



**Ta₂O₅ VE HA İLE TABAKALI VE HİBRİT KAPLANMIŞ MG
ALAŞIMININ İN VİTRO VE İN VİVO PERFORMANSININ
BELİRLENMESİ**

Sevda ALBAYRAK

**DOKTORA TEZİ
METALURJİ VE MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

NİSAN 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sevda ALBAYRAK

24/04/2024

Ta₂O₅ VE HA İLE TABAKALI VE HİBRİT KAPLANMIŞ MG ALAŞIMININ İN VİTRO VE İN VİVO PERFORMANSININ BELİRLENMESİ

(Doktora Tezi)

Sevda ALBAYRAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2024

ÖZET

Magnezyum ve alaşımları günümüzde biyomalzeme uygulamalarında son yılların odak noktası haline gelen metalik biyomalzemelerdir. Bu tez çalışmasında toz metalürji (TM) metoduyla üretilen AZ91 Mg altlık yüzeylerine Tantal Oksit (Ta₂O₅) ve Hidroksiapatit (HA) ile sol-jel yöntemiyle tabakalı ve hibrit kaplamalar yapılarak kalıcı ortopedik implant olarak kullanılabilme potansiyeli araştırılmıştır. Kaplamalarda fazların tayini için XRD, morfolojik değerlendirmesi ve elementel analizleri için SEM-EDS analizleri gerçekleştirilmiştir. Kaplama-altlık yapışma durumunu değerlendirmek için çizik testi ve bağ yapılarının tespiti için FTIR analizleri yapılmıştır. Potansiyodinamik elektrokimyasal korozyon özellikleri ise HBSS, DMEM ve DMEM+%10 FBS ortamları içerisinde değerlendirilmiştir. Antibakteriyel aktivite analizleri için *S. Aureus* ve *E. Coli* bakterileri kullanılmıştır. Numunelere PBS-DMEM-SBF gibi farklı tampon çözeltilerde 7 günlük süre ile biyobozunurluk analizi yapılmış ve günlük pH ve morfolojik değişimlerin takibi yapılmıştır. *In vitro* biyoyuymululuk analizleri kapsamında vasat ortamında (DMEM-LG) numunelerin iyon salım analizleri ve pH takibi 1, 7, 14, 21 ve 28. günler için ICP-OES cihazından ölçümler alınarak gerçekleştirilmiştir ve aynı periyotlarla pH takibi yapılmıştır. Sitotoksikite testleri için kiMKH ve skOBH hücreleri kullanılarak canlılıkları kantitatif olarak ters faz mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Kalitatif canlılık değerlendirmeleri için ise haftalık olarak MTT kiti ile ALP aktivitesi tespiti, histokimya analizlerinde vK ve AR boyamaları, immünohistokimya analizlerinde ise anti-kollajen-tip-1 ve anti-osteokalsin antikor boyamaları gerçekleştirilmiştir. *In vivo* deneyleri için erkek Yeni Zelanda tavşanları kullanılarak femur kemiği proksimalinde mikromatkap yardımıyla lateralde trokanter majör üzerinden medialde trokanter minör medial korteksine doğru bir tünel açılarak 1,5 mm çap, 6 mm uzunluktaki test materyali, oluşturulan bu tünele yerleştirilmiş ve 6-12 haftalık periyotlarda takibi yapılmıştır. *In vivo* çalışmalar kapsamında histolojik ve radyolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması sonucunda, özellikle Hibrit kaplanan AZ91 Mg alaşımının korozyon, *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları sonucunda kalıcı protez olarak kullanılma potansiyelinin olduğu ortaya koyulmuştur.

Bilim Kodu : 91501
Anahtar Kelimeler : AZ91, Ta₂O₅, Hidroksiapatit, Sol-jel kaplama, *In vitro*, *In vivo*, MKH, OBH
Sayfa Adedi : 173
Danışman : Doç. Dr. Hanifi ÇİNİCİ

DETERMINATION OF Ta₂O₅ AND HA COATED WITH LAYERED AND HYBRID
MG ALLOY IN VITRO AND IN VIVO PERFORMANCES

(Ph. D. Thesis)

Sevda ALBAYRAK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

April 2024

ABSTRACT

Magnesium and its alloys are metallic biomaterials that have become the focal point of attention in recent years for biomedical applications. In this thesis, the potential use of AZ91 Mg substrates produced by the powder metallurgy (PM) method was investigated as a permanent orthopedic implant by applying layered and hybrid coatings of Tantalum Oxide (Ta₂O₅) and Hydroxyapatite (HA) using the sol-gel method. XRD was performed for phase determination in the coatings, and SEM-EDS analyses were conducted for morphological evaluation and elemental analyses. Scratch tests were conducted to assess coating-substrate adhesion, and FTIR analyses were performed to detect bond structures. Potentiodynamic electrochemical corrosion properties were evaluated in HBSS, DMEM, and DMEM+%10 FBS environments. *S. Aureus* and *E. Coli* bacteria were used for antibacterial activity analyses. Biodegradation analysis was carried out in different buffer solutions such as PBS-DMEM-SBF for a duration of 7 days, with daily monitoring of pH and morphological changes. In vitro biocompatibility analyses included ion release analyses and pH monitoring of samples in a standard medium (DMEM-LG) on the 1st, 7th, 14th, 21st, and 28th days using ICP-OES, along with pH monitoring at the same intervals. Cytotoxicity tests were conducted using hFOB and hMSC cells, and their viability was quantitatively evaluated using phase-contrast microscopy. For qualitative viability assessments, weekly MTT assays, vK and AR staining in histological analyses, and anti-collagen-type-1 and anti-osteocalcin antibody staining in immunohistochemistry analyses were performed. In vivo experiments were conducted using male New Zealand rabbits, with a 1.5 mm diameter, 4 mm length test material inserted into a tunnel created from the lateral trochanter major to the medial trochanter minor medial cortex of the femur bone proximal using microdrill assistance. Follow-ups were performed at 6-12 week intervals. Histological and radiological examinations were conducted as part of in vivo studies. The results of the thesis indicate the potential use of the AZ91 Mg alloy, especially when coated with a hybrid layer, as a permanent prosthesis based on corrosion, in vitro, and in vivo studies.

Science Code : 91501

Key Words : AZ91, Ta₂O₅, Hydroxyapatite, Sol-gel coating, *In vitro*, *In vivo*, MKH, OBH

Page Number : 173

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Hanifi ÇİNİCİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden daha fazlasını sunan ve güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağıma inandığım kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hanifi ÇİNİCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda her türlü bilgi birikimini benimle paylaşan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bu tez çalışması sayesinde yollarımızın kesiştiği ve tezimin gerçekleşmesinde büyük emeği geçen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecimde ve savunmamda yer alan ve desteklerini esirgemeyen saygıdeğer jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Uğur GÖKMEN, Sayın Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN ve Sayın Prof. Dr. Ahmet GÜRAL'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu süreçte bana yoldaş olan her anlamda benim için elinden gelenin en iyisini yapan, akademik olarak beni her daim teşvik eden ve beni tamamlayan çok kıymetli ve sevgili arkadaşım Sayın Arş. Gör. Canser GÜL'e minnettar olduğumu söylemek isterim. Akademik hayatımın başlangıcından itibaren herdaim yanımda olup bana sabır gösteren, tüm sürecime şahitlik eden ve her konuda bana yardımcı olan değerli mesai arkadaşlarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi İrem Burcu ALGAN ŞİMŞEK ve Sayın Yasemin AKSU'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca vaktimizi beraber geçirdiğimiz tüm mesai arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteğini bir an olsun esirgemeyen, hayatıma değer katan Sevgili Annem, Babam ve kardeşlerime sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım. Hayatıma girdiğinden buyana bana her anlamda destek olan, akademik hayatım boyunca tüm zorlukları benimle göğüsleyen Sevgili Eşim Hüseyin Buğra ALBAYRAK'a, bana gösterdiği sonsuz sabır ve sevgiden dolayı teşekkürlerimi sunarım. Son olarak hayatımın en önemli parçası olan, bu serüvene beraber başladığımız, değerlim, canım oğlum Oğuz Kağan ALBAYRAK'a bu tez çalışması nedeniyle onunla geçiremediğim zamanlar nedeniyle öncelikle özürlerimi daha sonra ise bu sürecin bir parçası ve bana neşe kaynağı olduğu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

118M364 Proje Kodu ile bu tez çalışmasını destekleyen, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. BİYOMALZEMELER.....	5
2.1. Biyouyumluluk	6
2.2. Metalik Biyomalzemeler	7
2.3. Seramik Biyomalzemeler	8
2.4. Polimerik Biyomalzemeler.....	10
2.5. Kompozit Biyomalzemeler	10
2.6. Toz Metalurjisi İle Üretim.....	11
2.7. Biyomalzeme Olarak Mg Alaşımları	12
2.8. Biyomalzeme Olarak Tantal ve Tantaloksit.....	14
2.9. Biyomalzeme Olarak Hidroksiapatit	17
2.10. Biyomalzemelere Uygulanan Yüzey İşlemleri.....	20
2.10.1. Sol-jel kaplama yöntemi.....	22
3. LİTERATÜR ÖZETİ	25
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
4.1. Materyal	35

	Sayfa
4.1.1. Altlık.....	35
4.1.2. HA ve Ta ₂ O ₅ çözeltilerin elde edilmesi ve karakterizasyonu	35
4.1.3. Sol-jel yöntemi ile altlıkların kaplanması	37
4.2. Kaplamaların Karakterizasyonu	39
4.2.1. SEM/EDS analizi	39
4.2.2. XRD analizi.....	39
4.2.3. FTIR analizi.....	40
4.2.4. Çizik testleri	40
4.2.5. Korozyon testleri	40
4.2.6. Mikrobiyoloji analizi.....	41
4.2.7. İn vitro biyoyumluluk analizleri.....	41
4.2.8. Hücre kültürü çalışmaları	43
4.2.9. İn vivo deneyler.....	50
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	57
5.1. Kaplama Çözeltilerinin Karakterizasyonu	57
5.2. Kaplamaların Karakterizasyonu	58
5.2.1. Yüzey ve kesit SEM/EDS analizi.....	58
5.2.2. Kaplamaların FTIR spektrumları	61
5.2.3. Lineer çizik test sonuçları	63
5.3. Mikrobiyoloji Analizleri	69
5.4. Potansiyodinamik Elektrokimyasal Korozyon Testleri.....	73
5.5. İn Vitro Biyoyumluluk Analizleri	80
5.5.1. Biyobozunurluk sonuçları	80
5.5.2. ICP-OES iyon salım analizi ve pH değişimleri.....	86

	Sayfa
5.5.3. Hücre kültürü analizleri.....	91
5.6. İn Vivo Analizler	112
5.6.1. Biyokimyasal parametre sonuçları	112
5.6.2. Radyografi ve histogram.....	114
5.6.3. Histokimya analiz bulguları çalışmaları	116
6. TARTIŞMA.....	121
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	135
KAYNAKLAR.....	141
EKLER	161
EK-1. Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri	162
ÖZGEÇMİŞ	173

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı biyomalzemelerin fiziksel ve mekanik özelliklerinin Karşılaştırılması	8
Çizelge 2.2. HA kaplama tekniklerinin avantajları, dezavantajları ve kaplama Kalınlıkları	19
Çizelge 2.3. HA'nın mekanik özellikleri	19
Çizelge 4.1. Ta ₂ O ₅ ve HA çözeltileri için gerekli kimyasallar	35
Çizelge 4.2. ICP-OES cihazının çalışma koşulları	43
Çizelge 5.1. HBSS bileşenlerine ait miktar ve konsantrasyonlar	76
Çizelge 5.2. DMEM medyumuna ait bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları.....	77
Çizelge 5.3. PBS içerisinde işlem gören numunelerin zaman içerisindeki davranışlarına ait skorlama ve çözeltilerin pH ölçüm çizelgesi.....	81
Çizelge 5.4. HBSS içerisinde işlem gören numunelerin zaman içerisindeki davranışlarına ait skorlama ve çözeltilerin pH ölçüm çizelgesi.....	82
Çizelge 5.5. SBF içerisinde işlem gören numunelerin zaman içerisindeki davranışlarına ait skorlama ve çözeltilerin pH ölçüm çizelgesi.....	83
Çizelge 5.6. Degredasyon analizinin gravimetrik incelemeleri	84
Çizelge 5.7. Numunelerin DMEM-LG içerisindeki günlük pH değişimleri	87
Çizelge 5.8. Test örneklerinin serum parametrelerine etkisi	113

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. a) Tantal elementinin potansiyel-pH diyagramı, b) 1,0 M'lık HF çözeltilerinin içindeki Tantal elementinin potansiyel-pH diyagramı	15
Şekil 2.2. Sıçana implante edilen a) Kaplanmamış Ti malzemesi ve b) Ta-TaO-Ta ₂ O ₅ kaplı Ti malzemesi ile kemik arayüzeyine ait Micro-CT görüntüleri; c) BS: Kaplanmamış NiTi; TS-5: 5 µm Ta kaplı NiTi ve TS-10: 10 m Ta kaplı NiTi stent malzemelerinin X-Ray görüntüleri	16
Şekil 2.3. Yüzey mühendisliğinde uygulanan metotlar	21
Şekil 2.4. Sol-jel prosesi ile elde edilebilecek ürünler	23
Şekil 4.1. Ta ₂ O ₅ ve HA çözelti hazırlama akış diyagramı	36
Şekil 4.2. Elde edilen a) berrak açık sarı Ta ₂ O ₅ çözeltisi ve b) renksiz şeffaf HA çözeltisi	36
Şekil 4.3. Tabakalı ve Hibrit kaplama yapılarının şematik gösterimi	37
Şekil 4.4. Hibrit kaplama için hacimce a) %5, b) %10 ve c) %25 oranlarında Ta ₂ O ₅ karıştırılan HA çözeltileri	37
Şekil 4.5. Üretilen numunelerin a) ultrasonik temizlik ve b) kaplama-kurutma sonrası fotoğrafları	38
Şekil 4.6. XRD, Korozyon ve bakteri/hücre kültürü çalışmaları için kaplanıp kalsine edilen farklı şekillere sahip nihai numuneler	38
Şekil 4.7. İn vivo deneyler için üretilen silindirik numunelerin a) kaplama için tablaya tutturulması, b) kaplamaya hazır hali, c) kaplama anı ve kaplandıktan sonra kurutma için standı yerleştirilmiş hali	39
Şekil 4.8. Erkek Yeni Zelanda tavşanda implantasyonun yapıldığı bölge	52
Şekil 4.9. Cerrahi işlem basamakları, a) traşlama, b) ameliyata hazırlama, c) ilk kesinin oluşturulması, d) kan alma, e) implant yerleştirilecek olan femur kemiğine ulaşılması, f) femur kemik, g) microdrill ile defektin oluşturulması, h) implantların yerleştirilm esi ve i) dikiş ile kapatılması	53
Şekil 4.10. a) Femur kemiğin ilk çıkarıldığı hali, b) İmplant üzerinde oluşan doku örneklerinin toplanması ve c) İmplant yüzeyinde oluşan dokunun kaldırılmış hali	55

Şekil	Sayfa
Şekil 5.1. 400°C’de kalsine edilerek üretilen HA tozuna ait XRD deseni	57
Şekil 5.2. 400 °C’de kalsine edilerek üretilen amorf yapılı Ta ₂ O ₅ tozuna ait XRD deseni	58
Şekil 5.3. 1200 °C ve 1600 °C’de kalsine edilerek üretilen β -Ta ₂ O ₅ ve α -Ta ₂ O ₅ tozlarına ait XRD deseni	58
Şekil 5.4. a) HA kaplı, b) Ta ₂ O ₅ kaplı, c) Tabakalı kaplı ve d) %5, e) %10, f) %25 Hibrit kaplamalara ait kaplama yüzey morfolojileri (X250).....	59
Şekil 5.5. a) HA kaplı(2000X), b) Ta ₂ O ₅ kaplı (X500), c) Tabakalı kaplı ve d) %5, e) %10, f) %25 Hibrit (X500) kaplamalara ait kesit görüntüleri ve kaplama kalınlıkları ölçümü	60
Şekil 5.6. a) HA kaplı (2000X), b) Ta ₂ O ₅ kaplı (X500), c) Tabakalı kaplı (X500) ve d) %5, e) %10, f) %25 Hibrit (X500) kaplamalara ait kesit görüntülerinden alınmış EDS verileri	61
Şekil 5.7. Tabakalı kaplamaya ait kesit görüntüsü ve çeşitli EDS analizleri.....	61
Şekil 5.8. HA, Ta ₂ O ₅ , %5-10-25 Hibrit ve Tabakalı kaplı numunelerin FTIR spektrumları.....	62
Şekil 5.9. HA kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü	65
Şekil 5.10. Ta ₂ O ₅ kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü	66
Şekil 5.11. %5 Hibrit kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü	66
Şekil 5.12. %10 Hibrit kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü	67
Şekil 5.13. %25 Hibrit kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü	68
Şekil 5.14. Tabakalı kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü	69
Şekil 5.15. a) <i>E. Coli</i> suşuna ait bakteri kültüründe örneklerin ve amfisilin diskinin oluşturduğu inhibisyon zonu görüntüleri	70
Şekil 5.16. <i>S. Aureus</i> suşuna ait bakteri kültüründe örneklerin ve amfisilin diskinin oluşturduğu inhibisyon zonunun görüntüleri	71

Şekil	Sayfa
Şekil 5.17. <i>E. Coli</i> suşuna ait petride a) Tantaloksit ile tamamen kaplı AZ91 örneğinin ve amfisilin diskinin oluşturduğu inhibisyon zonunun görüntüsü, b) Oluşan inhibisyon zonunun petrinin arka kısmından alınan manuel ölçümün görüntüsü ve <i>S. Aureus</i> suşuna ait petride c) Tantaloksit ile tamamen kaplı AZ91 örneğinin ve amfisilin diskinin oluşturduğu inhibisyon zonunun görüntüsü, d) Oluşan inhibisyon zonunun petrinin arka kısmından manuel ölçümün görüntüsü.....	73
Şekil 5.18. HBSS, DMEM ve DMEM+%10 FBS ortamlarında kaplanmamış AZ91, HA, Ta ₂ O ₅ , %5 Hibrit, %10 Hibrit, %25 Hibrit ve Tabakalı kaplanmış numunelerin korozyon hızlarına ait sütun grafiği.....	74
Şekil 5.19. AZ91 altlık numunesinin a) HBSS, b) DMEM ve c) DMEM+%10 FBS ortamlarında korozyonu sonrası yüzey SEM morfolojileri (X1000)	78
Şekil 5.20. HBSS ortamında a) HA, b) Ta ₂ O ₅ , c) Tabakalı, d) %5 Hibrit, e) %10 Hibrit, f) %25 Hibrit kaplı numunelerin korozyon sonrası yüzey SEM morfolojileri (X1000).....	79
Şekil 5.21. DMEM ortamında a) HA, b) Ta ₂ O ₅ , c) Tabakalı, d) %5 Hibrit, e) %10 Hibrit, f) %25 Hibrit kaplı numunelerin korozyon sonrası yüzey SEM morfolojileri (X1000).....	79
Şekil 5.22. DMEM+%10 FBS ortamında a) HA, b) Ta ₂ O ₅ , c) Tabakalı, d) %5 Hibrit, e) %10 Hibrit, f) %25 Hibrit kaplı numunelerin korozyon sonrası yüzey SEM morfolojileri (X1000)	80
Şekil 5.23. Kaplanmamış AZ91, HA, Ta ₂ O ₅ ve Tabakalı kaplanmış örnekler üzerinde biriken beyaz çökeleklerin FTIR spektrumları.....	85
Şekil 5.24. Hibrit kaplamalı örnekler üzerinde biriken beyaz çökeleklerin FTIR spektrumları (400-4000 cm ⁻¹).....	86
Şekil 5.25. Numunelerin sodyum, potasyum, magnezyum, çinko, kalsiyum ve fosfat iyonları salımı için ICP-OES analiz grafikleri	90
Şekil 5.26. Numunelerin alüminyum iyonu salımı için ICP-OES analiz grafiği.....	91
Şekil 5.27. Wistar albino sıçanların femur kemik iliğinden izole edilen kiMKH a) P0, b) P1, c) P2 ve d) P3 aşamalarında faz kontrast mikroskopu ile takip edilen hücrelere ait fotoğraflar (X10)	92
Şekil 5.28. Wistar albino sıçanların kalvaria kemiğinden izole edilen skOBH a) P0 3. Gün, b) P0 6. gün c) P1 ve d) P2 aşamalarında faz kontrast mikroskopu ile takip edilen hücrelere ait fotoğraflar (X10).	93

Şekil	Sayfa
Şekil 5.29. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki değişimlerinin ve hücre-malzeme etkileşimlerinin ters faz kontrast mikroskobu ile incelenmesi	94
Şekil 5.30. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründe haftalık periyotlar ile gerçekleştirilen MTT analizi sonrasındaki formazan kristallerinin oluşumunun ters faz kontrast mikroskobu ile incelenmesi	95
Şekil 5.31. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki değişimlerinin ve hücre-malzeme etkileşimlerinin ters faz kontrast mikroskobu ile incelenmesi	96
Şekil 5.32. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründe haftalık periyotlar ile gerçekleştirilen MTT analizi sonrasındaki formazan kristallerinin oluşumunun ters faz kontrast mikroskobu ile incelenmesi	97
Şekil 5.33. OB ve MKH ile gerçekleştirilen kantitatif biyoyumluluk analizleri kapsamında mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı MTT analizi ile hücre canlılığı tespiti	98
Şekil 5.34. OB ve MKH ile OB ve MKH ile gerçekleştirilen kantitatif biyoyumluluk analizleri kapsamında hücre canlılığı mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı MTT analizi gerçekleştirilen kantitatif biyoyumluluk analizleri kapsamında hücrelerin osteojenik fenotipi alkalen fosfataz aktivitesini ölçmeye dayalı ALP analizi	99
Şekil 5.35. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki canlı hücrelerin H&E histolojik boyama ile incelenmesi	100
Şekil 5.36. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki canlı hücrelerin H&E histolojik boyama ile incelenmesi	101
Şekil 5.37. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin vK histolojik boyama ile incelenmesi	102
Şekil 5.38. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin vK histolojik boyama ile incelenmesi	103
Şekil 5.39. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin AR histolojik boyama ile incelenmesi	104
Şekil 5.40. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin AR histolojik boyama ile incelenmesi	105
Şekil 5.41. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki kemiğe özgü kollajen-tip-1 sentezinin, Anti-Kollajen Tip-1 immünohistokimya boyaması ile incelenmesi	106

Şekil	Sayfa
Şekil 5.42. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki kemiğe özgü kollajen-tip-1 sentezinin, Anti-Kollajen Tip-1 immünohistokimya boyaması ile incelenmesi.....	107
Şekil 5.43. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki kemiğe özgü osteokalsin sentezinin, Anti-osteokalsin immünohistokimya boyaması ile incelenmesi.....	108
Şekil 5.44. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki kemiğe özgü osteokalsin sentezinin, Anti-osteokalsin immünohistokimya boyaması ile incelenmesi.....	109
Şekil 5.45. Numunelerin hücresiz, 28 günlük in vitro MKH ve OB hücre kültüründeki davranışlarına ait morfolojik özelliklerin SEM ile incelenmesini gösteren mikrograflar (120X)	110
Şekil 5.46. Numunelerin hücresiz, 28 günlük in vitro MKH ve OB hücre kültüründeki davranışlarına ait morfolojik özelliklerin SEM ile incelenmesini gösteren mikrograflar (500X)	110
Şekil 5.47. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası deneklerden alınan röntgen görüntüleri.....	114
Şekil 5.48. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası röntgen görüntülerinden elde edilen kontrol doku ve implant çevresinden alınan histogramlar	116
Şekil 5.49. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen dokulardaki canlı hücrelerin H&E histolojik boyama yöntemi ile ışık mikroskobu altında incelenmesi (40X)	117
Şekil 5.50. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen dokulardaki kolajen moleküllerinin Safranin-O histolojik boyaması ile incelenmesi	118
Şekil 5.51. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen kesitlerde HDM'deki proteoglikanların Alcian Blue histolojik boyama yöntemi ile ışık mikroskobu altında incelenmesi (40X)	119
Şekil 5.52. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen dokulardaki kalsiyum birikiminin AR histolojik boyama ile incelenmesi.....	120
Şekil 5.53. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen dokulardaki kalsiyum birikiminin vK histolojik boyama ile incelenmesi	120

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

AZ91	Aluminyum ve çinko içerikli magnezyum alaşımı
cm	Santimetre
dk	Dakika
E	Desibel
M	Molarite
M	Molarite
Mm	Mili molar
mm	Milimetre
N	Normalite
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir
sn	Saniye
Ta₂O₅	Tantal oksit
Ti6Al4V	Aluminyum ve vanadyum içerikli titanyum alaşımı
V	Hertz
W	Watt
μ	Mikron
μl	Mikro litre

Kısaltmalar

Açıklamalar

ALP	Alkalen Fosfataz
AR	Alizarin Red
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose
EDS	Enerji Dağılım Spektroskopisi

Kısaltmalar**Açıklamalar**

FBS	Fötal Sığır Serum
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Pektrometresi
HA	Hidroksiapatit
HBSS	Hank'in Dengeli Tuz Çözeltilisi
HDM	Hücre Dışı Matris
H&E	Hematoksilen ve Eozin
ICP-OES	İndüktif Eşleşmiş Plazma - Optik Emisyon Spektrometresi
kiMKH	Kemik İliği Mezankimal Kök Hücreleri
MTT	Hücre Canlılık Testi
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
skOBH	Sıçan Kalvaria Osteoblast Hücreleri
TBS	Tris Tampon Çözeltilisi
TM	Toz Metalurji
XRD	X-Ray Difraktometre
vK	Von Kossa

1. GİRİŞ

Magnezyum ve alaşımları günümüzde biyomalzeme uygulamalarında kullanılmak üzere yoğunlaşmış çalışmaların odak noktası olan metalik biyomalzemelerdir. Metalik biyomalzemeler farklı amaçlar ile vücudun farklı bölgelerinde kullanılmakta ve doku kaybını engelleyerek, iyileşme sürecini desteklemek ve kayıp işlevi yerine getirmek amaçları ile tercih edilmektedir. Özellikle ortopedik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahip olan metalik malzemeler üstün mekanik ve fiziksel özellikleri nedeni ile tercih edilmektedir. Günümüzde en sık kullanılan metalik biyomalzemeler başta titanyum ve alaşımları olmak üzere nikel-titanyum alaşımları, paslanmaz çelikler ve kobalt-krom alaşımlarıdır. Bu alaşımlara eklenen farklı alaşım elementleri daha üstün özellikler kazandırabilir. Ancak bu alaşımların ortak bir dezavantajı literatürde “Gerilim Bariyer Etkisi” olarak adlandırılan, özellikle yoğunluğu kemiğin yoğunluğundan çok yüksek olan metalik biyomalzemelerde görülen ve implantasyon sonrası implant etrafında doku kaybına neden olan olumsuz etkisidir. Bu doku kaybı ilerleyen zamanlarda daha büyük tahribatlara neden olabilmekte, vücudun tepki vermesi ile implant kaybına kadar ilerleyebilmektedir. Dolayısıyla fazlaca ikincil operasyon ve kullanım zorluğu ortaya çıkmaktadır. Bu dezavantajın yanı sıra tüm metalik biyomalzemelerin biyouyumluluğundan bahsedilirken biyotolerant ifadesi kullanılır. Biyotolerant ifadesi metalik biyomalzemelerin biyouyumu şeklinde tanımlanmakta olup aslında tolere edilebilir negatif etkilerin varlığı ile açıklanabilmektedir. Bu negatif etkiler ise yoğun iyon konsantrasyonu içeren vücut içerisinde korozyona uğrayabilen metalik biyomalzemelerin alüminyum, vanadyum gibi zararlı elementlerin vücut içine salınımına ve birikimine neden olabilmesidir. Bu iyon birikimleri ise nöronlara ve osteoblastlara zarar vererek dementia ve alzheimer gibi nörolojik hastalıklara neden olabilmektedir.

Metalik biyomalzemeler arasında en düşük yoğunluğa sahip alaşım grubu magnezyum ve alaşımlarıdır ve bu alaşımların yoğunluk değerleri kemik dokusu ile yakın değerlerdedir. Vücut içine implante edilmeleri durumunda dokular ile implant arasında minimal yoğunluk farkına neden olabilir, bu durumda gerilim bariyer etkisinin önüne geçilebilir.

Magnezyum ve alaşımları biyomalzeme olarak iki farklı kullanım alanına sahiptir. Bunlardan ilki, magnezyum ve alaşımlarının vücut içinde kontrollü bir şekilde çözünmesini ve yerini sağlıklı dokuya bırakması üzerine gerçekleştirilen biyobozunma çalışmalarını

içerir. Magnezyum alaşımları düşük korozyon dayanımları nedeni ile vücut içinde mekanik bütünlüklerini uzun süre koruyamazlar ve çözünmeye başlarlar. Magnezyum elementi vücudun ihtiyacı olan ve vucüta belirli toleranslar dâhilinde bulunması sakınca yaratmayan bir elementtir. Bu nedenle magnezyum alaşımlarının vücut içine stent, kontrollü ilaç salınım sistemleri veya doku iskelesi uygulamalarında kullanımına yönelik başarılı çalışmalar sürdürülmektedir. Magnezyum alaşımlarının biyomalzeme uygulamalarında bir diğer kullanım alanı ise kalıcı ortopedik uygulamalardır. Bu uygulamalarda temel amaç gerilim bariyer etkisinin negatif sonuçlarından kurtulmak ve dokuları da destekleyebilecek, insan yaşamı boyunca vücut içinde mekanik bütünlüğünü koruyabilecek bir implant eldesidir. Bunu sağlayabilmek için de magnezyum alaşımlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Magnezyum ve alaşımları biyomalzeme uygulamalarında kullanılmak üzere farklı kaplama yöntemleri kullanılarak metalik, oksitli, nitrürlü, polimerik ve kompozit kaplamalar uygulanarak çalışılmalar yapılmıştır. Alaşımın kaplanması PVD sıçratma, elektroforetik ve sol-jel kaplama yöntemleri başlıca kullanılan yöntemlerdir. Magnezyum ve alaşımları ergime sıcaklıklarının düşük olması ve atmosferik ortamda çabuk oksitlenmesi sebepleri ile yüksek sıcaklık ve ortam atmosferi ile temas gerektiren yöntemler kullanılarak kolaylıkla kaplanamazlar. Özellikle sol-jel yöntemi yüksek saflıkta kaplama eldesi ve farklı kesitlere sahip malzemelere daldırılmalı kaplama yöntemi ile kolaylıkla uygulanabilir bir yöntem olması nedeni ile tercih edilmektedir. Ayrıca çok yüksek kurutma ve kalsinasyon sıcaklıklarına da ihtiyaç duyulmayan bu yöntem magnezyum ve alaşımlarının kaplanması için de uygun bir yöntemdir.

Magnezyum ve alaşımları sadece korozyon dayanımı için değil, genel anlamda yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi, aşınma dayanımı, sertlik, fiziksel özelliklerin geliştirilmesi, biyoaktiflik sağlanması, radyoopaklık kazandırılması ve antibakteriyel özellik sağlanması sebepleri ile de kaplanabilir. Hidroksiapatit, biyouyum göstermeyen özellikle metalik biyomalzemelerin biyoaktivitesini arttırmak amacı ile titanyum ve magnezyum alaşımları da dahil olmak üzere farklı alaşımlara uygulanan bir yüzey kaplamasıdır. Hidroksiapatit doğal kemik yapısında da bulunan Kalsiyum, Fosfor ve Oksijen elementlerini içeren organik bir yapıdır ve implantasyon sonrası doku ile implant arasında aktif bir bağlanma sağlayarak osseointegrasyonu teşvik ettiği bilinmektedir. Tantal elementi, yüksek asidik ortam pH değerlerinde ve iyon konsantrasyonlarında bile korozyon özelliklerinin iyi olması ile bilinen bir geçiş metali elementidir. Kendi yüzeyinde kararlı bir oksit filmi oluşturabilir ve bu oksit

filmi ile korozyon dayanımı daha da artar. Ayrıca literatürdeki çalışmalar incelendiğinde tantaloksitin antibakteriyel özellik gösterebileceği, radyoopasitesinin yani X-ışınları altında görünürlüğünün yüksek olduğu, iyileşme sürecinde biyoinert karakteristiğe sahip olup vücut içine herhangi bir salınım yapmadığı ve herhangi bir konakçı tepkisine neden olmadığı belirtilmiştir. Bu avantajları nedeni ile günümüzde alaşım elementi olarak farklı implant malzemelerine eklenmekte ve vücut içinde güvenle kullanılmaktadır.

Gerçekleştirilen tez çalışmasının temel amacı, kemik ile mekanik uyumluluk gösteren AZ91 Mg ana alaşımının tantal oksit (Ta_2O_5) katmanı ile korozyon direncinin artırılması, radyopak (MRI ve Röntgen’de görülebilir olma özelliği) ve antibakteriyel özellik kazandırılması, en üst katmanda ise hidroksiapatit (HA ; $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) tabakası ile biyoaktifliğinin artırılarak biyoyumluluğunun geliştirilmesi ve biyolojik sabitlemenin gerçekleştirilmesidir. Geliştirilecek olan malzemenin yeni nesil implant sektöründe birçok ihtiyacı aynı anda karşılayabilmesi, özgün bir tasarım olarak literatürde yerini alması ve ileride yapılacak çalışmalara da öncü olması hedeflenmiştir.

Bu amaçla, ana malzeme olarak seçilen AZ91 Mg alaşımı, toz metalürji (TM) yöntemi ile üretilmiş ve mekanik testleri yapılarak optimum üretim parametreleri belirlenmiştir. Yüzey hazırlıkları tamamlanan numunelerin yüzeyine, Ta_2O_5 ve HA çözeltileri ile sol-jel yöntemi kullanılarak farklı kombinasyonlarda kaplamalar yapılmıştır. Tabakalı kaplama için Ta_2O_5 kaplanan yüzeyler, kurutma işleminin ardından, yine sol-jel yöntemi kullanılarak HA ile kaplanmıştır. Hibrit kaplama yapılacak olan numuneler ise, önce Ta_2O_5 ile kaplanmış ve sonrasında üzerlerine %5-10-25 oranlarında Ta_2O_5/HA hibrit kaplamaları yapılmıştır. Hazırlanan tüm numuneler kurutma ve kalsinasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Numunelerin karakterizasyon işlemlerinde; faz analizleri X-ışını kırınımı (XRD), arayüzey bağlanma ve yüzey kaliteleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), kimyasal yapı ve bağ karakterizasyonu fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometre (FTIR) kullanılarak incelenmiştir. Aşınma ve kaplamanın yüzeye tutunma davranışlarını incelemek amacıyla çizik testleri yapılmış ve korozyon davranışlarının belirlenmesi için üç farklı tampon çözelti ortamında üç tekrarlı potansiyodinamik elektrokimyasal korozyon testleri yapılmıştır. Antibakteriyel özelliklerinin belirlenebilmesinde ise literatür taramaları sonucunda implant ile ilişkili enfeksiyonların yaygın sebepleri olarak belirlenen, gram pozitif *S. Aureus* ve gram negatif *E. Coli* bakteri kültürleri kullanılmıştır. *In vitro* biyoyumluluk analizleri kapsamında vasat ortamında (DMEM-LG) numunelerin iyon salım analizleri ve pH takibi

1, 7, 14, 21 ve 28. günler için ICP-OES cihazından ölçümler alınarak gerçekleştirilmiştir ve aynı periyotlarla pH takibi yapılmıştır. Hücrelerin canlılıkları kantitatif olarak ters faz mikroskobu ile alınan mikrograflarla değerlendirilmiştir. Kalitatif canlılık değerlendirmeleri için ise haftalık olarak MTT kiti ve ALP aktivitesi tespiti, histokimya analizlerinde vK ve AR boyamaları, immünohistokimya analizlerinde ise anti-kollajen-tip-1 ve anti-osteokalsin antikor boyamaları gerçekleştirilmiştir. 28. gün ise SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. *İn vivo* deneyleri için erkek Yeni Zelanda tavşanları kullanılarak femur kemiği proksimalinde mikromatkap yardımıyla lateralde trokanter majör üzerinden medialde trokanter minör medial korteksine doğru bir tünel açılarak 1,5 mm çap, 4 mm uzunluktaki test materyali, oluşturulan bu tünele yerleştirilmiş ve 6-12 haftalık periyotlarda takibi yapılmıştır. *İn vivo* çalışmalar kapsamında biyomalzemelerin sitotoksitesini belirlemek için biyokimya analizleri, radyografi ve histoloji analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. BİYOMALZEMELER

Biyomalzeme kendi içerisinde çok geniş bir alan olup disiplinler arası bir alan konumundadır ve bir kaç mühendislik dalı, tıp, diş hekimliği, eczacılık ve veterinerlik gibi alanların ortak bilgisine ihtiyaç duyar. Ancak genel ve ortak bir tanım olarak biyomalzeme, farklı amaçlar ile vücudun farklı bölgelerinde kullanılabilen ve doku kaybını engellemek, iyileşme sürecini desteklemek ve kayıp bir işlevi yerine getirmek amacı ile kullanılmaktadır.

İnsan hayat kalitesini önemli ölçüde etkileyen biyomalzemeler üzerine yapılan çalışmalar çok eskiye dayanmaktadır. İmplantlara duyulan ihtiyaç sadece yaşlılık durumunda veya doğumda karşılaşılabilecek eksik uzuv vakalarında ortaya çıkmamaktadır. Trafik kazaları, spor sırasında sakatlanmalar, postürel bozuklukların tetiklediği durumlar da iskelet sisteminin işlevini yitirmesine neden olabilir. Karşılaşılan bu rahatsızlıklar ortopedik implantlar yardımıyla giderilebilmektedir. Ancak bu metalik implantların ortalama 10-15 yıl olan ömürleri ileri yaştaki hastalar için kısmen uygun olsa bile genç hastalar için yeterli değildir. Hastalıklı doku ve organları desteklemek, tedavi etmek amaçlarıyla ve kimi zaman da bu doku ve organların yerini alacak şekilde tasarlanan biyomalzemeler, uzun yıllar bizlere eşlik etmektedir (İbrahim vd., 2017; Manivasagam vd., 2010). İnsan hayat kalitesini bu denli etkileyen malzemelerden aynı anda beklenen pek çok farklı özellikler mevcuttur. Bu özelliklerin hepsini aynı anda sağlayabilecek ve tamamen doğal olan malzeme ile aynı özellikleri gösterebilecek bir biyomalzeme henüz üretilmemiştir. Dolayısıyla günümüzde kullanılmakta olan bütün biyomalzemeler gelişen teknoloji ve yeni oluşturulan malzeme kombinasyonları ile geliştirilebilir. Bu nedenle bu alanda yapılan çalışmalar gün geçtikçe ilerleme kaydetmekte ve güncelliğini hiçbir zaman kaybetmemektedir.

