarında önemli azalmalar olduğunu da rapor etmişlerdir. Yüzey pürüzlülüğünün artması ile hidrofilik özelliğin azalması Cassie – Baxter (CB) modeli ile açıklanabilir. CB modeli ile kimyasal olarak heterojen bir yüzeyde su damlasının oluşturduğu temas açısı θ_c olarak tanımlanmakta ve sıvının pürüzlü yüzeydeki oluklara girmediği ve hava boşlukları bıraktığı için yüzeyde yayılmasının azaldığı ve temas açısının artabileceği ifade edilmektedir. Kısaca süperhidrofobik yüzeylere su damlacıkları yerleştiğinde, mikro boyutlardaki gözenek yapıları arasındaki boşluklar su ile tamamen ıslatılmamakta hava ile dolmakta ve temas açısı artmaktadır [102].

Bu çalışmada anodizasyon işleminin temas açısını önemli derecede etkilediği belirlenmiştir. Benzer şekilde Gao ve ark. [103] anodizasyon işlemi sonrasında hidrofilik karakterdeki Ti6Al4V yüzeylerinin hidrofobik özellik kazandığını ve su ile $158,5^\circ \pm 1,9^\circ$ ’luk bir temas açısı elde edildiğini rapor etmişlerdir. Yüzeydeki hidrofilik özelliğin azalmasını anodizasyon uygulama süresinin artması ile artan yüzey pürüzlülüğü ile ilişkilendirmişlerdir. Chudinova ve ark. [29] Ti6Al4V ve elektro biriktirme yöntemi ile Ag kaplanan Ti6Al4V yüzeylerinin temas açılarını ve yüzey enerjilerini karşılaştırmış ve Ag kaplama sonrasında temas açısının önemli derecede değiştiğini ve yüzeyin daha yüksek bir yüzey enerjisine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Elektrokimyasal biriktirme işlemi sonrasında oluşan nanopartiküler yüzeyin yüzey serbest enerjisi ve yüzey gerilimi oluşturarak kimyasal potansiyele katkıda bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Bir biyomateryalin yüzeyi canlı ortamda biyolojik hücreler veya sıvılarla temas eden ilk bileşenidir. Bu nedenle, biyomateryalin biyouyumluluk özelliği yüzey özelliklerinden, özellikle ıslanabilirlik, yüzey kimyası, yüzey enerjisi ve yüzey topografyasından etkilenmektedir. Biyomalzemelerin yüzeyinin karakterizasyonunda temas açısı ölçümleri yüzey enerjisi, ıslanabilirlik, adezyon ve absorpsiyon ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Katı bir yüzeyle düşük miktarda bir sıvının teması durumunda bir damla oluşmakta ve sıvıya teğet olan bir çizginin ve temas ettiği katının

yüzeyinin kesişme açısı temas açısı olarak kabul edilmektedir. Sıvının yüzey gerilimi, yüzeyin kompozisyonu, enerjisi ve pürüzlülüğü temas açısını etkileyen önemli sistem parametreleridir. Düşük bir temas açısı iyi ıslanabilirliği gösterirken, yüksek temas eğilimi zayıf ıslatılabilirliğe işaret etmektedir. Katı yüzeylerin 0°-90° arasındaki temas açısı hidrofilik karakteri temsil ederken 90°-180° açılar hidrofobik karaktere işaret etmektedir. Düşük temas açılarının elde edildiği yüzeylerde sıvının tüm yüzey üzerinde kolayca akması ve katı yüzeye yapışması gerçekleşmektedir. Bir sıvının katı yüzeydeki akma kabiliyeti, yüzeyin sertliği, yüzeyin temizliği, sıvı ve atmosferik katının yüzey enerjisi gibi bir dizi faktörden etkilenmektedir. Bu faktörler sıvının yüzeye yayılması için itici bir güç oluşturmaktadır. Düşük temas açısı yüksek derecede ıslanabilirliği ve aynı zamanda gelişmiş biyouyumluluğa da işaret etmektedir [104-106]. Tzoneva ve ark. [107] fibronektin, fibrinojen ve kollajen gibi hücre dışı matris proteinlerinin yüzeye yapışma özelliklerini hidrofilik ve hidrofobik karakterdeki iki yüzeyde test etmiş ve sonuç olarak proteinlerin hidrofobik yüzeylere adezyonunun daha düşük olduğunu saptamışlardır. Hidrofobik yüzeye yapışan proteinlerde konformasyonel değişim de olduğunu ve bu değişimin endotel hücrelerin yerleşmesi için gerekli olan yapışma bölgelerine erişimi kısıtlandığını da rapor etmişlerdir.

4.3. Antibakteriyel Aktivite

Ti6Al4V ve yüzeyi çeşitli yöntemlerle modifiye edilen Ti6Al4V kaplamaların antibakteriyel özelliği bakteri adezyonu ile test edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. Biyomalzeme yüzeylerine bakteri adezyonu *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri kullanılarak test edilmiştir. Anodizasyon yöntemi ile modifiye edilerek yüzeyinde nanotübüler yapıların oluşturulduğu Ti6Al4V-20V malzemelerde yüzeye adeze olan *E. coli* ve *S. aureus* canlılığında azalma olduğu saptanmıştır. Anodize edilmemiş Ti6Al4V yüzeye kıyasla Ti6Al4V-20V yüzeylerde *E. coli* canlılığında %37,4, *S. aureus* canlılığında %30,2 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. Bu azalma anodizasyon sonrasında yüzeyde oluşan nanotüp yapıları ve bu yapılardaki florür varlığı ile ilişkilendirilebilir. NH₄F’ye daldırılarak gerçekleştirilen anodizasyon işlemi, yüzeyde kimyasal modifikasyon ve artmış flor