Vücut içinde hasar görmüş bir dokunun tedavisini sağlamak ve sonrasında vücuttan atılmak veya bu doku ile temas halinde bir ömür boyu vücutta kalıcı bir şekilde bulunmak üzere üretilen, canlı dokular ve vücut sıvıları ile temas halinde iken toksik etki yaratmayan malzemelere biyomalzemeler denir. Biyomalzemeler metalik, seramik, polimerik ve kompozit olacak şekilde sınıflandırılabilir. Kullanım yerlerine bağlı olacak şekilde farklı malzeme sınıfları tercih edilmektedir. Örneğin, dental uygulamalarda sert malzemeler tercih edilirken iç organları desteklemek veya bu organların yerine kullanılacak yapay kalp kapakçık uygulaması gibi uygulamalarda polimerik biyomalzemeler tercih edilir. Bu konuda esas olan, doğal olana en yakın özellikleri gösterecek malzemeleri seçebilmektir.

Biyomalzemelerin vücutta uzun süre durabilmesi için doğalına yakın veya doğaldan biraz daha yüksek mekanik özellikler, yeterli aşınma dayanımı, biyouyumluluk ve osseointegrasyon (kemik dokusu ile bağ yapabilme) özelliği sergilemesi gerekmektedir. Nihayetinde yerine geçeceği bölgedeki organ veya dokuyu birebir taklit edecek şekilde tasarlanmaya çalışılır. İstenilen özellikler ise kullanım yerine göre değişiklik gösterir. Vücudun farklı bölgeleri farklı pH değerlerine sahip olabilir. Vücuda yerleştirilecek olan biyomalzemenin o bölgedeki pH değeri ile uyumlu olması önemlidir (Kokubo vd., 2003; Manivasagam vd., 2010). pH değerlerinin yanı sıra vücut içinde farklı bölgeler farklı gerilmelere maruz kalabilirler. Tendon ve kaslar çekme gerilmesine, farklı bölgelerdeki kemikler basma gerilmelerine maruz kalabilir. Bu gerilmelerin şiddetleri 80 MPa'a kadar ve hatta sıçrama gibi faaliyetlerde bu gerilmeler 10 kat kadar daha fazla olabilir (Ramakrishna vd., 2001). Bu nedenlerle vücut içinde kullanılacak biyomalzemenin sertlik, elastisite modülü, mukavemet değerleri önem arz etmektedir. Ayrıca belirli aralıklarla veya sürekli gerilmelere maruz kalacak biyomalzemeler için yorulma dayanımı da önemli bir parametredir (Li vd., 2016).

2.1. Biyouyumluluk

Biyoyumluluk, biyomalzemenin implante edilmesi sonrası kendisini çevreleyen dokularda herhangi bir hasar meydana getirmemesidir. Yani kullanılan biyomalzeme hücrelerin canlılığına olumsuz etki etmemeli, ödem veya alerjik/toksik reaksiyonlara sebep olmamalı ve kararlı bir yapıya sahip olmalıdır. Biyomalzemeler farklı şekillerde biyouyum gösterebilirler (Geetha vd., 2009; Heimann, 2013; Oshida, 2007). Biyomalzemelerin biyouyumlulukları; biyoaktiflik, biyoinertlik, biyoçözünürlük ve biyotolerantlık şeklinde olabilir. Kullanım yerine göre biyomalzemenin beklenen özellikler doğrultusunda tüm bu biyouyumluluk türlerinin tercih edildiği uygulamalar mevcuttur. Biyoaktiflik biyomalzemelerin doku ile temas ettiğinde dokunun kolaylıkla büyümesini teşvik eder niteliktedir. Biyoinert olması durumunda tam bir birleşme sağlanamaz ve doku ne çözünür ne de tam aktif bir ara yüzey sergiler. Biyoçözünür olması durumunda kullanılan biyomalzeme zamanla çözünür ve yerini sağlıklı dokuya bırakır. Biyotolerant olması halinde ise genellikle metalik biyomalzemelerde gözlemlenen bir biyouyumluluk türüdür. Malzeme vücut sıvıları ve dokular ile temas halinde iken bir miktar korozyona uğrar ve iyon salınımı yapar. Bu iyon salınımı miktarı az olduğu için kısa zamanda olumsuz etkilerini görebilmek

pek de mümkün değildir ve bu etkiler tolere edilebilir etki olarak kabul edilir (Güven, 2014; Heimann, 2013; Kokubo, 2008; Oshida, 2007).

2.2. Metalik Biyomalzemeler

Metalik biyomalzemeler yüksek mekanik özellikleri nedeni ile biyomalzeme uygulamalarında eski dönemlerden beri sıklıkla kullanılmaktadır. Biyomalzeme alanında büyük payı olmasına rağmen metalik malzemelerin biyouyumluluğu düşüktür. Çoğu zaman biyotolerant kabul edilirler ve bu nedenle pek çok metal malzemeye çeşitli işlemler uygulanarak yüzeyin doku ile uyumu artırılmaya çalışılmaktadır. Yüzeyin biyoaktivitesi implantın çevre doku ile bağ yapmasını doğrudan etkilediği için son derece önemlidir. Doku ile bağ kurulamaz veya zayıf bağlanma olursa implantta yük ve zorlanma etkisi ile gevşeme sonucu istenmeyen bir durum oluşabilir. Bu gibi durumlarda dokuda enfeksiyon olabileceği gibi implantın kullanılamaz duruma gelmesi de söz konusu olabilir. Bu duruma sebep olabilecek bir diğer etmen ise korozyon ve buna bağlı iyon salınımıdır. Vücutta pasif olarak bilinen biyomalzemelerde dahi uzun vadede veya aşınma sebebiyle iyon salınımları gerçekleşebildiği için korozyon performanslarını iyileştirmeye yönelik çalışmalar halen devam etmektedir. Biyouyum ve iyon salınımı gibi dezavantajlarına rağmen yine de mekanik olarak son derece üstün performans göstermeleri nedeniyle metalik malzemeler en çok tercih edilen biyomalzeme gruplarından biridir. Bu grupta en çok kullanılan malzemeler ise paslanmaz çelikler, kobalt-krom alaşımları, titanyum ile titanyum alaşımları ve magnezyum alaşımlarıdır. Bazı biyomalzemelerin mekanik ve fiziksel özellikleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı biyomalzemelerin fiziksel ve mekanik özelliklerinin karşılaştırılması (Carter ve Norton, 2013; Dowling, 2012; Gupta ve Sharon, 2011; Ibrahim vd., 2017; James vd., 2015; Kokubo vd., 2003; Lide, 2003; Staiger vd., 2006)

Malzeme	Yoğunluk (g/cm ³)	Akma Mukavemeti (MPa)	Elastik Modül (GPa)	Tokluk (MPa√m)
Süngerimsi Kemik	-	4-12	0,02-0,5	-
Kortikal Kemik	1,8-2,1	130-180	10-40	3-6
Ti ve Ti Alaşımları	4,4-4,5	590-1117	55-117	55-115
Co-Cr Alaşımları	8,3-9,2	450-1896	200-253	100
Paslanmaz Çelik	7,9-8,1	170-310	189-205	50-200
Mg Alaşımları	1,74-2,0	65-100	41-45	15-40
Yapay hidroksiapatit	3,1	600	73-117	0,7
Tantal Pentaoksit	8,2	-	100	3-10

2.3. Seramik Biyomalzemeler

Seramik biyomalzemeler tarihin en eski biyomalzemeleri olarak da bilinmekte olup fildişi protezler ile başlayan ve günümüze kadar gelen bir kullanım sürecine sahiptir. Seramikler kimyasal olarak kararlı ve çok yüksek dayanıma sahip malzemelerdir. Bu malzemelerin insan vücuduyla uyumlu olmaları, önemli bir avantajdır. Sadece sentetik olarak üretilmelerinin yanı sıra, doğal kaynaklardan da elde edilebilmeleri (örneğin sığır kemiği, yumurta kabukları, midye kabukları, balık kılçıkları, denizkestaneleri, mercan kayalıkları), bu malzemelerin çeşitli kaynaklardan temin edilebilmesini sağlayarak büyük bir avantaj sunmaktadır. Ancak kırılma yapıları, plastik deformasyona müsaade etmeden kırılmalarına neden olur. Fakat basma mukavemetleri aksine oldukça yüksektir. Bu kırılma eğilimi tolere edebilmek için polimer veya metalik malzemeler matris olarak kullanılarak kompozit malzeme halinde kullanılabilirler, özellikle metalik malzemelerde biyouyumluluğu artırmak için yüzey kaplaması olarak tercih edilmektedir. Seramik biyomalzemeler vücutla etkileşim şekline (kimyasal reaktivliklerine) göre “biyoinert”, “biyoaktif” ve “biyoçözünür” olarak üçe ayrılır.

Biyoinert seramikler, vücutla etkileşime girmeyen, inert bir yapıya sahip olan malzemelerdir. Aynı zamanda oksit seramikleri olarak bilinirler ve oksijen iyonlarından oluşan düzlemde metal iyonların dağılması ile meydana gelen çok kristalli seramiklerdir. Bu seramikler, dokularla sadece mekanik bir bağlantı sağlar ve kimyasal etkileşime girmezler. Vücuda implant edildiklerinde, implant çevresinde ipliksi bir yapı olan fibroz tabakayı

oluşturur ve bu fibroz yapı doku-implant etkileşimine engel olur; herhangi bir toksik etkileri bulunmaz. İpliksi tabakanın kalınlığı, seramik malzemenin biyoinertlik derecesine bağlı olarak değişebilir. Kimyasal bağ oluşturmamaları bir eksiklik olsa da, yüksek dayanıklılıkları sayesinde ortopedik uygulamalarda başarıyla kullanılmaktadırlar. Alümina (Al_2O_3) ve zirkonya (ZrO_2) biyoinert seramik örnekleridir.

Biyoaktif seramikler, dokular ile bağ kurduklarından arayüzeyde fibroz tabaka gözlenmez. Yüksek biyoaktiviteleri sayesinde yüzeyde doku büyüebilmekte ve böylece kemikle bütünleşme sağlanabilmektedir (Kokubo vd., 2003). Bu sayede biyoinert özellikteki seramiklerin aksine gerilmelere çok daha dayanıklıdır. Aktif yüzey alanının artırılması gerekli görüldüğünde gözenekli halde üretimi mümkündür. Sünek yapılı olmamaları nedeniyle daha çok basma mukavemeti gereken yerlerde kullanılırlar. Bunun yanı sıra yüksek mukavemetli malzemelerle beraber kullanılarak mekanik özellikleri iyileştirilebilir. Bu kullanımlara örnek verilecek olursa, ortopedik kaplamalarda, diş ve çene kemiği tedavilerinde, yüz kemiklerinde, kulak kemiklerinde, kalça ve diz protezlerinde ise kemik tozu şeklinde kullanımları mevcuttur. Biyoaktif seramiklerden en bilinenleri kalsiyum fosfatlar ve düşük silikatlı camlardır (Tan vd., 2013). Hidroksiapatit te biyoaktif seramikler grubunda yer alan bir yapıdır. Bu gruptaki seramikler hasarlı dokunun iyileşme sürecinde oluşan ara tabakanın muhafazası ve implant doku bağlanmasının geliştirilmesi için kullanılmaktadır (Dhinasekaran vd., 2021; Jiang vd., 2022).

Biyobozunur seramikler, vücutta kullanıldığı yerde zamanla bozunarak doku ile yer değiştirir ve çözünen biyomalzeme ise vücut içerisinde emilir veya vücuttan atılır. Burada önemli olan çözünen maddenin toksik etki yaratmamasıdır. Kullanılan biyomalzemenin yüzey alanı, kimyasal bileşimi, yüzey özellikleri çözünme hızının ve miktarının kontrol edilmesini sağlar. Dünden bugüne sağlık sektöründe kemik dolguların tedavisinde, dişçilikte anemi tedavisinde, yaralı ve kırık kemiklerin tedavisine kadar pek çok alanda kullanımı mevcuttur. Biyobozunur seramikler için yaygın kullanıma sahip malzemeler ise trikalsiyum fosfat (TCP), alüminyum-kalsiyum-fosfat (ALCAP) ve ferrik-kalsiyum-fosfor-oksit (FECAP) örnek olarak verilebilir.

2.4. Polimerik Biyomalzemeler

Polimer malzemeler, polimerizasyon yöntemi ile üretilirler. Bu üretim yönteminin yapıtaşlarını daha küçük birimler olan monomerler oluşturur. Monomer yapılar birleştğinde oluşan polimerler zincirlerin büyüklüğüne ve bağlanma şekline göre birbirinden farklı özellikler sergilerler. Doğada kendiliğinden oluşan polimerlerin yanı sıra yapay üretilmeleri de mümkündür. Doğal polimerler, kimyasal reaksiyonlar sonucunda biyolojik sistemin bir parçası olarak meydana gelirler. Proteinler (kollajen, jelatin, aktin, vb.), polisakkaritler (kitin, nişasta, selüloz, vb.) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) bunlara verilebilecek en önemli örneklerdir. Yapay üretilen polimerler biyomalzeme olarak pek çok kullanım alanına sahiptir. Özellikle polipropilen (PP), polietilen (PE), polimetil metakrilat (PMMA), politetrafloroetilen (PTFE), polilaktik asit (PLA), silikon kauçuk, poliamidler, polivinil klorür (PVC), polietilen tereftalat (PET) ve hidrojelers öne çıkan örneklerdir. Örneğin ışığı geçirilmesi, hidrofobikliği, mukavemeti ve kimyasal kararlılığı sayesinde gözle uyumlu bir malzeme olan PMMA sert kontakt lenslerde kullanılırlar. Kalp kapakçıkları gibi elastikliğin önemli olduğu uygulamalarda veya biyobozunur ameliyet ipliği örneği gibi uygulamalarda kullanılabilirler. Sentetik ve doğal birçok polimer kullanım yerindeki young modülü ve yoğunluk değerlerine göre farklı uygulamalarda tercih edilebilirler (Güven, 2014; Yang vd., 2020b)(Güven, 2014; Kandala vd., 2021; Soni ve Rodell, 2021; Yang vd., 2020a). Dayanım gerektiren kalça protezlerinde, kateterlerde özellikle yüksek yoğunluklu polietilen (UHMWPE) kullanımı daha uygundur. Yüksek sıcaklıkta sterilizasyon gerektiren malzemelerde ise düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) kullanımı uygun değildir. Polipropilen (PP), PE'nin kullanıldığı pek çok yerde kullanılabilir. Kimyasal direnç ve sıcaklık gerektiren uygulamalara politetrafloroetilen (PTFE) uygun bir polimerdir. Buna ek olarak PTFE yüksek hidrofobik özelliği sayesinde damar protezlerinde tercih edilir. Kan nakli ve diyaliz makineleri gibi tıbbi cihazlarda ise PVC (polivinil klorür) kullanılmaktadır. Plastikleştirici katıldığında, PVC'nin kırılkan yapısı esnek hale getirilebilir; ancak zamanla plastikleştiricilerin sızma eğilimi göstermesi ve zehirli olmaları nedeniyle uzun süreli kullanımda sorunlara neden olabilir. Mukavemetleri sayesinde dikiş ipliklerinde naylonlar kullanılırlar (Bronzino ve Peterson 2015; Enderle ve Bronzino, 2012).

2.5. Kompozit Biyomalzemeler

Bir malzemenin tek başına tüm gereksinimleri karşılayamadığı durumlarda, eksik yönlerini

tamamlamak için başka bir malzeme ile birleştirilmesi gerektiği durumlarda, biyokompozit malzemelere başvurulur. Bu malzemeler, en az iki farklı malzemenin bir araya getirilmesiyle oluşabileceği gibi, birbirinden farklı malzeme kombinasyonlarını içeren çeşitli bileşenleri bir arada barındırabilirler. İstenilen özelliklere sahip malzemelerin birleştirilmesi ile hafiflik, sertlik, dayanım, biyoyum gibi farklı özelliklerin optimum birleşimine sahip olacak şekilde üretilmesine olanak sağlanmış olur (Enderle ve Bronzino, 2012). Diğer biyomalzemelere göre biyokompozit malzemeler, çok daha karmaşık bir yapıya sahiptir ve bir dizi parametreye bağlıdır. Bu malzeme, genellikle matris fazı ve takviye elemanı fazı olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Takviye bileşeni genellikle güçlendirici bir rol oynar ve tamamen çözünebilir, kısmi çözünebilir veya inert bir karaktere sahip olabilir. Genellikle, takviye bileşenleri arasında karbon fiberler, cam fiberler, polimer fiberler ve seramik partiküller bulunurken, polimerler en sık kullanılan matris bileşenidir. Biyokompozitler özellikle doku-biyomalzeme uyumsuzluklarını azaltmak amacıyla kullanılır. Bu malzemelerin kullanım alanları arasında ortopedik cerrahi uygulamalar, ağız ve çene cerrahisi, kalp-damar cerrahisi ve dermatoloji bulunmaktadır. Örneğin, cam fiber takviyeli polimer matrisler, karbon/grafit fiber takviyeli seramik matrisler (kalsiyum fosfat), polimer fiber (UHMWPE) takviyeli polimer matrisler (PMMA) ve seramik partikül (HA) takviyeli polimer matrisler (PE) biyokompozitlere örnek olarak gösterilebilir. (Bronzino ve Peterson, 2015; Enderle ve Bronzino, 2012).

2.6. Toz Metalurjisi İle Üretim

Boyut ve tolerans olarak hassas parça üretimi TM yöntemi ile çok daha kolay bir şekilde gerçekleştirilebilir. Literatürde toz metalurjisi yöntemi kullanılarak üretilen AZ91 Mg alaşımı ürünlere yönelik yapılan çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Taleghani, ve Torralba, (2013) tarafından yapılan çalışmada AZ91 alaşımının sıcak deformasyonu için optimum koşulların 275-325 °C sıcaklıklarda elde edildiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmada koruyucu atmosfer olarak Ar tercih edilmiştir (Taleghani ve Torralba, 2013). Diğer araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada ise AZ91 Mg alaşımı numuneler farklı sıcaklıklar (380-400-420 °C), farklı basınç değerleri (150-250 MPa) ve farklı süreler (1-3-5 saat) kullanılarak sıcak preslenme yöntemi ile %95 N₂ + %5 H₂ atmosferi altında üretilmiştir. Elde edilen numunelerin yoğunluk değerleri presleme basıncındaki artışa bağlı olarak artarken, diğer taraftan kalsinasyon sıcaklığı ve süresinin eğme mukavemetini olumsuz yönde etkilediği görülmüştür (Tahmasebifar vd., 2016).

2.7. Biyomalzeme Olarak Mg Alaşımları

Magnezyum alaşımları spesifik mukavemet ve rijitliklerinin yüksek (Hu vd., 2010; Jamesh vd., 2015; Wang vd., 2011, 2016; Xiong vd., 2015), düşük yoğunluklu (Fintová ve Kunz, 2015; Wang vd., 2010) ve yüksek titreşim sönümleme kabiliyeti (Taleghani ve Torralba, 2013) sayesinde otomotiv sektöründe vites kutuları ve motorda, şasi ve kaporta parçalarında, hava-motor helikopter elemanlarında yaygın olarak tercih edilmektedir (Hiromoto ve Yamamoto, 2009; Öztürk ve Kaçar, 2012). Kemik ile benzer olan mekanik özellikleri sayesinde mekanik biyouyumluluk gerektiren biyomalzeme uygulamalarında da kullanılmaktadır (Liu vd., 2011a; b). AZ91 alaşımı özellikle döküm ve TM metodu ile üretilebilir (Tahmasebifar vd., 2016). Kısa üretim süreci, seri üretime yakınlık ve uygun maliyet açısından döküm metodu ile üretim avantajlı olsa da gözeneklilik, düşük dayanım ve soğuk birleşme gibi olumsuz yönleri de mevcuttur (Taleghani ve Torralba, 2013). Buna ek olarak boyut hassasiyetinin önem arz ettiği biyomedikal uygulamalarda gerekli toleransı karşılayamamaktadır.

Titanyum ve alaşımları, kobalt esaslı alaşımlar ve paslanmaz çelik gibi metalik malzemeler, özellikle sert doku tamirine yönelik biyomalzeme üretiminde günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu malzemeler kemikle kıyaslandığında, yoğunluklarının aşırı yüksek olması nedeniyle gerilme bariyer etkisine, bunun sonucunda doku-implant arayüzey uyumsuzluklarına ve enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Sert ve yumuşak dokularda kullanılan biyomalzemelerin mekanik dayanımları da çevresindeki dokular ile paralel olacak şekilde olmalıdır. Gerilim bariyer etkisi şeklinde tanımlanan etki, mekanik dayanımın implantı çevreleyen dokulardan daha fazla olması sonucu etrafındaki dokularda hasara neden olmasıdır. Bu durumda aslında mekanik özelliklerin çok üstün olması değil, kullanım yerine göre çevresindeki dokulara uyum sağlayacak yeterlilikte olması beklenir.

Böyle durumlar çoğunlukla implant kaybı ve yeni travmatik doku hasarı ile sonuçlanmakta ve dolayısıyla ikincil operasyon gerektirmektedir. Bunlara karşın Mg alaşımlarının biyouyumluluğuna ek olarak kemik ile benzer mekanik özellikleri ve düşük yoğunluğu sayesinde bilimsel araştırmalarda çalışma konusu haline gelmiştir. Genellikle biyobozunur özelliğinden faydalanılarak çeşitli çalışmalar yapılmış ve ortopedik fiksasyon araçları (vida ve plaka vb.) gibi biyomalzeme uygulamalarında başarılı olduğu görülmüştür. Günümüzde metalik biyomalzeme olarak kullanılan malzemeler arasında en düşük yoğunluğa sahip olan

magnezyumdur. Fakat diğer metaller gibi magnezyumun da saf hali yapısal ve biyomalzeme uygulamalarında kullanım için yeterli gelmez. Mukavemet artırıcı yöntemlerin başında ise alaşımlama ve çökelti sertleşmesi mekanizmaları gelir. Mg alaşımları için kullanılan alaşım elementlerinden Al, mukavemeti; Zn tokluğu; Mn ise korozyon dayanımını arttırmaktadır (Chen ve Thouas, 2015; Öztürk ve Kaçar, 2012).

AZ91 Mg alaşımı, yukarıda bahsedilen özellikleri açısından Mg alaşımları içinde en iyi kombinasyona sahip alaşımlarından biridir. Ancak biyobozunur olması kalıcı biyomalzeme uygulamaları için en büyük dezavantajıdır ve bunun kontrol altına alınabilmesi için bilimsel araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla kompozit türevlerinin oluşturulması, yüzey modifikasyonları ve/veya farklı kimyasal ya da fiziksel kaplamalar yapılarak biyobozunurluğunun önlenmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Bu işlemler sadece korozyon dayanımı sağlamaya yönelik olmayıp, ayrıca biyomalzemelerdeki farklı ihtiyaca yönelik özelliklerin de geliştirilmesini amaçlamaktadır. AZ91 Mg alaşımı yaklaşık olarak %9 Al ve %1 Zn içermektedir (Hiromoto ve Yamamoto, 2009; Majumdar vd., 2008; Razavi vd., 2010a; Zhang vd., 2010). Düşük yoğunluğu sebebiyle Mg alaşıma hafiflik sağlarken, yapısında bulunan Zn çökeltme sertleşmesi, Al ise katı eriyik mukavemetlenmesi ile yorulma dayanımı sağlar (Murugan vd., 2009; Zhang vd., 2010, 2011). Magnezyum alaşımları içerisinde korozyon direnci, hafiflik ve mukavemet açısından optimum değerlere sahip olan (Murugan vd., 2009) AZ91 alaşımı yüksek biyoyumluluğu, hafifliği ve mekanik özelliklerinin kemik ile çok yakın olması sebebiyle biyomedikal uygulamalar için yoğun olarak çalışılmaktadır (Hu vd., 2010; Niu vd., 2016; Xiong vd., 2015). Öncelikle AZ91 alaşımı, fiksasyon gibi ikincil operasyonları gerektiren işlemlerindeki post operasyonları ortadan kaldırmak için üzerinde çalışılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda ise son yıllarda vücuttaki iyileşme sürecini tamamlayabilesi açısından, biyobozunma hızını ve süresini kontrol altına almaya yönelik çalışmalar yapılmıştır (Kayhan vd., 2016; Kumar vd., 2016; Liu vd., 2011b; c; Razavi vd., 2010b, 2015). Biyobozunurluk sürecinde, Magnezyum alaşımlarının korozyon ürünleri olan iyonlar, toksik seviyeye ulaşmadan boşaltım sistemi yoluyla vücuttan atılmaktadır (Gopi vd., 2015). Bu iyonların vücuda herhangi bir zararı olmadığı gibi (Fintová ve Kunz, 2015), Mg iyonları yeni kemik hücrelerinin çoğalmasında da teşvik ederek kemik gelişimine destek sağlamaktadır (Gopi vd., 2015; Ren vd., 2015; Wang vd., 2010). Ancak bütün bu avantajların yanı sıra AZ91'in bileşiminde bulunan alüminyum vücuda çok hızlı salındığında vücuttan atılamamakta, nöronlara ve osteoblastlara zarar

vererek dementia ve alzheimer hastalıklarına sebep olduğu düşünülmektedir (Kumar vd., 2016; Pan vd., 2015).

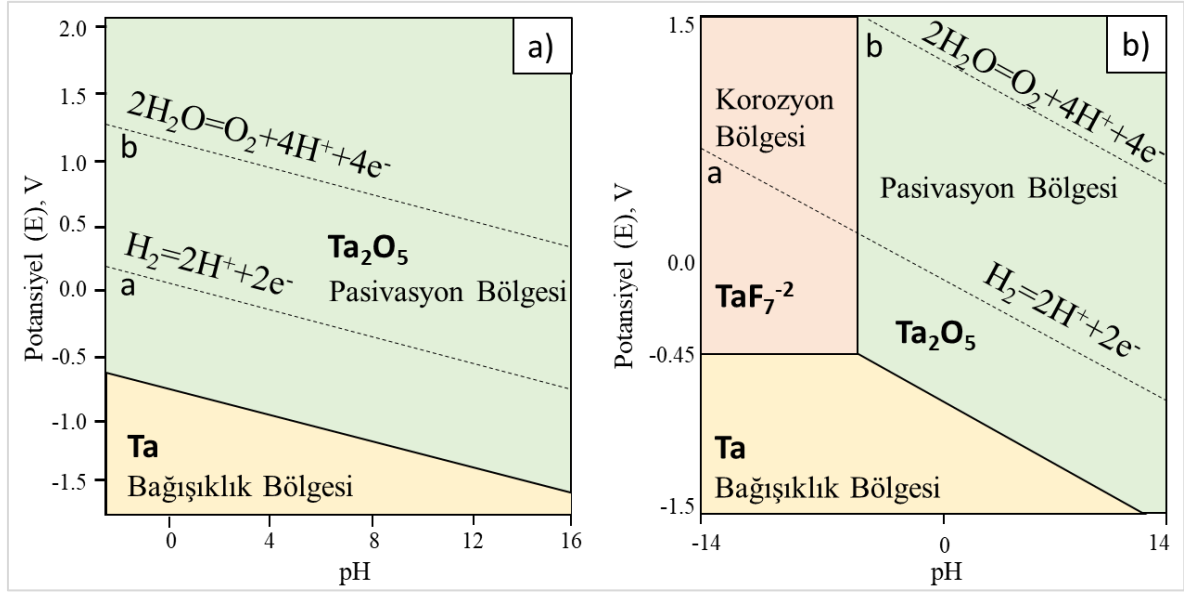
2.8. Biyomalzeme Olarak Tantal ve Tantaloksit

Tantal 5B grubuna ait geçiş elementidir. Ergime sıcaklığı 3017 °C'dir ve refrakter özelliklidir. Yüksek mukavemetlidir ve iyi süneklik gösterir. Korozyon direnci yüksek sıcaklıklarda kullanılmadığı sürece oldukça iyidir, sadece florür iyonlarınca zengin asidik çözeltilerden, serbest kükürt trioksit ve hidroflorik asitten etkilenir (Lide, 2003). Oksitleri arasındaki en kararlı formu tantal pentaoksittir (Ta_2O_5) ve ergime sıcaklığı 1784°C'dir. Ortalama 400°C sıcaklığa kadar amorf yapıda olup bunun üzerindeki sıcaklıklarda alfa ve beta olarak adlandırılan iki farklı kristal yapıya dönüşür (Stavrou vd., 2017).

Ta elementi mükemmel kırılma tokluğuna ve işlenebilirliğe sahip (Chang vd., 2014a), yüzeyde kendiliğinden oluşturduğu kararlı oksit tabakası sayesinde çok iyi korozyon direnci sergileyebilen bir elementtir (Cheng vd., 2006; Singh vd., 2019a; b; Sowa ve Simka, 2018; Zhou vd., 2013). Ayrıca aşınmaya dirençli, vücuda toksik etki göstermeyen, antibakteriyel ve radyoopak (röntgen ve MRI görüntülemelerinde optik özellikleri iyileştiren) özelliklere de sahiptir (Chang vd., 2014a).

Ta korozyon dayanımı en yüksek element olarak bilinmektedir. Şekil 2.1'de Ta elementine ait potansiyel-pH diyagramı sunulmuştur. Tantalın yüzeyde oluşturduğu oksit katman ile yüzeyini kararlı hale getirdiği ve pasivasyon bölgesi oluşturduğu Şekil 2.1.a'daki diyagramdan da net bir şekilde görülmektedir. Oksit oluşmayan tek bölge ise bağımsızlık bölgesidir. Daha açık ifade edilecek olursa korozyon bölgesi mevcut değildir (McCafferty, 2010). Yalnızca Şekil 2.1.b'de gösterildiği gibi çok kuvvetli asidik ortamlarda ($pH < 3$) korozyona uğramaktadır (Sapra vd., 2006).

Tantalın tıptaki kullanımı 1940'lı yıllara dayanmaktadır. Radyoopaklığı sayesinde radyolojik işaretlemelerde, biyouyumluluğu, yüksek mekanik ve korozyon dayanımı sayesinde endovasküler stentlerde, vasküler klipslerde, ortopedik ve kraniyoplasti plakalarında ve diş implantları gibi geniş bir yelpazede günümüzde kullanım alanı bulmuştur (Chang vd., 2014a; Ma vd., 2016). Stabil oksit tabakası sayesinde vücut içerisinde tamamen biyoinert davranış gösterir (McCafferty, 2010).



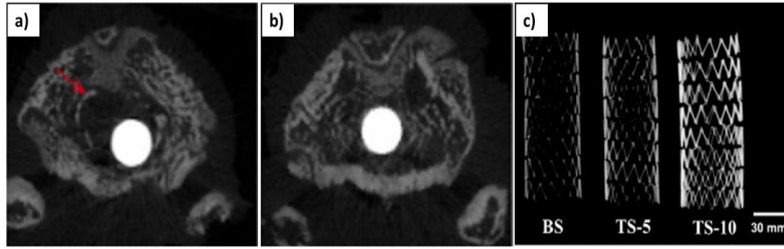
Şekil 2.1. a) Tantal elementinin potansiyel-pH diyagramı, b) 1,0 M'lık HF çözeltisinin içindeki Tantal elementinin potansiyel-pH diyagramı (McCafferty, 2010; Sapro vd., 2006)

Yüksek aşınma ve korozyon dayanımını sergileyen Ta₂O₅'in birçok alanda kullanımı mevcuttur:

- Kimyasal ve biyolojik sensör uygulamalarında ve seçici gaz dedektörlerinde kullanılabilir (Manjakkal vd., 2016; Wolf vd., 2013; Yildirim vd., 2005).
- Saf hali kolay işlenebilir ve yüksek sıcaklık dayanımı sayesinde elektronik kondansörlerde, jet ve uçak motor elemanlarında kullanılmak amacıyla süper alaşım üretiminde ve roket parçalarının imalinde, nükleer reaktörlerde kullanımları mevcuttur (Krebs, 2006).
- Kimyasal kararlılığı, üstün fiziksel özellikleri ve biyoyumluluğu sayesinde implantlarda (Rahmati vd., 2015a), cerrahi aletlerde ve yüzey hassasiyeti yüksek olan optik sensör uygulamalarında kullanılması mümkündür. Yüksek korozyona dayanımı ve antibakteriyel (Chang vd., 2014a) özellikleri sayesinde biyomedikal alanda yüksek potansiyele sahip bir malzemedir. Ti alaşımları ve Ni-Ti alaşımları yüzeyine korozyon sebebiyle iyon salınımını engellemek için kaplama olarak uygulanmış ve oldukça başarılı sonuçlar sergilemiştir (Arnould vd., 2010; Zein El Abedin vd., 2005).

İmplant ve protezlerde Ti, Nb, Mo, Zr ve Co-Cr alaşımlarına takviye olarak veya yüzeylerine kaplanarak kullanımları söz konusudur (Balagna vd., 2012, 2014; Biesiekierski vd., 2016; Hussein vd., 2016; Liu vd., 2017). Ta alaşım takviyesinin kullanıldığı implant malzemelerde biyoyumluluğun ve korozyon dayanımının arttığı görülmüştür (Biesiekierski vd., 2016; Ma

vd., 2014; Singh vd., 2019a; b; Sowa ve Simka, 2018; Stenlund vd., 2015; Xu vd., 2015). Takviye elemanlarının kullanılmasının yanı sıra farklı kaplama yöntemleri kullanılarak da yüzey özelliklerinin geliştirilebileceği bilinmektedir. Tantal ve tantal oksit kaplamalar yapılarak alaşımlara radyopak özellik kazandırılması mümkündür (Chang vd., 2014a; Zhou vd., 2013).



Şekil 2.2. Sıçana implante edilen a) Kaplanmamış Ti malzemesi ve b) Ta-TaO-Ta₂O₅ kaplı Ti malzemesi ile kemik arayüzeyine ait Micro-CT görüntüleri (Yang vd., 2019). c) BS: Kaplanmamış NiTi; TS-5: 5 μ m Ta kaplı NiTi ve TS-10: 10 m Ta kaplı NiTi stent malzemelerinin X-Ray görüntüleri (Park vd., 2016)

Yang vd., (2019) Ti ile Ti altlık üzerine, Ta ve oksitli Ta yapılarından oluşan nanofilm kaplanmış malzemeleri sıçana implante ederek mikro-CT görüntülerini almış ve kemik-implant ara yüzeyindeki davranışı incelemişlerdir. Şekil 2.2.a'da kırmızı ok ile gösterilen kemik yıkımının Şekil 2.2.b'deki nanofilm kaplı yüzeyde gerçekleşmediği ve arayüzeyin yekpare olduğu görülmektedir. Bu durum, Ta kaplı yapıların integrasyonu arttırdığını, enfeksiyon oluşumunu elimine ettiğini göstermektedir (Yang vd., 2019). Şekil 2.2.c'de verilen Park vd., (2016)'nın yaptığı çalışmada ise NiTi stent malzemenin kaplanmamış hali ile 5 ve 10 μ m'lik Ta kaplanmış stent malzemelerinin X-ray görüntüleri alınarak radyopaklıkları karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucu, Şekil 2.2.c'de de açıkça görüldüğü üzere Ta kaplama tabakası kalınlığının artması sonucu radyopaklık artmıştır (Park vd., 2016). Ta kaplama Ti içerikli metalik implantların X-ray görünürlüğüne yani radyopaklığını arttırmaktadır (Park vd., 2016, 2019; Yang vd., 2019). Radyopak özelliğin yanı sıra korozyon özelliklerinde üstün bir artış ve hücre büyümesini de destekler yapıda Ta ve Ta₂O₅ kaplamalar olduğu, bu kaplamalarla kemik apatit oluşumunun hızlandırılabildiği ve osseointegrasyonun sağlanabildiği farklı çalışmalarda da vurgulanmıştır (Arnould vd., 2010; Balla vd., 2010; Biesiekierski vd., 2016; Kokubo vd., 2003).

Kemik yapısındaki maddelerin yoğunluğunun ölçülmesinde, kemik madde kaybının tespit edilmesinde, kemik densitesinin saptanmasında, dokular ile restoratif malzemelerin

opasitelerinin değerlendirilmesinde ve teşhiste densitometre kullanılır. Bununla birlikte implantların osteointegrasyonunun ve kemik greftlerinin kemikleşme oranlarının belirlenmesinde de yine densitometre kullanılmaktadır. Densitometrik Analizlerin yapılmasında ISO ve ANSI/ADA materyallerin radyoopasitesinin belirlenmesi için alüminyum alaşımının referans olarak kullanıldığı standart yöntemler benimsenmiştir. Buna göre, materyallerin radyoopaklık miktarlarının ölçülümünde, alüminyumdan yapılmış %99,5 saflıkta 1 mm kalınlığında “Alüminyum Step-wedge” referans olarak kullanılmaktadır. Radyoopaklık ayrıca klinik tanıda da yardımcı olan bir yöntemdir. Ta₂O₅ farklı kalsinasyon sıcaklık ve sürelerine bağlı olarak bazı faz dönüşümlerini gerçekleştirmektedir (Roth ve Waring, 1970). Kristalin yapıdayken en iyi doku uyumuna ve hücre tutunmasına sahipken, amorf yapıda en iyi antibakteriyel özelliği göstermektedir (Chang vd., 2014a).

2.9. Biyomalzeme Olarak Hidroksiapatit

Ca₅(PO₄)₃X genel formülüne sahip kalsiyum fosfat apatitlerdeki X yerine F⁻ iyonu gelirse fluoroapatit; Cl⁻ iyonu gelirse kloroapatit ve OH⁻ iyonu gelirse de hidroksiapatit adı verilir. Seramiklerin apatit grubunun en yaygın bilinen örneği olan hidroksiapatit (HA), Ca₅(PO₄)₃OH veya Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ formülleri ile gösterilir. 3,219 g/cm³ yoğunluğa sahiptir ve hekzagonal kristal yapısına sahip olan HA'nın kafes parametreleri, a=b=9,432 Å ve c=6,881 Å'dur.