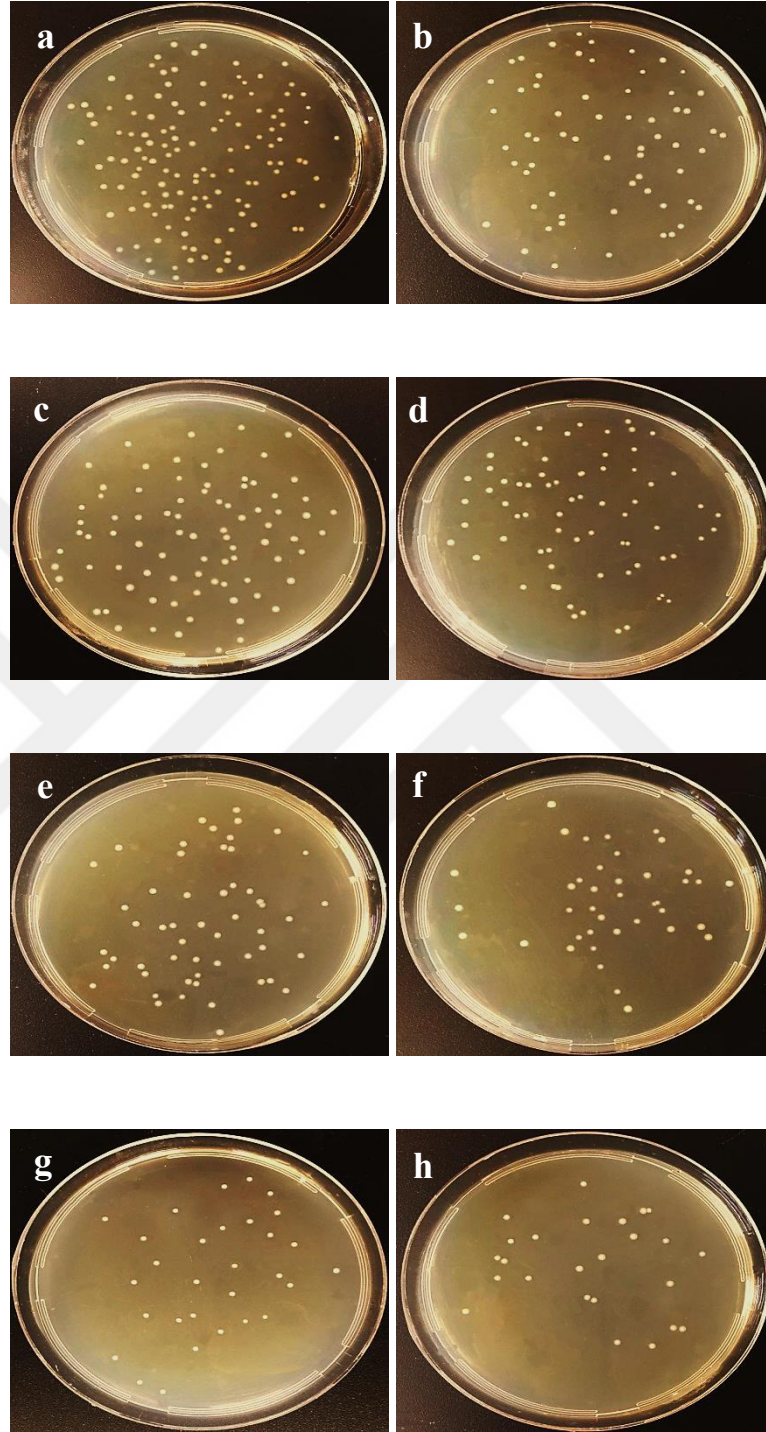
içeriği sağlamaktadır. Benzer şekilde Roguska ve ark. [108] TiO₂ yüzeylerde nanotüp yapılarının oluşturulması ile yüzeye *S. epidermidis* adezyonunun ve bakteriyel biyofilm oluşumunun azaldığını rapor etmişlerdir. Arenas ve ark. [109] yüksek florür yüzdesine sahip anotlanmış nanotüpler yapıların *S. aureus* ve *S. epidermidis* klinik suşlarına karşı modifiye edilmemiş Ti yüzeylere kıyasla artmış antibakteriyel özelliğe sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Lin ve ark. [110] anotlanmış ve florür kullanılarak üretilmiş nanotüp yüzeyde in vitro ve in vivo *S. aureus* canlılığının anodize edilmemiş Ti yüzeyine kıyasla azaldığını bildirmişlerdir.

Nanotüp yapıda yüzey özelliklerine sahip titanyum implantlar düşük elastik modülleri ve benzersiz topografyaları nedeniyle biyomalzeme biliminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüzeydeki nanotüplerin yarı açık yapısı, antibakteriyel ajanların yüzeye eklenmesine olanak sağlamakta ve yüzeyde depolanabilmesi için de rezervuar görevi üstlenebilmektedir [111,112]. Biyomedikal implantların yüzeyine antibakteriyel ajanların modifiye edilmesi üzerine pek çok çalışma mevcuttur. Yüzeye uygulanan antibakteriyel ajanların özellikle antibiyotiklerin hızlı salınımı güvenlik endişelerine neden olmakta ve dirençli suşların ortaya çıkma olasılığını da beraberinde getirmektedir [113]. Ag, antibiyotiklerin aksine pek çok bakteri ve mantar türlerine karşı etkili olan geniş spektrumlu spesifik olmayan bir bakterisittir. Ag, fizyolojik ortamdaki yüksek stabilitesi ve dirençli suşlar geliştirme potansiyelinin düşük olması nedeniyle antibakteriyel ajanlar arasında oldukça dikkat çekicidir. Bununla birlikte Ag'nin belirli bir dozun üzerinde sitotoksik etki göstermesi sadece terapötik doz aralığında kullanımına imkan sağlamaktadır. İmplantlara uygun miktarda Ag ekleyerek ve salımını kontrol ederek, mükemmel antibakteriyel özellikte ve orijinal biyolojik işlevlerini kaybetmeyen biyomalzeme yüzeyleri elde etmek mümkündür [114,115].

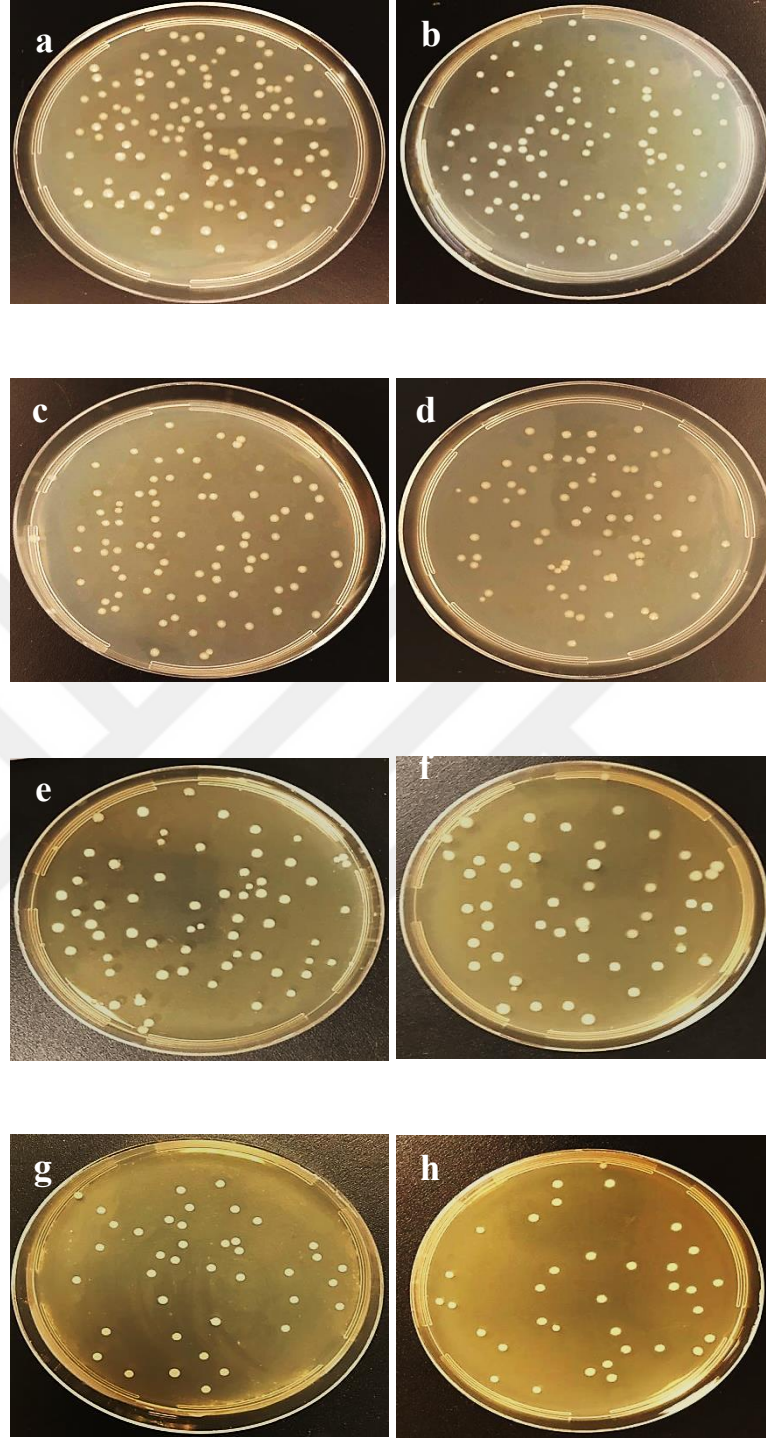
Bu çalışmanın devamında TB yöntemi kullanılarak 1nm, 3 nm ve 5 nm Ag kaplı nanotabaka yapıda Ti6Al4V yüzeyler ile elektro biriktirme yöntemi kullanılarak 30s, 60s ve 500s süreyle Ag kaplanan nanopartikül yapıda Ti6Al4V yüzeyler elde edilmiştir. Ag kaplı tüm yüzeylerin antibakteriyel etkisi *E. coli* ve *S. aureus* ile test edilmiştir. Ag kaplı tüm yüzeylerin Ti6Al4V ve Ti6Al4V-20V yüzeylerine kıyasla daha iyi antibakteriyel özellik sergilediği belirlenmiştir. Termal buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan 1nm, 3 nm ve 5 nm Ag kaplı Ti6Al4V yüzeylerde *E.coli*

canlılığında Ti6Al4V yüzeyine kıyasla sırasıyla %37,4, %52,7 ve %58 oranlarında azalma belirlenmiştir. Aynı yüzeyler için *S. aureus* canlılığında %30,2, %38,4 ve %45,7 oranlarında azalma tespit edilmiştir. Test edilen tüm yüzeyler içerisinde en yüksek antibakteriyel aktivite EB yöntemi ile hazırlanan yüzeyler ile elde edilmiştir. 30 saniye EB uygulanarak Ag kaplanan Ti6Al4V yüzeylerde *E. coli* canlılığının Ti6Al4V ve Ti6Al4V-20V yüzeylere kıyasla %69,5 ve %51,2 oranında azaldığı tespit edilmiştir. *S. aureus* canlılığında ise bu azalmalar %61,2 ve %44,4 olarak hesaplanmıştır. EB uygulama süresinin 60 saniyeye arttırılması ile antibakteriyel özelliğin daha da iyileştiği gözlenmiştir. 60 saniye süreyle Ag ile kaplanan Ti6Al4V yüzeyde aktif *E.coli* koloni sayılarında 30 saniye EB uygulanan yüzeye kıyasla %25, *S. aureus* kolonilerinde ise %22 azalma belirlenmiştir. 500s EB uygulanarak Ag kaplanan yüzeylerde de *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel özellikte belirgin bir artış olduğu fakat bu artışın uygulama süresindeki artış ile doğru orantılı olmadığı da belirlenmiştir.

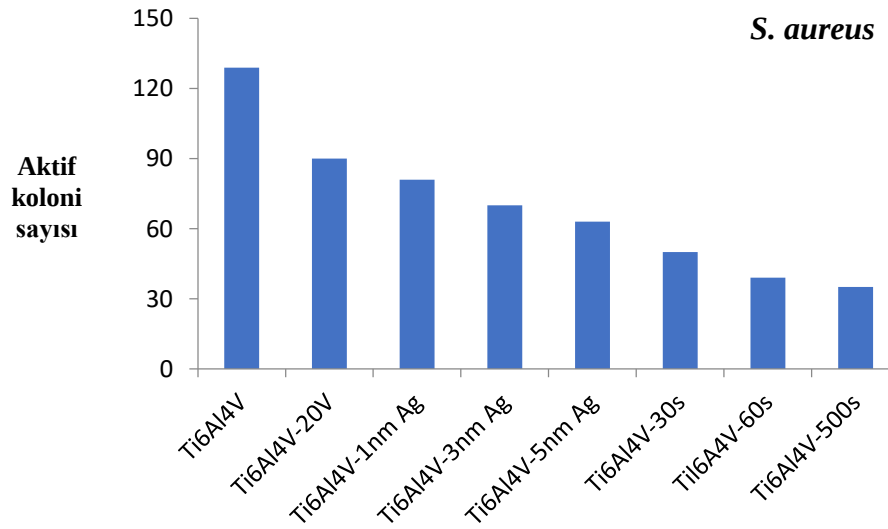
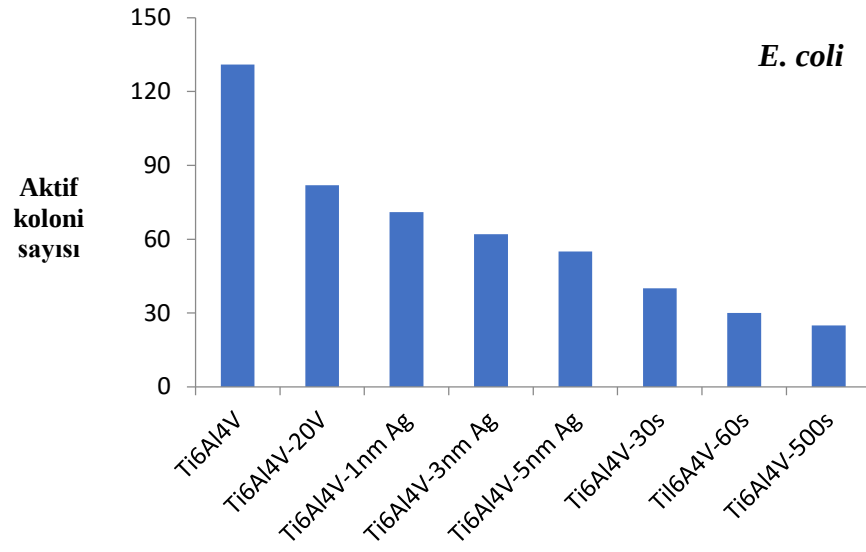
Literatürde biyomalzeme yüzeylerinin Ag ile modifikasyonu sonucunda antibakteriyel özelliğin arttığını rapor eden pek çok çalışma mevcuttur. Zhang ve ark. [32] mikroark oksidasyonu ve iyon implantasyonu ile üretilen ve Ag partikülleri ile kaplanmış TiO₂ yüzeyinin *S. aureus* şusuna karşı yüksek antibakteriyel etki sergilediğini belirtmişlerdir. Durdu ve ark. [116] TiO₂ yüzeylerinin Ag ile kaplanması sonrasında yüzeye yapışan *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin aktif koloni oranlarında sırasıyla %67,2 ve %57,8 azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Roguska ve ark. [108] nanotüp yapıli titanyum oksit ve Ag kapli titanyum oksit yüzeylerine adeze olan *S. epidermidis* suşlarının canlılığı araştırılmışlardır. Titanyum, nanotüp yapıli titanyum oksit ve Ag kapli nanotüp yapıli titanyum oksit yüzeylere yapışan canlı hücre sayısını sırasıyla 55555±4721, 42825±2581 ve 45089±13362 olarak saptamışlardır. Sonuç olarak yüzeyde oluşan nanotüp yapılarının bakteri canlılığında azalmaya neden olduğunu, nanotüp yapılara eklenen Ag metalinin ise bakteri canlılığında ileri düzeyde bir gerilemeye neden olduğunu rapor etmişlerdir.