Mükemmel biyoyyum ve biyoaktif özellikler sargıleyen HA biyomedikal uygulamalarda özel bir yere sahiptir. Stokiyometrik olarak 1,5-1,67 aralığında Ca/P oranı gösteren kalsiyum fosfatlar mükemmel biyoaktiviteye ve biyoyyumluluğa sahiptirler (Sadat-Shojai vd., 2013). Doğal kemik hacimde %50 oranında bulunmaktadır. Kemiğe yerleştirildiğinde doğrudan kemik ile kaynaşma sağlayabilir ve kemikteki doku hücrelerinin içeriye alınmasına izin verir. Bu etkileşim osseointegrasyon olarak adlandırılır ve bu sayede kırık ve çatlaklı kemik dokuların tedavisi amacıyla kullanıldığında apatit büyümesini teşvik edici etkiye sahiptir (Chen ve Thouas, 2015). Ortopedik ve diş implant uygulamalarında doğrudan kemik yerine kullanımı mevcuttur. Bunun yanı sıra biyoaktivite gösteremeyen biyomalzemelerde yüzey kaplaması olarak kullanılır ve böylece biyoyyumlulukları arttırılmış olur. Dahası aşınma dayanımının da arttırılarak metal iyonlarının vücuda salınmasına engel olur (Bakhsheshi-Rad vd., 2015; Rajendran vd., 2014; Tan vd., 2010).

HA'nın basma mukavemeti 120–900 MPa, elastik modülü ise 80–110 GPa, eğme mukavemeti 38–250 MPa ve çekme mukavemeti ise 38–300 MPa civarındadır. Vickers sertliği 600 HV'dir. Klasik biyomalzemelere göre mekanik özelliklerinin kemik ile olan benzerliği sayesinde, mekanik uyumsuzluk nedeniyle oluşan 'gerilme bariyer etkisi'ni (stress shielding effect) ortadan kaldıracağı düşünülür (Wang vd., 2011).

HA'nın hazırlanmasında ve kaplanmasında, yaş kimyasal çöktürme, sol-jel, hidrotermal, termal püskürtme, elektroforetik kaplama, daldırmalı kaplama, ultrasonik sprej pirolizi, iyon demeti püskürtme, elektron demeti kaplama, elektrokimyasal kaplama, darbeli lazer kaplama, plazma elektrolitik oksidasyonu, biyomimetik kaplama, sıcak eş basınçlı presleme, mekanokimyasal, emülsiyon ve kıyı mercanlarının dönüştürülmesi yöntemleri kullanılabilir (Barranco vd., 2010; Gu vd., 2011; Kannan, 2016; Liu vd., 2011a; b; Pasinli ve Aksoy, 2010; Ren vd., 2015; Tang ve Gao, 2016; Wang vd., 2010). HA kaplama eldesi için uygulanan bazı yöntemler, bu yöntemlerin ile elde edilen kaplama kalınlıkları ve yöntemlere ait avantaj ve dezavantajlar Çizelge 2.2'de verilmiştir. Bunlardan sol-jel yöntemi düşük sıcaklıklarda moleküler seviyede homojen karışımların elde edilmesini ve nano boyutta tozların üretilmesini mümkün kıldığından diğer yöntemlere kıyasla daha avantajlı ve uygulaması kolay bir yöntemdir (Ma vd., 2014; Wang ve Bierwagen, 2009).

Kemik iyileşmesindeki olumlu etkilerinden dolayı HA hem takviye elemanı, hem de biyomalzemelere yüzey kaplaması olarak kullanılmaktadır (Aktug vd., 2017). Kalsiyum fosfatın tüm formları dokularla son derece uyumludur. Ancak kalsiyum fosfat fazları arasında sadece HA ve dikalsiyum fosfat (DCP) insan vücudunun sıcaklık ve pH değerinde kimyasal olarak stabil kalabilmektedir. Çizelge 2.3'te mekanik özellikleri gösterilen HA çoğu zaman düşük mukavemet ve tokluğu nedeniyle tek başına implant olarak kullanılamamaktadır (Kumar vd., 2016; Wang vd., 2010). Fakat doğal kemik dokusuna kimyasal kompozisyonunun benzerliği sayesinde, biyomalzemenin dokuya daha kuvvetli bağlanmasını sağladığından ve yüksek biyouyumluluğu nedeniyle implant yüzeylerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rojaee vd., 2013, 2014). Metalik altlıklar üzerine HA kaplama uygulanması sayesinde seramik malzemenin biyoaktifliği ve metalin mekanik özellikleri bir arada kullanılarak, seramik kaplama kemik gelişimi için gerekli gözenekliliği sağlarken altlık da yüklemeye karşı gerekli tokluk ve dayanımı sağlamaktadır.

Çizelge 2.2. HA kaplama tekniklerinin avantajları, dezavantajları ve kaplama kalınlıkları (Sun vd., 2001)

<i>Teknik</i>	<i>Kalınlık</i>	<i>Avantajları</i>	<i>Dezavantajları</i>
<i>Termal sprey</i>	30-200 μm	Düşük maliyet, Yüksek biriktirme miktarı	Sürekli takip gerektirir, yüksek sıcaklık bozunmayı tetikler, hızlı soğuma edeniyle amorf kaplama
<i>Püskürtmeli kaplama</i>	0,5-3 μm	Yoğun ve homojen kaplama	Sürekli takip gerektirir, amorf kaplama, zaman alıcı, pahalı
<i>Daldırmalı kaplama</i>	0,05-0,5 mm	Ucuz, hızlı, karmaşık şekillere uygulanabilir	Yüksek kalsinasyon sıcaklıkları, termal genleşme uyumsuzluğu
<i>Sol-jel</i>	< 1 μm	Düşük işlem sıcaklıkları, karmaşık şekillere uygulanabilir, oldukça ince kaplama, nispeten ucuz	Bazen kontrollü atmosfer gerektirir, pahalı hammadde
<i>Elektroforetik kaplama</i>	0,1-2 mm	Homojen kaplama kalınlığı, hızlı birikme oranı, karmaşık şekillere uygulanabilir	Çatlaksız kaplama üretimi zor, yüksek kalsinasyon sıcaklıkları
<i>Biyomimetik kaplama</i>	< 30 μm	Kemik benzeri apatit üretimi, karmaşık şekillere uygulanabilir, kemik büyümesini teşvik eder	Zaman alıcı, kullanılan SBF'nin sabit bir pH değerinde olması ve sürekli değişmesi gerekir
<i>Elektrokimyasal çöktürme</i>	80 μm	Karmaşık şekillere uygulanabilir, homojen kaplama	Elektrolitin sabit pH'ta olması gerekir

Çizelge 2.3. HA'nın mekanik özellikleri (Pasinli ve Aksoy, 2010)

<i>Özellik</i>	<i>Değer</i>
Elastisite modülü (GPa)	4,0-117
Basınç mukavemeti (MPa)	294
Eğilme dayanımı (MPa)	147
Sertlik (Vickers, GPa)	3,43
Yoğunluk (teorik, g/cm ³)	3,16

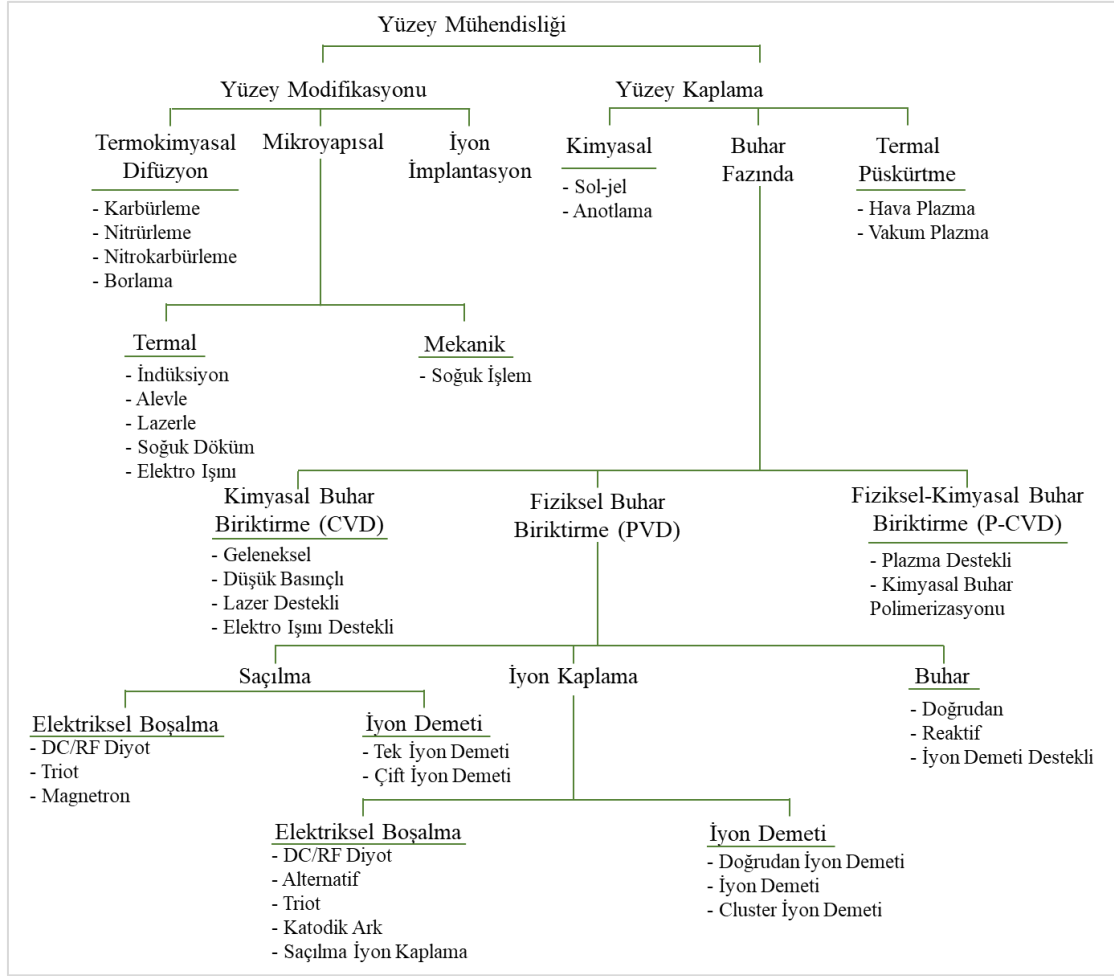
Yeterli mekanik özelliklere ve yüksek biyouyumluluğa sahip olan HA kaplama, korozyon dayanımını arttırmasına rağmen (Kumar vd., 2016; Singh vd., 2019c) korozyon tamamen önlenememiş ve yalnız başına kaplandığı takdirde, uzun süreli ortopedik uygulamalar için yetersiz görülmüştür. HA'nın doku ile birebir uyumlu olması, onu kaplamalarda vazgeçilmez hale getirmiş ve tek başına yetersiz olduğu için çalışmalar, çeşitli takviye elemanları ile

birlikte kaplanması veya tabakalı kaplamalar yapılması üzerine yönelmiştir (Gao vd., 2015; Huang vd., 2016; Singh vd., 2019c; Wang vd., 2016; Xiong vd., 2015).

2.10. Biyomalzemelere Uygulanan Yüzey İşlemleri

Biyomalzemelere yüzey işlemleri daha çok biyoaktivitesini, antibakteriyel özelliğini ve korozyon direncini geliştirmek amacıyla yapılmaktadır. Bunun yanı sıra kullanılacağı bölgeye göre aşınma ve mukavemet arttırmak için veya dizayn amacıyla dahi olsa yüzey işlemi uygulamaları mevcuttur. Dolayısıyla yüzeyi geliştirmek için bu uygulamalar kaçınılmazdır. Şekil 2.3'te genel olarak malzemelere uygulanan yüzey işlemleri verilmiştir. Çizelgede yer alan işlemlerden daha çok yüzey modifikasyonlarından özellikle iyon implantasyonu ve yüzey kaplamalarının hemen hepsi biyomalzemelerde sıkça çalışılan ve/veya uygulanan yöntemlerdir.

HA ve Ta₂O₅ kaplama teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan teknikler; termal püskürtme, iyon demeti püskürtmeli kaplama, elektron demeti kaplama, elektroforetik kaplama, biyomimetik kaplama, darbeli lazer kaplama, sol-jel, döndürmeli kaplama, elektrokimyasal kaplama ve plazma elektrolitik oksidasyon yöntemleridir (Gu vd., 2011; Huang vd., 2016; Rafieerad vd., 2016; Ren vd., 2015; Rojaee vd., 2014; Surmeneva vd., 2015; Surmeneva ve Surmenev, 2015; Xiong vd., 2015). Kaplamalar için sol-jel yöntemi yaygın olarak kullanılmakta olup, bu yöntemin diğer yöntemlere kıyasla kolay uygulanabilirliği, tekrar edilebilirliği, yüzeyde homojen ve yüksek saflıkta kaplama elde edilmesi ve düşük maliyetli oluşu tercih edilme nedenlerindendir (Niu vd., 2016; Rojaee vd., 2013, 2014; Tepehan vd., 1997).



Şekil 2.3. Yüzey mühendisliğinde uygulanan metotlar (Arslan, 2005)

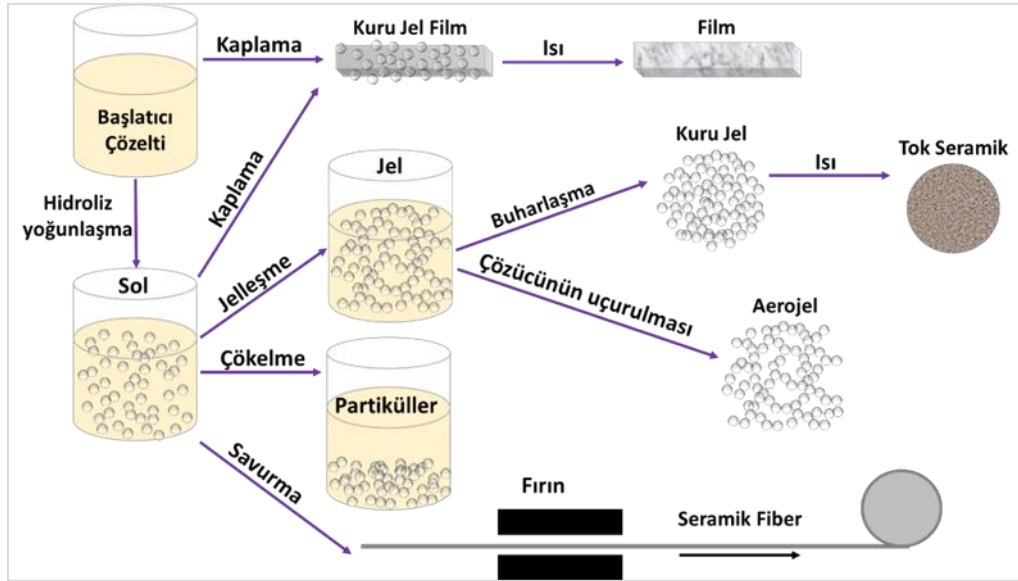
Magnezyum ve alaşımlarının mekanik bütünlüklerini koruyabildikleri sürenin uzatılması için geliştirilen çeşitli yüzey işlem uygulamaları mevcuttur. Mg alaşımlarının korozyonu önleyecek veya kontrol altına alabilecek çeşitli yüzey işlemlerine veya takviye elemanlarına ihtiyaç duyulmuştur (Gu vd., 2011; Hiromoto ve Tomozawa, 2011; Razavi vd., 2010b; Rojaee vd., 2014). Ancak bu işlemler yalnızca iyon salınımının ve korozyonun önlenmesi amacıyla değil, malzemeye antibiyotik salınımı, biyoaktiflik ve antibakteriyel özellik kazandırılması, biyouyumluluk, aşınma, kopma ve sürünme dayanımının artırılması gibi özellikler kazandırmak için de yapılmaktadır (Arnould vd., 2010; Chang vd., 2014b; Cheng vd., 2006; Gao vd., 2015; Hiromoto vd., 2015; Huang vd., 2016; Ren vd., 2015; Surmeneva vd., 2015; Xu vd., 2009; Zhou vd., 2013). Korozyon, mekanik ve aşınma dayanımını geliştirmek amacıyla SiC (Wang vd., 2017), Al₂O₃ (Ahmadkhaniha vd., 2016), TiC (Sahoo ve Panigrahi, 2016), TiB₂, HA (Chen vd., 2016) ile AZ91Mg alaşımının takviye uygulamaları mevcuttur. Biyomedikal uygulamalarda takviyeli yapılar, özellikle kemik iskelesi olarak kullanılmakta olup, bir yandan iskelenin boşlukları arasında hücre büyümesi

sağlanırken, bir yandan da takviye elemanlarıyla korozyon hızını yavaşlatarak iyileşme ve vücuttan atılma süreçlerinin dengelenmesi sağlanmaktadır (Chen vd., 2016). Kompozit yapılardan daha ziyade, yüzey işlemlerinin yapılması korozyon hızını yavaşlatma açısından daha etkilidir. Mg alaşımları üzerine korozyonu önlemek amacı ile yapılan oksidasyon, elektroforetik depolama, biyomimetrik çöktürme, sıçratma, döndürerek (spinning) kaplama ve sol-jel kaplama tekniklerinin kullanımı mevcuttur (Gu vd., 2011; Majumdar vd., 2008; Rojaee vd., 2014; Wang vd., 2010). Bu teknikler ve performansları Çizelge 2.2’de (Bkz.) verilmiştir. Fakat yukarıda bahsedildiği gibi biyomedikal uygulamalar için sadece korozyon direnci yeterli değildir. İyileşme sürecinde, yüzeyde apatit oluşumunun ve hücre büyümesinin teşvik edilmesi, doku-implant uyumunun sağlanması ve enfeksiyonların engellenmesi de gerekmektedir (Chang vd., 2014b). Bu nedenle, Ta ve Ca-P gibi vücuda zararı olmayan biyouyumlu katkı malzemeleri (Rafieerad vd., 2016) kullanılarak yapılan kaplamalar yüzeye olumlu özellikler katmaktadır. Bu tür kaplamalar, özellikle sık kullanılan Ti-6Al-4V ve Ni-Ti alaşımlarının toksik ve alerjik etkilerini ortadan kaldırmak (Rafieerad vd., 2016), röntgen ve MRI uyumluluğu iyi olmayan alaşımların röntgende daha net bir şekilde görülebilmesini ve iyileşme sürecinin takibinin daha iyi yapılmasını sağlayabilmek (Cheng vd., 2006; Zhou vd., 2013), hücre büyümesini teşvik etmek (Almeida Alves vd., 2016b; a; Rahmati vd., 2016), aşınma ve korozyon dayanımlarını geliştirmek için yapılabilmektedir (Wang vd., 2007; Xu vd., 2016).

2.10.1. Sol-jel kaplama yöntemi

Sol-jel metodu düşük işlem sıcaklıklarında uygulanan, yaş kimyasal yöntemlerdendir. Bu yöntem çözeltiden yola çıkarak farklı uygulamalara yönelik seramik, cam ve kompozit malzemeler üretim tekniğine verilen genel isimdir. Sol, koloidal parçacıkların sıvı çözelti içerisinde çökme olmaksızın askıda olduğu halidir. Burada parçacıklar 500 nm ve daha altındaki boyutlarda olup, çökmelerinin nedeni, aralarındaki Van Der Waals ve elektriksel itme kuvvetinin, yerçekimi kuvvetine göre daha yüksek olmasıdır. Jel ise bu koloidal taneciklerin çöktürülerek sıvı içeren yapıya dönüşmesi sonucu oluşur ve viskozitesi yüksek bir fazdır.

Sol-jel yöntemi ile değişik materyaller üretilmektedir ve Şekil 2.4’de üretilebilecek malzeme çeşitleri gösterilmiştir (Toygun vd., 2013).



Şekil 2.4. Sol-jel prosesi ile elde edilebilecek ürünler (Toygun vd., 2013)

Sol-jel yönteminin aşamaları

Sol-jel metodu, başlangıç malzemesi (metalik tuzlar veya alkoksitler), çözücü (alkoller) ve katalizörler kullanılarak birkaç basamakta tamamlanır. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir (Toygun vd., 2013; Wang ve Bierwagen, 2009);

- Hidroliz
- Polimerizasyon
- Jelleşme
- Kurutma
- Kalsinasyon

Sol-jel yönteminde başlangıç maddesi (precursor) olarak metalik tuzlar veya alkoksitler kullanılır. Organik çözücü ya da su seçimini bu başlangıç maddeleri belirler ve başlatıcılar uygun çözücüler içerisinde çözdürülerek sol elde edilir. En fazla kullanılan çözücü etanoldür. Organik çözücü kullanıldığında reaksiyonların kontrolü daha kolay ve düşük yüzey gerilimine sahip olduğundan daha esnek ve yüzeyi daha iyi ıslatan, çatlaksız ve kaliteli yüzey kaplaması elde edilir (Barranco vd., 2010; Toygun vd., 2013).

Hidroliz: Hidroliz tepkimesi ile hidroksil grubu metal atomuna bağlanır, su ve katalizör miktarına göre hepsi OH'a dönüşerek tepkime tamamlanır.

Polimerizasyon: Polimerizasyon adımı kullanılarak kullanılan elektrolitler sayesinde sol içerisindeki tanecikler yüklenir. Bu sayede koloidal tanecikler daha kararlı bir hale gelebilirler ve çökmeleri engellenmiş olur. Yüksüz haldeki taneciklerin dibe çökmesine koagülasyon denir. Burada gerçekleşen olaya ise koagülasyonun tam tersi olup dekoagülasyon olarak adlandırılır. Tanecikler negatif yüklendiğinde OH^- (bazlarla); pozitif yüklendiğinde ise H^+ iyonları (asitlerle) ile polimerizasyona uğrarlar. Eklenen elektrolit miktarı gerektiğinden az veya çok olursa polimerizasyon gerçekleşmez. Elektrolit yüksek miktarda olursa taneleri yüksüz bırakarak polimerizasyonu önler; az miktarda olursa da çökelti oluşumu devam eder. Polimerizasyon, monomerlerin birleşerek tanecikleri, taneciklerin büyüyerek bir zincir halini alması ve sıvı içerisinde ağ yapısı oluşturması ile büyüyerek jelleşmesi şeklinde gerçekleşir. Polimerizasyon adımı reaksiyon hızı, pH, sıcaklık, katalizör, yaşlandırma sıcaklık ve süresine bağlıdır (Toygun vd., 2013).

Jelleşme: Polimerlerin birleşerek ağ tabaka haline gelmesi ve giderek yoğunlaşmasına jelleşme denir. Jelleşme başladığı andan itibaren viskozitede anlık artış meydana gelir. Jel içerisinde bulunan sıvı birbirine zayıf ya da kuvvetli bağlarla bağlı ve katı-sıvı arasında bir faz olup viskoelastik bir yapıya sahiptir. Jel oluşturulurken en önemli adım, jelde çatlak oluşturmaktan kurutmaktır. Çok yavaş kurutma yapıldığında oluşabilecek gerilmeler minimize edilebilir (Toygun vd., 2013).

Kurutma: İstenilen yapıda elde edilen jellerin yapısında bulunan su ve alkoller kurutma adımı kısmen uzaklaştırılır. Film kaplamalar ince boyutlarından dolayı oda sıcaklığında kurutulabilirler. Başka bir yöntem ise otoklavda kritik noktada çözücülerin yapıdan uzaklaştırılmasıdır (Toygun vd., 2013).

Kalsinasyon: Sol-jel ile boşluk içermeyen yoğun oksit tabakaları oluşturulması hedeflenmektedir. Dolayısıyla son olarak kurutulan jeller kalsine edilerek porozitelerin giderilmesi, yoğun bir oksit yapısının elde edilmesi hedeflenir (Toygun vd., 2013).

3. LİTERATÜR ÖZETİ

Magnezyum alaşımları yoğunluk ve özgül ağırlıklarının düşük (Esmaily vd., 2017; Wang vd., 2013), özgül dayanım ve rijitliklerinin yüksek olması (Wang vd., 2013), titreşim sönümleyebilme (Esmaily vd., 2017) özelliklerinden dolayı birçok alanda kullanılmaktadır. Literatür çalışmaları incelendiğinde, biyouyumluluğu nedeniyle biyomalzeme uygulamaları için de büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür (Chen vd., 2014; Kirkland vd., 2012). Mg alaşımları vücutta kullanılmak için gerekli biyouyumluluk özelliklerini gösteriyor olsa da zayıf korozyon dayanımı ve aşınma özellikleri sergilediği ve kimyasal aktivitesi sebebi ile tek başına kullanım için çok uygun değildir (Chen vd., 2014; Kirkland vd., 2012). Korozyon özelliğinin geliştirilmesi halinde, günümüzde kullanılmakta olan biyomalzemelerden daha üstün özelliklere sahip olabileceği düşünülmektedir (Kirkland vd., 2012; Pan vd., 2015).

AZ91 Mg alaşımı mekanik özelliklerinin kemiğe yakın olması, hafiflik ve diğer Mg alaşımlarına kıyasla yüksek korozyon dayanımı nedeni ile biyomalzeme uygulamalarında kullanım potansiyeli en yüksek olan alaşımdır (Chen vd., 2014; Gopi vd., 2015). AZ91 Mg alaşımı uygulamalarında genellikle döküm ve toz metalurji yöntemleri kullanılmaktadır (Esmaily vd., 2017). Döküm yöntemi düşük maliyet ve seri üretime uygunluğu nedeni ile tercih edilmekte fakat bunun yanında prosesin getirdiği soğuk birleşme, porozite ve düşük mukavemet gibi dezavantajları da bünyesinde barındırmaktadır (Chen vd., 2012). Toz metalurji yöntemi ise hassas boyut toleransına sahip kolay üretim yapılabilir olması ve düşük maliyeti nedeni ile tercih edilen bir yöntemdir.

Mg alaşımlarının biyomalzeme olarak kullanımının düşünüldüğü ilk yıllarda yapılan çalışmalar çoğunlukla AZ91 Mg alaşımının vücuda yerleştirildikten bir süre sonra çözünerek kaybolması ve yerini sağlıklı dokuya bırakması üzerinedir. Fakat AZ91 Mg alaşımı bazı durumlarda özellikle iyileşme süresinin uzun olduğu yaralanma durumlarında uzun süre vücutta stabil kalmaz ve iyileşme tamamlanmadan çözünebilir (Wu vd., 2013; Zheng vd., 2014). Bu durumun engellenmesi için korozyonu yavaşlatmak veya uzun süreli kullanım için korozyonu tamamen engellemeye çalışmak üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları sadece korozyon dayanımını arttırmakla kalmamış aynı zamanda alaşımın biyoaktifliğini de arttırmayı başarmıştır (Kannan, 2016; Tan vd., 2013; Wu vd., 2013).

Mg alaşımlarının aşınma ve korozyon dayanımı ve mekanik özelliklerini geliştirmek için SiC (Esmaily vd., 2016; Kamieniak ve Malik, 2015; Mingo vd., 2017), Al₂O₃ (Ahmadkhaniha vd., 2016), TiC (Jia vd., 2005; Wang vd., 2010), TiB₂ (Wang vd., 2010) ve hidroksiapatit gibi oksitli ve karbürlü sert partikül takviyeleri ile yapılan çalışmalar mevcuttur. Biyomedikal alanda kullanım için üretilen bu malzemelerde Mg alaşımları arasına dağıtılan takviye elemanları çözünmeyi engellemekte ve Mg alaşım kısımları çözündükçe yerinde sağlıklı doku oluşumu gerçekleşmektedir.

Mg ve alaşımları üzerine yapılan kaplamalar ise korozyon hızını azaltmada daha etkilidir. Mg ve alaşımları üzerinde korozyon direncini iyileştirmek için kimyasal olarak değişmiş bir tabaka oluşturulması şeklinde uygulamalar mevcuttur (Wang vd., 2013). Mg alaşımlarının yüzey özelliklerini geliştirmek ve biyomalzeme olarak kullanılmasını sağlamak amacıyla fiziksel buhar biriktirme (Gray ve Luan, 2002), iyon implantasyonu (Hiromoto vd., 2015; Hornberger vd., 2012), mikro ark oksidasyonu (Zhang vd., 2015), plazma elektrolitik oksidasyon (Hornberger vd., 2012), elektroforetik (Kumar vd., 2016; Xiong vd., 2015), sol-jel (Agarwal vd., 2016; Rojaee vd., 2014), sıçratma (Kiahosseini vd., 2017) teknikleri kullanılarak yapılan seramik, polimerik ve metalik esaslı kaplamalar mevcuttur.

Ta metali mükemmel kırılma tokluğuna ve işlenebilirliğe sahip, yüzeyde oluşturduğu oksit tabakası ile yüzeyi kararlı hale getirebilen ve bu sayede yüksek korozyon dayanımı sağlayabilen bir metaldir (Arnould vd., 2009; Hussein vd., 2016). Ayrıca yüksek aşınma dayanımına sahip, vücut içerisinde kullanıldığında toksik etki yaratmayan (Hussein vd., 2016; Matsuno vd., 2001; Sun vd., 2013) antibakteriyel özellikli ve radyopak (röntgen ve MRI görüntülemelerinde optik özellikleri iyileştiren) (Arnould vd., 2009), özellikleri için de günümüzde tercih edilmektedir. Protez ve implant malzemelerinde Ti, Nb, Mo, Zr ve Co-Cr alaşımlarına takviye edilerek veya kendi başına bir metalik implant olarak kullanımı mevcuttur (Biesiekierski vd., 2016; Hussein vd., 2016; Liu vd., 2017; Stenlund vd., 2015; Xu vd., 2015). Ta alaşım elementinin kullanıldığı implant malzemelerde biyoyumluluğun (Li vd., 2013; Stenlund vd., 2015) ve korozyon dayanımının (Biesiekierski vd., 2016; Stenlund vd., 2015; Xu vd., 2015) arttığı görülmüştür. Hatta yapılan in-vitro ve in-vivo testlerde biyoyumluluk ve korozyon dirençleri kıyaslanan metalik biyomalzemeler arasında Ti ve alaşımlarından bile daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (Li vd., 2013; Liu vd., 2017).

Alaşım elementi olarak kullanılmasının yanı sıra farklı kaplama ve yüzey geliştirme yöntemleri kullanılarak da biyomalzemelerin özelliklerinin geliştirilebileceği bilinmektedir. Tantal metali ve tantal pentaoksit kaplanarak yüzeyleri geliştirilen biyomalzemeler de mevcuttur (Hu vd., 2016; Rahmati vd., 2015b, 2016). Tantal ve tantal pentaoksit kaplamalar yapılarak alaşımlara; radyoopak özellik kazandırılması (Cheng vd., 2006; Maho vd., 2013; Zhou vd., 2013) ve metalik biyomalzemelerin korozyon ve aşınma dayanımının artırılması (Almeida Alves vd., 2016b; a; Arnould vd., 2010; Balagna vd., 2014; Jin vd., 2017; Rahmati vd., 2015a; b; Sun vd., 2013; Wang vd., 2007; Xu vd., 2016; Zein El Abedin vd., 2005), antibakteriyel özelliğin geliştirilmesi (Chang vd., 2014b) mümkündür. Bunların yanı sıra hücre büyümesini de destekler yapıda Ta ve Ta₂O₅ kaplamalar olduğu (Arnould vd., 2010; Jin vd., 2017; Maho vd., 2013), bu kaplamalar sayesinde kemik apatit oluşumunun hızlandırılabildeği ve osseointegrasyonun sağlanabildeği görölmüştür (Almeida Alves vd., 2016a; Balla vd., 2010; Chang vd., 2014b; Frandsen vd., 2014; Rahmati vd., 2015b, 2016; Sun vd., 2013; Xu vd., 2015).

Ta₂O₅ kaplama teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan teknikler; fiziksel ve kimyasal buhar biriktirme (Frandsen vd., 2014; Ma vd., 2016; Sathasivam vd., 2017), plazma spreycaplama (Moldovan vd., 2004), sağtırma (Almeida Alves vd., 2016a; Gladczuk vd., 2004; Hu vd., 2016; Mannequin vd., 2016; Matson vd., 2000; Shang vd., 2013; Xu vd., 2016), atomik tabaka biriktirme (Egorov vd., 2015; Kukli vd., 1997; Mannequin vd., 2016) ve sol-jel (Maho vd., 2013; Tran vd., 2017) yöntemleridir.

Ta ve Ta₂O₅'in biyomalzeme olarak kullanılması üzerine literatürde çalışmalar mevcuttur. Çeşitli malzemelerin yüzeylerine yapılan Ta ve Ta₂O₅ kaplamalar, tantalın birçok özelliğini ortaya çıkarmıştır. Tantalın SiC, titanyum alaşımları ve paslanmaz çelikler üzerine farklı uygulamaları mevcuttur. Güncel literatürde magnezyum alaşımlarının korozyon dayanımını geliştirmeye yönelik de tantal ve tantal-oksit kaplama uygulamaları kullanılarak çalışmalar gerçekteştirilmeye başlanmıştır. Li vd. (2013), yaptıkları çalışmada gözenekli Ti6Al4V alaşımını tantal kaplamış ve yaptıkları in-vitro çalışmalarda tantalın, mezenkimal kök hücrelerin tutunma, büyüme ve proliferasyon özelliklerine pozitif etkisi olduğunu göstermişlerdir. Tantal kaplanmış olan numunelerin diğerlerine göre biyouyumluluğunun daha iyi olduğunu vurgulamışlardır (Li vd., 2013). Rudnev vd. (2014), paslanmaz çelikler ve titanyum üzerine Ta içerkli kaplamaları plazma elektrolitik oksidasyon yöntemi ile uygulamıştır (Rudnev vd., 2014). Çalışma sonucunda korozyon dayanımını artırma

konusunda Ta elementinin pozitif etkisi vurgulanmıştır. Xu vd. (2015), yaptıkları çalışmada titanyum yüzeylere sol-jel metodu ile döndürmeli kaplama kullanarak Ta_2O_5 kaplamalar yapmış, bu kaplamaların korozyon dayanımına ve hücre uyumluluğuna etkisini incelemiş ve Ta_2O_5 kaplı numunelerin hücre büyümesini destekler nitelikte olduğunu, kaplanmamış yüzeylere kıyasla daha yüksek korozyon dayanımına sahip olduğunu göstermişlerdir (Xu vd., 2015). Ma vd. (2016), yaptıkları çalışmada, gözenekli SiC yapı üzerine tantal ile kaplamış ve daha sonra sitotoksikite ve hücre büyümesi testleri yapmışlardır. Çalışmada hücrelerin kaplama yüzeyine rahatça tutunabildiğini ve tantal kaplı SiC'ün biyomalzeme uygulamaları için mekanik özellikleri iyi olan geliştirilebilir bir biyomalzeme olduğunu vurgulamışlardır (Ma vd., 2016). Xu vd. (2016), yaptıkları çalışmada Ti6Al4V alaşımı üzerine β - Ta_2O_5 ve TaON nanoseramik kaplamalar yaparak aşınma ve korozyon davranışlarını incelemiştir. β - Ta_2O_5 kaplamaların sertlik ve elastisite modüllerinin TaON nanoseramik kaplamalara ve kaplanmamış Ti6Al4V alaşımına göre daha yüksek olduğu, aşınma test sonuçlarına göre de TaON nanoseramik kaplamalara yakın değerlerde olduğunu göstermişlerdir. Ağırlıkça %5 HCl çözeltisi içinde yaptıkları korozyon deneyleri sonucunda ise iki kaplamanın da kaplanmamış Ti6Al4V alaşımına göre üstün olduğunu göstermişlerdir (Xu vd., 2016). Tran vd. (2017), yaptıkları çalışmada kaplamaya uygun hale getirilmiş altlıkların üzerine tantal pentaoksit ve PDMS hibrit kaplamalar yapmış kaplamaları karakterize etmiş ve kaplamaların üzerindeki fibroblast hücrelerin gelişimini gözlemlemiştirler. Yapılan kaplamaların fibroblast hücre tutunmasını desteklediğini görmüş ve implantların enfeksiyona karşı direnç göstermeleri için, kaplamaların kontrollü, lokal salımını sağlamak için kullanılmak üzere geliştirilebileceğini vurgulamışlardır (Tran vd., 2017). Jin vd. (2018), yaptıkları çalışmada Mg-Y-RE alaşımı üzerine korozyon dayanımını geliştirmek amacı ile TaN kaplamalar uygulamıştır. PVD sıçratma yöntemini kullanmış ve çalışma sonucunda SBF çözeltisi içinde 30 gün süre ile korozyon davranışlarını incelemiş ve TaN filmlerin Mg alaşımlarını SBF içinde uzun süre korozyondan koruduğunu vurgulamıştır (Jin vd., 2018). 2019 yılına kadar literatürde magnezyum alaşımlarının korozyon ve antibakteriyel özelliklerinin geliştirilmesinde Ta içerikli kaplama uygulamalarına rastlanmamıştır. Bu tarih itibarıyla Mg ve alaşımları da yoğun bir şekilde geliştirme çalışmalarına dâhil edilmiş ve tantal içerikli kaplama çalışmaları özellikle kompozit kaplama alanında yoğunlaşmaya başlamıştır. Bakhsheshi-Rad vd. (2019), yaptıkları çalışmada biyoçözünür magnezyum alaşımı uygulamalarında çözünme hızının kontrolünün sağlanması için kaplamalar uygulamıştır. MgO, Ag ve Ta_2O_5 kaplamalar gerçekleştirdikleri Mg alaşım implant malzemelerinin antibakteriyel özelliklerini

incelemiştir. Gümüş ve tantaloksitin magnezyum ve alaşımlarındaki bakteri oluşumunu minimize ettiği ve alaşımın korozyon özelliklerini geliştirdiğini tespit etmişlerdir (Bakhsheshi-Rad vd., 2019). Biyomalzeme uygulamalarına yönelik olmasa da, AZ31B magnezyum alaşımı üzerine uygulanan Al, Ta ve Ti soğuk spreyci kaplama tabakalarının incelendiği Daroonparvar vd. (2020)'nin çalışmalarında, tuz çözeltisi içinde yaptıkları korozyon test sonuçlarına göre kompozit kaplamaların ve özellikle tantalın olumlu etkilerini vurgulamışlardır. Hatta tantal içerikli kompozit kaplamalarda magnezyumlarda sık karşılaşılan iki korozyon türünden biri olan galvanik korozyonun etkisinin tamamen engellendiği ve herhangi bir galvanik etkinin gözlemlenmediği tespit edilmiştir (Daroonparvar vd., 2020). Cheon vd. (2021), çalışmalarında WE43 Mg alaşımları üzerine Ta ve polieterimid kaplamalar gerçekleştirmiştir. Ta içerikli kaplamaların in-vitro ve tavşanlarda gerçekleştirilen in-vivo çalışmalarında uzun süreli kullanıma ve ortopedik implant olarak kullanıma uygun olabileceği konusunda önemli bulgular elde etmişlerdir (Cheon vd., 2021a). Chen vd. (2021), titanyum alaşımı üzerine sol-jel yöntemi kullanılarak magnezyum içeren tantaloksit kaplamalar gerçekleştirmiştir. Çalışmada amaç titanyumun iyon salınımını azaltmak, korozyon dayanımını arttırmak ve ALP aktivasyonu ile osseointegrasyonu incelemektir. Çalışma sonucunda kaplanmamış titanyum alaşımına göre daha üstün özellikte malzeme elde edildiği vurgulanmıştır (Chen vd., 2021). Biyoçözünür bir stent uygulamasında kullanılabilmek üzere geliştirilen bir magnezyum alaşım çalışması Cheon vd. (2022) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada polimer ve tantal içerikli kaplamalar fonksiyonel ve birçok özelliği taşıyan kompozit kaplama eldesi için kullanılmıştır. Çalışmada ilaç salınım hücre kültür, hidrofiliklik gibi farklı özellikler incelenmiş ve tantal kullanılan kaplanmış numunelerde klinik bulguların geliştiğini ve magnezyum stentlerin daha efektif kullanılabileceğini vurgulamıştır (Cheon vd., 2021b). Zhang vd. (2022), magnezyum alaşımları üzerine tantaloksit ve MAO kompozit kaplamalar gerçekleştirmiş ve korozyon özelliklerini incelemiştir. Çalışma sonucunda korozyon davranışlarının önemli ölçüde geliştirildiğini vurgulamışlardır (Zhang vd., 2022).