Şekil 4.6. Re-kültürasyon sonrasında aktif *E. coli* kolonileri a. Ti6Al4V, b. Ti6Al4V, c. Ti6Al4V-1nm Ag, d. Ti6Al4V-3 nm Ag, e. Ti6Al4V-5 nm Ag, f. Ti6Al4V-30s Ag, g. Ti6Al4V-60s Ag, h. Ti6Al4V-500s



Şekil 4.7. Re-kültürasyon sonrasında aktif *S.aureu* kolonileri a. Ti6Al4V, b. Ti6Al4V, c. Ti6Al4V-1nm Ag, d. Ti6Al4V-3 nm Ag, e. Ti6Al4V-5 nm Ag, f. Ti6Al4V-30s Ag, g. Ti6Al4V-60s Ag, h. Ti6Al4V-500s



Şekil 4.8. Yüzeye adeze olan *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin re-kültürasyonu sonrasında aktif koloni sayıları

Ag kaplama kalınlığının artması ile yüzeylerin antibakteriyel aktivitesinin de önemli derecede artması antibakteriyel test sonuçlarından elde edilen önemli diğer bir bulgudur. TB yöntemi ile hazırlanan Ag kaplı Ti6Al4V yüzeylerde kaplama kalınlığının 1 nm'den 5 nm'ye arttırılması ile aktif *E. coli* koloni sayılarında %22,5, *S. aureus* koloni sayısında ise %22,2 kat azalma saptanmıştır. Literatürde Ag kaplı titanyum yüzeylerin antibakteriyel etkisinin kaplama kalınlığı ile arttığını rapor eden benzer sonuçlar mevcuttur. Thukkaram ve ark. [117] %5,8 ve %3,5 Ag içeren titanyum yüzeylerin Ag içermeyen ve %1,5 Ag içeren yüzeylere kıyasla *E. coli* ve *S. aureus* büyümesinde tam bir inhibisyon sağladığını rapor etmişlerdir. Benzer bir sonuç EB yöntemi kullanılarak hazırlanan yüzeylerde de elde edilmiştir. EB uygulama süresinin 30 saniyeden 60 saniyeye arttırılması ile re-kültürasyon sonrasında *E. coli* canlılığında %25, *S. aureus* canlılığında ise %22 azalma saptanmıştır. Uygulama süresinin 500 saniyeye arttırılması her iki bakteriye karşı antibakteriyel aktiviteyi güçlendirmiş fakat doğru orantılı bir artış sağlamamıştır.

Ag kaplı yüzeylerin antibakteriyel etkisi Ag'nin bakteri hücreleri üzerindeki toksik etkisi ile açıklanabilir. Ag bakteri hücrelerindeki solunum enzimlerinde bulunan tiyol grupları ile etkileşime girerek enzimleri inhibe etmekte ve solunum reaksiyonlarını durdurmaktadır [118]. Ag'nin bakteri hücresi ile etkileşiminden sonra protein molekülleri denatüre olur ve DNA sentezi bloke edilir. Bakterilerin Ag kaplı yüzeylerle doğrudan teması, bakteri zarında hücre ölümüne yol açan fiziksel hasara neden olmaktadır. Pozitif yüklü Ag ile negatif yüklü bakteri hücreleri arasındaki elektrostatik etkileşim de bakterisidal etkiye neden olmaktadır [119,120]. Bakteri hücresindeki bu etkilerin bir sonucu olarak hücre döngüsü bozulur, proliferasyon azalır ve sonuç olarak koloni oluşumunda azalma gerçekleşir. Ag'nin *E. coli*'de fosfat alımını inhibe ederek, fosfat, mannitol, süksinat, prolin ve glutamat gibi moleküllerin salınımını durdurarak bakteriyostatik/sidal etki gösterdiği bilinmektedir. *S. aureus*'ta ise Ag'nin peptidoglikan yapıdaki bağlara, glikan zincirlere ve aminoasitlere zarar vererek bakteri büyümesini önlediği rapor edilmektedir [121,122].

Bu çalışmada elde edilen önemli sonuçlardan biri de Ag kaplı Ti6Al4V yüzeylerin gram negatif *E. coli*'ye karşı gram pozitif *S. aureus*'a kıyasla daha güçlü antibakteriyel etki göstermesidir. En yüksek antibakteriyel aktivitenin gözlemlendiği

500 saniye EB uygulaması ile Ag kaplanan yüzeylerde *E. coli* canlılığında %81 azalma belirlenirken, *S. aureus* canlılığında bu azalma %72,9 olarak tespit edilmiştir. Antibakteriyel aktivitedeki bu seçicilik gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasındaki hücresel farklılıklar ile açıklanabilir. Gram pozitif *S. aureus*'taki kalın peptidoglikan tabakası, Ag iyonlarının bakteriyel hücre duvarı boyunca taşınmasını önlemekte ve Ag'nin toksik etkilerini azaltmaktadır. Bu sonuç literatürdeki benzer çalışmalarla da desteklenmektedir. Durdu ve ark. [116] Ag kaplı- TiO_2 yüzeylerine adeze olan *E. coli* canlılığında %67,2 ve *S. aureus* canlılığında ise %57,8 azalma olduğunu, Ag'nin gram negatif bakteride daha etkin olduğunu rapor etmişlerdir. Feng ve ark. [120] *E. coli*'nin Ag toksisitesine karşı *S. aureus*'a göre daha duyarlı olduğunu ve bu sonucun *S. aureus*'un savunma sistemi ve hücre yapısı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyomalzemeler, insan vücudunda işlevini yitirmiş doku ve organların görevini üstlenmek ya da desteklemek için kullanılmaktadır. Titanyum ve alaşımlarının kimyasal olarak inert olması, korozyona karşı dirençli ve yüksek biyouyumluğa sahip olması biyomalzeme olarak kullanımını yaygınlaştırmaktadır. Titanyum alaşımlarından olan Ti6Al4V ortopedi, dental ve beyin cerrahisi uygulamalarında kullanılan biyomalzemelerin çoğunun hammaddesi olarak kullanılmakta ve yüksek dayanıklılık, korozyona dirençli olması, kırılmadan esneyebilme ve yüksek biyolojik uyumluluk en önemli özelliklerindendir.

Bu çalışmada, üç farklı yöntem kullanılarak Ti6Al4V kaplamaların yüzey özellikleri iyileştirilmiş ve her bir modifikasyondan sonra yüzey özellikleri karakterize edilmiştir. Anodizasyon tekniğiyle kaplanan yüzeylerin nanotübüler yapıda olduğu ve su ile temas açısının arttığı belirlenmiştir. TB ve EB yöntemleriyle Ag ile kaplanan Ti6Al4V yüzeylerin pürüzlü bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yüzeylerin su ile yaptığı temas açılarında ve ıslanabilirlik özelliklerinde önemli değişimler olduğu saptanmıştır. Biyomalzeme yüzeyinin ıslanabilirliği biyolojik ortam ile uyumluluğu sağlayarak implant-hücre etkileşimini düzenlemektedir. Ag ile kaplanan tüm yüzeylerin antibakteriyel özellikte olduğu, yüzeylerle temas eden *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin aktif koloni canlılığında azalma olduğu belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, modifikasyon yöntemlerinin biyomalzeme yüzeyinde istenilen özelliklerin oluşturulmasında önemli bir role sahip olduğu, biyomalzeme yüzeyinin Ag ile kaplanması sonucu yüksek antibakteriyel özelliğin oluşturulabileceği belirlenmiştir. Bu sonuç, nanoteknoloji ve imalat yöntemlerindeki gelişmelere bağlı olarak biyomalzemelere uygulanan yüzey modifikasyon yöntemlerinin biyouyumlu ve yüksek performanslı biyomalzemelerin geliştirilmesine imkan sağladığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Pasinli, A., Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler. Makine Tek. Elekt. Derg., 4(2), 25-34, 2004.
- [2] Gümüřdereliođlu, M., Biyomalzemeler. Tübitak Bil. Tek. Derg., 7, 2002.
- [3] Black, J., Biological performance of materials, 2nd ed. New York: M. Dekker, Inc., 1992.
- [4] Park, J. B., & Kim, Y. K., Metallic biomaterials, The Biomedical Engineering Handbook:Second Edition. CRC Press LLC, 2000.
- [5] Ask, M., Lausmaa, J., & Kasemo, B., Preparation and surface spectroscopic characterization of oxide films on Ti6Al4V. App. Surf. Sci., 35(3), 283-301, 1989.
- [6] Zeng, L., & Bieler, T. R., Effects of working, heat treatment, and aging on microstructural evolution and crystallographic texture of α' , α'' , α and Q phases in Ti-6Al-4V wire. Mat. Sci. Eng. A., 392, 403-414, 2005.
- [7] Pekřen, C., & Dođan, A., İmplant dayanımı Türk Ort. Travm. Bir.i Dern., 10-122, 2011.
- [8] Geetha, M., Singh, A. K., Asokamani, R., & Gogia, A. K., Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopedic implants–A review. Prog. Mater. Sci., 54, 397-425, 2009.
- [9] Kaur, M., & Singh, K., Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. Mater. Sci. Eng. C., 102, 844-862, 2019.
- [10] Sittig, C., Textor, M., Spencer, N. D., Wieland, M., & Vallotton, P. H., Surface characterization. J. Mater. Sci. Mater. Med., 10(1), 35-46, 1999.
- [11] Liu X., Chu, P. K., & Ding, C., Surface modification of titanium, titanium alloys and related materials for biomedical applications. Mater. Sci. Eng. R., 47, 49-121, 2004.
- [12] Costa, B. C., Tokuhara, C. K., Rocha, L. A., Oliveira, R. C., Lisboa-Filho, P. N., & Pessoa, J. C., Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. Mater. Sci. Eng. C., 96, 730-739, 2019.

- [13] Keleşoğlu, E., Sert kaplamalar üretim teknikleri ve özellikleri. İstanbul YTÜ., 1-131, 2011.
- [14] Havıtcıoğlu, H., İmplant malzemelerinin yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi. TOTBİD Derg., 10(2), 178-183, 2011.
- [15] Al-Swayih, A. A., The electrochemical behavior of titanium improved by nanotubular oxide formed by anodization for biomaterial applications: A Review. Orient. J. Chem., 32(6), 2841-2856, 2016.
- [16] Binyamin, G., Shafi, B. M., & Mery, C. M., Biomaterials: a primer for surgeons. In Seminars in pediatric surgery, 15, 276-283, 2006.
- [17] Cook, E., F. W., Lemons, J. E., & Ratner, B. D., Properties of materials. In Biomater. Sci., 11-35, 1996.
- [18] Shackelford, J. F., & Clode, M. P., Introduction to materials science for engineers. sutlib2.sut.ac.th, 2005.
- [19] Niinomi, M., Metallic biomaterials. J. Art. Org., 11(3), 105, 2008.
- [20] Tüylek, Z., Nanotıp ve biyomateryal kullanımı. Müh. Beyinler Derg., 1(2), 41-52, 2017.
- [21] Güven, Ş. Y., & Çetin, H., Metalik biyomalzemeler ve implantlar. S.D.Ü. 15. Yıl Mühendislik Mimarlık Semp., SDÜ, (s. 175-181), 2007.
- [22] Güven, Ş. Y., Ortopedik malzemelerin biyouyumlulukları ve mekanik özelliklerine göre seçimi. Ulusal Tasarım İmalat ve Analiz Kong., Balıkesir, (s.472-484), 2010.
- [23] Wapner, K. L., Implications of metallic corrosion in total knee arthroplasty. Clin. Orth. Rel. Res., 271, 12-20, 1991.
- [24] Sutherland, D. S., Forshaw, P. D., Allen, G. C., Brown, I. T., & Williams, K. R., Surface analysis of titanium implants. Biomaterials, 14, 893-899, 1993.
- [25] Kasemo, B., Biocompatibility of Ti implants. Jour. Prosth. Dent., 6, 832-837, 1983.
- [26] Williams, J. C., Titanium. Eng. Mat. Process., Springer. 2007.
- [27] Günyüz, M., Uğurlu, F., Baydoğan, M., Şener, C., & Çimenoglu, H., Mikro ark oksidasyon işlemi uygulanmış Ti6Al4V alaşımlarının in-vivo biyouyumluluk özelliklerinin incelenmesi. Eng. Mach. Mag., 600, 2010.