Chen vd. (2008) AZ91 Mg alaşımı üzerine MAO kaplama yaparak korozyon performansını incelemiş ve kaplama yapılmayan alaşıma kıyasla korozyon direncinin arttığını gözlemlemiştir (Chen vd., 2008). Fakat sadece magnezyum oksit yüzeye sahip bir magnezyum alaşımı vücuda implante edildiğinde yeterince uzun süre mekanik bütünlüğünü koruyamaz. Ayrıca biyoaktifliği de yeterince iyi değildir. Bu nedenle Mg alaşımlarının HA kaplamaları üzerine de çok fazla çalışmalar yapılmaktadır. Hiromoto ve Yamamoto, (2009)

saf Mg ve Mg alaşımları (AZ31, AZ61 ve AZ91) üzerine yüksek Ca içerikli sulu çözelti kullanarak 8, 16 ve 24 saatlik işlem süreleriyle, yüzeyde yüksek derecede kristallenmiş HA kaplama elde etmişlerdir. Bu numunelere korozyon testi yapılmış ve bu numunelerin yanında bir de parlatılmış numune korozyon deneyine tabi tutularak kontrol grubu oluşturulmuştur. Sonuç olarak işlem görmemiş numuneden, işlem süresi en fazla olan numuneye doğru korozyon direncinin arttığı açıkça görülmüştür (Hiromoto ve Yamamoto, 2009). Wen vd. (2009) AZ31 Mg alaşımı üzerinde katodik elektrokaplama yöntemi ile HA kaplama tabakası elde etmiş ve kaplamanın SBF ortamındaki korozyonu azalttığını ortaya koymuşlardır (Wen vd., 2009). Xu vd. (2009) Mg-Mn-Zn alaşımı üzerine bir dizi kimyasal işlem uygulayarak ardından fosfat banyosuna daldırarak, yüzeyde kalsiyum fosfat (Ca-P) kaplama elde etmişlerdir. Ardından işlem görmemiş ve işlem görmüş numuneleri 1, 3 ve 5 günlük sürelerle hücre kültüründe inkübe ederek yüzeye tutunan hücre miktarını incelemişlerdir ve Ca-P kaplamanın hücre tutunmasını arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca bu numuneler tavşanlara yerleştirilerek hücre büyüme in-vivo olarak incelenmiş ve sonuçları in-vitro çalışmaları ile desteklemiştir (Xu vd., 2009). Tomozawa vd. (2010) kimyasal çöktürme metodu ile MAO-Mg üzerine Ca-P kaplama yapmış ve Ca-P kaplamanın mükemmel biyoaktivite ve iyi korozyon direnci gösterdiği gözlenmiştir (Tomozawa vd., 2010). Tan vd. (2010) kimyasal çöktürme yöntemini kullanarak AZ31 Mg alaşımı üzerinde Ca-P kaplama elde etmiş ve yapılan kaplama sonucu korozyon direncinin, biyouyumluluğun ve hücre büyümesinin arttığını kaydetmiştir (Tan vd., 2010). Hiromoto ve Tomozawa (2011) sulu çözelti kullanarak AZ31 Mg alaşımı yüzeyinde HA kaplama elde etmiş ve kontrol grubu olan Mg alaşımına göre korozyon direncinin son derece arttığını gözlemlemiştir (Hiromoto ve Tomozawa, 2011). Yanovska vd. (2012) düşük manyetik alan ve düşük sıcaklıkta biyomimetik yöntemle Mg yüzeyler üzerinde HA kaplama elde ederek, HA'nın korozyon direncini düşürdüğünü ifade etmişlerdir (Yanovska vd., 2012). Gao vd. (2015) biyomimetik yöntem kullanarak AZ91 Mg alaşımı üzerinde grafen oksit kullanarak HA çekirdekleyici bölgeler oluşturarak yüzeyde hızlı ve etkili bir şekilde HA/GO kaplama tabakası elde etmişlerdir. Bu kaplama sayesinde SBF içerisindeki korozyon direncinin etkili bir şekilde arttığı kaydedilmiştir (Gao vd., 2015). Abdal-Hay vd. (2013) AZ31 Mg alaşımını sprey kaplama yöntemi kullanarak HA katkılı poli laktik asit (PLA) kaplamıştır. Bu kaplamanın biyoaktiviteyi ve korozyon dayanımını geliştirdiği gözlenmiştir (Abdal-Hay vd., 2013).

Wang vd. (2013) AZ91 Mg alaşımı üzerine iki aşamada MgO/ZrO₂ çift katmanlı elektrolit kaplama yapmıştır. Sonuç olarak, tek katmanlı MgO kaplamaya göre, çift katmanlı

MgO/ZrO₂ kaplamanın korozyon dayanımının arttığını gözlemlemiştir (Wang vd., 2013). Rojaee vd. (2013) AZ91 alaşımı üzerine sol-jel ve daldırmalı kaplama yöntemleri kullanılarak nano-hidroksiapatit (n-HA) kaplama uygulanmıştır. Hazırlanan numunelerin yüzeyinde apatit benzeri çökeltiler elde edebilmek için SBF ortamında bekletilmişlerdir. Korozyon davranışını incelemek için elektrokimyasal polarizasyon testleri yapılmış ve kaplama yapılmayan numuneye göre korozyon direncinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Rojaee vd., 2013). Rojaee vd. (2014) AZ91 alaşımının yüzeyine elektroforetik kaplama ve sol-jel ile daldırmalı kaplama yöntemlerini kullanarak n-HA kaplama yapmış ve iki farklı yöntem ile yapılan kaplamaların korozyon dirençlerini kıyaslamıştır. Elektrokimyasal korozyon testlerini 37 °C’de, SBF ortamında gerçekleştirmiş ve her iki yöntemin de korozyon direnci sağladığını ancak elektroforetik kaplamanın sol-jel yöntemine kıyasla daha homojen ve kristalin yapıda kaplama tabakası oluşturduğunu ve korozyon direncini az da olsa arttırdığını ortaya koymuştur (Rojaee vd., 2014). Gopi vd. (2014) AZ91 Mg alaşımının biyolojik performansını ve korozyon dayanımını iyileştirmek amacıyla elektrokaplama yöntemi ile stronsiyum katkılı poroz hidroksiapatit (Sr-HA)/çinko oksit (ZnO) kaplama yapmıştır. Kaplamanın korozyona etkisi SBF ortamında yapılan elektrokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir ve önemli ölçüde korozyon dayanımını arttırdığı görülmüştür (Gopi vd., 2014). Roncevic vd. (2014) AZ91 alaşımının yüzeyi HA ile elektrokaplama yöntemi kullanılarak ve kimyasal kaplama (alternatif daldırma metodu) ile modifiye edilmiştir. Elektrokaplama ile kaplanan yüzeyler sıcak alkali çözelti ile muamele edilerek elde edilen HA yapısının kemiğe benzer yapıya dönüşmesi sağlanmıştır. Farklı işlem sıcaklıklarına bağlı olarak kaplamanın koruyuculuğu HBSS çözeltisinde, polarizasyon ölçümleri ile değerlendirilmiş ve sonuçlar HA kaplamanın yerel korozyonu net bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. Ayrıca artan kaplama süresi ile kaplama tabakasının kalınlığının da arttığı gözlenmiştir (Roncevic vd., 2014). Hiromoto vd. (2015) AZ31 Mg alaşımı üzerine kimyasal çöktürme metodu kullanarak oktakalsiyum fosfat (OCP) ve HA kaplama yapmıştır. Kaplamaların biyoyumluluğu ve korozyon direncini arttırdığı; in-vitro ve in-vivo korozyon değerlendirmesine göre in-vitro deneylerde neredeyse homojen bir korozyon davranışı görülürken in-vivo deneylerde ise yerel korozyonun hakim olduğu gözlemiştir (Hiromoto vd., 2015). Ren vd. (2015) mikrodalga enerji yardımıyla AZ31 Mg alaşımı üzerine Ca miktarı az olan HA (CDHA) kaplama uygulamıştır. Bu kaplamanın homojen bir şekilde elde edildiğini ve korozyon direncini arttırdığını kaydetmiştir (Ren vd., 2015). Surmeneva ve Surmenev (2015) radyo frekans tekniği ile AZ31 alaşımı yüzeyinde nano yapılı HA kaplama tabakası elde etmiştir ve kaplanmamış AZ31 ile kıyaslandığında korozyon direncinin açıkça

arttığı görülmüştür (Surmeneva ve Surmenev, 2015). Niu vd. (2016) sol-jel tekniği ile AZ31 Mg alaşımı üzerine Ca-P kaplama yapmış ve farklı kalsinasyon sıcaklıklarının (300, 400 ve 500 °C) kaplamaya etkisini incelemiştir. SBF ortamında yapılan korozyon deneylerine göre kaplanmamış AZ31 ile kıyaslandığında korozyon direncinin arttığı ve artan kalsinasyon sıcaklığına bağlı korozyon direncinin azaldığı kaydedilmiştir (Niu vd., 2016). Wang vd. (2016) korozyon direncini ve biyoaktiviteyi arttırmak için elektrolitik ve tavlama yöntemleriyle AZ91 Mg alaşımı üzerine fosfat/zirkonya (CaP/ZrO₂) kaplamıştır. Burada ZrO₂ ara tabakası kalsiyum fosfatın yüzeye bağlanmasını kuvvetlendirici ve korozyonu azaltıcı etki sağlarken CaP ise biyoaktiviteyi artırıcı etki sağlamıştır (Wang vd., 2016). Tang ve Gao (2016) mikro-ark oksidasyonu (MAO) yöntemi ile AZ31 Mg alaşımı üzerine HA içeren kaplama yapmıştır ve kaplama yapılan numunelerde korozyon direncinin geliştiği gözlenmiştir (Tang ve Gao, 2016). Mukhametkaliyev vd. (2017) radyo frekans (RF) manyeton püskürtme yöntemi ile AZ91 üzerine nano boyutlu HA kaplama yaparak bu kaplamanın elektrokimyasal olarak korozyon ve in-vitro olarak biyoaktivitesini incelemiştir. Yapılan testler sonucunda HA kaplamanın büyük ölçüde korozyon dayanımını ve biyoaktiviteyi arttırdığı görülmüştür (Mukhametkaliyev vd., 2017). Kiahosseini vd. (2017) AZ91 alaşımının yüzeyine ZrN orta katmanı kaplandıktan sonra bu tabaka üzerine iyon demeti püskürtme metodu ile 300 °C’de 180, 240, 300, 360 ve 420 dakika sürelerle HA kaplama yapmıştır. Yüzey profilometresi ile kaplama kalınlıkları ölçülmüş ve 180-420 dakikalık sürelerde 2-4,7µm’lik kaplamalar elde edilmiştir. Kaplama süresi arttıkça yüzeydeki çatlak genişliklerinin arttığı görülmüş, bunun nedeninin kaplama kalınlığı arttıkça adhezyonun azalması ile açıklanmıştır. Polarizasyon ölçümleri ile yapılan korozyon deneylerine göre 360 dakikaya kadar olan kaplamalarda korozyon akım yoğunluğunun 5,5 µA/cm²’den 0,33 µA/cm²’ye kadar düştüğü ancak bu süreden sonra, artan kaplama süresi arttıkça akım yoğunluğu da 8,2 µA/cm²’ye çıkmıştır. Yine bunun nedeni artan kaplama kalınlığı ile çatlak oranının artması ile açıklanmıştır (Kiahosseini vd., 2017). Harun vd. (2018) özellikle biyomedikal uygulama için HA bazlı kaplamaların metalik biyomalzemelerde yapışma özelliklerini kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Bu incelemeler sonucunda, HA kompozit kaplamaların, saf HA kaplamalara kıyasla mekanik ve biyokimyasal özellikleri geliştirmek için önemli bir potansiyele sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Harun vd., 2018). Ding vd. (2018) Mg alaşımlı altlık malzemesinin üzerine HA içeren kaplamayı micro ark oksidasyonu (MAO) tekniğini kullanılarak yapmışlardır. Elektrolit çözeltisine ilave edilen HA partiküllerinin, kaplamaların yüzey morfolojisi, kalınlığı ve sertliği üzerindeki etkileri incelenmiştir. Özellikle HA içeren ve içermeyen

kaplamaların korozyon direnci üzerinde durmuşlardır. HA kaplı yüzeyin daha iyi bir yüzey morfolojisine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca HA içeren seramik kaplamalar, magnezyum alaşımlarının biyouyumluluğunu ve korozyon direncini aynı anda geliştirmek için etkili bir yol olabileceğini yazmışlardır. HA içeren kaplamanın ortalama mikro sertliğinin yaklaşık 215,8 HV, HA katkı maddesi içermeyen kaplamanın ortalama mikro sertliğinin yaklaşık 194,7 HV olduğu saptanmıştır (Ding vd., 2018). Iqbal vd. (2020), çinko katkılı hidroksiapatit kaplamaları magnezyum alaşımları üzerine daldırılmalı kaplama yöntemi ile uygulamış, korozyon, in-vitro ve antibakteriyel performanslarını incelemiştir. Uyguladıkları kompozit kaplamalar ile sadece korozyon dayanımını geliştirmekle kalmamış aynı zamanda antimikrobiyal performansta da artış gözlemlenmiştir (Iqbal vd., 2020). Askarnia vd. (2021), AZ91D alaşımı üzerine HA, Chitosan ve grafenoksit ile kompozit kaplamalar gerçekleştirmiştir. Elektroforatik biriktirme yöntemi kullanarak yaptıkları kaplamaların ana malzemenin antibakteriyel ve biyoaktiflik özelliklerine, korozyon davranışlarına etkisini incelemiştir. Çalışma sonucunda kompozit kaplamalarda grafen oksitin antibakteriyel özelliği artırıcı ve hidroksiapatitin de biyoaktifliği artırıcı rol oynayabileceği dolayısıyla kompozit kaplama uygulamalarının daha etkili sonuç eldeinde rolü olduğunu vurgulamıştır (Askarnia vd., 2021). Chunyan vd. (2021), magnezyum ve alaşımlarına polikaprolakton ve hidroksiapatit kompozit kaplamalar ile antibakteriyel özelliklerini araştırmıştır. Kaplama yöntemi olarak hidrotermal ve daldırma methodunu kullanmıştır. Çalışma sonucunda iyi hücre uyumu gösterildiğini fakat antibakteriyel özelliklerin geliştirilmesi gerektiğini vurgulamıştır (Chunyan vd., 2022). Yapılan literatür taramaları sonucunda magnezyum alaşımlarının başlangıçta korozyon, biyoaktiflik ve vücut içindeki mekanik özelliklerini geliştirmeye yönelik çalışmalar uygulanmış olsa da ilerleyen zamanlarda teknolojinin de gelişmesiyle daha üstün özellikte kaplama uygulamalarına başlanmıştır. Kompozit ve takviyeli kaplamalar gerçekleştirilmiş ve korozyon ve in-vitro özelliklerinin yanı sıra antibakteriyel özelliklerinin de geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu yaklaşımın sadece hidroksiapatit kaplama ile sağlanmasının mümkün olmadığı, hidroksiapatitin biyouyum ve biyoaktifliği arttırdığı fakat antibakteriyel özellik konusunda çok da etkili olmadığı tespit edilmiştir (Askarnia vd., 2021; Chunyan vd., 2022; Iqbal vd., 2020; Kiahosseini vd., 2017; Niu vd., 2016; Tong vd., 2022).

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Altlık

Altlık malzemeler Zhejiang Bainianyin Industry and Trade firmasından temin edilen <150 μm toz boyutlarındaki AZ91 magnezyum alaşım tozları (Ağırlıkça % bileşim, Al:8,77; Zn:0,74; Ni<0,01; Cu<0,01 ve kalan Mg) kullanılarak toz metalürji yöntemi ile üretilen pres numunelerdir. Numuneler alaşım tozların tek eksenli preste 350 MPa basınç uygulanarak 1 saat boyunca 400°C sıcaklıkta bekletilerek sıkıştırılmış ve %99,7 teorik yoğunlukta elde edilmiştir.

4.1.2. HA ve Ta₂O₅ çözeltilerinin elde edilmesi ve karakterizasyonu

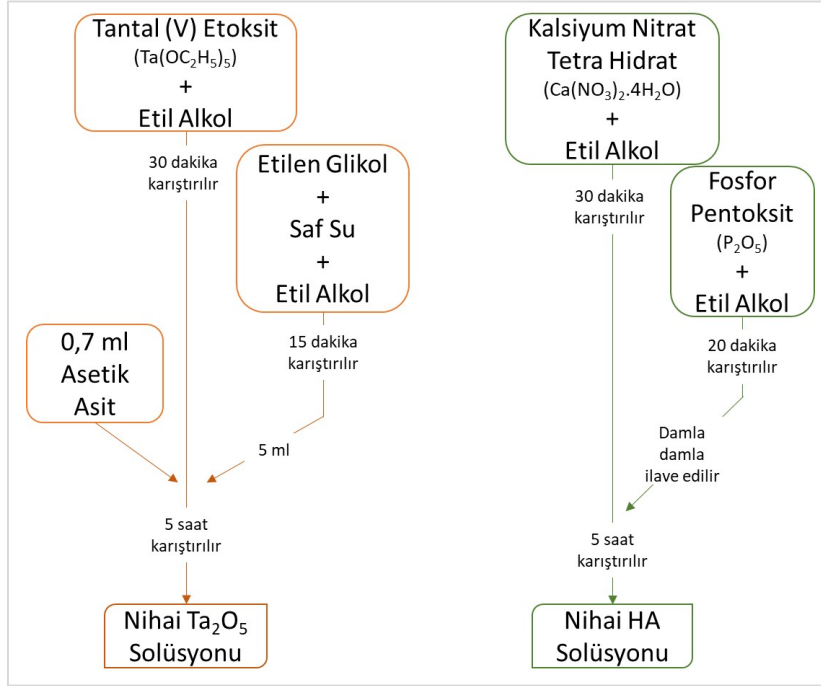
AZ91 altlık malzemelerin yüzeyinde oluşturulacak olan HA ve Ta₂O₅ kaplamalar için çözeltiler ayrı ayrı hazırlanmış olup, kullanılan kimyasallar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Kimyasal malzemelerin her biri analiz saflığında olup Merck Millipore’dan temin edilmiştir.

Çizelge 4.1. Ta₂O₅ ve HA çözeltileri için gerekli kimyasallar

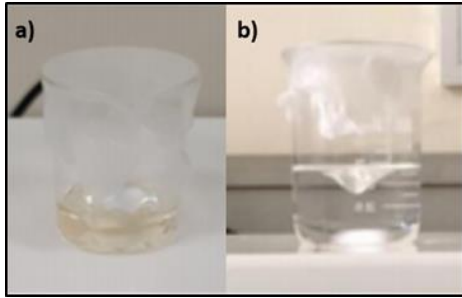
Ta ₂ O ₅ çözeltisi için	HA çözeltisi için
Etil Alkol	
Tantal (V) Etoksit	Etil Alkol
Etilen Glikol	Fosfor Pentoksit
Asetik Asit	Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat
Saf Su	

Numunelerin kaplama işlemi sol-jel yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Şekil 4.1’de Ta₂O₅ ve HA çözeltisinin hazırlanması şematik olarak gösterilmiştir. İlk adımda Tantal (V) etoksit ve etanol bir beher içerisine bire bir oranda katılarak 150 rpm ile oda sıcaklığında yarım saat karıştırılır. İkinci adımda ise 1/125 oranında Etilen glikol ile saf su karışımı elde edilerek bu karışımdan 10 ml alınarak üçüncü adımda bire bir oranda etanol ile karıştırılarak süspansiyon elde edilir. Son olarak dördüncü adımda birinci adımda elde edilen tantal çözeltisi üzerine üçüncü adımdaki çözeltiden bir miktar damla damla ilave edilerek yine 150 rpm ve oda sıcaklığında karışmaya bırakılır. Son olarak 0,7 ml asetik asit ilavesi yapılır. 5 saat karıştırma işleminden sonra çözelti hazır hale gelir. HA çözeltisi hazırlanırken her iki kimyasal öncül ayrı beherlerde etanol içerisinde çözündürülür ve kalsiyum içerikli çözelti diğer

çözeltiye damlatılarak ilave edilir ve 400 rpm ve oda sıcaklığında 5 saat karıştırmaya bırakılır. Böylece Şekil 4.1'deki açık sarı berrak Ta_2O_5 ve renksiz şeffaf HA çözeltileri elde edilir.



Şekil 4.1. Ta_2O_5 ve HA çözelti hazırlama akış diyagramı



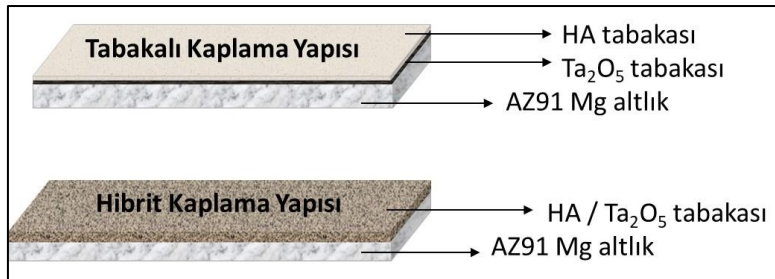
Şekil 4.2. Elde edilen a) berrak açık sarı Ta_2O_5 çözeltisi ve b) renksiz şeffaf HA çözeltisi

Bu çözeltilerde Ta_2O_5 ve HA yapılarının elde edilip edilemediği kaplama parametreleri ile aynı koşullarda üretilip kurutulan ve kalsine edilen çözeltiden elde edilen tozun XRD deseni alınarak bakılmıştır. Bu amaçla sol-jel yoluyla elde edilen çözeltilerin kurutma ve kalsinasyon sonucu toz haline getirilerek XRD ölçümleri alınmıştır. X-ışını analizleri Gazi Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümüne ait XRD Laboratuvarında Bruker D8 Advance marka XRD cihazı ile saniyede $0,03^\circ$ derece tarama hızında $CuK\alpha$ ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) ışını, 40 mA akım ve 40 V voltaj kullanılarak, $20-80^\circ$ aralığında ölçümler alınarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. Sol-jel yöntemi ile altlıkların kaplanması

Kaplamalar Şekil 4.3'teki şematik gösterime göre altlık yüzeylere sol-jel daldırmalı kaplama yöntemi ile uygulanmıştır. Tabakalı kaplamalar için altlık AZ91 Mg numuneler ultrasonik banyoda temizlik aşamasından sonra tantal oksit çözeltisine 3 defa 100 mm/dk sabit hızda daldırılıp aynı hızda geri çıkarılarak kaplanmıştır. Yapılan kaplamaların üzerine ise yine aynı parametreler ile HA çözeltisine 3 defa daldırılarak kaplama işlemi uygulanmıştır. Her bir daldırma sonrası 60°C'de, 1°C/dk. ısıtma hızı ile numuneler etüvde 1 saat kurutulmuştur. En son daldırma adımından sonra kurutulan numuneler sinter fırınında 5°C/dk. ısıtma hızıyla 1 saat kalsine edilmiş ve fırında soğutmaya bırakılmıştır.

Hibrit kaplamalar için ise ayrı beherlerde hacimce %5-10-25 oranlarında Ta₂O₅ içeren HA hibrit kaplama çözeltileri elde edilmiştir (Şekil 4.4). Bu seride yine önce AZ91 Mg altlık üzerine 3 daldırma ile tantal çözeltisinde kaplama yapılmış ve bu kaplama üzerine yine 3 daldırma ile hibrit çözeltileri kullanılarak kaplama yapılmıştır. Yine yukarıda bahsi geçen tabakalı kaplamada olduğu gibi her bir daldırma adımında aynı koşullarda kurutma ve son olarak kalsinasyon işlemi yapılmıştır.

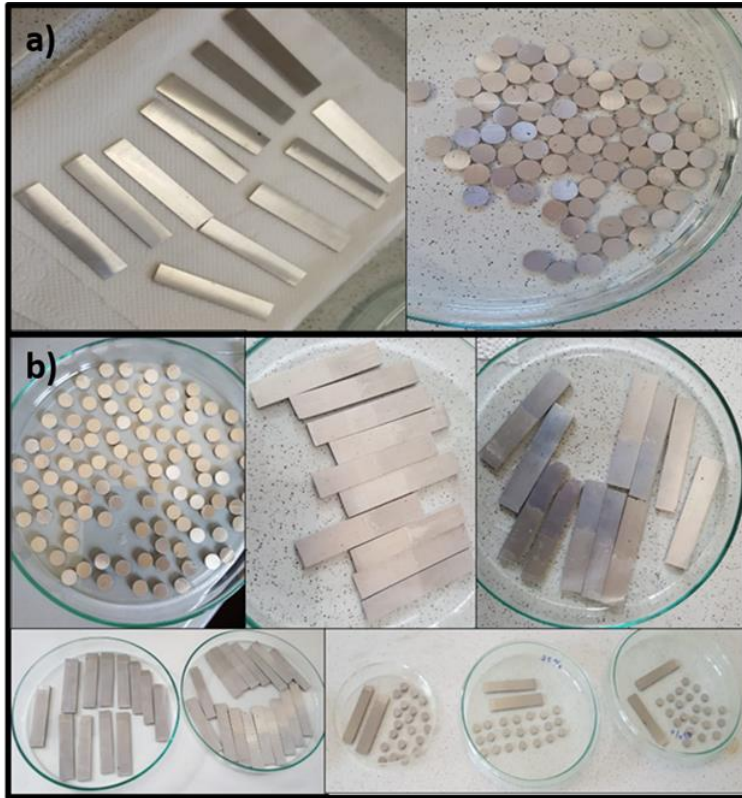


Şekil 4.3. Tabakalı ve Hibrit kaplama yapılarının şematik gösterimi

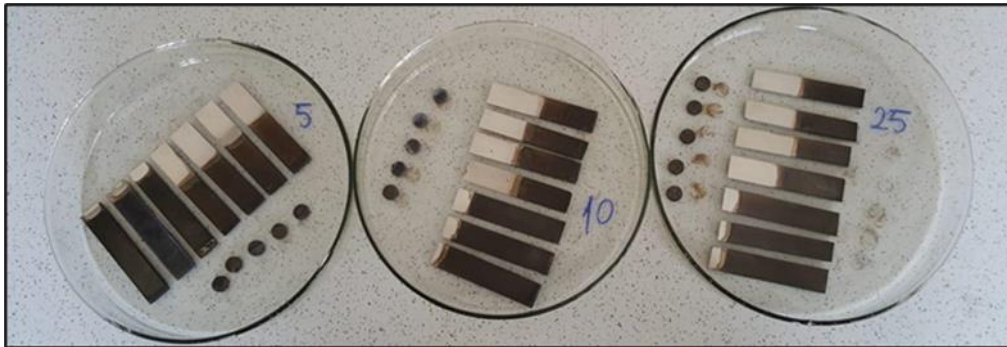


Şekil 4.4. Hibrit kaplama için hacimce a) %5, b) %10 ve c) %25 oranlarında Ta₂O₅ karıştırılan HA çözeltileri

XRD, FTIR, çizik, korozyon ve bakteri analizleri için üretilip kaplanan numuneler Şekil 4.5'te verilmiştir. Analizlerin ve kaplama uygulamasının kolaylığı açısından XRD, Çizik ve Korozyon için $60 \times 10 \times 2$ mm ebatlarında numuneler üretilip kaplanmıştır. Bakteri ve hücre kültürü çalışmaları için 8 mm çapında 1 mm kalınlığında pul numuneler üretilip kaplanmıştır. Şekil 4.5'te bu numunelerin ultrasonik temizlik ve kaplama-kurutma sonrası hali gösterilmektedir. Şekil 4.6'daki görüntüler ise kaplanmış ve kalsine edilmiş numunelere aittir.

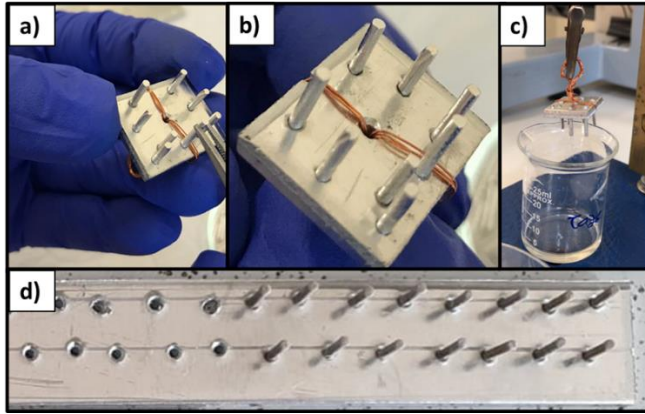


Şekil 4.5. Üretilen numunelerin a) ultrasonik temizlik ve b) kaplama-kurutma sonrası fotoğrafları



Şekil 4.6. XRD, Korozyon ve bakteri/hücre kültürü çalışmaları için kaplanıp kalsine edilen farklı şekillere sahip nihai numuneler

In vivo deneyler için TS EN ISO 10993-6 (ISO 10993-6:2016) standardına ve deney hayvanlarının büyüklüğüne uygun olacak şekilde 1,5 mm çapında ve 6 mm uzunluğunda silindirik numuneler üretilmiştir. Üretilen numuneler hayli küçük olduğundan kaplama, kurutma ve kalsinasyon için ayrı ayrı standlar tasarlanarak hazırlanmış ve Şekil 4.7’de görüldüğü üzere numuneler bu standartlara yerleştirilerek kaplama, kurutma ve kalsinasyon işlemleri yapılmıştır.



Şekil 4.7. *In vivo* deneyler için üretilen silindirik numunelerin a) kaplama için tablaya tutturulması, b) kaplamaya hazır hali, c) kaplama anı ve kaplandıktan sonra kurutma için standda yerleştirilmiş hali

4.2. Kaplamaların Karakterizasyonu

4.2.1. SEM/EDS analizi

Kaplanan numunelerin yüzey morfolojileri (X250), kesit görüntüleri (X500) ve korozyon sonrası yüzey görüntüleri (X1000) Gazi Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümünde bulunan Jeol 6064 LV marka modellenli taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı ile alınmıştır. Bu cihaza ait enerji dağılımı spektrometresi (EDS) ünitesi ile numunelerin yüzeyindeki kaplamaların kimyasal değişimlerini görebilmek için kesitten ve korozyon sonrası yüzeylerden bölgesel EDS analizleri yapılmıştır.

4.2.2. XRD analizi

Ta₂O₅/HA tabakalı ve hibrit kaplanmış AZ91 Mg alaşım numunelerin X-ışını analizleri Gazi Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümüne ait XRD Laboratuvarında Bruker D8 Advance marka XRD cihazı ile saniyede 0,03° derece tarama hızında CuKα

($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) ışını, 40 mA akım ve 40 V voltaj kullanılarak, 20-80° aralığında ölçümler alınarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.3. FTIR analizi

Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi (FTIR), ODTÜ Merkezi Laboratuvarında bulunan Bruker IFS 66/S, FRA 106/S, HYPERION 1000, RAMANSOPE II cihazı ile gerçekleştirilmiştir. HA, Ta₂O₅, tabakalı ve farklı oranlardaki hibrit kaplanmış AZ91 Mg altlık numunelere ait farklı fonksiyonel grupları belirlemek amacıyla 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ölçümler kaydedilmiştir.

4.2.4. Çizik testleri

Çizik testleri ODTÜ Merkezi Laboratuvarında bulunan Scratch test cihazı ile yapılmıştır. Elmas Rockwell uç ile Lineer Scratch yöntemine göre uygulanan testler 0,1-5 Newton aralığında artan yük ile 4 mm/dk. ilerleme hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.5. Korozyon testleri

Korozyon deneyleri kapsamında numuneler 3 farklı fizyolojik çözelti ortamında test edilmiştir. Bunlar, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) hücre kültürü temel besin ortamı, DMEM + %10 Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS) karışımı ve Hank'in Dengeli Tuz Çözeltisi (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) ortamlarıdır. Her bir ortamda, her bir örnek için 3'er tekrar yapılmıştır. Bu testler Gamry Interface 1010 cihazı ve Echem Analyst yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler üç elektrotlu (çalışma, yardımcı ve referans elektrotlar) korozyon hücresi kullanılarak 37 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Tafel eğrileri ile korozyon potansiyeli (E_{kor}), korozyon akım değerleri (I_{kor}) ve korozyon hızları korozyon cihazına ait yazılım ile hesaplanmıştır. Değerler, eğrilere ait anodik ve katodik kollarda belirlenen noktalardan çizilen teğetlerin kesiştirilmesi ile elde edilmiştir. Her bir numune için 3 tekrar ve hesaplama yapılarak ortalamaları grafiklere ve Çizelgelere aktarılmıştır.

4.2.6. Mikrobiyoloji analizi

Kaplanmış ve kaplanmamış numunelerin antibakteriyel aktivitelerinin tespit edilmesinde *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negatif) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram pozitif) suşları kullanılmıştır. Suşlar Brain Heart Broth besiyerinde 37°C sıcaklıkta 0,5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde (2-6 saat) inkübe edilmiştir. 100'er µl bakteri süspansiyonu Mueller Hinton Agar besiyerine ekilmiştir. Her iki suş içinde pozitif kontrol olarak amfisilin antibiyotik diski kullanılmıştır. Deney numuneleri, analiz öncesinde etüv sterilizatörde 175°C'ta 1 saat süreyle steril edilmiştir. Deney düzeneğinin hazır hale getirilmesinin akabinde, numuneler petri yüzeyine yerleştirilmiştir ve petriler 37°C'de 16-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası numunelerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirilmiştir.

4.2.7. İn vitro biyouyumluluk analizleri

Numunelerin biyouyumluluklarının belirlenebilmesi için hücresel analizlerden önce numunelerin, farklı fizyolojik tampon çözeltiler içerisindeki biyobozunurluk davranışları, vasat ortamına iyon salım ve sızabilir madde analizleri ile bu analizler süresince ortamın pH değerindeki değişimlerinin takibi gerçekleştirilmiştir.

Biyobozunurluk analizi AZ91 alaşımı ve kaplanmış örnekler için 3 farklı ortam kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan ortamlar fizyolojik ortamı taklit eden ve in vitro hücre kültürü ile uyumlu olan çözeltilerdir. Bunlar:

- Tuzlu fosfat tamponu (PBS), fizyolojik pH 7,4'e ayarlı.
- Hank'in dengeli tuz çözeltisi (HBSS), fizyolojik pH 7,4'e ayarlı.
- Yapay vücut sıvısı (SBF), fizyolojik pH 7,4'e ayarlı.

Bu çözeltilerden ilk ikisi özellikle in vitro hücre ve doku kültürleri ile biyobozunurluk analizlerinde kullanılmaktadır. SBF çözeltisi ise kalıcı implantların biyobozunurluk analizi için kullanılmaktadır. Numuneler çözelti ortamına alındıktan sonraki davranışları günlük olarak takip edilmiştir. Örneklerin çözelti içerisinde morfolojik ve gravimetrik değerlendirmeleri kayıt altına alınmış ve pH takibi yapılmıştır. Zamana göre biyobozunurluk

dereceleri, skrolama çizelgesi oluşturularak verilmiştir. Kütle artışı olan numunelerdeki çöken yapının ayrıca FTIR spektrumları alınarak kimyasal bileşimleri incelenmiştir.

Hücrel etkilere dayalı yürütülen çalışmalarda ortam pH'ındaki değişimi belirleyebilmek için numunelerin temel besi yeri içerisindeki davranışları takip edilmiştir. Bu amaçla numuneler, 48 kuyucuklu petri kap içerisine koyularak üzerine hücre kültüründe vasat ortamı olarak kullanılan pH 7,4'e ayarlı DMEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose) çözeltisinden 500 µl eklenmiş ve 37°C'ta 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda vasatın pH'ı pH metre (Hanna HI 2211-02, ABD) ile ölçülmüştür. Sonuçları ise çizelge haline getirilerek değerlendirilmiştir. Akabinde kirli vasat ependorf tüp içerisine alınarak etiketlenmiş, içerisindeki Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Al^{+3} , PO_4^{-3} , Zn^{+2} iyonlarının (Na, K, Ca, Mg, Al, P, Zn) elementel analizi için +4°C'de saklanmıştır. Numune üzerine 500 µl taze vasat eklenerek inkübasyona devam edilmiştir. Bu işleme günlük olarak 28 gün süreyle devam edilmiştir ve ortama sızan element konsantrasyonları hücre canlılık analizleri ve proliferasyon döngüsü de dikkate alınarak 1, 7, 14, 21 ve 28. günler için İndüklenmiş Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopi (ICP-OES) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Vasat ortamının analizi de kör olarak gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar köre göre değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler element bazında değerlendirilerek, örnekler arasında karşılaştırmalı olarak grafiğe geçirilmiştir. Analizler Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde yaptırılmıştır. ICP-OES analizi için numuneler, içinde partikül kalmayacak şekilde mikrofiltrelerden süzölmüş ve analiz için 250 kat seyreltme uygulanmıştır. Seyreltmenin yetersiz geldiği numunelerde cihazın okuma kapasitesine göre 416,6 kat seyreltme uygulanmıştır. Kalibrasyon standartlarının hazırlanmasında, analize uygun standart çözelti seçilerek ICP-OES için temin edilen multielement standart stok çözeltisi (Merck, Germany) kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler ve kalibrasyon çözeltileri SpectroBlue marka ICP-OES cihazında analiz edilmiştir.