- [28] Guleryuz, H., & Cimenoglu, H., Surface modification of a Ti–6Al–4V alloy by thermal oxidation. *Surf. Coat. Tech.*, 192(2-3), 164-170, 2005.
- [29] Chudinova, E. A., Surmeneva, M. A., Timin, A. S., Karpov, T. E., Wittmar, A., Ulbricht, M., Ivanova, A., Loza, K., Prymak, O., & Koptug, A., Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on additively manufactured Ti6Al4V alloy scaffolds modified with calcium phosphate nanoparticles. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 176, 130–139, 2019.
- [30] Sarraf, M., Dabbagh, A., Razak, B. A., Nasiri-Tabrizi, B., Hosseini, H. R. M., Saber-Samandari, S., & Sukiman, N. L., Silver oxide nanoparticles-decorated tantala nanotubes for enhanced antibacterial activity and osseointegration of Ti6Al4V. *Mater. Design*, 154, 28-40, 2018.
- [31] Hin, T.S., *Engineering Materials for Biomedical Applications*. World Scientific, Singapore, 2004.
- [32] Zhang, P., Zhang, Z. G., & Li, W., Antibacterial TiO₂ coating incorporating silver nanoparticles by microarc oxidation and ion implantation. *J. Nanomater.*, 1–8, 2013.
- [33] Surmeneva, M., Lapanje, A., Chudinova, E., Ivanova, A., Koptug, A., Loza, K., & Rijavec, T., Decreased bacterial colonization of additively manufactured Ti6Al4V metallic scaffolds with immobilized silver and calcium phosphate nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.*, 480, 822-829, 2019.
- [34] Nouri, A., & Wen, C., Introduction to surface coating and modification for metallic biomaterials. In *Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials*. Woodhead Publishing, 3-60, 2015.
- [35] Chou, L., Firth, J. D., Nathanson, D., Uitto, V. J., & Brunette, D. M., Effects of titanium on transcriptional and post-transcriptional regulation of fibronectin in human fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 31, 209-217, 1996.
- [36] García, A. J., Surface modification of biomaterials. In A. Atala, R. Lanza, J. A. Thomson & R. M. Nerem (Eds.), *Principles of regenerative medicine*. Burlington: Academic Press, Elsevier, 656-665, 2008.
- [37] Duan, K., & Wang, R., Surface modifications of bone implants through wet chemistry. *J Mater. Chem.*, 16, 2309-2321, 2006.
- [38] Davies, J. E., Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 28, 5058-5067, 2007.

- [39] Boyan, B. D., Hummert, T. W., Dean, D. D., & Schwartz, Z., Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 17, 137-146, 1996.
- [40] Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y., Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.*, 23, 844-854, 2007.
- [41] Dee, K. C., Puleo, D. A., & Bizios, R., *An introduction to tissue-biomaterial interactions*. Hoboken, NJ: Wiley & Sons Inc., 2002.
- [42] Chang, H. I., & Wang, Y., Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. In D. Eberli (Ed.), *Regenerative medicine and tissue engineering—cells and biomaterials*, 569-588, 2011.
- [43] Chung, T. W., Liu, D. Z., Wang, S. Y., & Wang, S. S., Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials*, 24, 4655-4661, 2003.
- [44] Planell, J. A., Navarro, M., Altankov, G., Aparicio, C., Engel, E., Gil, J., Ginebra, M. P., & Lacroix, D., Materials surface effects on biological interactions. *Advances in regenerative medicine: Springer*, 233-252, 2010.
- [45] Wennerberg, A., Hallgren, C., Johansson, C., & Danelli, S., A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin. Oral Implants Res.*, 9, 11-19, 1998.
- [46] Brett, P. M., Harle, J., Salih, V., Mihoc, R., Olsen, I., Jones, F. H., & Tonetti M., Roughness response genes in osteoblasts. *Bone*, 35, 124-133, 2004.
- [47] Bauer, S., Schmuki, P., Von Der Mark, K., & Park, J., Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces *Prog. Mater. Sci.*, 58(3), 261-326, 2013.
- [48] Sul, Y. T., Johansson, C. B., & Albrektsson, T., Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int. J. Oral Maxillofac Implants*, 17, 625-634, 2002.
- [49] Sul, Y. T., Johansson, C. B., Kang, Y., Jeon, D. G., & Albrektsson, T., Bone reactions to oxidized titanium implants with electrochemical anion sulphuric acid and phosphoric acid incorporation. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.*, 4, 78-87, 2002.
- [50] Deligianni, D. D., Katsala, N., Ladas, S., Sotiropoulou, D., Amedee, J., & Missirlis, Y. F., Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*, 22(11), 1241-1251, 2001.

- [51] Johnston, E. E., & Ratner, B. D., Surface characterization of plasma deposited organic thin films. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, 81(3), 303-317, 1996.
- [52] Hamamoto, N., Hamamoto, Y., Nakajima, T., & Ozawa, H., Histological, histocytochemical and ultrastructural study on the effects of surface charge on bone formation in the rabbit mandible. *Arch. Oral Biol.*, 40, 97-106, 1995.
- [53] Krukowski, M., Shively, R. A., Osdoby, P., & Eppley, B. L., Stimulation of craniofacial and intramedullary bone formation by negatively charged beads. *Int. J. Oral Maxillofac Implants*, 48, 468-475, 1990.
- [54] Bongrand, P., Capo, C., & Depieds, R., Physics of cell adhesion. *Prog. Surf. Sci.*, 12, 217-285, 1982.
- [55] Trommler, A., Gingell, D., & Wolf, H., Red blood cells experience electrostatic repulsion but make molecular adhesions with glass. *Biophys. J.*, 48, 835-841, 1985.
- [56] Fukuzaki, S., Urano, H., & Nagata, K., Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces. *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 163-167, 1996.
- [57] Anselme, K., & Biggerelle, M., Effect of a gold-palladium coating on the long-term adhesion of human osteoblasts on biocompatible metallic materials. *Surf. Coat. Technol.*, 200, 6325-6330, 2006.
- [58] Feng, B., Weng, J., Yang, B. C., Qu, S. X., & Zhang, X. D., Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials*, 24, 4663-4670, 2003.
- [59] Tyrkiel, E., & Deardney, P., A guide to surface engineering terminology. London: The Institute of Materials, 1995.
- [60] Shastri, P., Altankov, G., & Lendlein, A., Advances in regenerative medicine: role of nanotechnology, and engineering principles, Springer, 2010.
- [61] Paital, S. R., & Dahotre, N. B., Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: materials, performance factors, and methodologies. *Mater. Sci. Eng. R.*, 66, 1-70, 2009.
- [62] Xu, L. C., & Siedlecki, C. A., Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 28, 3273-3283, 2007.
- [63] Dietschweiler, C., Protein adsorption at solid surfaces. Term paper. Zürich: Swiss Federal Institute of Technology, 2008.

- [64] Latour, R. A., Biomaterials: protein-surface interactions. In G. L. Bowlin & G. Wnek (Eds.), Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. Taylor & Francis, 1-15, 2005.
- [65] Altankov, G., & Groth, T., Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility. Journal of Materials Science: Mater. Med., 5, 732-737, 1994.
- [66] Oh, S., Daraio, C., Chen, L.H., Pisanic, T.R., Finones, R.R., & Jin, S., Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. J. Biomed. Mater. Res. A, 78, 97, 2006.
- [67] Kuromoto, N. K., Simão, R. A., & Soares, G. A., Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. Mater. Charac., 58(2), 114-121, 2007.
- [68] Saji, V.S., Choe, H.C., & Brantley, W.A., An electrochemical study on self-ordered nanoporous and nanotubular oxide on Ti-35Nb-5Ta-7Zr alloy for biomedical applications. Acta Biomater., 5, 2303, 2009.
- [69] Ghicov, A., & Schmuki, P., Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO₂ nanotubes and other self-aligned MOx structures. Chem. Comm., 20, 2791, 2009.
- [70] Yu, W., Qiu, J., Xu, L., & Zhang, F., Corrosion behaviors of TiO₂ nanotube layers on titanium in Hank's solution. Biomed. Mater., 4, 065012, 2009.
- [71] Mohan, L., Anandan, C., & Rajendran, N., Electrochemical behaviour and bioactivity of self-organized TiO₂ nanotube arrays on Ti-6Al-4V in Hanks' solution for biomedical applications. Electrochim. Acta, 155, 411, 2015.
- [72] Zykova, A., Safonov, V., Walkowich, J., Rogowska, R., & Yakovin, S., Corrosion properties of nitride, oxide and multilayer coatings on stainless steel and titanium-based substrates. In Journal of Physics: Conference Series, 223, 12024, 2010.
- [73] Kodama, A., Bauer, S., Komatsu, A., Asoh, H., Ono, S., & Schmuki, P., Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite. Acta Biomater., 5, 2322, 2009.
- [74] Ferraris, S., & Spriano, S. J. M. S., Antibacterial titanium surfaces for medical implants. Mater. Sci. Eng. C, 61, 965-978, 2016.
- [75] Hori, K., & Matsumoto, S., Bacterial adhesion: from mechanism to control. Biochem. Eng. J., 48(3), 424-434, 2010.

- [76] Tranquillo, E., & Bollino, F., Surface Modifications for Implants Lifetime Extension: An overview of sol-gel coatings. *Coatings*, 10(6), 589, 2020.
- [77] Zhao, G.J., & Stevens, S.E., Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals*, 11, 27–32, 1998.
- [78] Lu, X., Zhang, B., Wang, Y., Zhou, X., Weng, J., Qu, S., & Leng, Y., Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition. *J Royal Soc. Inter.*, 8(57), 529-539, 2011.
- [79] Milošev, I., Surface treatments of titanium with antibacterial agents for implant applications. In *Biomedical and Pharmaceutical Applications of Electrochemistry*, Springer, Cham, 1-87, 2016.
- [80] Zhang, Y., Tao, J., Pang, Y., Wang, W., & Wang, T., Electrochemical deposition of hydroxyapatite coatings on titanium. *The Trans. Nonferr. Metals Soc. China*, 16, 633–637, 2006.
- [81] Zhitomirsky, I., Gal-Or, L., Kohn, A., & Hennicke, H.W., Electrodeposition of ceramic film from non-aqueous and mixed solutions. *J. Mater. Sci.*, 30, 5307–5312, 1995.
- [82] Mattox, D M., *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing: Film formation, adhesion, surface preparation and contamination control*. Westwood, N.J.: Noyes Publications, 1998.
- [83] Elshahawy, W., Biocompatibility. In *advances in ceramics-electric and magnetic ceramics*, Bioceramics, Ceramics and Environment. Intech Open., 2011.
- [84] Sarao, T. P. S., Singh, H., & Singh, H., Enhancing biocompatibility and corrosion resistance of Ti-6Al-4V alloy by surface modification route. *J. Thermal Spray Tech.*, 27(8), 1388-1400, 2018.
- [85] Ferraris, S., Spriano, S., Pan, G., Venturello, A., Bianchi, C. L., Chiesa, R., ..& Vernè, E., Surface modification of Ti–6Al–4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification. *J of Materials Science: Mater. Med.*, 22(3), 533-545, 2011.
- [86] Gorbet, M. B., & Sefton, M. V., Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 25(26), 5681-5703, 2004.
- [87] Anderson, J. M., Rodriguez, A., & Chang, D. T., Foreign body reaction to biomaterials. In *Seminars in immunology*, Academic Press. 2008.