ICP-OES cihazında metallerin konsantrasyonları ölçölürken cihaz kendiliğinden üç ölçüm yapmaktadır (n=3). Daha sonra bu üç ölçümün ortalaması alınarak standart sapma cihaz yazılımı ile hesaplanmaktadır. Ortalama sonuçlar daha sonra seyreltme faktörleri ile çarpılarak nihai konsantrasyon değerleri tespit edilmiş ve standart sapması hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir. ICP-OES cihazının çalışma şartları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. ICP-OES cihazının çalışma koşulları

Cihaz	SPECTRO BLUE I
Dalga boyu	Nm
Tekrar	3
Sprey chamber	Cyclonic
Nebulizatör akışı (L / dak)	0.8
Plazma Torc	Quartz
Soğutucu Akışı (L / dak)	13
Yardımcı Gaz Akışı (L / dak)	0.8
Örnek Pompa Hızı (rpm)	30
Plazma Gücü (W)	1200

4.2.8. Hücre kültürü çalışmaları

Numunelerin sterilizasyonu ve hücre kültüründe kullanılan vasatların hazırlanması

Numuneler cam petri kaplarına yerleştirilerek petri kapakları kapatılmıştır. Hava akımını asgari seviyede tutmak için petri kapları alüminyum folyo ile iki kat kaplanmış ve üzerlerine sterilizasyonun takibi için kimyasal gösterge bandı yapıştırılmıştır. Numune hazırlama işlemi bittikten sonra 1 saat süreyle 175 °C'ye ayarlı kuru sıcaklık etüvünde (Mettler, Almanya) sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Mezankimal kök hücreleri (MKH) minimum besin içeriğine sahip vasat ortamında kültüre edilmiştir. Bu amaçla temel besin sıvısı olarak α -MEM (Minimum Essential Medium, Sigma, ABD) kullanılmış ve içerisine %10 FBS (fötal sığır serumu, Sigma, ABD), %1 antibiyotik-antimikotik çözelti (penisilin/streptomisin, Sigma, ABD) eklenerek kök hücreler için tam vasat ortamı olarak kullanılmıştır.

Osteoblast (OB) hücreleri numuneler ile etkileştirildiğinde ostejenik vasat içerisinde kültüre edilmiştir. Osteojenik tam vasat, temel besin sıvısı olarak DMEM-LG (Sigma, ABD) içerisine %10 FBS (Sigma, ABD), %1 penisilin-streptomisin (Euroclone, İtalya), %1 askorbik asit (Sigma, ABD), %1 non-esansiyel aminoasit (Sigma, ABD), %1 beta-gliserofosfat (Sigma, ABD), %1 dexametazon (Sigma, ABD), %1 L-glutamin (Euroclone, İtalya) ilave edilerek hazırlanmıştır.

Tüm hücre çalışmaları için temel besin sıvı içerisinde ek katkılarla hazırlanan tam vasat çözeltileri, vasat değişim günlerinde taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır.

Etik beyan

Sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (MKH) ve osteoblast hücreleri etik kurul izniyle (2018/09 sayılı Kastamonu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KÜ-HADYEK)), Tarım ve Orman Bakanlığı'ndan onaylı ve ruhsatlı birim olan Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesine getirilmiş olan Wistar ırkı sıçanların femur kemik iliğinden ve kalvaria kemiğinden izole edilmiştir. Elde edilen kemik iliğinden MKH'ın ayrıştırılması ve kültüre edilmesi işlemlerine KÜ-MERLAB bünyesinde bulunan Doku Mühendisliği, Biyomalzeme ve Kök Hücre Laboratuvarında, kalvaria kemiğinden eksplant kültür ile osteoblast izolasyonuna Doku Kültür laboratuvarında devam edilmiştir.

Hücrelerin izolasyonu ve çoğaltılması

Biyouyumluluk ve sitotoksite analizlerinde kullanılacak hücreler, primer kaynaktan izolasyon ile istenilen sayıya çoğaltılarak analizlere hazır hale getirilmiştir. Tez kapsamında üretilen numunelerin in vitro memeli hücre kültürlerinde Mg alaşımlarında ve implant çalışmalarında sıklıkla kullanılan skOBH (sıçan kalvaria osteoblast hücreler) ve kiMKH (kemik iliği mezenkimal kök hücreler) ile etkileştirilerek in vitro biyouyumluluklarının belirlenmesini amaçlanmıştır. Numunelerin in vitro korozyon ve biyouyumluluk analizleri için kemik iliği MKH sıçan femur kemik iliğinden aseptik koşullarda izole edilmiştir. Kastamonu Üniversitesi Kök Hücre Laboratuvarında steril koşullarda izole edilen hücreler, %10 FBS, %1 antibiyotik-antimikotik çözelti (penisilin/steroptemisin 100x) içeren alfa-MEM vasatı içerisinde T-75 doku kültür kaplarında kültüre alınmıştır. Hücreler, çoğalarak bolluğa eriştiğinde tripsin-EDTA kullanılarak alt kültüre alınarak çoğaltılmıştır. Hücreler Leica DMIL LED faz kontrast mikroskobu ile takip edilmiştir.

Kontrol grubu olarak ticari osteojenik hücre hattı yerine, implantın etkisini daha sağlıklı şekilde belirleyebilmek için EN ISO 10993-5 numaralı standartta da tavsiye edildiği üzere primer kaynaktan somatik osteoblast hücreleri kullanılmıştır. Bu amaçla, MKH izolasyonu sırasında doğrudan primer kaynaktan (Wistar Albino Sıçanı) izole edilen ve farklı pasajlarda dondurularak stoklanan sıçan kalvaria osteoblast (skOB) hücreleri kontrol deneylerinde kullanılmıştır.

Numunelere hücre ekimi ve kültür işlemi

Hücreler ile etkileştirilen numunelere fenotipik karakterizasyon için immünohistokimya analizinde anti-kollajen-tip-1 ve anti-osteokalsin antikor boyamaları, histokimya analizinde hücrelerin yapısı hematoxilen-eosin (H&E) boyaması, kalsiyum birikimi alizarin-red (AR) ve von kossa (vK) boyamaları, hücrelerin mineralizasyon aktivitesi alkalenfosfataz aktivitesi ölçümü (ALP kit analizi); hücre canlılığı ve proliferasyonu mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinin tespitine dayalı MTT kit analizi ile (üç tekrar numune üzerinden) haftalık periyotlarda, SEM analizi ise 28. Gün örnekleri için (tek tekrar numune üzerinden) gerçekleştirilmiştir. Toplamda her bir implant malzeme için MKH ve skOB kültürlerinde ayrı ayrı 45'er adet, toplam 90 adet numune kullanılmıştır. Kültür ve analizler için numune toplama işlemleri kök hücre kültürü ve ostejenik kültür için aşağıda açıklandığı şekilde aynı prosedür üzerinden, her hücre tipi için kendi vasat bileşimleri kullanılarak ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Steril numuneler, 48-kuyucuklu steril petri kapları içerisine yerleştirilmiştir. Her numune üzerine 500 µl tam vasat eklenmiş ve numuneler 30 dakika ıslanması için bekletilmiştir. Bu aşamada T-75 kaplarında çoğaltılan hücreler tripsin-EDTA kullanımı ile zeminden kaldırılmış ve temel besin sıvısı ile yıkanarak enzim ortamdan uzaklaştırılmıştır. Santrifüjleme ile yıkama işlemi sonucunda elde edilen hücre pelleti tam vasat içerisinde re-süspanse edilerek hücre ekimine hazır hale getirilmiştir. Ön ıslatma işlemine tabi tutulan numunelerin üzerinden vasatın tamamı inkübasyon süresinin sonunda uzaklaştırılarak her kuyucuğa 5×10^3 hücre/numune olacak şekilde hücre ekimi yapılmış ve vücut ortamını uyarlayan 37°C'ta ayarlı %5 CO₂ %95 hava %90 nem içeren karbondioksit inkübatörüne kaldırılarak hücrelerin numune yüzeyine adapte olması (yapışması ve/veya tutunması) için 30 dakika beklenmiştir. Süre sonunda her kuyucuktaki vasat miktarı, tam vasat kullanılarak 500 µl ye tamamlanarak tekrardan karbondioksit inkübatörüne yerleştirilmiştir. Ortam pH'sının bazik yönde değişmesi nedeniyle vasat ortamı günlük olarak değiştirilmiştir.

Analiz numunelerinin hazırlanması

Analizler için haftalık zaman noktalarında (7, 14, 21 ve 28. gün) numuneler, yapılacak analize uygun yöntemler kullanılarak hazırlanmıştır.

Histokimya ve immünohistokimya analizleri için ayrılan örneklerin vasatı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra %10 formalin çözeltisi ile 30 dk süreyle hücreler fikse edilmiştir. Süre sonunda pipetaj yapılarak numune yüzeyindeki hücre kümeleri ependorf tüpüne toplanarak 500 µl PBS çözeltisi ile 10 dakika süreyle 3 defa yıkama işlemi yapılmıştır. Her yıkama adımı 10 dakika 1500 rpm'de santrifüj işlemi uygulanarak hücre pelleti formalinden uzaklaştırılmıştır. Yıkama adımının akabinde dondurarak kesit alma yöntemi için hücre pelleti üzerine 3 ml %15'lik sükröz çözeltisi ilave edilerek +4°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda sükröz çözeltisi santrifüjleme ile uzaklaştırılmıştır. Oluşan hücre pelleti, dondurma kalıpları kullanılarak dondurma medyumunu (Tissue freezing medium, Sigma, Germany) içerisine gömülerek -20°C'de histolojik bloklar oluşturulmuştur. Örneklerden dondurarak kesit alma cihazı Kriyomikrotom (Leica CM 1860 UV, Wetzlar, Almanya) kullanılarak 8 µm kalınlığında kesitler cam slaytlar üzerine alınarak boyamaya hazır hale getirilmiştir.

SEM analizi için örnekler %2,5 gluteraldehit çözeltisi ile fikse edilmiştir. Sonrasında, numuneler PBS ile yıkanarak %70, %80 ve absöüt etanol çözeltileri ile dehidratasyonu yapılmıştır. Numuneler, üzerindeki etanolün uzaklaşması için çeker ocak içerisinde bekletilmiştir. Hazırlanan malzeme-hücre örnekleri Kastamonu Üniversitesi Merkezi araştırma Laboratuvarında bulunan FEI Quanta FEG 250 marka SEM cihazı ile görüntülenerek analizlenmiştir.

Numunelerin sitotoksosite testleri hücre canlılığına dayalı in vitro testler ile gerçekleştirilmiştir. Sitotoksosite analizlerinde hücre canlılığı, mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesini ölçmeye dayalı MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)- 2,5 difenil tetrazolyum bromür] (Sigma, ABD) reaktifi ile standart protokol uygulanarak analizlenmiştir. Bu yöntemde MTT reaktifi formazana indirgenerek kristalize halde çöker. Oluşan formazan kristallerinin miktarı ve büyüklüğü canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Formazan kristallerinin çözünmesi ile oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Bu test için numunelerin içerisinde bulunduğu 48-kuyucuklu petri kabı kullanılmıştır. Öncelikle numunelerin üzerindeki kirli vasatın tamamı kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 270 µl %1 pen/strep içeren temel besin sıvısı (*MKH için α-MEM, OB için DMEM-LG*) ve %10 konsantrasyonu sağlayacak şekilde 30 µl MTT reaktifi (Serva, ABD) eklenmiştir. Kuyucuklardan birine örnek konulmayarak içerisindeki vasat kontrol olarak

kullanılmıştır. Reaksiyonun tamamlanması için örnekler 4 saat süreyle karbondioksit inkübatöründe bekletilmiştir. İnkübasyonun sonunda formazan kristallerinin oluşumu ters faz-kontrast mikroskopunda (Leica DMIL LED, Almanya) incelenmiştir. Sonrasında ise koyu mavi formazan kristalleri MTT çözücüsü ile çözülerek, her bir örnekten 200 µl alınarak 96 kuyucuklu steril petri içerisine konulmuş ve optik yoğunlukları 570 nm’de spektrofotometrik olarak mikroparka okuyucuda (BioTek, Synergy HTX, ABD) ölçülmüştür. Kültürlere uygulanan MTT testleri üç defa tekrarlanmış olup, üç farklı ölçümün ortalama değeri alınarak günlere göre grafiğe geçirilmiş ve MKH ile OB kültürü örnekleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Alkalen fosfataz aktivitesinin tayini

Hücre kültürlerindeki mineral matriks sentezi yapabilen hücrelerin osteojenik fenotipinin varlığı ve haftalık periyotlara göre değişimi biyokimyasal analizle, alkalen fosfataz enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tespit edilmiştir (Eaton, 1977; Williamson, 1972). Bu amaçla QuantiChrom Alkalene Phosphatase Assay Kit (DALP-250; Gentaur, Kampenhout, Belçika) kullanılmıştır. Analiz için hücresel numuneler aşağıdaki protokole göre hazırlanmıştır.

48-kuyucuklu petri içerisindeki numunelerin kirli vasatı uzaklaştırılarak 500 µl PBS çözeltisi eklenmiştir. Pipetaj işlemi yapılarak numune yüzeyindeki hücre kümelerinin ayrılması sağlanmıştır. Ayrıca, numune yüzeyinde hücre kümelerinin kalma ihtimalinden dolayı bir bisturi yardımıyla numunenin yüzeyi hassas bir şekilde sıyrılarak PBS içerisindeki hücre süspansiyonu ependorf tüplere toplanmıştır. 10 dakika 1500 rpm’de santrifüj işlemi yapılarak hücre pelleti oluşması sağlanmıştır. Süpernatant atılarak pellet üzerine 250 µl Triton-100 çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika aksiyel karıştırıcı üzerinde muamele edilmiştir. Süre sonunda hücre süspansiyonu ependorf tüpe toplanarak analiz için tüm haftalık örnekler toplanana kadar -20°C’de saklanmıştır.

Hücre kültür işlemleri 28. gün sonunda tamamlanmıştır. Haftalık periyotlarla hazırlanan örnekler -20°C’den çıkartılarak oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. Çalışma çözeltisi standart kit protokolü ile 5 µl asetat (nihai 5 mM), 2 µl pNPP sıvı substrat (10 mM), 200 µl assay buffer çözeltileri karıştırılarak hazırlanmıştır. ALP analizi için 96-kuyucuklu petrinin 1 kuyucuğuna 200 µl distile su konulmuştur. Başka bir kuyucuğa 200 µl kalibratör çözelti

eklenmiştir. Diğer boş kuyucuklara ön işlem den geçerek hazırlanan hücre süspansiyonundan 50 µl eklenmiş ve üzerine 150 µl çalışma çözeltisi eklenerek pipetaj işlemi yapılmıştır. Örneklerin optik yoğunlukları 0 anında (T=0 dk) ve 4. dakikada (T=4 dk) 405 nm’de spektrofotometrik olarak mikrop laka okuyucuda (BioTek, Synergy HTX, ABD) ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değ erleri Eş. 4.1’de yerine konularak numunelerdeki alkale n fosfataz aktiviteleri (IU/L=µmol/(L.dk)) hesaplanmış ve grafiğ e geçirilmiştir. Veriler MKH ve OB hücre kültürü çalışmaları için karşılaştırmalı olarak değ erlendirilmiştir.

$$ALP \text{ Aktivitesi} = \frac{(OD_4 - OD_0) \times RV}{(OD_{kalibratör} - OD_{su}) \times SV \times t} \times 35,3 \quad \text{Eşitlik (4.1)}$$

Örneğ in 405 nm’deki, OD₄, t=4 dakikadaki optik yoğunluğ u, OD₀, t=0 dakikadaki optik yoğunluğ u; RV, reaksiyon hacmi; SV, örnek hacmi.

Histokimya analizleri

Hematoksilen-Eosin analizi;

Dondurarak kesit alma yöntemine göre hazırlanan numunelerde hücreler hematoksil en-eosin histolojik boyası ile aşağıda açıklanan standart boyama prosedürü kullanılarak boyanmıştır.

1. Slaytlar distile su ile yıkanmış ve suyun fazlası uzaklaştırılmıştır.
2. Hematoksil en boyasından 2-3 damla damlatılarak yayma işlemi yapılmış ve 5 dakika bekletilmiştir.
3. Süre sonunda distile su ile fazla boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır.
4. Ardından eosin boyası 2-3 damla damlatılarak 4 dakika bekletilmiştir.
5. Boyamanın tamamlanmasının ardından slaytlar distile su ile yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Boyanan örnekler ışık mikroskopunda (Leica DMIL700, Almanya) 40X büyütmede görüntülenerek fotoğ raf lanmıştır. İmplant numunelerine ait tüm örnekler karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Alizarin Red analizi;

1. Slaytlar ddH₂O (bidistile) ile yıkanmış, fazla su uzaklaştırılmıştır.
2. Alizarin red boyasından 2-3 damla damlatılarak dokuların tamamen boyanabilmesi için yayma işlemi yapılmış ve 10 dakika bekletilmiştir.
3. Süre sonunda ddH₂O yıkama yapılarak boyanın fazlası uzaklaştırılmış ve slaytlar kurumaya bırakılmıştır.

Boyanan örnekler ışık mikroskopunda (Leica DMIL700, Almanya) 40X büyütmede görüntülenerek fotoğraflanmıştır. İmplant numunelerine ait tüm örnekler karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Von Kossa boyaması;

Haftalık olarak alınan numunelerden dondurarak kesit alma yöntemine göre 8 µm kalınlığında ince kesit olarak hazırlanan preparatlar, aşağıdaki sunulan standart protokole göre von Kossa boyaması ile analizlenmiştir.

1. Slaytlar üzerindeki dokular, distile su ile yıkanmış, 1 dakika bekletilerek fazla su uzaklaştırılmıştır.
2. Reaktif 1 (gümüş nitrat çözeltisi) 1 damla eklenmiş ve 20 dakika 50 W ışık altında bekletilmiştir.
3. Süre sonunda distile su ile yıkanmış ve slaytlar üzerindeki fazla su uzaklaştırılmıştır.
4. Reaktif 2 (sodyum tiyosülfat) çözeltisinden 1 damla eklenerek dokulara yayılması sağlanmış ve 3 dakika bekletilmiştir.
5. Distile su ile yıkama işlemi yapılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Boyanan örnekler ışık mikroskopunda (Leica DMIL700, Almanya) 40X büyütmede görüntülenerek fotoğraflanmıştır. İmplant numunelerine ait tüm örnekler karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

İmmünohistokimya analizi

İmmünohistokimya analizi, kemiğin yapısındaki ana kollajen bileşeni olan kollajen-tip-1 ve kemik oluşumu için geç dönem markörü ve kemik doku matriksinde en çok bulunan non-

kollajen protein olan osteokalsin için standart avidin-biotin kompleks HRP kit sistemi (DAB500 Merck Millipore, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimya boyamaları için monoklonal anti-kollojen-tip-1 ve monoklonal anti-osteokalsin primer antikorları 1:250 seyreltme oranında kullanılmıştır. Boyama işlemleri için aşağıda açıklanan standart HRP protokolü uygulanmıştır (Koç vd., 2008).

1. Örnekler ait ince kesitler, 15 dk hidrojen peroksit blok çözeltisi ile muamele edilmiştir.
2. TBS (Tris tampon çözeltisi) ile yıkanmış ve slayt üzerindeki fazla olan yıkama çözeltisi uzaklaştırılmıştır.
3. %1'lik FBS içeren PBS ile 1/250 oranında seyreltilmiş primer antikorlar (ayrı ayrı anti-kollojen-tip-1 ve antiosteokalsin) slaytlar üzerine 1-2 damla olacak şekilde eklenmiş ve örnekler ile etkileşimi için oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir.
4. TBS ile yıkanmış ve slayt üzerindeki fazla olan yıkama çözeltisi uzaklaştırılmıştır.
5. 2-3 damla biotinlenmiş sekonder antikoru eklenerek örnekler yayılması sağlanmış ve 10 dakika bekletilmiştir.
6. TBS ile yıkanmış ve slayt üzerindeki fazla olan yıkama çözeltisi uzaklaştırılmıştır.
7. Streptavidin-Peroksidaz (HRP) çözeltisinden 2-3 damla eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. TBS ile yıkanmış ve slayt üzerindeki fazla olan yıkama çözeltisi uzaklaştırılmıştır.
9. AEC kromojen-AEC substrat karışımından 2-3 damla eklenerek boyamanın tamamlanması için 5-10 dakika inkübe edilmiştir.
10. Boyanın fazlası ddH₂O ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.

Boyanan örnekler, kurutulduktan sonra ışık mikroskopunda (Leica DMIL700, Almanya) 40X büyütmede görüntülenerek fotoğraflanmıştır. İmplant numunelerine ait tüm örnekler karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

4.2.9. İn vivo deneyler

Etik beyan

İn vivo deneyler, 10.02.2018 tarihli ve 269 protokol ve onay numarası ile KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A. Ş. tarafından etik kurul izniyle gerçekleştirilmiştir.

Deney hayvanları

Deneylerde SAYLab Firması Hayvan Laboratuvarından temin edilen 2-2.5g ağırlığında erkek New Zealand tavşanlar kullanılmıştır. Hayvanlar 12 saat gece-gündüz periyodunda 21-24°C sıcaklıktaki hayvan barınma yerlerinde muhafaza edilmiştir. Hayvanların deney ortamına uyum sağlayabilmesi için deneye başlamadan önce laboratuvar şartlarında en az iki gün bekletilmiştir. Bu bekleme süresince hayvanlar standart yem ve su beslenmişlerdir. Deneylere başlamadan 24 saat önce hayvanların beslenmesi kesilmiş ancak içtikleri su serbest bırakılmıştır (ad libitum).

İmplantasyon için numunelerin hazırlanması

In vivo analizler femur kemiği üzerinde in situ olarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Titanyum Grade 5 ve AZ91 Mg alaşım numuneler silindirik olacak şekilde TS EN ISO 10993-6 standardı ve deneklerin büyüklüğü dikkate alınarak 1,5 mm çap ve 6 mm uzunlukta işlenmiştir. Mg alaşımları %10'luk HNO_3 ve Grade 5 numuneleri ise H_2SO_4 -HCl çözeltileri ile yüzeyleri kimyasal olarak temizlenmiştir. Daha sonra aseton ve etanol ile ultrasonik banyoda temizleme işlemleri tamamlanmıştır. AZ91 Mg alaşımları daha önceki kaplama prosedürü tekrar edilerek kaplama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Üretimi ve kaplaması tamamlanan tüm numuneler cam petri kaplarına yerleştirilerek petri kapakları kapatılmıştır. Hava akımını asgari seviyede tutmak için petri kapları alüminyum folyo ile iki kat kaplanmış ve üzerlerine sterilizasyonun takibi için kimyasal indikatör bandı yapıştırılmıştır. Numune hazırlama işlemi bittikten sonra 1 saat süreyle 175 °C'ye ayarlı kuru sıcaklık etüvünde (Memmert, Almanya) sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Cerrahi işlem

İmplantasyon uygulamaları için aşağıda belirtilen gruplar oluşturulmuştur:

Grup Ia (Kontrol grubu): İmplant uygulanmayacak, 6. hafta sakrifikasyon

Grup Ib (Kontrol grubu): İmplant uygulanmayacak, 12. hafta sakrifikasyon

Grup IIa (Referans grubu): Ti6Al4V, 6. hafta sakrifikasyon

Grup IIb (Referans grubu): Ti6Al4V, 12. hafta sakrifikasyon

Grup IIIa: AZ91 Magnezyum alaşımı, 6. hafta sakrifikasyon

Grup IIIb: AZ91 Magnezyum alaşıımı, 12. hafta sakrifikasyon

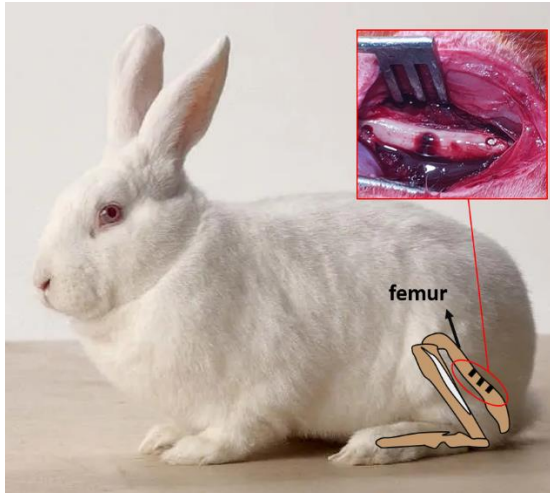
Grup IVa: %25 Hibrit kaplanmış AZ91 Magnezyum alaşıımı, 6. hafta sakrifikasyon

Grup IVb: %25 Hibrit kaplanmış AZ91 Magnezyum alaşıımı, 12. hafta sakrifikasyon

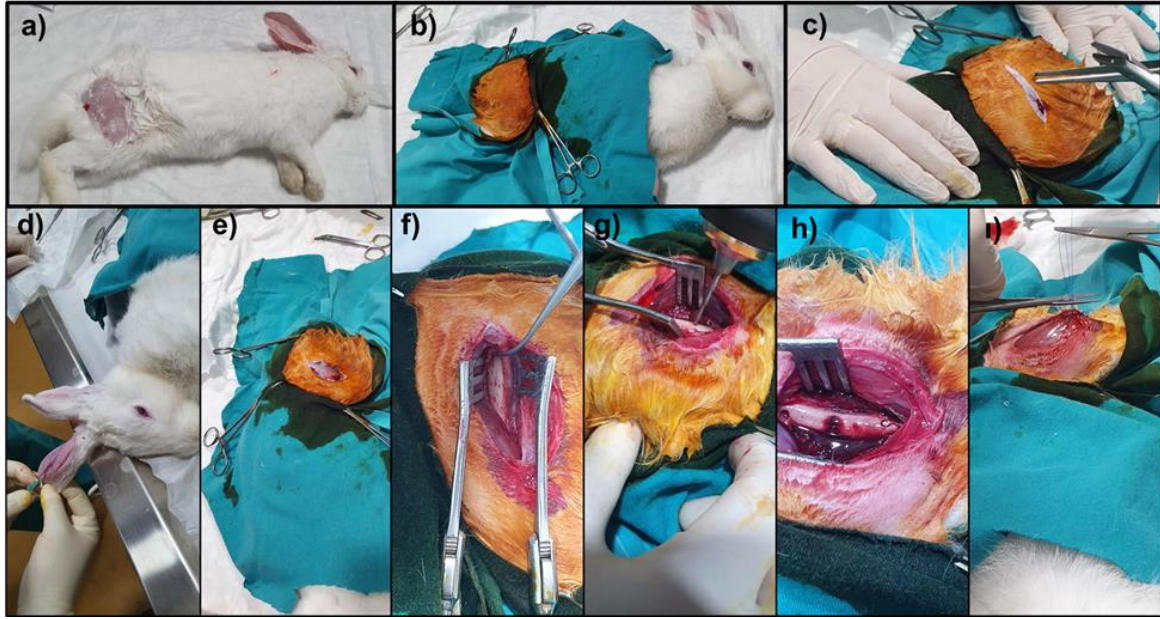
Grup Va: Ta₂O₅/Hidroksiapatit Tabakalı kaplanmış AZ91 Magnezyum alaşıımı, 6. hafta sakrifikasyon

Grup Vb: Ta₂O₅/Hidroksiapatit Tabakalı kaplanmış AZ91 Magnezyum alaşıımı, 12. hafta sakrifikasyon

Tavşanlar intramusküleri olarak uygulanan ketamin + ksilazin ile anestezi altına alınmıştır. Ekstremiteler tıraş edildikten sonra steril hale getirilmiştir. Lateral cilt insizyonu yapılarak biceps femoris kası ve gluteus superficialis kasları arasından sol femura ulaşılmıştır. Kemik proksimalinde mikromatkap yardımıyla lateralde trokanter majör üzerinden medialde trokanter minör medial korteksine doğru bir tünel açılarak daha önce 1,5 mm (kalınlık) x 6 mm (uzunluk) ebatlarında hazırlanmış olan test materyali, oluşturulan bu tünele yerleştirilmiştir. Kas planları emilebilir sütür, cilt emilemez sütür ile kapatılarak işlem sonlandırılmıştır. Kontrol grubundaki deneklerde açılan tünele herhangi bir implant yerleştirilmeksizin deney sonlandırılmıştır. Şekil 4.8’de Yeni Zelanda tavşanının implant yapılan bölgesi, Şekil 4.9’da ise cerrahi işlem basamaklarına ait görüntüler verilmiştir.



Şekil 4.8. Erkek Yeni Zelanda tavşanda implantasyonun yapıldığı bölge



Şekil 4.9. Cerrahi işlem basamakları, a) traşlama, b) ameliyata hazırlama, c) ilk kesinin oluşturulması, d) kan alma, e) implant yerleştirilecek olan femur kemiğine ulaşılması, f) femur kemik, g) mikromatkap ile defektin oluşturulması, h) implantların yerleştirilmesi ve i) dikiş ile kapatılması

Cerrahi işlem sonrasında sekonder enfeksiyon gelişimini önlemek amacıyla her deneye subkütan enjeksiyonla gentamisin (geniş spektrumlu antibiyotik) uygulaması yapılmıştır. Deneklerin cerrahi prosedür sonrası kafes içerisinde serbestçe yürümelerine izin verilmiş ve denekler 12 hafta süresince takip edilerek 6. ve 12. hafta sonunda, radyolojik ve histolojik analizler için yüksek doz anestezi ile kurban edilmiştir.

Serum parametreleri

Mg içerikli implantların kanda Mg değerlerine etkisi ve böbrek toksikasyonu yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla deneklerden cerrahi işlem ve sakrifikasyon öncesinde retro-orbital ponksiyon yoluyla 0,5-1 cc kan alınmıştır. Serum parametrelerini değerlendirmek üzere santrifüj cihazında (Jouan-MR 1822, France) 4°C’de, 3000 rpm’de, 15 dk santrifüj edilen kan örneklerinde Na, Üre, Ca, K, Cl düzeyleri Roche Cobas C501 otoanalizör diyagnostik kitleri ve iyon selektif elektrot metotları kullanılarak tespit edilmiştir. Magnezyum düzeyleri Perkin Elmer Atomik Absorbsiyon Spektrometresi ile ölçülmüştür.

Radyografların elde edilmesi, dansitometre

Postoperatif 6. ve 12. hafta sonunda sakrifikasyon öncesi anestezi altındaki deneklerin alt ekstremitelerinin X-Ray filmi çekilerek implantların radyolojik incelemeleri yapılmıştır. Görüntülerin elde edilmesi Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Analiz için görüntülerin elde edilmesinde VistaScan Occlusal fosfor plaklar (Dürr Dental AG, Bissingen, Germany) kullanılmıştır. Ölçümler ImageJ2x 2.1.7.2.2, (Rawak Software, Inc. Almanya) programı ile gerçekleştirilmiştir. Fosfor plak üzerine 12 basamaktan oluşan Alüminyum Step-Wedge (%99,5 alüminyumdan yapılmış, ilk basamağı 1 mm olan ve her basamakta kalınlığı 1 mm artan), örnekler yerleştirilmiştir. Fokal spot-film mesafesi 40 cm olacak şekilde 70 kVp, 8 mA, FS 0,1x0,1mm, total filtrasyon 2,5 mm Al, ışınlama süresi 0,25 sn olmak üzere Trophy CCX Digital (Trophy Radiologie S.A., Vincennes, France) cihazıyla ışınlamalar yapılmıştır.

Işık mikroskobu görüntüleme

Histokimya incelemeleri için sakrifiye işlemi sonrasında çıkarılan femur kemikleri %10 formalin çözeltisinde fikse edildikten sonra Şekil 4.10'da gösterildiği gibi implantların üzerinden postoperatif süreçte oluşan doku örnekleri toplanmıştır. Kemiklerden alınan doku örnekleri önce PBS ile yıkanmış, sonra süktroz (%15'lik) çözeltisine alınarak en az yarım saat +4 °C'ta bekletilmiştir. Ardından süktrozdan pens ile alınan örnekler dondurma medyumu içeren kalıplara yerleştirilerek 30 dk kadar bekletilmiştir. Ardından üzerine tekrar dondurma medyumu ilave edilmiş ve -20 °C'ta donması sağlanmıştır. Dondurulan bu örnekler Leica CM 1860 UV cihazında 5-8 µm kalınlığında kesitler halinde lam üzerine yerleştirilmiş ve boyamaya hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan numunelerde hücreler hematoksilin-eosin, inorganik matriks Alizarin Kırmızısı ve von Kossa, organik matriks Safranin-O ve Alcian Mavisi histolojik boyaları ile in vitro analizlerde açıklandığı gibi standart boyama prosedürü kullanılarak boyanmıştır. Boyanan örnekler ışık mikroskobunda 40X büyütmede incelenmiştir.



Şekil 4.10. a) Femur kemiğin ilk çıkarıldığı hali, b) İmplant üzerinde oluşan doku örneklerinin toplanması ve c) İmplant yüzeyinde oluşan dokunun kaldırılmış hali

İn vitro çalışmalarda yer almayan Safranin-O ve Alcian Mavisi histolojik boyaları aşağıda açıklanan standart boyama prosedürü kullanılarak boyanmıştır.

Safranin-O analizi;

Demir hematoksilin (Weigert's) çözeltisi:

Çözelti A: 1 gr hematoksilin 100 ml %95'lik etil alkolde hazırlanır.

Çözelti B: 4 ml %29'luk ferik klorit (FeCl_3), 95 ml saf su ve 1 ml derişik HCl karıştırılarak hazırlanır.

Eşit hacimlerde A ve B çözeltileri alınıp karıştırılarak Weigert's çözeltisi hazırlanır.

1. Slaytlar ddH₂O (bidistile) ile yıkanmış, fazla su uzaklaştırılmıştır.
2. Weigert's demir hematoksilin çalışma çözeltisi ile 7 dk boyanmıştır.
3. Akan musluk suyu altında 10 dk yıkama yapılmıştır.
4. Fast Green çözeltisi ile 3 dk boyanmıştır.
5. Hızlıca %1'lik asetik asit çözeltisi ile 10-15 sn yıkama yapılmıştır.
6. %0,1 Safranin-O çözeltisi ile 5 dk boyanmıştır.
7. %95 etil alkol, absolut etil alkol ve ksilen ile 2'şer dk suyu uzaklaştırılarak temizlenmiştir.

Alcian mavisi analizi;

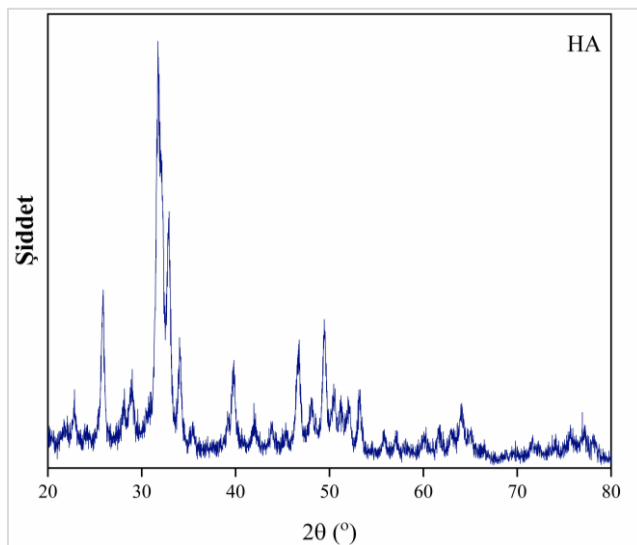
1. Slaytlar ddH₂O (bidistile) ile yıkanmış, fazla su uzaklaştırılmıştır.
2. pH 1'deki %1'lik Alcian Blue çözeltisi ile 30 sn %70 güçle mikrodalgada boyanmıştır.
3. 0,1 N HCl ile 5 sn yıkanmıştır.
4. %95 etil alkol ile yıkanarak dehidrate edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

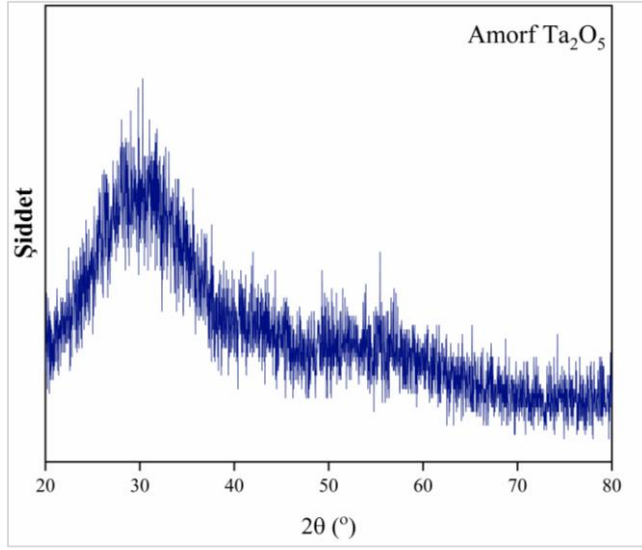
5.1. Kaplama Çözeltilerinin Karakterizasyonu

HA çözeltisinin 400 °C’de kalsine edilmesi sonucu elde edilen toza ait XRD deseni Şekil 5.1’de verilmiştir. Buradaki piklerin HA’ya ait ICDD kart numarası 9-432 olup elde edilen toz numunelerin pikleri ile örtüştüğü tespit edilmiştir.

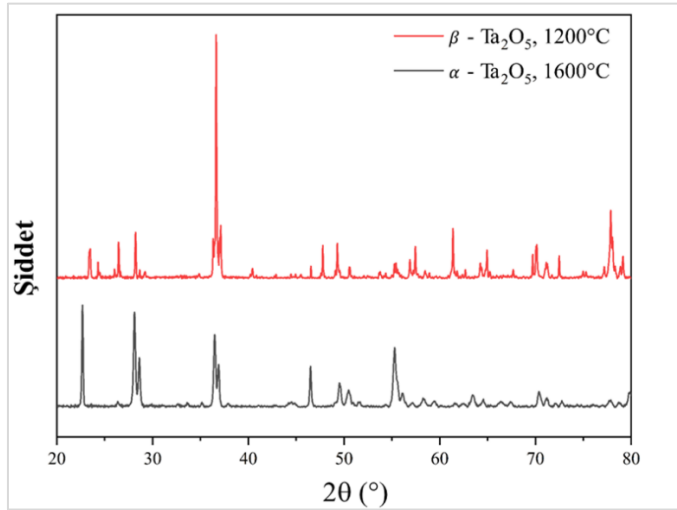
Ta₂O₅ çözeltisinin kaplama koşullarında, yani 400 °C’de kalsine edilmesi ile elde edilen toz amorf bir yapı sergilemektedir (Şekil 5.2). Bunun nedeni Ta₂O₅’in kristal yapı sergilediği sıcaklıkların 1200-1600 °C olmasıdır. Dolayısıyla üretilen tozlarda, kristal yapıyı gözlemleyebilmek ve Ta₂O₅ eldesini doğrulayabilmek amacıyla 1200 °C ve 1600 °C sıcaklıklarda da kalsinasyon yapılarak XRD analizleri yapılmıştır. Şekil 5.3’te 1200 °C ve 1600 °C’de kalsine edilerek üretilen Ta₂O₅ tozlarının XRD desenleri verilmiştir. 1200 °C’de kalsine edilen tozun 25-0922 ICDD kart numaralı β - Ta₂O₅ yapısına sahip olduğu ve 1600 °C’de kalsine edilen tozların ise α -Ta₂O₅ yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Dolayısı ile elde edilen çözeltiler Ta₂O₅’in kristalleşme sıcaklığına kalsine edildiği zaman kristal α ve β Ta₂O₅ yapıları doğrulanmıştır. Ta₂O₅ farklı kalsinasyon sıcaklık ve sürelerine bağlı olarak bazı faz dönüşümleri gerçekleştirmektedir (Roth ve Waring, 1970). Kristalin yapıdayken en iyi doku uyumuna ve hücre tutunmasına sahipken, amorf yapıda ise en iyi antibakteriyel özelliği gösterdiği bilinmektedir (Chang vd., 2014b). Çalışma için istenen yapının ise amorf yapı olduğu ve 400°C’de yapının amorf olduğu Şekil 5.2’de görülmektedir.



Şekil 5.1. 400°C’de kalsine edilerek üretilen HA tozuna ait XRD deseni



Şekil 5.2. 400 °C’de kalsine edilerek üretilen amorf yapılı Ta₂O₅ tozuna ait XRD deseni



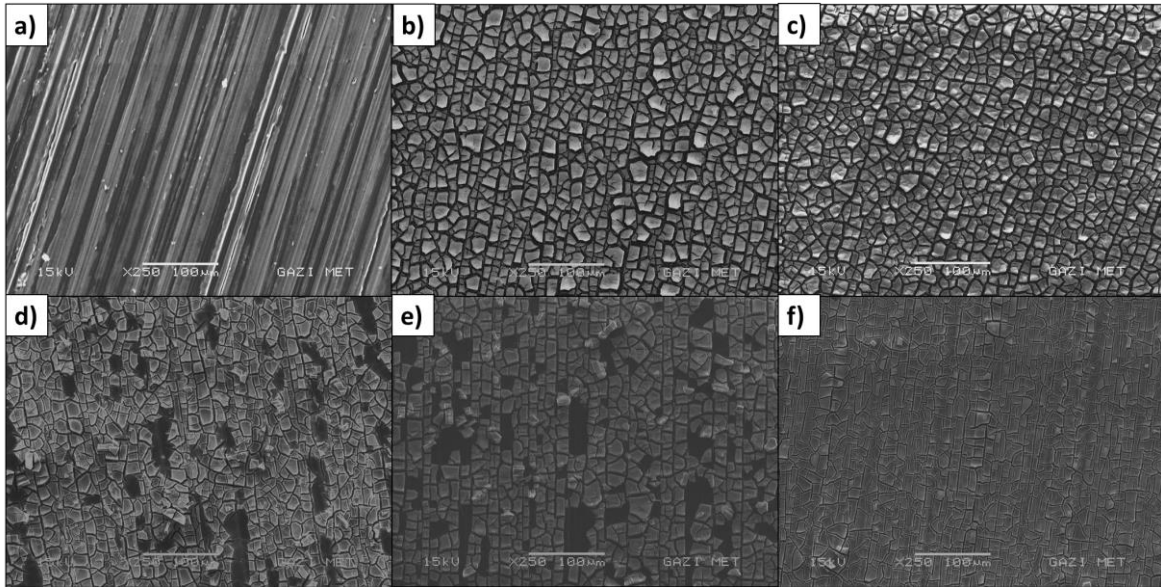
Şekil 5.3. 1200 °C ve 1600 °C’de kalsine edilerek üretilen β -Ta₂O₅ ve α -Ta₂O₅ tozlarına ait XRD deseni

5.2. Kaplamaların Karakterizasyonu

5.2.1. Yüzey ve kesit SEM/EDS analizi

HA, Ta₂O₅, Ta₂O₅/HA tabakalı ve %5-10-25 Hibrit kaplanmış numunelere ait yüzey morfolojilerini gösteren SEM görüntüleri Şekil 5.4’te mevcuttur. Aynı numunelerin kesit görüntülerinden alınan kaplama kalınlık ölçümleri Şekil 5.5’te ve bu kesit görüntülerindeki kaplama ve altlık malzeme bölgelerinden alınan EDS analizleri ise Şekil 5.6’da verilmiştir. Özellikle HA kaplı numune Şekil 5.5.a’da görüldüğü üzere 4,3 µm ile en ince kaplama tabakasına sahip numunedir. Çok ince tabaka olmasına rağmen yine de HA kaplamanın

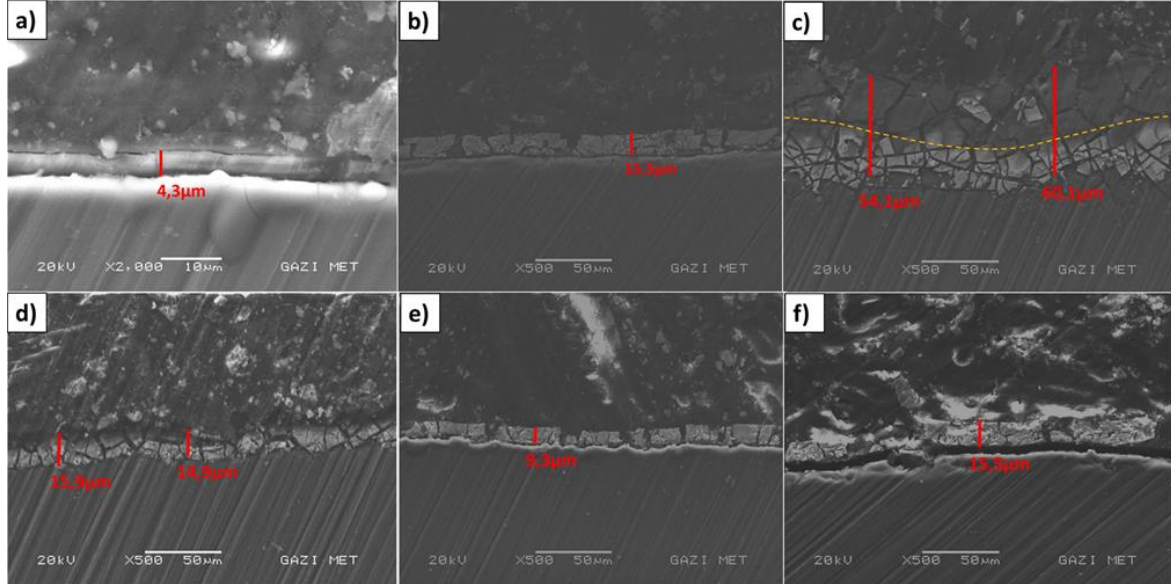
yüzeyde homojen dağıldığı aşikârdır. Yine Şekil 5.4.b’de de Ta₂O₅ kaplamanın homojen dağıldığı net bir şekilde ifade edilebilir. Şekil 5.5.b’de bu kaplamanın kalınlığı 15,5 µm olarak ölçülmüş ve düzgün bir kaplama kalınlığı dağılımı olduğu görülmüştür. Ayrıca üst üste yapılan daldırmalar sonucu bazı bölgelerde belirgin olarak tabakalar belli olmaktadır. Şekil 5.4.c’deki tabakalı kaplamada da yine homojen bir dağılım gözlenmiştir. Bu kaplamayı diğer kaplanmış numunelerden bariz bir şekilde öne çıkaran özelliği ise Şekil 5.5.c’de görüldüğü üzere 54-60 µm olarak ölçülen kaplama kalınlığıdır. Ayrıca tabakalı kaplama altta 3 katman Ta₂O₅ ve onun üzerine 3 katman HA kaplama yapılarak kaplanmıştır. Bu iki kaplama malzemesine ait ayırım net bir şekilde renk farkı ile görüntülenebilmiştir (Sarı kesikli çizgilerle görüntü üzerinde işaretlenmiştir). Bu iki farklı renkteki katmanların birbirlerine girişimleri sağlanmıştır. Ara yüzeyleri direkt bir çizgi gibi ayırık değil birbiri ile iç içe geçmiş – bütünleşmiş – haldedir. Ayrıca bu farklı renkteki tabakalardan ayrı ayrı EDS alınmış ve alt tabakanın (açık renk) Ta₂O₅, üst tabakanın (koyu renk) ise HA’ya ait olduğu doğrulanmıştır (Şekil 5.7).



Şekil 5.4. a) HA kaplı, b) Ta₂O₅ kaplı, c) Tabakalı kaplı ve d) %5, e) %10, f) %25 Hibrit kaplamalara ait kaplama yüzey morfolojileri (X250)

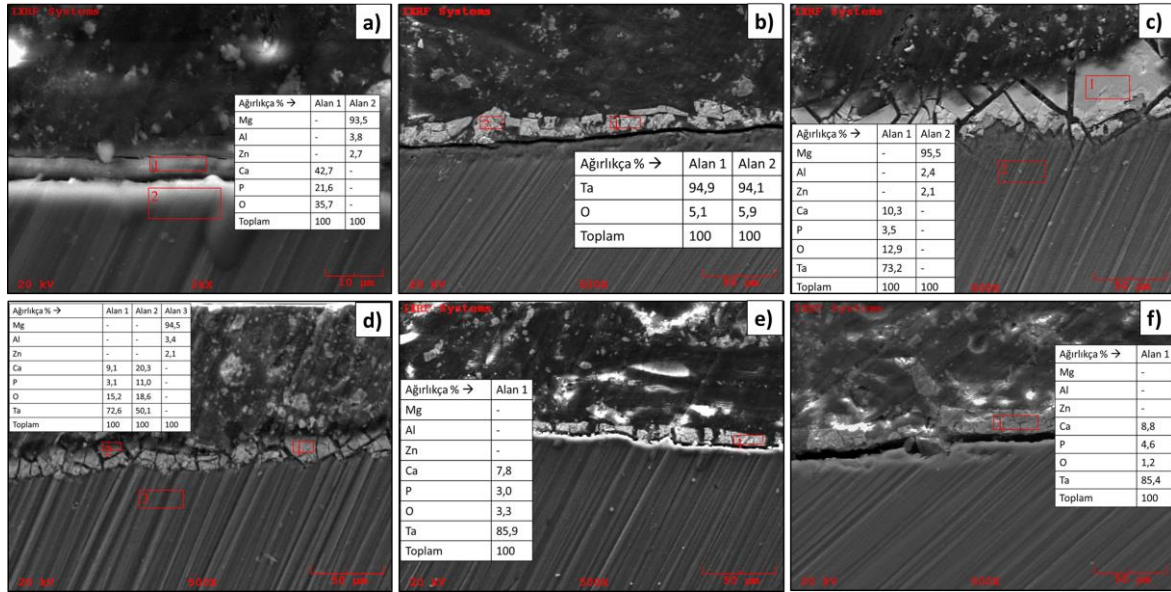
Hibrit kaplamalar kendi aralarında değerlendirilecek olursa %5 ve %10 Ta₂O₅ içerikli HA çözeltisi ile yapılan hibrit kaplamaların yer yer kalktığı görülmekte olup bu durumun %25’lik çözelti ile yapılan kaplamada görülmediği ifade edilebilir. Özellikle %25’lik numunenin homojen kaplama katmanına sahip olduğu ve yüzeyden kalkmadığı söylenebilir. Kaplama kalınlıkları ise birbirine yakın değerlerde olmuştur. %5 ve 25’lik ortalama 15 µm

iken %10'luk ise 9 μm civarında ölçülmüştür. En homojen dağılımlı kaplamaya sahip olan %25'lik hibrit kaplama tabakalı kaplamaya göre daha pürüzsüz ve homojen görünümlü olmasının yanı sıra adacıklar arası mesafesi çok daha dardır.

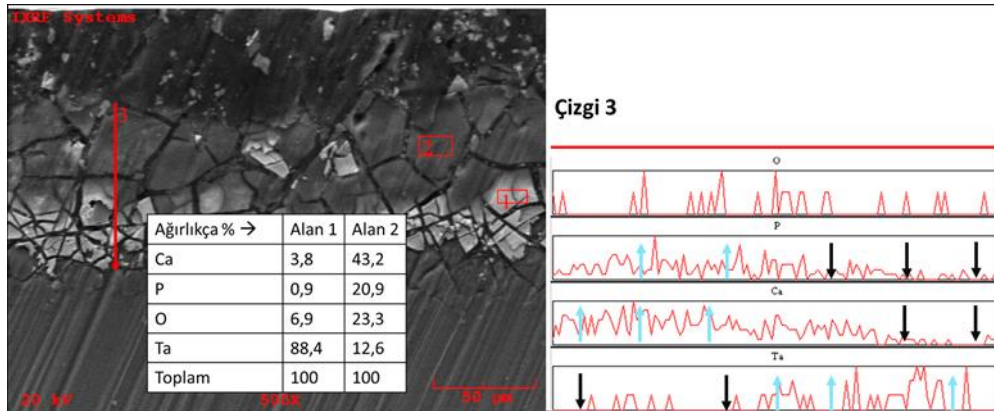


Şekil 5.5. a) HA kaplı(2000X), b) Ta_2O_5 kaplı (X500), c) Tabakalı kaplı ve d) %5, e) %10, f) %25 Hibrit (X500) kaplamalara ait kesit görüntüleri ve kaplama kalınlıkları ölçümü

Şekil 5.8'de verilen kesit görüntülerindeki kaplama ve altlık malzemelere ait bölgelerden alınan alan EDS analizlerinde alınan sonuçlar tamamen beklendiği gibi kaplama çözelti içeriği ile aynı olmuştur. Özellikle 50-60 μm kalınlığa sahip olan tabakalı kaplama için bölgesel EDS haricinde bir de çizgisel EDS analizi alınmış ve Şekil 5.7'de verilmiştir. Burada renk farkının olduğu bölgelerden ayrı ayrı alınan EDS ölçümleri alt tabakanın Ta_2O_5 ve üst tabakanın ise HA olduğunu doğrulamış ve kaplama kesiti boyunca kırmızı ok ile gösterilen Çizgi 3'e ait EDS verilerinde elementlerin değişimi de bu sonuçları desteklemiştir.



Şekil 5.6. a) HA kaplı (2000X), b) Ta₂O₅ kaplı (X500), c) Tabakalı kaplı (X500) ve d) %5, e) %10, f) %25 Hibrit (X500) kaplamalara ait kesit görüntülerinden alınmış EDS verileri



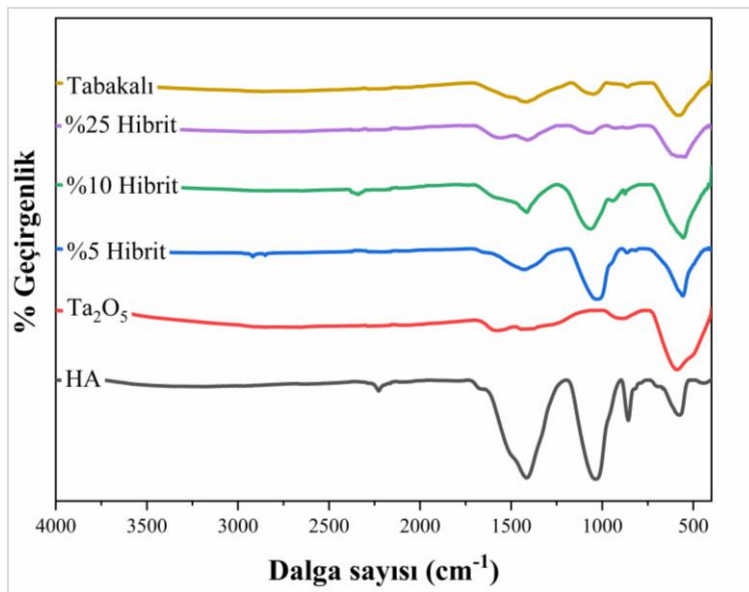
Şekil 5.7. Tabakalı kaplamaya ait kesit görüntüsü ve çeşitli EDS analizleri

5.2.2. Kaplamaların FTIR spektrumları

Kaplama sonrası kurutulup kalsine edilen numunelerde oluşan bağların tespiti için FTIR analizi kullanılmış ve elde edilen FTIR spektrumları Şekil 5.8’de grafik olarak verilmiştir. Elde edilen tüm yapılarda bağlanmaların, oluşan C, O, H bağlarının tespiti için bu analiz gereklidir. Yapıda oluşan kovalent bağlar büyük çoğunlukla M-O-M bağlarından oluşur (Aparicio vd., 2012; Klein vd., 2018). HA kaplı AZ91 Mg alaşımının FTIR spektrumunda 3185 cm⁻¹ dalga sayısında pik yapan 3000-3600 cm⁻¹ dalga sayısındaki pik O-H esnemesini göstermektedir. Bu pik ve 440 cm⁻¹ dalga sayısında gözlemlenen pik OH⁻ grubuna aittir. 2227 cm⁻¹ değerinde gözlemlenen 2000-2350 cm⁻¹ aralığındaki pik ise C-H bağlarını içerir.

1416 cm^{-1} (CO_3)⁻² grubuna ait asimetric gerinme pikidir. Orta emilim piki olarak adlandırılan ve karbonat gruplarına ait olan bu pikler daha yüksek kalsinasyon sıcaklıklarında kaybolmaktadır. 1035 cm^{-1} (PO_4)⁻³ grubunun ana ve en belirgin pikidir ve P-O bağlarını içerir. 857 cm^{-1} (CO_3)⁻² grubunun bükülme pikidir. Karbonat gruplarına ait olan ve 1416 cm^{-1} ve 857 cm^{-1} dalga sayılarında gözlemlenen bu pikler daha yüksek kalsinasyon sıcaklıklarında kaybolmaktadır. 571 cm^{-1} dalga sayısındaki pik ise (PO_4)⁻³'ün asimetric bükülme piki olup O-P-O bağlarını içerir.

Tantal oksit kaplı numunenin FTIR spektrumu sonucu incelendiğinde Ta-O ve Ta-O-Ta gerilme titreşimi nedeniyle oluşan piklerin tespit edildiği ve bu sayede oluşması beklenen kovalent bağların oluştuğu gözlemlenmiştir. Her ne kadar kalsinasyon işlemi yapılmış olsa da yapıda bir miktar su bulunmaktadır. Bu durum yine FTIR analizlerinde gözlemlenen hidroksil grubuna ait titreşimler ve H₂O veya O-H'in oluşturduğu gerilme piklerinden anlaşılmaktadır. $500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ 'de Ta-O ve Ta-O-Ta gerilme titreşimi nedeniyle oluşan pikler görülmektedir. 856 cm^{-1} civarındaki pik ise C-C ve C-O bükülümünden kaynaklıdır. 1580 cm^{-1} 'deki pik ise hidroksil grubuna aittir. 2658 cm^{-1} 'de bulunan yayvan pik H₂O veya O-H'in oluşturduğu gerilme titreşimine aittir. Ono ve Koyanagi (2000) yaptıkları çalışmada, Ta ve O arasındaki bağ oluşumları ve bu oluşumların etkisini incelemişler ve elde ettikleri bağların, bu tez çalışmasında üretilen Ta₂O₅ bağlar ile çok benzer olduğu görülmüştür (Ono ve Koyanagi, 2000).



Şekil 5.8. HA, Ta₂O₅, %5-10-25 Hibrit ve Tabakalı kaplı numunelerin FTIR spektrumları

Tabakalı ve hibrit kaplamaların FTIR analizleri sonucunda Ta–O ve Ta–O–Ta gerilme titreşimi nedeniyle oluşan pikler, hibrit çözeltide bulunan Ta₂O₅ oranı arttıkça artmıştır. Bu durum ise hibrit çözeltide kullanılan başlatıcı miktarının artması ile kovalent bağ oluşumunun teşvik edildiğini göstermektedir. Tabakalı kaplamada 1000 cm⁻¹ dalga sayısındaki pikin şiddetinde azalma gözlemlenmiştir. %10 Hibrit kaplama olan numunede 460 cm⁻¹'deki pik şiddetinde ve 2300 cm⁻¹'de artış gözlemlenmiştir. 500-1000 cm⁻¹'de Ta–O ve Ta–O–Ta gerilme titreşimi nedeniyle oluşan piklerin, hibrit çözeltide bulunan Ta₂O₅ oranı arttıkça arttığı gözlemlenmiştir. 3000-3600 cm⁻¹ dalga sayısındaki pik O–H esnemesini gösterir ve OH⁻ grubuna aittir. Bu pikin tabakalı kaplamada hibrit kaplamalara göre daha şiddetli olduğu söylenebilir. 2227 cm⁻¹ değerinde gözlemlenen 2000-2350 cm⁻¹ aralığındaki pik ise C–H bağlarını içerir. 1416 cm⁻¹ (CO₃)⁻² grubuna ait asimetrik gerilme pikidir. Orta emilim piki olarak adlandırılan ve karbonat gruplarına ait olan bu pikler daha yüksek kalsinasyon sıcaklıklarında kaybolmaktadır. 1035 cm⁻¹ (PO₄)⁻³ grubunun ana ve en belirgin pikidir ve P–O bağlarını içerir. 857 cm⁻¹ (CO₃)⁻² grubunun bükülme pikidir. Karbonat gruplarına ait olan ve 1416 cm⁻¹ ve 857 cm⁻¹ dalga sayılarında gözlemlenen bu pikler daha yüksek kalsinasyon sıcaklıklarında kaybolmaktadır. 571 cm⁻¹ dalga sayısındaki pik ise (PO₄)⁻³'ün asimetrik bükülme piki olup O–P–O bağlarını içerir. 1000 cm⁻¹'deki pik ise C–C and C–O bükülümünden kaynaklıdır. 1580 cm⁻¹'deki pik ise hidroksil grubuna aittir. 2658 cm⁻¹'de bulunan yayvan pik H₂O veya O–H'in oluşturduğu gerilme titreşimine aittir.

5.2.3. Lineer çizik test sonuçları

Çizik testleri kaplama ile altlık malzeme arayüzey bağlanmasını değerlendirmek amacıyla yapılmıştır, ancak sayısal olarak yapışma derecesini ifade etmek oldukça zordur. Çünkü Lc, kritik yükü, altlık malzeme, kaplama kalınlığı, arayüzeyde oluşan bağlar ve sertlik gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Sürtünme kuvveti eğrisindeki ani yük değişimleri Lc kritik yükün belirlenmesi için önemlidir. Ayrıca çizik testi sonucu oluşan iz de bu testin yorumlanması için faydalı bilgiler sağlamaktadır. İz başlangıcından itibaren kaplamanın ilk kalktığı nokta ve kaplamanın tamamen deforme olduğu bölgeleri görmeyi kolaylaştırdığı gibi, ilerleyen mesafe ile izin genişliğinin ne kadar arttığına bağlı olarak deformasyon miktarı ile ilgili bilgiler de sağlar (Ferraris vd., 2020; Lenis vd., 2020).

Çizik testi referans ölçümlere dayanan karşılaştırmalı bir yöntemdir ve bu nedenle kritik yük olarak kabul edilen kriterler kullanıcı tarafından belirlenir. Bu tez çalışmasında çizik testi

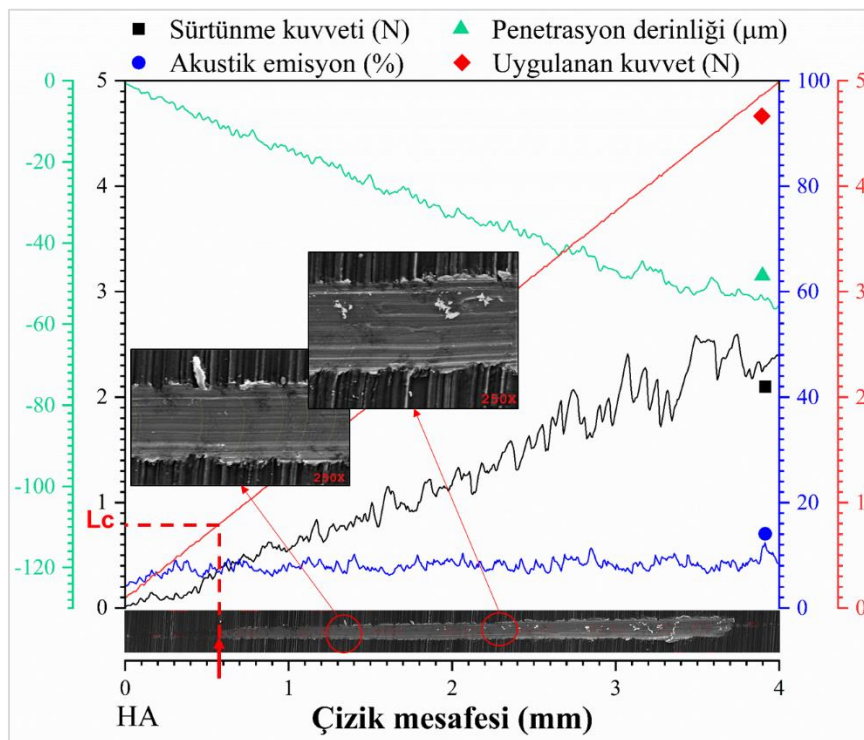
kaplamayı değerlendirmek adına yapıldığından, kaplamadan altlık malzemeye geçişin gerçekleştiği anda uygulanan yük, kritik yük olarak kabul edilmiştir. Çizik testi sonuçlarından elde edilen grafik ve çizik testi sonrası 4 mm uzunlunda oluşan izden alınan SEM görüntüleri grafik üzerinde birleştirilerek değerlendirilmiştir.

Şekil 5.9'da HA kaplanan örneğe ait çizik testi sonuçları verilmiştir. HA kaplı numunede kaplama kalınlığı ortalama 4 mikron civarındadır. 0,6 mm mesafeye kadar yüzeydeki kaplama tabakası devam etmektedir ve bu noktada penetrasyon derinliği 5 mikrona ulaşmış ve artık altlık malzeme görünmeye başlamıştır. Dolayısıyla kaplamanın ilk kalktığı nokta $L_c=0,8$ N, kritik yük değerine tekabül etmektedir. Bu mesafenin sonrasında sem görüntülerinde altlık malzemede yarım ay şeklinde chevron izlerine rastlanmış ve bu izler 1,725 mm mesafenin sonrasında tamamen kaybolarak yerini şiddetli deformasyon sonucu plastik deformasyon izlerine bırakmıştır. Maksimum kuvvet uygulandığı andaki penetrasyon derinliği ise 56 mikron civarındadır.

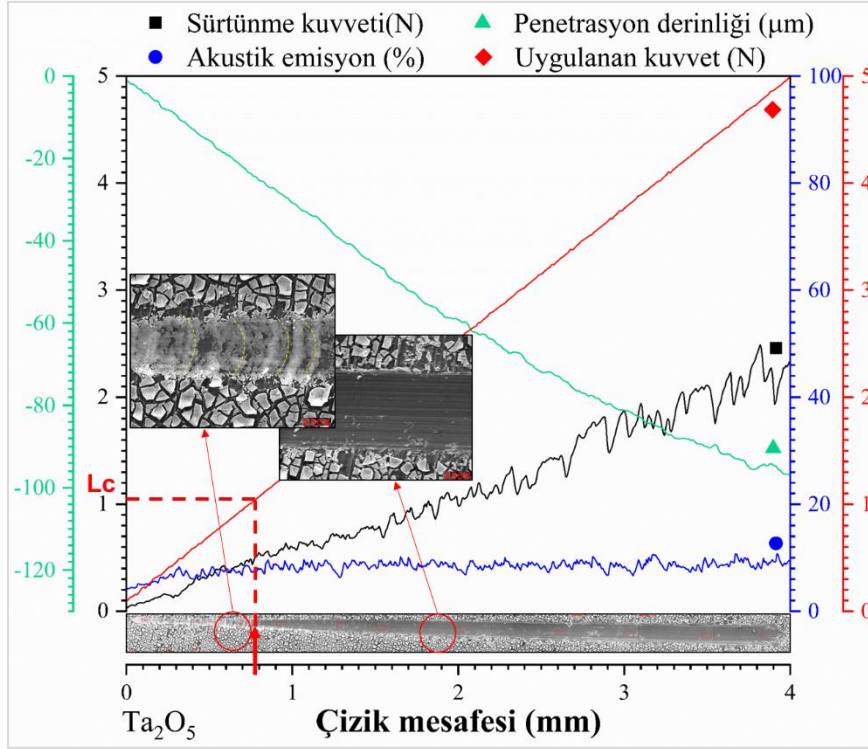
Ta₂O₅ kaplı numuneye ait sonuçlar Şekil 5.10'da verilmiştir. Ta₂O₅ kaplama kalınlığı ortalama 15 mikron civarındadır. 0,79 mm mesafeye kadar yüzeydeki kaplama tabakası devam etmektedir ve kaplama tabakasında chevron izleri mevcuttur. Bu noktadan sonra kaplama görülmemektedir ve grafikten penetrasyon derinliği -23 µm olarak okunmaktadır. Dolayısıyla kritik yük olarak kabul edilen kaplamanın kalktığı bu noktada L_c değeri 1,08 N olarak okunmaktadır. Bu mesafenin sonrasında SEM görüntülerinde altlık malzemede çizik yönüne paralel derin çizik izleri mevcuttur. Maksimum kuvvet uygulandığı andaki penetrasyon derinliği ise 96 µm civarındadır.

%5 Hibrit kaplı numuneye ait sonuçlar Şekil 5.11'de verilmiştir. %5 Hibrit kaplama kalınlığı ortalama 15,5 µm civarındadır. 0,85 mm mesafeye kadar yüzeydeki kaplama tabakası devam etmektedir ve kaplama tabakasında chevron izleri mevcuttur. Bu noktadan sonra kaplama yer yer görülse de penetrasyon derinliği bu noktadan sonra kaplama kalınlığını aşmıştır. Kaplama olarak görülen tabaka kuvvetle muhtemel rockwell ucunun yüzeyden kaldırdığı kaplama tabakasının yine yüzeye yapışmasına sebep olması ile alakalıdır. Kaplamanın kalktığı ilk andaki noktada L_c değeri 1,16 N'dur. Bu andaki penetrasyon derinliği -17 µm olarak okunmaktadır. Çiziğin sonlarında gösterilen sem görüntülerinde altlık malzemede çizik yönüne paralel derin çizik izleri mevcuttur. Maksimum kuvvet uygulandığı andaki penetrasyon derinliği ise 60 µm civarındadır.

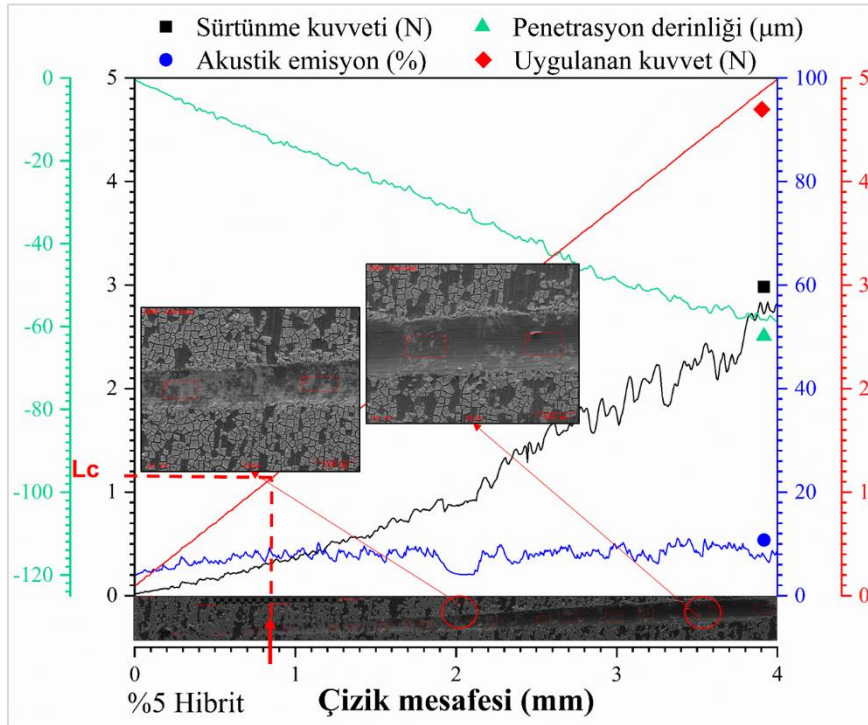
%10 Hibrit kaplı numuneye ait sonuçlar Şekil 5.12’de verilmiştir. %10 Hibrit kaplama kalınlığı ortalama 10 mikron civarındadır. 0,49 mm mesafeye kadar yüzeydeki kaplama tabakası devam etmektedir ve kaplama tabakasında belli belirsiz chevron izleri mevcuttur. Bu noktadan sonra kaplama görüntüsü daha da azalmaktadır. Bu andaki penetrasyon derinliği ise 12 μm gibi bir değerde olup yine bu değer kaplama kalınlığından biraz fazla olduğundan altlık malzemeye ulaşıldığını çok net anlayabiliriz. Dolayısıyla buna karşılık gelen L_c değeri grafikten 0,6 N civarındadır. Yakından alınan SEM görüntüsü şiddetli deformasyon izlerini içermektedir. Maksimum kuvvet uygulandığı andaki penetrasyon derinliği ise 62 mikron civarındadır.



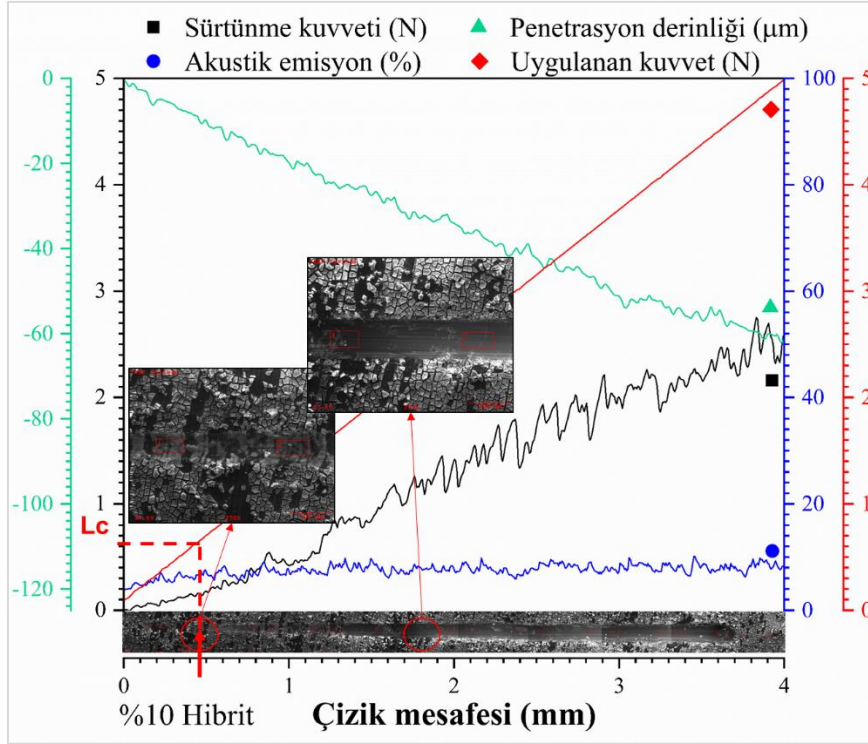
Şekil 5.9. HA kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü



Şekil 5.10. Ta₂O₅ kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü

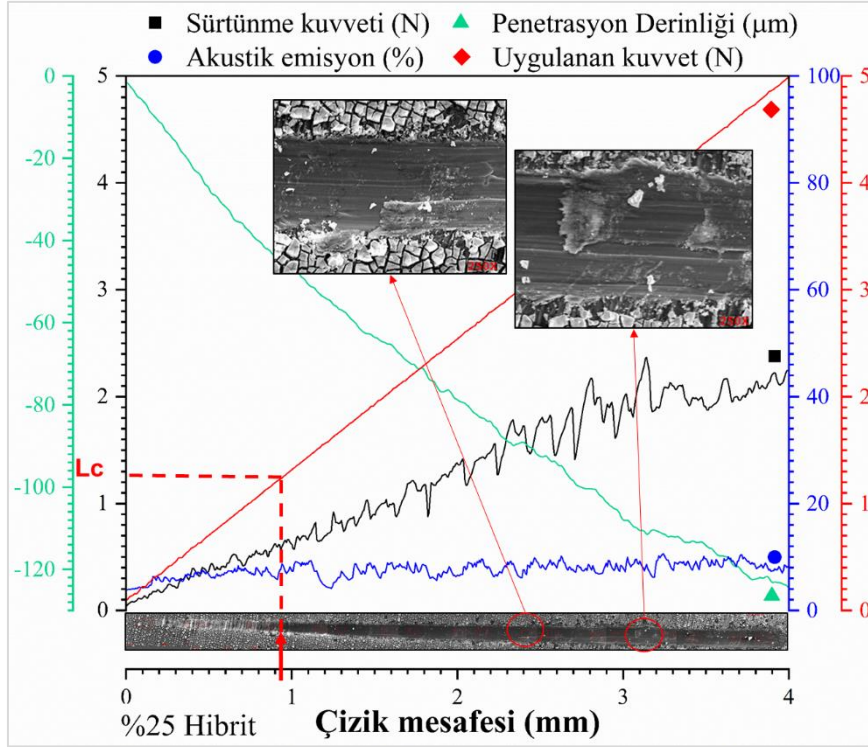


Şekil 5.11. %5 Hibrit kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü



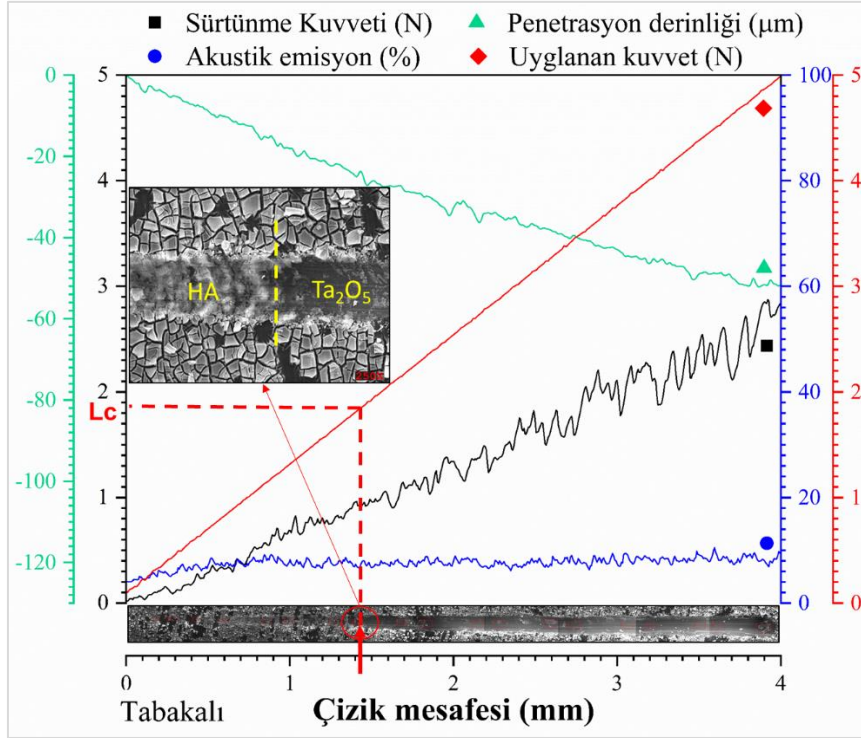
Şekil 5.12. %10 Hibrit kaplı örneğin Linear çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü

Şekil 5.13, %25 Hibrit kaplı numunenin sonuçlarını göstermektedir. %25 Hibrit kaplı numunede kaplama kalınlığı ortalama 15 μm civarındadır. 0,95 mm mesafeye kadar yüzeydeki kaplama tabakası devam etmektedir ve kaplama tabakasında yoğun chevron izleri mevcuttur. Bu noktadan sonra kaplama görülmemektedir ve grafikten penetrasyon derinliği -43 μm olarak okunmaktadır. Dolayısıyla kritik yük olarak kabul edilen kaplamanın kalktığı bu noktada Lc değeri yaklaşık 1,3 N olarak okunmaktadır. Bu mesafenin sonrasında sem görüntülerinde altlık malzemede yoğun deformasyon ve yırtılmalar olduğu görülmüştür. Maksimum kuvvet uygulandığı andaki penetrasyon derinliği ise 125 μm civarındadır.