- [88] Nilsson, B., Ekdahl, K. N., Mollnes, T. E., & Lambris, J. D., The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol. Immun.*, 44(1-3), 82-94, 2007.
- [89] Badylak, S. F., (Ed.). Host response to biomaterials: the impact of host response on biomaterial selection. Academic Press, 2015.
- [90] Park J. W, Jang J. H., & Lee C. S., Hanawa T. Osteoconductivity of hydrophilic microstructured titanium implants with phosphate ion chemistry. *Acta Biomater.*, 5, 2311–2321, 2008.
- [91] Hasan, A., Saxena, V., & Pandey, L. M., Surface functionalization of Ti6Al4V via self-assembled monolayers for improved protein adsorption and fibroblast adhesion *Langmuir*, 34(11), 3494-3506, 2018.
- [92] Çolak, Z., Anodik Oksidasyon Yöntemi İle Üretilen Titanyum Oksit Nanotüplerin Hidrojen Algılama Özelliklerinin İncelenmesi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- [93] Macak, J. M., Tsuchiya, H., Ghicov, A., Yasuda, K., Hahn, R., Bauer, S., & Schmuki, P. TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr. Opin in Solid St. M.*, 11, 3–18, 2007.
- [94] Sul, Y. T., Johansson, C. B., Jeong, Y., & Albrektsson, T., The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Med. Eng. Phys.*, 23, 329–346, 2001.
- [95] Sarıca N., Titanyum malzemelerin anodizasyon yöntemiyle titanyum oksit kaplanması ve karakterizasyonu, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2016.
- [96] Schultze, J. W., Lohrengel, M. M., & Ross, D., Nucleation and growth of anodic oxide films. *Electrochim. Acta*, 28, 973–984, 1983.
- [97] Zhitomirsky, I., & Gal-Or, L., Electrophoretic deposition of hydroxyapatite. *J Materials Science: Mater. Med.*, 8, 213–219, 1997.
- [98] Kıcırcı K., Elektroforetik biriktirme metodu ile yüzeyi modifiye titanyum implantların hazırlanması ve karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2013.
- [99] Qadir, M., Li, Y., & Wen, C., Ion-substituted calcium phosphate coatings by physical vapor deposition magnetron sputtering for biomedical applications: A review. *Acta Biomater.*, 89, 14-32, 2019.

- [100] Trivedi, P., Srivastava, S., Jayaganthan, R., Chandra, R., & Roy, P., Characterization and in vitro biocompatibility study of Ti-Si-N nanocomposite coatings developed by using physical vapor deposition. *Appl. Surf. Sci.*, 293, 143-150, 2014.
- [101] Zalilah, U., & Mahmoodian, R., Comparative study on microstructure, crystallite size and lattice strain of as-deposited and thermal treatment silver silicon nitride coating on Ti6Al4V alloy. In *IOP Conf Ser. Mater. Sci. Eng.*, 210, 9, 2017.
- [102] Cassie, A. B. D., & Baxter, S., Wettability of porous surfaces. *Trans. Faraday Soc.*, 40, 546, 1944.
- [103] Gao, Y., Sun, Y., & Guo, D., Facile fabrication of superhydrophobic surfaces with low roughness on Ti-6Al-4V substrates via anodization. *Appl. Surf. Sci.*, 314, 754-759, 2014.
- [104] Demir, A. G., Furlan, V., Lecis, N., & Previtali, B., Laser surface structuring of AZ31 Mg alloy for controlled wettability. *Biointerphases*, 9, 2014.
- [105] Mekayarajjananonth, T., & Winkler, S., Contact angle measurement on dental implant biomaterials. *J Oral Implant.*, 25(4), 230-236, 1999.
- [106] Menzies, K. L., & Jones, L., The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optom. Vis. Sci.*, 87(6), 387-399, 2010.
- [107] Tzoneva, R., Faucheux, N., & Groth, T., Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1770(11), 1538-1547, 2007.
- [108] Roguska, A., Belcarz, A., Piersiak, T., Pisarek, M., Ginalska, G., & Lewandowska, M., Evaluation of the antibacterial activity of Ag-loaded TiO₂ nanotubes. *Eur. J Inorg. Chem.*, 32, 5199-5206, 2012.
- [109] Arenas, M. A., Perez-Jorge, C., Conde, A., Matykina, E., Hernandez-Lopez, J. M., Perez-Tanoira, R., Damborenea, J. J., Gomez-Barrena, E., & Esteba, J., Doped TiO₂ anodic layers of enhanced antibacterial properties. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 105, 106-112, 2013.
- [110] Lin, W., Tan, H., Duan, Z., Yue, B., Ma, R., He, G., & Tang, T. T., Inhibited bacterial biofilm formation and improved osteogenic activity on gentamicin-loaded titania nanotubes with various diameters. *Int. J. Nanomed.*, 9, 1215-1230, 2014.
- [111] Park, J., Bauer, S., von der Mark, K., & Schmuki, P., Nanosize and vitality: TiO₂ nanotube diameter directs cell fate. *Nano Lett.*, 7, 1686-1691, 2007.

- [112] Oh, S., Brammer, K. S., Li, Y. J., Teng, D., Engler, A. J., Chien, S., & Jin, S., Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106, 2130-2135, 2009.
- [113] Zheng, Y. H., Li, J. B., Liu, X. Y., & Sun, J., Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface. *Int. J. Nanomed.*, 7, 875-884, 2012.
- [114] Cao, H. L., Liu, X. Y., Meng, F. H., & Chu, P. K., Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials*, 32, 693-705, 2011.
- [115] Greulich, C., Braun, D., Peetsch, A., Diendorf, J., Siebers, B., Epple, M., & Köller, M., The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *RSC Adv.*, 2, 6981-6987, 2012.
- [116] Durdu, S., Aktug, S. L., Korkmaz, K., Yalcin, E., & Aktas, S., Fabrication, characterization and in vitro properties of silver-incorporated TiO₂ coatings on titanium by thermal evaporation and micro-arc oxidation. *Surf. Coat. Technol.*, 352, 600-608, 2018.
- [117] Thukkaram, M., Cools, P., Nikiforov, A., Rigole, P., Coenye, T., Van Der Voort, P., .. & De Wilde, L., Antibacterial activity of a porous silver doped TiO₂ coating on titanium substrates synthesized by plasma electrolytic oxidation. *Appl. Surf. Sci.*, 500, 144-235, 2020.
- [118] Klasen, H. J., A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Part I early uses *Burns*, 30, 1-9, 2000.
- [119] Sondi, I., & Salopek-Sondi, B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.*, 275, 177–182, 2004.
- [120] Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.*, 52, 662–668, 2000.
- [121] Rai, M., Yadav, A., & Gade, A., Silver nanoparticles as a new generation of anti-microbials. *Biotechnol. Adv.*, 27, 76–83, 2009.
- [122] Yamanaka, M., Hara, K., & Kudo, J., Bactericidal Actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl. Env. Microbiol.*, 71, 7589-759, 2005

ÖZGEÇMİŞ

Muharrem SANCAK 1989 yılında Giresun’da doğdu. 2007 yılında Giresun Aksu Lisesi’nden mezun oldu. 2010 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nü 2014 yılında bitirdi. 2018 yılında Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans eğitimini Kasım-2020’de tamamladı.