Şekil 5.13. %25 Hibrit kaplı örneğin Linear çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü

Tabakalı kaplanan numunenin sonuçları Şekil 5.14’te verilmiştir. Tabakalı kaplı numunede kaplama kalınlığı ortalama 55-60 mikron aralığındadır. Altlık malzemeye temas etmeyen bu çizik testinde 1,42 mm mesafede çizik sem görüntülerinde belirgin farklılıklar olduğu görülmektedir. 1,42 mm mesafeye kadar yüzeydeki kaplama tabakasında chevron izleri mevcuttur. Bu mesafeye denk gelen penetrasyon derinliği grafikten $-24\ \mu\text{m}$ olarak okunmaktadır. Tabakalı kaplı numunede yaklaşık $60\ \mu\text{m}$ olan kaplamanın 2 tabakadan oluştuğu (üstte HA, altta Ta_2O_5 tabakası) ve kesit SEM görüntülerinden ise tabakaların kalınlığının ortalama $25\text{-}30\ \mu\text{m}$ olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 5.7). Dolayısıyla bu noktadan sonra HA tabakasından Ta_2O_5 tabakasına geçildiği tahmin edilmektedir. Bu mesafeye kadar devam eden HA tabakasında görülen chevron izleri Ta_2O_5 katmanında görülmemektedir. Maksimum kuvvet uygulandığı andaki penetrasyon derinliği ise $51\ \mu\text{m}$ civarındadır. Bu demek oluyor ki altlık malzemeye ulaşılmamış ve hala kaplama tabakası görüntülenmektedir. Dolayısıyla kaplama tabakasının tamamen kalkıp altlık malzemenin görüldüğü nokta olarak kabul edilen L_c değeri belirlenememiştir.



Şekil 5.14. Tabakalı kaplı örneğin Lineer çizik test sonuçları ve çizik izi SEM (250X) görüntüsü

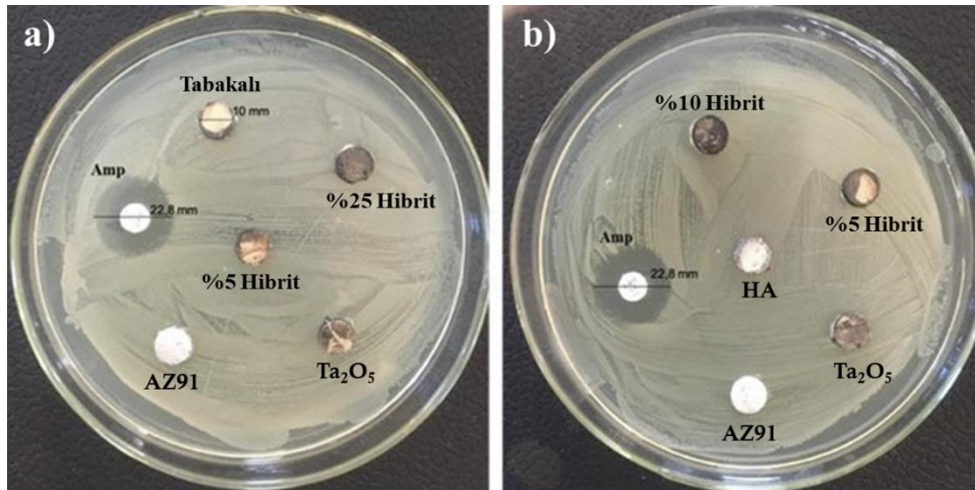
5.3. Mikrobiyoloji Analizleri

Antibakteriyel aktivite analizleri yapılan numuneler aşağıda numaralandırılmıştır. 1 numaralı numune kontrol numunesi olup, üzerine kaplama uygulanmamış AZ91 altlık numunesidir. 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 numaraları ile kodlanmış örnekler ise alaşımın kaplamalar gerçekleştirildikten sonra 10 mm çapında disk şeklinde kesilmeleri ile elde edilmiştir. 8 numaralı son örnek ise; 10 mm çapında tek parça disk şeklinde üretilen AZ91 alaşımının tüm yüzeylerinin Tantaloksit ile kaplanması sonucu elde edilmiştir.

1. Kaplanmamış AZ91altlık, kontrol numunesi,
2. Tantaloksit kaplı AZ91 alaşımı
3. HA kaplı kaplı AZ91 alaşımı
4. %5 Hibrit kaplı AZ91 alaşımı
5. %10 Hibrit kaplı AZ91 alaşımı
6. %25 Hibrit kaplı AZ91 alaşımı
7. Tabakalı kaplı AZ91 alaşımı
8. Yekpare tüm yüzeyi Tantaloksit kaplı AZ91 alaşımı

Escherichia Coli ATCC 25922 (Gram negatif) suşuna ait petride amfisilin inhibisyon zonu 22,8 mm (Şekil 5.15), *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 (Gram pozitif) suşuna ait petride amfisilin inhibisyon zonu 50,3 mm (Şekil 5.16) olarak tespit edilmiştir. Buna karşın kaplanmamış ve kaplanmış AZ91 örneklerinin *E. Coli* ATCC 25922 ve *S. Aureus* ATCC 25923 suşları içerisinde kabul edilebilir bir zon oluşturmadıkları tespit edilmiştir.

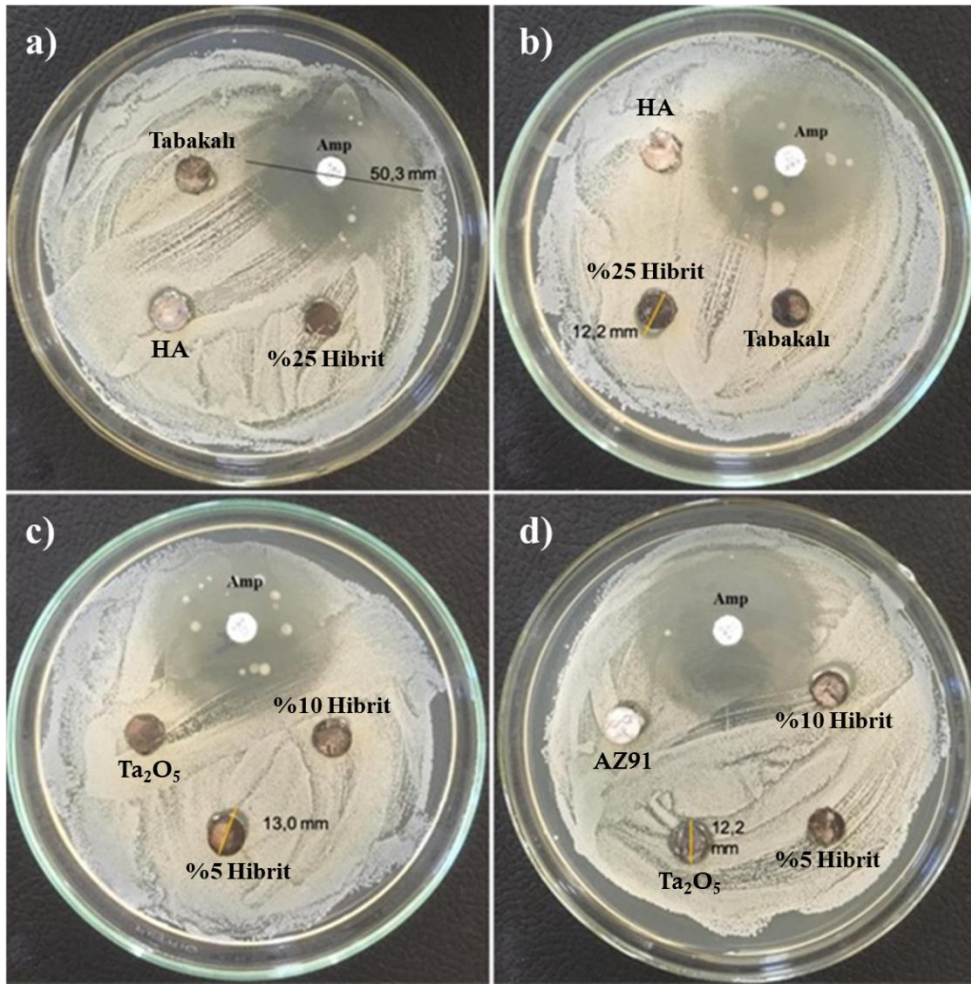
Literatürde HA'nın *S. Aureus* ve *E. Coli* bakterileri ile yapılan çalışmalarında, tek başına antibakteriyel özellik sergilemediği ancak yapısına çeşitli dopantlar katıldığında antibakteriyel özellik sergileyebildiği gösterilmiştir (Calabrese vd., 2021; Franco vd., 2021; Wang vd., 2021). Örneğin, Ullah vd.'nin (2020) yaptığı çalışmada, üretilen HA peletlerinden Sr^{+2} ve Zr^{+2} katkılı olanlar *S. Aureus* ve *E. Coli* bakterilerine karşı antibakteriyel özellik sergilerken, katkısız HA peletinde antibakteriyel özellik sergilemediği vurgulanmıştır (Ullah vd., 2020). Aynı şekilde Dhandapani vd.'nin (2020) yaptığı çalışmada, *S. Aureus* ve *E. Coli* bakterilerine karşı tek başına HA numunesinin inhibisyon zonu oluşturmadığı, ancak Ag katkısının inhibisyon zonunu 18-22 mm'ye çıkardığı kaydedilmiştir (Dhandapani vd., 2020). Benzer şekilde Citradewi vd.'nin (2021) yaptığı çalışmada da HA'nın inhibisyon zonu oluşturmadığı kaydedilmiştir (Citradewi vd., 2021).



Şekil 5.15. *E. Coli* suşuna ait bakteri kültüründe örneklerin ve amfisilin diskinin oluşturduğu inhibisyon zonu görüntüleri

Gram pozitif *S. Aureus* ATCC 25923 suşunda gerçekleştirilen antibakteriyel analizlerde ise bazı örneklerin çevresinde kısmen zon olduğu (Şekil 5.16) gözlenmiştir. Ancak, oluşan zonlar örneğin 360 derecelik çevresinin tamamında yer almadığından, ayrıca tekrar analizlerde aynı sonuca ulaşılamadığından antibakteriyel özelliğinin varlığı kabul edilebilir

değildir. Özellikle kaplanmayan ve HA kaplı numunelerde hiç zon gözlenmezken, Tantaloksit ve hibritlerin bazılarında tam çevrelemeyen kısmi zonlar gözlenmiştir. Fakat tam çevreleme olmadığından zon oluşmadığı kabul edilerek ölçüm alınması uygun görülmemiştir. Kısmi zon oluşan ve ölçüm alınmayan numunelerin yan yükseklik yüzeylerinde kaplama olması ve altlık malzemenin temas yüzeyinin minimuma indirilmesi halinde tüm numune yüzeyini çevreleyebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, literatürde antibakteriyel özelliği kabul görmüş olan Tantaloksit kaplama için yeniden tek başına ve direk 10 mm çapında 2 mm kalınlığında olacak şekilde pul numune üretilerek tüm yüzeylerinin kaplanması sağlanmış ve bakteri testine tabi tutulmuştur (Şekil 5.17).



Şekil 5.16. *S. Aureus* suşuna ait bakteri kültüründe örneklerin ve amfisilin diskinin oluşturduğu inhibisyon zonunun görüntüleri

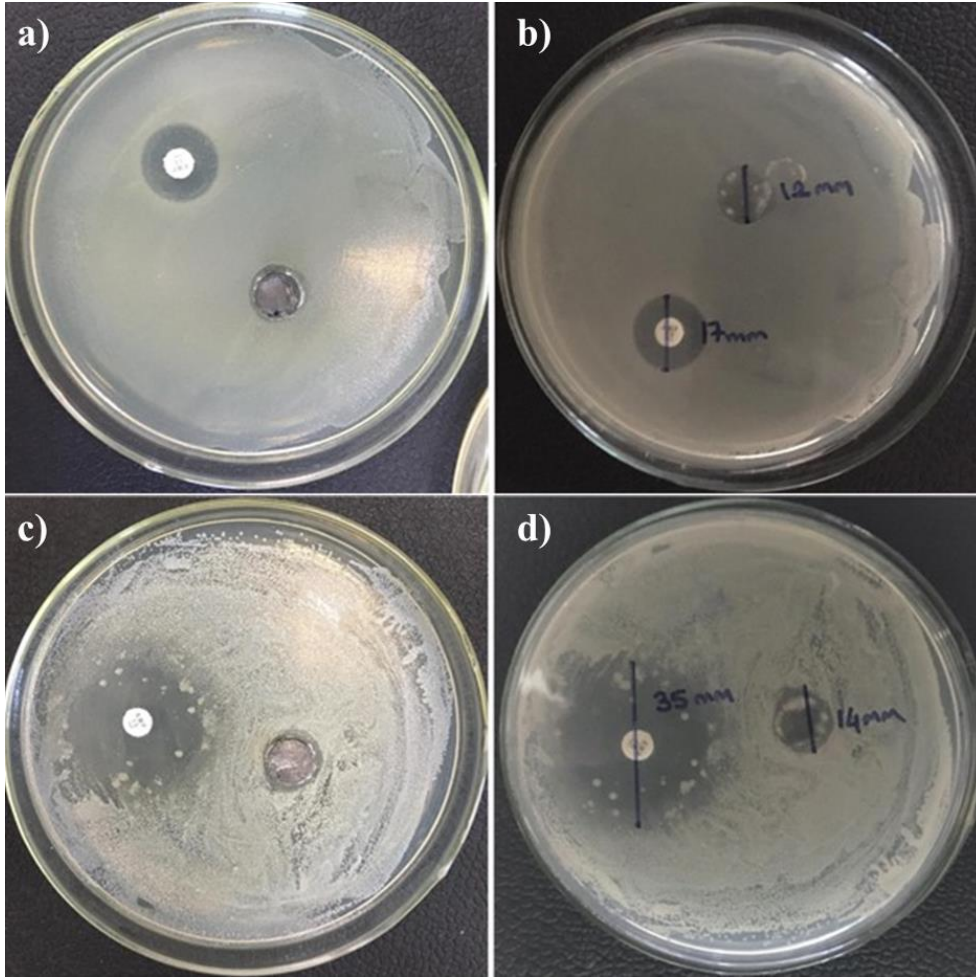
İlk 7 örneğin antimikrobiyal analizlerinin sonucuna istinaden, 8 numaralı örnek üretilmiş olup, doğrudan 10 mm çapında disk şeklinde üretilen AZ91 alaşımının tüm yüzeylerinin Tantaloksit ile kaplanması ile elde edilmiştir. Son örnekteki kaplamada temel fark, yan

kısımlarda (yükseklik) da kaplamaların bulunması ile kesmeden kaynaklanan mikro kırıkların ve mikrogözenekliliklerin bulunmamasıdır. Bu şekilde, kaplamanın bakteri ile temas yüzeyi artırılmıştır. Böylece yan yüzeylerden, açıkta kalan iç kısma vasatın difüzyonunu kolaylaştıran mikroçatlaklar ve mikrogözeneklilikler asgari seviyeye çekilmeye çalışılmıştır.

E. Coli ATCC 25922 (Gram negatif) suşuna ait petride amfisilin inhibisyon zonu 17 mm, numunenin oluşturduğu inhibisyon zonu ise 10 mm'lik numune çapı dâhil 12 mm olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.17.a ve b). Gram pozitif *S. Aureus* ATCC 25923 suşunda gerçekleştirilen antimikrobiyel analizde daha büyük bir zon tespit edilmiştir. Kontrol örneği amfisilin ile 35 mm'lik bir zon elde edilmişken, tantaloksit kaplı örnekte 14 mm'lik bir zon oluştuğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.17.c ve d'de verilmiştir.

Literatürde de Tantaloksitin antibakteriyel olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bunlardan özellikle Chang vd.'nin (2014) yaptığı çalışmada, amorf Tantaloksit tabakasının *A. Actinomycescomitans* (Gram-negatif) ve *S. Aureus* (Gram-pozitif) bakteri tutunmasını kristalin Tantaloksit ve Tantaldan daha fazla engellediği vurgulanmıştır (Chang vd., 2014a). Bu tez çalışmasında da amorf yapılı Tantaloksit kullanıldığından inhibisyon zonu oluşturması beklentiyi karşılar niteliktedir.

Başka bir çalışmada *S. Aureus* karşı Tantaloksit ve farklı oranlarda Ag katkılanmış Tantaloksit kaplı paslanmaz çelik numunelerin antibakteriyel özellikleri karşılaştırılmıştır. Buradaki sonuçlara göre paslanmaz çelik kontrol numunesine kıyasla Tantaloksit kaplanmış numune ve %12 Ag içerikli Tantaloksit kaplı numune aynı derecede bakteri tutunmasını engellediği ve yarı yarıya düşürdüğü, %23 Ag katkılı Tantaloksit kaplanan numunenin de bir miktar daha düşürdüğü grafiklerde gösterilmiştir. Ancak Ag katkısının sağladığı düşüş kayda değer değildir (Huang vd., 2014). Titanyum üzerine Ta₂O₅ ve PEO-Ta₂O₅ kaplamalar yapılarak *S. Aureus* bakterisine karşı aktivitesi araştırılmış ve bakteri tutunmasının en iyi Ta₂O₅ kaplama ile sağlandığı vurgulanmıştır (Huang vd., 2019). Yine bir çalışmada, Ti6Al4V üzerine Cu-Ta₂O₅/Ta₂O₅/Ta₂O₅-TiO₂/TiO₂/Ti (kısaca Cu-MTa₂O₅) katmanlarından oluşan kaplamalarda Cu konsantrasyonunun *S. Aureus* bakteri tutunmasını nasıl etkilediğini gözlemlemişlerdir. Cu olmasa dahi Ta₂O₅ kaplanan numunenin antibakteriyel özelliği 2 katından daha fazla arttırdığı ve Cu içeren kaplamaların ise konsantrasyon etki etmeksizin 4 kata kadar arttırdığı görülmüştür (Ding vd., 2020).



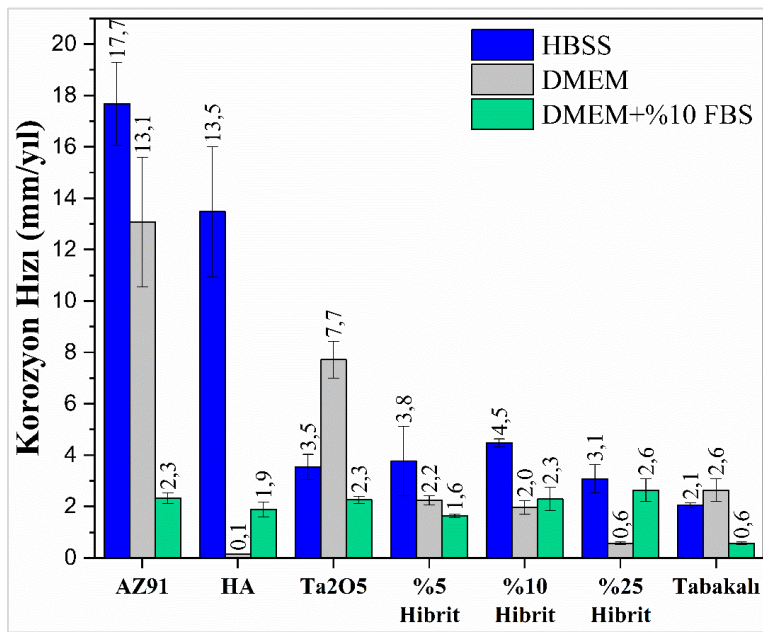
Şekil 5.17. *E. Coli* suşuna ait petride a) Tantaloksit ile tamamen kaplı AZ91 örneğinin ve amfisilin diskinin oluşturduğu inhibisyon zonunun görüntüsü, b) Oluşan inhibisyon zonunun petrinin arka kısmından alınan manuel ölçümün görüntüsü ve *S. Aureus* suşuna ait petride c) Tantaloksit ile tamamen kaplı AZ91 örneğinin ve amfisilin diskinin oluşturduğu inhibisyon zonunun görüntüsü, d) Oluşan inhibisyon zonunun petrinin arka kısmından manuel ölçümün görüntüsü

Antimikrobiyel analizlerden elde edilen sonuçlar, altlık malzemenin şekli verildikten sonra kaplanmasının, vasat ile etkileşiminde daha kararlı olduğunu göstermiştir. Bu şekilde üretilip Tantaloksit kaplanan örnekte gram pozitif ve gram negatif bakteri kültürlerinde inhibisyon zonu oluştuğu açıkça görülmüştür.

5.4. Potansiyodinamik Elektrokimyasal Korozyon Testleri

Üç farklı ortamda yapılan korozyon testleri için korozyon hızı grafikleri mm/yıl cinsinden Şekil 5.18’de verilmiştir. Yapılan korozyon testleri sonrasında numunelerin yüzeylerinden SEM görüntüleri (Şekill 5.19, Şekil5.20, Şeki5.21 ve Şekil 5.22) ve EDS analizleri (EK-1) alınmıştır. HBSS ortamında yapılan korozyon deneyinde en düşük korozyon hızı Tabakalı

kaplı, en yüksek korozyon hızı ise kaplanmamış AZ91 ve HA kaplı numunelere aittir. Hibrit kaplı numunelerden ise en düşük korozyon direncine sahip olan Ta₂O₅ oranının en fazla olduğu %25 Hibrit kaplı numune olmuştur. DMEM ortamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda ise en düşük korozyon oranı HA kaplı ve %25 Hibrit kaplı numunelerde görülürken yine en fazla korozyon oranı kaplanmamış numunede görülmüştür. DMEM+%10 FBS ortamında ise Tabakalı kaplı numune en iyi korozyon performansı sergilerken, en çok korozyona uğrayan bu defa %25 Hibrit kaplı numune ile kaplanmamış numune olmuştur.



Şekil 5.18. HBSS, DMEM ve DMEM+%10 FBS ortamlarında kaplanmamış AZ91, HA, Ta₂O₅, %5 Hibrit, %10 Hibrit, %25 Hibrit ve Tabakalı kaplanmış numunelerin korozyon hızlarına ait sütun grafiği

Korozyon potansiyel değeri pozitif yöne gittikçe ve akım yoğunluk değeri küçüldükçe korozyon hızı azalmaktadır. Teorik olarak birim anot yüzey alanından geçen akım şiddeti, korozyon hızını vermektedir (Callister ve Rethwisch, 2007). Korozyon sırasında ortamla temas eden çalışma numunesinin yüzeyinde doğrudan koruyucu film oluşumu başlar, ancak pH ve iyon konsantrasyon değişimi oldukça oluşan bu filmin direnci azalarak kırılır ve bu kırılma yerlerinden tekrar korozyon olayı devam eder. Oluşan bu film direncine göre de korozyon hızı artar veya azalır (Gu vd., 2009). Korozyon ortamlarının içeriklerinden kaynaklı her ortam için korozyon hızları oldukça farklı çıkmıştır. Örneğin en fazla korozyona uğrayan kaplanmamış numuneyi dikkate aldığımızda HBSS ortamına kıyasla DMEM’de 1,4 kat ve DMEM+%10 FBS’de ise 8,8 kat daha az korozyona uğradığı

görülmektedir. Aynı şekilde en az korozyona uğrayan numunelerden biri olan Tabakalı kaplı numunede de yine DMEM ve DMEM+%10 FBS'te hemen hemen aynı değerler söz konusu olup, 4 kat daha düşük korozyon gözlenmiştir. Korozyon ortamlarının içeriğinin bu denli korozyon hızına etki etmesinin temel sebebi tamponlama kapasitesine bağlıdır. Korozyon testi yapılan bu numuneler insan vücudunda kullanılması hedeflenen malzemeler olduğundan insan vücut sıvısı ve kan plazmasının yapısına uygun içeriklere sahip tampon çözeltiler ile bu testler gerçekleştirilir. Böylece insan vücudunda bu malzemelerin nasıl davranış sergileyeceği tahmin edilebilir. İnsan kan plazması öyle bir tampon çözeltilidir ki vücuda alınan herhangi bir şey sonucu (implant veya ağızdan alınan her türlü gıda ve ilaç türevleri) kandaki H^+ ve OH^- iyon dengesi mutlaka dengede tutulmaktadır (Xin vd., 2010). Öyle ki dengeden sapma olursa ve bunu kan tamponlama görevini yerine getiremez ise ölüm ile sonuçlanır. Burada korozyon testine indirgenecek olursa en iyi tamponlamanın gerçekleştiği çözeltilerde pH değişimi minimum olacağından bu çözeltilerdeki sonuçların gerçekleri daha doğru yansıtmaları beklenir. Ayrıca pH değişiminin en az olması sonucu korozyona uğrama oranlarının da tüm numuneler için diğer ortamlardan daha düşük çıkması beklenen bir sonuçtur.

Kandaki temel tamponlar, plazmada bikarbonat-karbonik asit ve eritrositlerde ise hemoglobindir. Hem kan hem eritrositlerde ortak olarak bir de protein fonksiyonel grupları yer almaktadır. Bunların dışında plazmada fosfatlar da sınırlı olsa da tampon görevini kısmen üstlenirler. O halde HBSS, DMEM ve DMEM+%10 FBS ortamlarında farklı sonuçların çıkması doğrudan çözeltiler içeriklerine bağlı olarak tamponlama kapasiteleri ile alakalıdır denilebilir. HBSS içeriği Çizelge 5.1'de, DMEM medyumunun içeriği ise Çizelge 5.2'de verilmiştir. HBSS'te sadece inorganik tuzlar mevcut iken, DMEM medyumunu içeriği amino asitler, inorganik tuzlar ve vitaminler açısından oldukça zengindir ve haliyle insan kan plazmasına daha benzer içeriktedir. DMEM içerisine %10 FBS (fetal bovine serum) ilave edilen ortamda ise FBS'den kaynaklı DMEM'den farklı olarak proteinler içerir. FBS hücre kültür çalışmalarında hücrelerin çoğalması amacı ile kullanılan, doğal kandan elde edilmiş zengin bir protein çözeltilisi olup hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinlerinden oluşur. İçeriği her üretimde partiden partiye farklılık göstereceğinden tam olarak içerik verilememektedir (URL 1). Ancak bir çalışma yapılırken aynı partiden üretilmiş olan FBS'nin kullanılması daha doğru olacaktır.

Çizelge 5.1. HBSS bileşenlerine ait miktar ve konsantrasyonlar (URL 2)

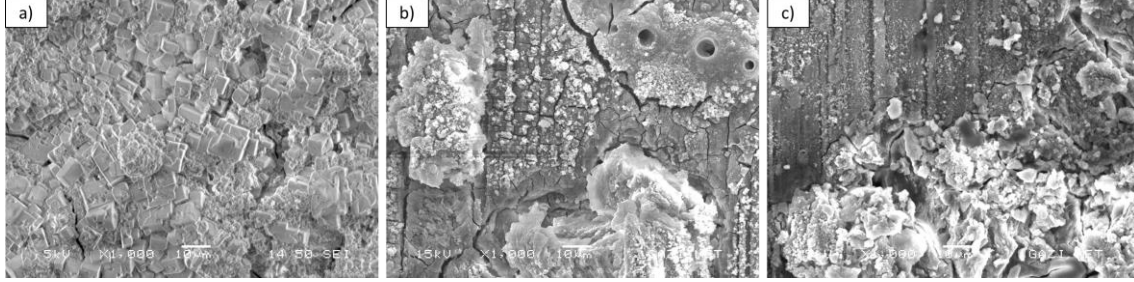
Bileşen	Miktar (mg/L)	Konsantrasyon (M)
NaCl	8000	0,14
KCl	400	0,005
CaCl ₂	140	0,001
MgSO ₄ .7H ₂ O	100	0,0004
MgCl ₂ .6H ₂ O	100	0,0005
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	60	0,0003
KH ₂ PO ₄	60	0,0004
D-Glukoz	1000	0,006
NaHCO ₃	350	0,004

Çizelge 5.2. DMEM medyumuna ait bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları (URL 3)

	Bileşen	Miktar (mg/L)	Konsantrasyon (mM)
Amino Asitler	Glycine	30	0,4
	L-Arginine hydrochloride	84	0,3981
	L-Cystine 2HCl	63	0,2012
	L-Glutamine	584	4,0
	L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	42	0,2
	L-Isoleucine	105	0,8015
	L-Leucine	105	0,8015
	L-Lysine hydrochloride	146	0,7978
	LMethionine	30	0,2013
	LPhenylalanine	66	0,4
	L-Serine	42	0,4
	L-Threonine	95	0,7983
	L-Tryptophan	16	0,0784
	L-Tyrosine disodium salt dihydrate	104	0,3984
	L-Valine	94	0,8034
Vitaminler	Choline chloride	4	0,0285
	D-Calcium pantothenate	4	0,0083
	Folic Acid	4	0,0090
	Niacinamide	4	0,0327
	Pyridoxine hydrochloride	4	0,0194
	Riboflavin	0,4	0,0010
	Thiamine hydrochloride	4	0,0118
	i-Inositol	7,2	0,04
İnorganik Tuzlar	Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	200	1,8018
	Ferric Nitrate (Fe (NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,1	2,4752
	Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	97,67	0,8139
	Potassium Chloride (KCl)	400	5,33
	Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	3700	44,0476
	Sodium Chloride (NaCl)	6400	110,3448
	Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	125	0,9057
Diğer	D-Glucose (Dextrose)	4500	25
	Phenol Red	15	0,0398

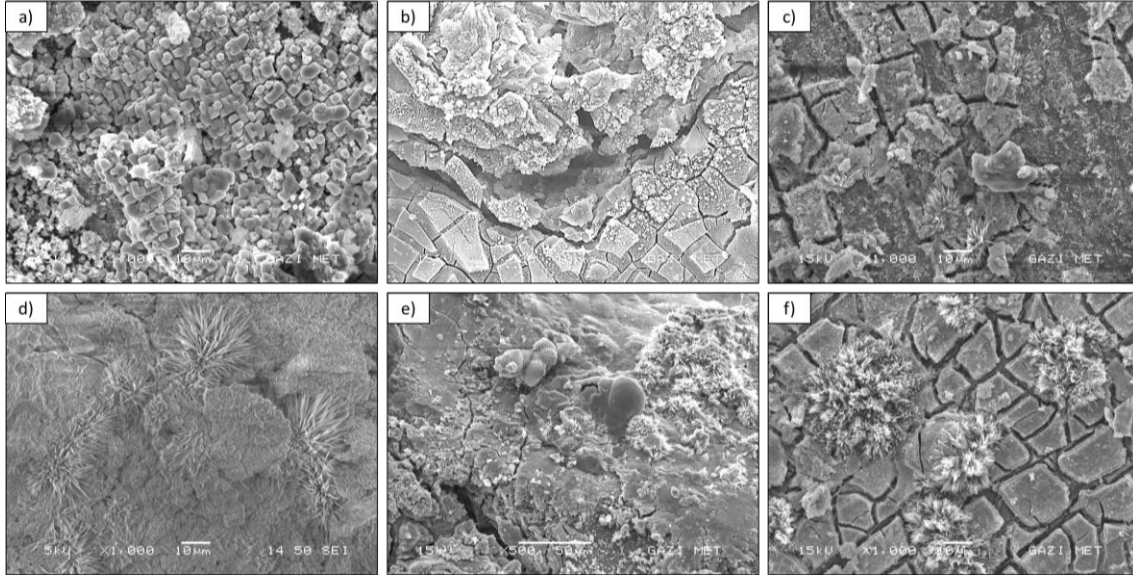
Sonuç olarak aynı numunelerin aynı şartlarda yapılan testlerde, her bir ortamda farklı oranda korozyona uğramaları bu medyumların içeriğine bağlıdır. DMEM ortamına FBS ilave edilmesi özellikle proteinlerin yüzeye yapışmasına ve korozyona karşı bariyer oluşturmaya neden olmaktadır. Proteinlerin yüzey tarafından adsorblanması yüzeyin pH değişiminden etkilenmesini engellediğinden korozyon hızını azaltmaktadır (Gu vd., 2009). Yapılan pek çok çalışmada da buna vurgu yapılmaktadır. Örneğin Gu vd.'nin (2009) çalışmasında yine aynı bu üç farklı ortamda yapılan korozyon deneyleri sonucu içeriğe atfederek DMEM+FBS çözeltisinde yüzeyde oluşan filmin diğerlerine kıyasla daha kararlı ve dirençli olması nedeni ile korozyon hızının bu ortamda düşük çıkmasından bahsedilmektedir. Bunun dışında bir diğer sebep olarak klorür konsantrasyonunun daha düşük olmasına da atfedilmektedir. Özellikle Mg olan altlıkta klorürün konsantrasyonuna bağlı olarak korozyonun

hızlanmasının söz konusu olduğuna, hidrokarbonatların ise yüzeyde pasivizasyon sağlayarak korozyonu azalttığına vurgu yapılmaktadır (Gu vd., 2009). Xin vd. (2008) de yaptığı çalışmada klorürün çukurcuk korozyonunu arttırırken fosfat iyonlarının ise yüzeyde bir pasivasyon tabakası oluşturarak düşürdüğü sonucuna varmıştır (Xin vd., 2008).

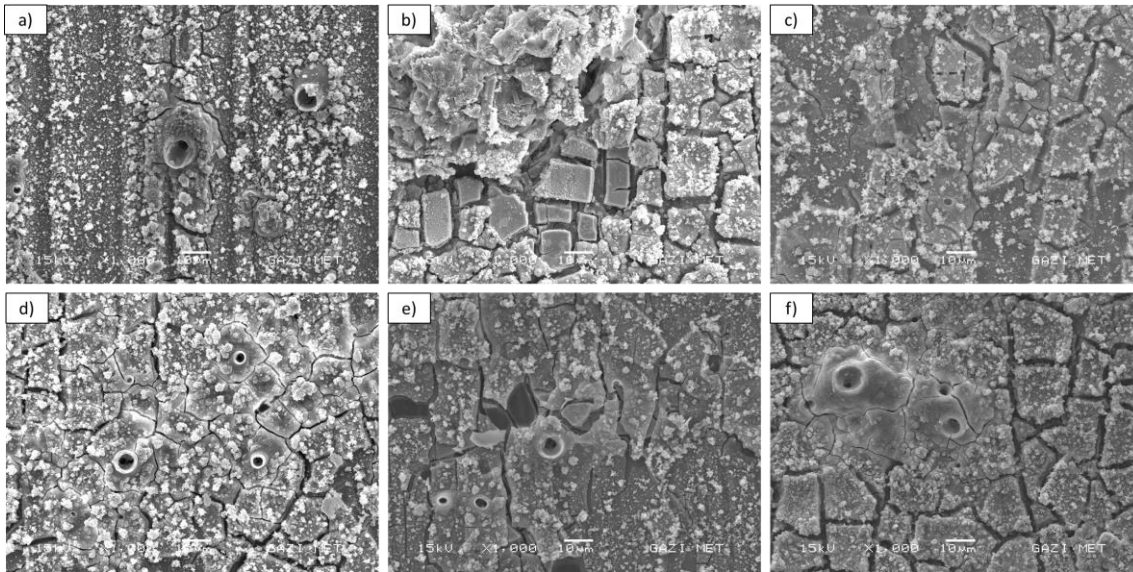


Şekil 5.19. AZ91 altlık numunesinin a) HBSS, b) DMEM ve c) DMEM+%10 FBS ortamlarında korozyonu sonrası yüzey SEM morfolojileri (X1000)

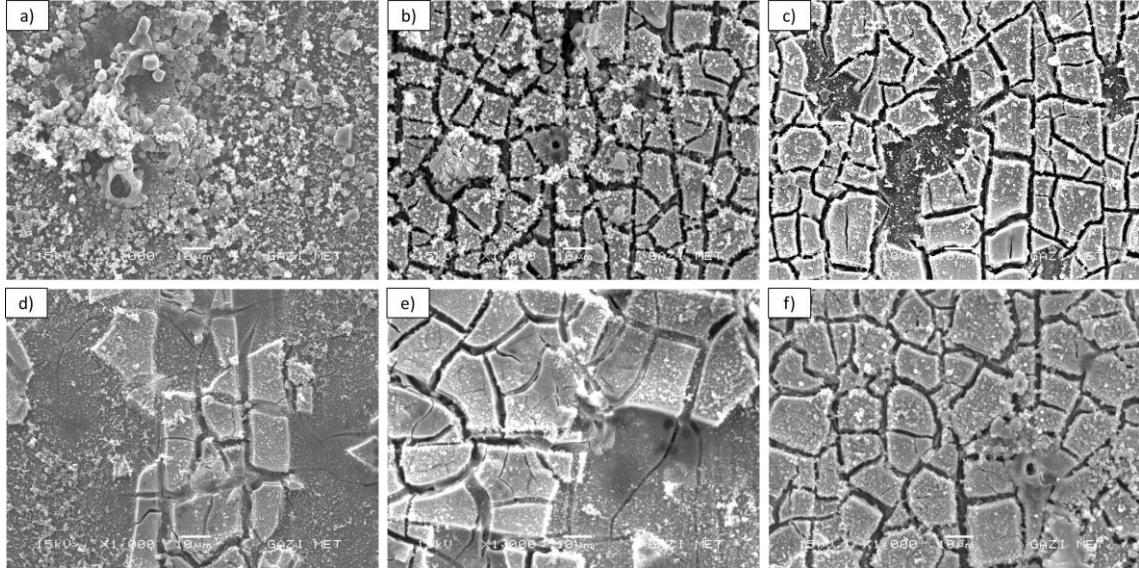
HBSS, DMEM ve DMEM+%10 FBS’de korozyon sonrası SEM görüntülerinden yukarıda bahsedildiği gibi HBSS dışındaki ortamlarda yapılan korozyon deneyleri sonucu yüzeyde farklı yapıların homojen olarak dağıldığı ve buna benzer bir yapının HBSS’te gözlenmediği net bir şekilde görüntülenmektedir. Ayrıca HBSS’te test edilen numunelerin yüzeylerinde diğerlerinden farklı olarak korozyon ürünlerinde daha heterojen yapılanmaların söz konusu olduğu ve kaplamaların fazlaca kalktığı görüntülenirken, DMEM esaslı ortamlarda test edilen numunelerin yüzeyindeki kaplamaların daha az bozunduğu halen mevcut olduğu görüntülenmiştir. DMEM içerikli ortamlarda numune yüzeylerinde ortalama 10 mikron ve daha küçük boyutlarda pitting noktalarının olduğu görülmektedir. Bu noktalardan ve yüzeye homojen dağılmış olan küçük yapıların ise Ca ve P’ce zengin olduğu EK-1’de verilen EDS analizlerinden anlaşılmaktadır. Yüzeyi sardığı için pasivasyon tabakası oluşturduğu düşünülen proteinlerin, kaplamaların arasında yer alan kılcal çatlakları doldurduğu ve bu nedenle de korozyona karşı daha dirençli hale geldiği düşünülmektedir.



Şekil 5.20. HBSS ortamında a) HA, b) Ta₂O₅, c) Tabakalı, d) %5 Hibrit, e) %10 Hibrit, f) %25 Hibrit kaplı numunelerin korozyon sonrası yüzey SEM morfolojileri (X1000)



Şekil 5.21. DMEM ortamında a) HA, b) Ta₂O₅, c) Tabakalı, d) %5 Hibrit, e) %10 Hibrit, f) %25 Hibrit kaplı numunelerin korozyon sonrası yüzey SEM morfolojileri (X1000)



Şekil 5.22. DMEM+%10 FBS ortamında a) HA, b) Ta₂O₅, c) Tabakalı, d) %5 Hibrit, e) %10 Hibrit, f) %25 Hibrit kaplı numunelerin korozyon sonrası yüzey SEM morfolojileri (X1000)

5.5. İn Vitro Biyoyoumluluk Analizleri

5.5.1. Biyobozunurluk sonuçları

Morfolojik analiz

Numunelerin çözelti ortamına alındıktan sonraki davranışları günlük olarak takip edilmiştir. Örneklerin çözelti içerisinde reaksiyon verme durumları, morfolojik değişimleri görüntülenerek kayıt altına alınmıştır. Genel olarak numunelerin kullanılan her üç ortam ile benzer sonuçlar verdiği ve biyobozunduğu tespit edilmiştir. Zamana göre biyobozunurluk dereceleri, skrolama çizelgesi oluşturularak verilmiştir (Çizelge 5.3, Çizelge 5.4 ve Çizelge 5.5).

PBS ortamında yapılan biyobozunurluk analizinde (Çizelge 5.3), bozunmaya en dirençli yapı 3 günlük süre ile tabakalı kaplama yapılmış AZ91 alaşımı olsa da en stabil numune HA kaplı alaşımlardır ve tamamen parçalanma gözlenmemiştir. 1. Saatin sonunda ölçülen pH değerlerinin, tüm numuneler için 11'in üzerinde olduğu, dolayısıyla ortamın aşırı bazik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Ta₂O₅ kaplı numunelerin, içerisine konulduğu tüm çözeltileri absorbladığı ve şiştiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu numunelerin bulunduğu kuyucuklara ayrıca 500 µl çözelti ilavesi yapılmıştır.

Çizelge 5.3. PBS içerisinde işlem gören numunelerin zaman içerisindeki davranışlarına ait skorlama ve çözeltilerin pH ölçüm çizelgesi (Skor değerleri: Reaksiyon ve/veya bozunma; Yok (1), Az-Sürekli (2), Hızlı-Sürekli (3), Kısmi Parçalanma (4), Tam Parçalanma (5), Beyaz çökelti oluşumu (+))

	AZ91	HA	Ta ₂ O ₅	%5 Hibrit	%10 Hibrit	%25 Hibrit	Tabakalı
1. Saatin sonunda pH ölçümü	11	12	14	13	13	12	14
1. saat	3, +	2, -	2, +	1, -	2, -	1, -	1, -
1. gün	4, +	2, +	4, +	3, +	3, +	4, +	2, +
2. gün	4, +	2, +	4, +	4, +	4, +	4, +	2, +
3. gün	4, +	2, +	4, +	4, +	4, +	4, +	2, +
4. gün	5, +	4, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +
5. gün	5, +	4, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +
6. gün	5, +	4, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +
7. gün	5, +	4, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +

HBSS içerisinde numunelerin PBS ortamına göre daha hızlı bozundukları ve 4. Günden sonra tüm numunelerin parçalandığı tespit edilmiştir. 1. Saatin sonunda ölçülen pH değerlerinin, tüm numuneler için 10'un üzerinde olduğu, dolayısıyla ortamın aşırı bazik olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın tantaloksit kaplama hariç, ortam pH değerinin PBS ortamına göre daha asidik olduğu söylenebilir.

Çizelge 5.4. HBSS içerisinde işlem gören numunelerin zaman içerisindeki davranışlarına ait skorlama ve çözeltilerin pH ölçüm çizelgesi (Skor değerleri: Reaksiyon ve/veya bozunma; Yok (1), Az-Sürekli (2), Hızlı-Sürekli(3), Kısmi Parçalanma (4), Tam Parçalanma (5), Beyaz çökelti oluşumu (+))

	AZ91	HA	Ta ₂ O ₅	%5 Hibrit	%10 Hibrit	%25 Hibrit	Tabakalı
1. Saatin sonunda pH ölçümü	10	11	14	11	10	10	11
1. saat	3, -	2, -	3, +	2, +	2, -	2, -	2, -
1. gün	3, +	3, +	3, +	4, +	4, -	4, +	2, +
2. gün	2, +	4, +	3, +	4, +	4, +	4, +	4, +
3. gün	2, +	4, +	3, +	4, +	4, +	4, +	4, +
4. gün	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	4, +	5, +
5. gün	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +
6. gün	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +
7. gün	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +

SBF içerisinde gerçekleştirilen biyobozunurluk analizinde, numunelerin tamamen bozunmaları, 5. günde gerçekleşmiştir. Ortam pH değerinin, 1. saatin sonunda tabakalı ve tantal oksit kaplamaları hariç pH 8 civarında kaldığı ve SBF'nin pH değerini (7,5-7,7) fazlaca değiştirmedığı tespit edilmiştir. İlk andan itibaren numunelerin üzerinde beyaz renkli çökeltilerin olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun, SBF'nin aşırı iyonik yapısı ile numunelerin reaksiyon vermesi sonucu gerçekleşmiş olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, SBF apatit çekirdeklenmesi için kullanılan bir çözeltisi olması nedeniyle de ortamda bulunan numuneler üzerinde apatit oluşturabilmektedir.

Çizelge 5.5. SBF içerisinde işlem gören numunelerin zaman içerisindeki davranışlarına ait skorlama ve çözeltilerin pH ölçüm çizelgesi (Skor değerleri: Reaksiyon ve/veya bozunma; Yok (1), Az-Sürekli (2), Hızlı-Sürekli(3), Kısmi Parçalanma (4), Tam Parçalanma (5), Beyaz çökelti oluşumu (+))

	AZ91	HA	Ta ₂ O ₅	%5 Hibrit	%10 Hibrit	%25 Hibrit	Tabakalı
1. Saatin sonunda pH ölçümü	8	8	14	8	9	8	11
1. saat	2, +	2, -	3, +	2, -	3, -	2, -	1, -
1. gün	4, +	2, +	4, +	4, +	4, +	4, +	2, +
2. gün	4, +	4, +	4, +	4, +	4, +	4, +	3, +
3. gün	4, +	4, +	4, +	4, +	4, +	4, +	3, +
4. gün	5, +	4, +	5, +	4, +	4, +	4, +	4, +
5. gün	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +
6. gün	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +
7. gün	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +	5, +

Gravimetrik analiz

Numunelerin biyobozunurluk analizleri, kütledeki değişimleri tespit edilerek gravimetrik olarak da takip edilmiştir. Numunelerin sıfır anındaki kütleleri ile 7. gün sonundaki kuru kütleleri tartılarak değişim yüzdesel olarak tespit edilmiş ve Çizelgede verilmiştir (Çizelge 5.6). 7 günlük süre içerisinde numunelerin tamamına yakını parçalanarak şekillerini kaybetmiştir. Sadece PBS içerisindeki HA kaplı numune verilen şekli büyük ölçüde muhafaza etmiştir. Buna karşın gravimetrik analizde genel olarak katı kütlelerinde bir artış meydana gelmiştir. Bu durum, genel olarak çözeltilerde bulunan iyonların, numuneler ile reaksiyona girerek katı halde numune üzerine çökmesinden ileri gelmektedir. Çöken partiküllerin bileşimleri ise FTIR analizi ile tespit edilmeye çalışılmıştır.

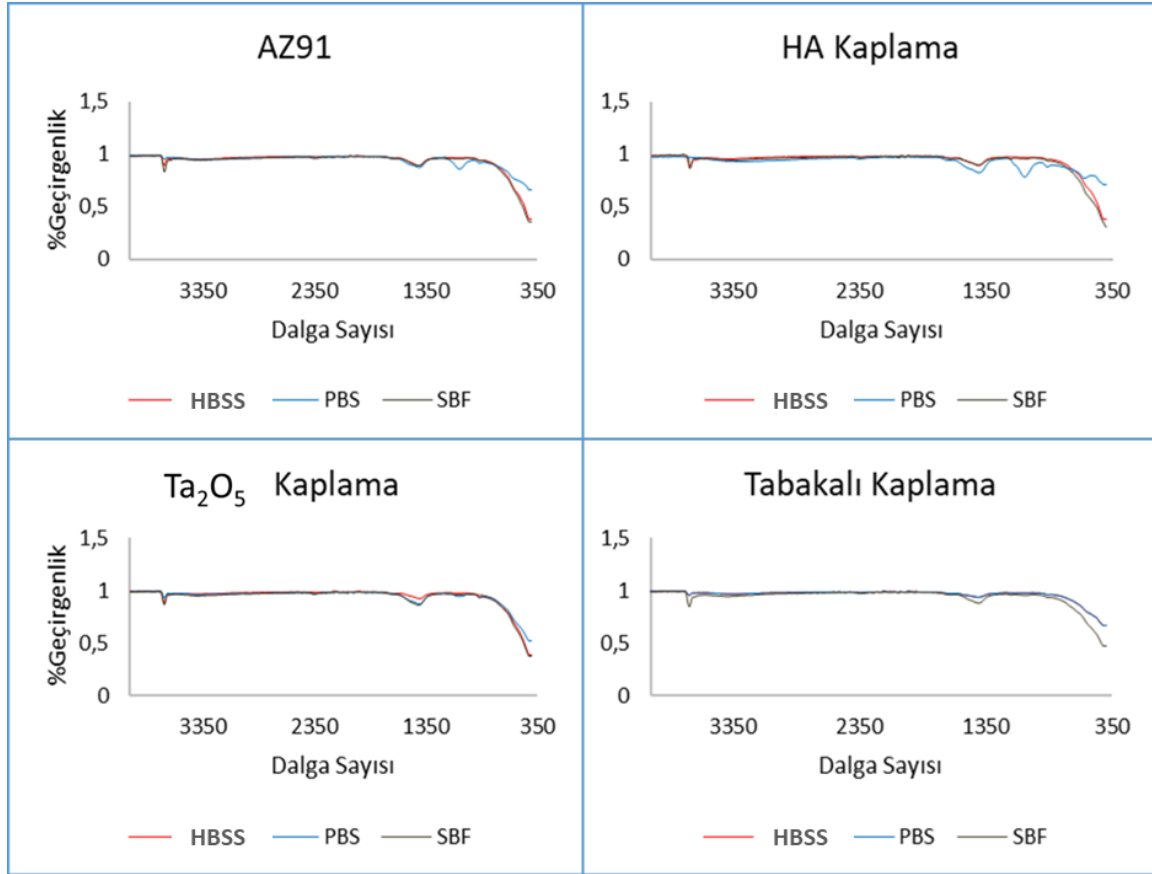
Çizelge 5.6. Degredasyon analizinin gravimetrik incelemeleri

Numune	İlk Kütle	Son Kütle			% Kütle Değişimi		
		PBS	HBSS	SBF	PBS	HBSS	SBF
AZ91	0,09946	0,21022	0,17206	0,26617	211,36	172,99	267,62
HA	0,12789	0,21916	0,25528	0,20908	171,37	199,61	163,48
Ta ₂ O ₅	0,25470	0,53047	0,49620	0,53040	208,27	194,82	208,24
%5 Hibrit	0,12308	0,30024	0,29010	0,28823	243,94	235,70	234,18
%10 Hibrit	0,13100	0,31094	0,25650	0,26324	237,36	195,80	200,95
%25 Hibrit	0,17390	0,22090	0,28310	0,25720	127,03	162,80	147,90
Tabakalı	0,15654	0,33377	0,27169	0,19555	213,22	173,56	124,92

Numunelerin üzerinde oluşan çökeltilerin FTIR spektrumları

Analiz süresince örnekler üzerinde biriken beyaz çökeleklerin FTIR spektrumları alınmıştır. Bir FTIR spektrumunda 470, 550, 600, 950 ve 1000–1100 cm⁻¹ civarındaki pikler fosfat gruplarını temsil etmektedir. Örneklerin hepsinde, 1100-900 cm⁻¹ aralığında farklı şiddetlerde pik görülmektedir. Bu piklerden en şiddetli olanları, PBS içerisinde gerçekleştirilen analizlere ait örneklerde görülmektedir. Bu durum çöken yapı içerisinde fosfat gruplarının olduğunu göstermektedir. Ayrıca örneklerin hepsinde görülen 3690 cm⁻¹ de görülen pikler, yapıdaki O-H esnemesini göstermektedir. Bu pik, hidroksiapatit için 3600 cm⁻¹ civarında görülen karakteristik OH⁻ genişleme pikine uyum göstermektedir. Bu durum oluşan çökeltinin hidroksiapatitin yapısında olduğunu güçlendirmektedir.

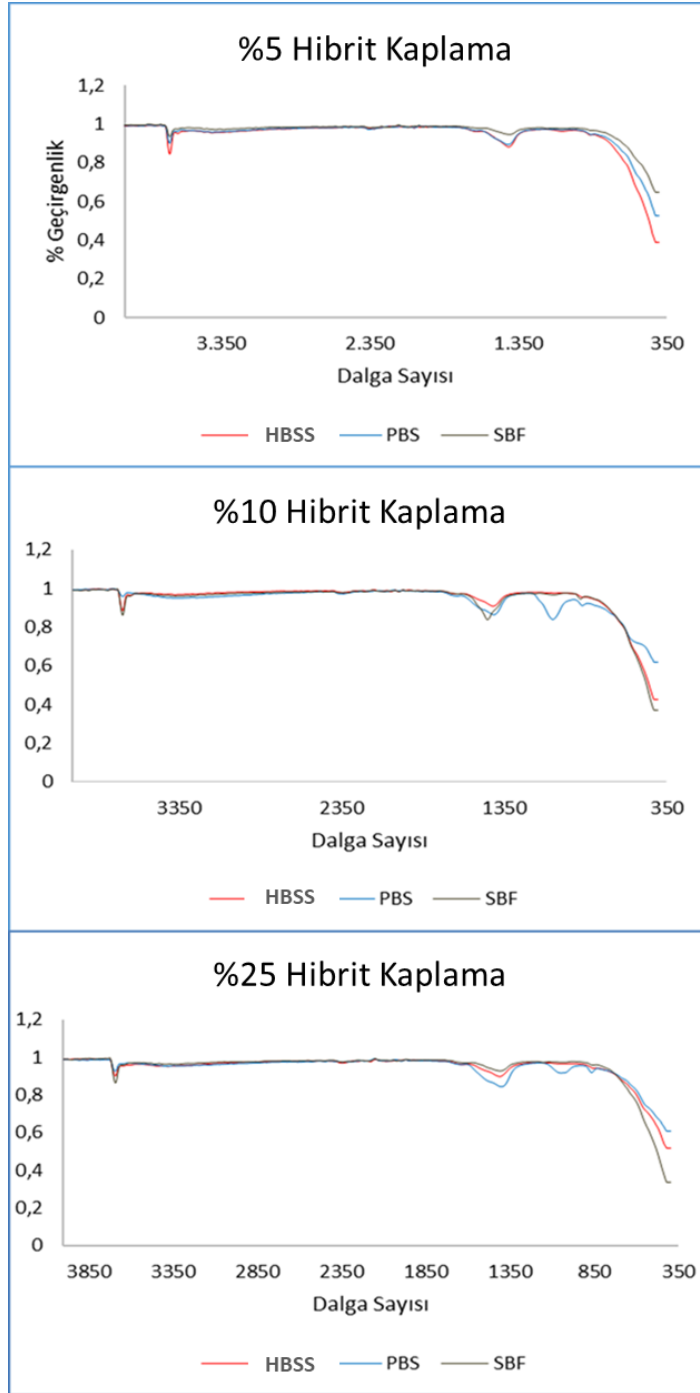
HA kaplı numunelerde OH, H₂O, CO₃⁻ bantları şiddetli pik verirken 960 cm⁻¹ civarındaki fosfat piki zayıftır. Ancak, PBS içerisinde inkübe edilen HA örneği üzerinde biriken çökeltide hidroksiapatite karakteristik 1406 ve 865 cm⁻¹ de karbonat ve 1045 ve 571 cm⁻¹ de fosfat pikleri görülmektedir. SBF içerisindeki HA kaplamalı örneklerde ise bu pikler, zayıf şiddette görülmüştür. Kontrol olarak analizlenen AZ91 alaşımı ise özellikle fosfat tamponu içerisindeki analizinde, 1044 cm⁻¹ civarında şiddetli fosfat piki ile 1404 ve 863 cm⁻¹ de karbonat piki vermiştir. Bu durum AZ91'in üstünde fosfat ve karbonat gruplarının biriktiğini göstermektedir. Özellikle AZ91 spektrumunda gözlenen 2000-2350 cm⁻¹ aralığında görülen pikler, yapıdaki karbondioksit absorpsiyonunu göstermektedir (Şekil 5.23).



Şekil 5.23. Kaplanmamış AZ91, HA, Ta₂O₅ ve Tabakalı kaplanmış örnekler üzerinde biriken beyaz çökeleklerin FTIR spektrumları

Analiz süresince hibrit kaplanmış örnekler üzerinde biriken beyaz çökeleklerin FTIR spektrumları (Şekil 5.24) incelendiğinde; 3300-3400 cm⁻¹ aralığında gözlemlenen bant, yapıya absorblanmış H₂O molekülünü göstermektedir. 1400 cm⁻¹ civarında tüm spektrumlarda görülen pik ile %10 hibrit kaplamalı numunenin SBF içindeki inkübasyonu sonucu oluşan çökeltilerin FTIR spektrumunda 860 cm⁻¹ civarında görülen pik, karbonat iyonlarının varlığını göstermektedir.

Numunelerin hepsinde oksit bileşikler bulunmaktadır. Ayrıca, degradasyon analizi için kullanılan tüm çözeltilerde fosfat iyonları bulunmaktadır. Sulu çözeltilerde inkübasyon sıcaklığı da (37 °C) dikkate alındığında, fosfat grupları ile havadaki karbondioksitin reaksiyonu sonucu oluşan karbonat iyonlarının yer değiştirerek çökmüş olabileceği düşünülmektedir. Bu durum, yapılarıdaki kütle artışını da açıklayabilmektedir.



Şekil 5.24. Hibrit kaplamalı örnekler üzerinde biriken beyaz çökeleklerin FTIR spektrumları (400-4000 cm^{-1})

5.5.2. ICP-OES iyon salım analizi ve pH değişimleri

Ortam pH'ındaki değişimi belirleyebilmek için günlük takip edilen pH değerlerinin ortalaması alınarak çizelge haline getirilmiştir (Çizelge 5.7).

Çizelge 5.7. Numunelerin DMEM-LG içerisindeki günlük pH değişimleri

Gün	Hidroksiapatit	Ta ₂ O ₅	%25 Hibrit	Tabakalı
1	11,1	11,1	11,2	10,4
2	11,2	9,4	11,1	10,4
3	10,3	10,3	11,2	9,1
4	9,1	9,3	10,3	10,2
5	9,2	10,5	11,1	11,2
6	9,2	9,4	9,4	10,4
7	8,4	8,2	9,2	11,2
8	9,2	8,3	8,5	10,1
9	9,3	8,4	9,4	9,2
10	9,4	8,4	8,2	10,2
11	8,4	9,2	8,3	10,1
12	10,2	9,4	9,4	10,8
13	9,4	9,4	8,4	11
14	9,2	10,2	9,2	10,9
15	9,3	9,3	9,5	11,1
16	10,4	9,5	9,4	11
17	9,1	9,4	9,2	10,2
18	9,2	9,2	9,3	10,1
19	9,4	8,3	9,4	9,2
20	9,2	9,4	8,4	9,8
21	9,3	8,4	8,2	9,1
22	8,4	9,2	9,5	9,2
23	9,9	9,4	10,4	8,9
24	10,2	9,4	9,2	9,2
25	9,4	10,3	9,3	10
26	9,2	9,3	8,4	10,1
27	8,3	9,5	8,4	9,3
28	9,3	9,4	8,2	9,3
Ortalama	9,436	9,339	9,346	10,061

ICP-OES analizlerine kadar olan tüm analiz sonuçlarından yola çıkarak hücre kültürü çalışmalarında numune gruplarından en iyi performans alınan gruplar ve bunların kontrol grupları ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu numune grupları kaplanmamış AZ91, HA kaplı, Ta₂O₅ kaplı, %25 Hibrit kaplı ve Tabakalı kaplı gruplardır ve grafikler Şekil 5.25 ve Şekil 5.26 da verilmiştir. pH değişimlerinin tüm numuneler için genel olarak benzer ve bazik değerlerde olduğu belirlenmiştir. Ta₂O₅ kaplamalarda pH değişiminin 11,1-8,2 aralığında ve

ortalama 9,339; HA kaplamalarda pH değişiminin 11,2-8,3 aralığında ve ortalama 9,436; %25 Hibrit kaplamalarda pH değişiminin 11,2-8,2 aralığında ve ortalama 9,346; Tabakalı kaplamalarda pH değişiminin 11,2-8,9 aralığında ve ortalama 10,061 değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında en yüksek pH değerlerine tabakalı kaplama ile ulaşıldığı görülmüştür.

DMEM-LG (pH 7,4) içerisinde, seramik kaplı iskelelerin iyon salımları ICP-OES cihazı ile ölçülerek sonuçları günlere göre grafiğe geçirilip değerlendirilmiştir (Şekil 5.25 ve Şekil 5.26). Değerlendirme sırasında ortamdaki iyonların sonuçlara etkisini belirlemek için kör olarak vasat bileşimi de aynı elementler için analiz edilerek örneklerin sonuçları köre göre değerlendirilmiştir. Vasat ortamı içerisinde, ölçümü yapılan elementlerden sadece Mg ve Al iyonlarının olmadığı, diğer iyonların ise belirli oranlarda bulunduğu belirlenmiştir.

Analiz sonuçları sodyum iyonunun (Na^+) genel olarak, 1. günde daha yüksek olmak üzere tüm örneklerde beş zaman noktasında en yüksek konsantrasyonda salınarak çözeltiye geçtiğini göstermektedir. En yüksek Na^+ salımının saf tantal kaplanan numunelerde olduğu, bunu yüzeyde en son Ta_2O_5 bulunan tabakalı kaplamanın izlediği ve en düşük Na^+ salımının ise HA kaplamalarda olduğu ve periyodik zaman noktalarında düzenli bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Beş zaman noktası üzerinden yapılan ölçümlerde toplamda en yüksek Na^+ salımının 12608,75 ppm ile tabakalı kaplamada, en düşük Na^+ salımının 9062,083 ppm ile HA kaplamalarda olduğu tespit edilmiştir.

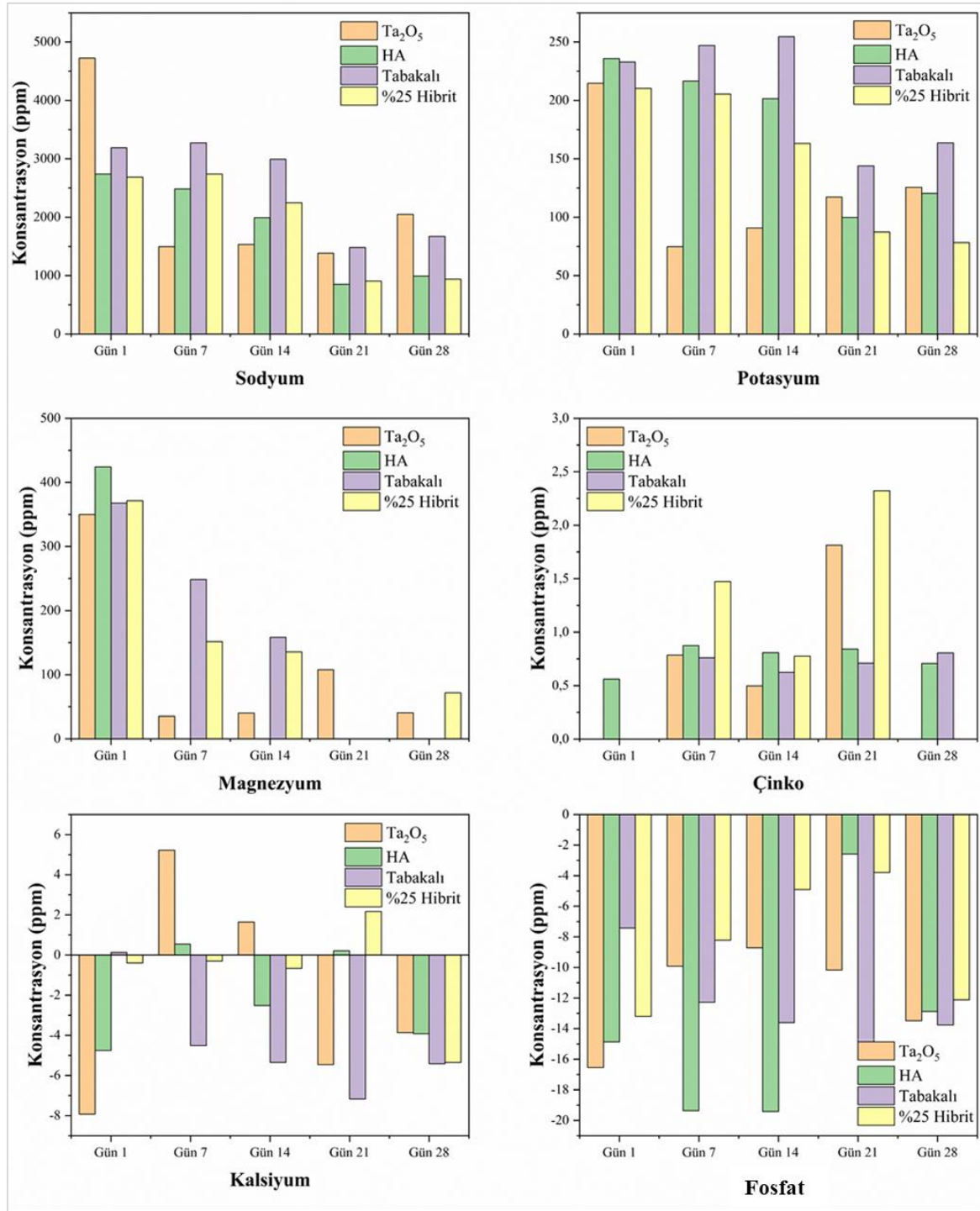
Potasyum iyonu (K^+) ölçümünde, HA kaplı numunelerde sodyum salımına benzer şekilde ilk gün tüm örnekler içerisinde en yüksek salımın gerçekleştiği (235,833 ppm) ve periyodik zaman noktalarında düzenli bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Tabakalı kaplamalarda ise ilk gün HA kaplamalara çok yakın K^+ salımının olduğu, devam eden periyodik zaman noktalarında diğer numunelere oranla daha yüksek K^+ salınımı yapıldığı, tüm ölçümler için 254,583 ppm ile en yüksek K^+ iyon salımının 14. günde tabakalı kaplamada gerçekleştiği belirlenmiştir. Beş zaman noktası üzerinden yapılan ölçümlerde toplamda en yüksek K^+ salımının 1041,75 ppm ile tabakalı kaplamada, en düşük K^+ salımının 623,25 ppm ile Ta_2O_5 kaplamalarda olduğu tespit edilmiştir.

Magnezyum iyonunun (Mg^{+2}) salımının, 1. günde 350-425 ppm aralığında tüm numunelerde yüksek olduğu, buna karşın özellikle HA içeren numunelerde takip eden zaman noktalarında

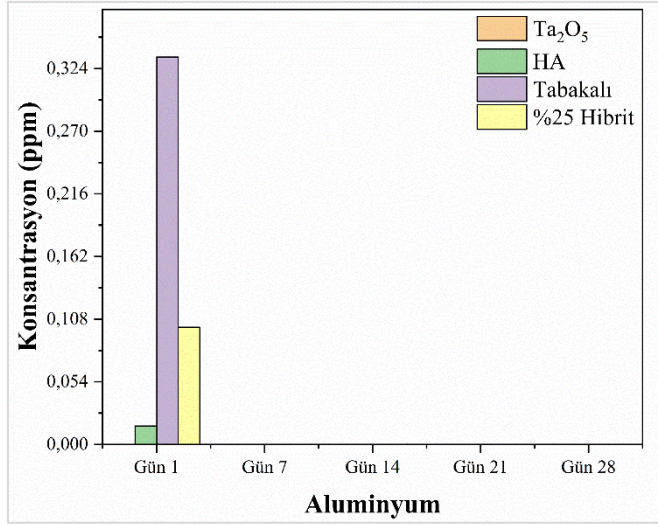
salımın dramatik şekilde düştüğü ve yaklaşık olarak sıfırlandığı (0,073, 0,035, 0,0 ve 0,0 ppm) görülmüştür. Tabakalı ve %25 Hibrit numunelerde salım hızının nispeten daha yüksek miktarda ve haftalara göre azalarak devam ettiği ve 21 ve 28. Günlerde sıfıra yaklaştığı belirlenmiştir. Beş zaman noktası üzerinden yapılan ölçümlerde toplamda en yüksek Mg^{+2} salımının 774,753 ppm ile tabakalı kaplamada, en düşük Mg^{+2} salımının 424,274 ppm ile HA kaplamalarda olduğu tespit edilmiştir.

Çinko iyonunun (Zn^{+2}) salımının, tüm numunelerde 1 ppm konsantrasyondan daha az gerçekleştiği görülmüştür. Salımın haftalar bazında farklılık gösterdiği ve Ta_2O_5 , %25 Hibrit ve Tabakalı numunelerinde 1. günde salım miktarı sıfırken 7, 14 ve 21. günde nispeten ortama salımın gerçekleştiği belirlenmiştir. Sadece HA numunelerinin, tüm zaman noktalarında 0,56-0,88 ppm aralığında Zn^{2+} salımı yaptığı görülmüştür.

Analizi gerçekleştirilen iyonlar içerisinde en ilginç sonuçlar kalsiyum ve fosfat iyonlarında tespit edilmiştir. Kalsiyum iyon salımının pozitif konsantrasyonu Ta_2O_5 kaplamalar için 7 ve 14. günlerde, %25 Hibrit kaplama için 21. günde tespit edilmiştir. Diğer zaman noktalarında iyon salımının sıfıra yakın ya da köre göre negatif değerde olduğu görülmüştür.



Şekil 5.25. Numunelerin sodyum, potasyum, magnezyum, çinko, kalsiyum ve fosfat iyonları salımı için ICP-OES analiz grafikleri



Şekil 5.26. Numunelerin aluminyum iyonu salımı için ICP-OES analiz grafiği

Numunelerdeki Alüminyum iyonunun salımı (Al^{3+}) sadece 1. günde HA, %25 Hibrit ve Tabakalı numunelerinde tespit edilmiş olup, değeri en düşük 0,016 ppm (HA) ve en yüksek 0,334 ppm (Tabakalı) aralığında eser miktarda olduğu belirlenmiştir.

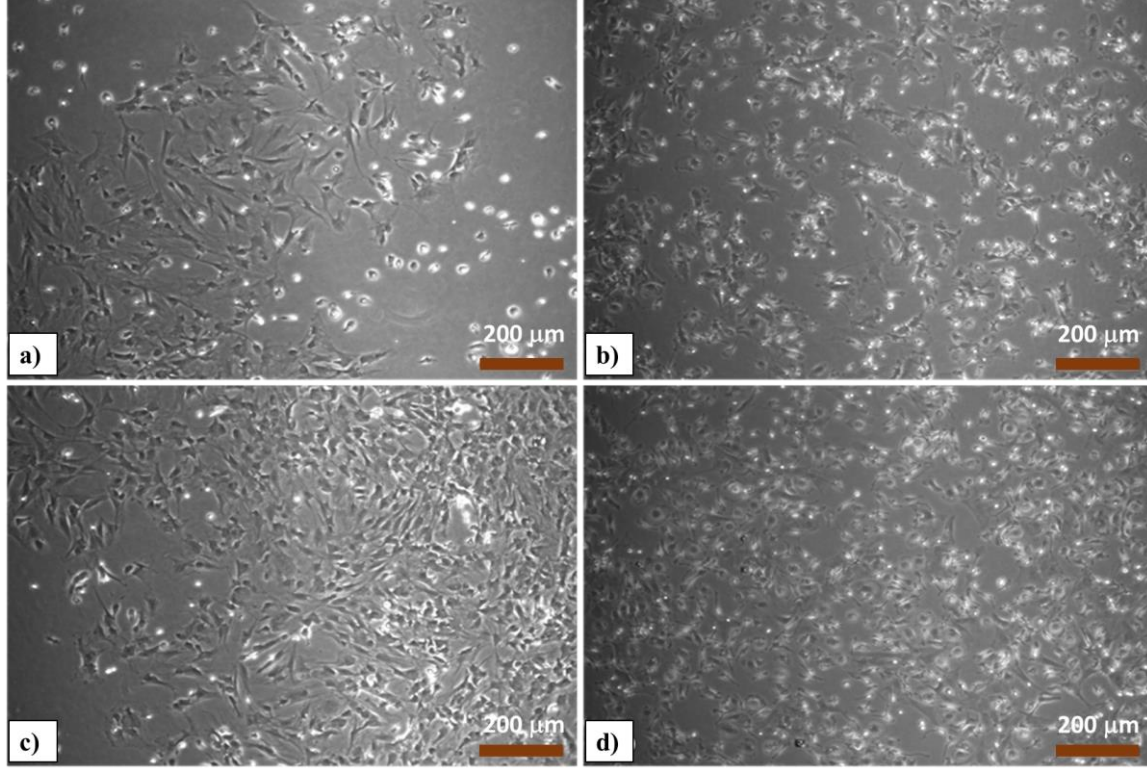
Sonuç olarak kalsiyum iyonlarının genel olarak salımının önemli oranda gerçekleşmediği, buna karşın ortamdaki kalsiyum iyonlarının çekildiği görülmüştür. Benzer şekilde fosfor bileşimi için fosfat iyon konsantrasyonunun da tüm örnekler için tüm zaman noktalarında köre göre negatif değerde olduğu belirlenmiştir. Fosfor iyonları sulu ortamda fosfat iyonları şeklinde bulunmakta olup, fosfat iyonlarının bazik pH değerlerinde çözünürlüğü düşüktür. Bu nedenle, doğal kemiğin mineralizasyonuna benzer şekilde fosfat iyonlarının 28 günlük periyotta ortamdaki kalsiyum iyonları ile birlikte çökerek ayrıldığı düşünülmekte ve bu biyobozunurluk analizinde numune üzerindeki çökeklere yapılan FTIR sonuçları ile örtüşmektedir. Ayrıca bu sonuçlar numunelerin biyoaktif özellikte olduğunu, osteokondüktif olduğunu ve osteointegrasyonu destekleyebileceğini göstermektedir.

5.5.3. Hücre kültürü analizleri

Hücrelerin izolasyonu ve çoğaltılması

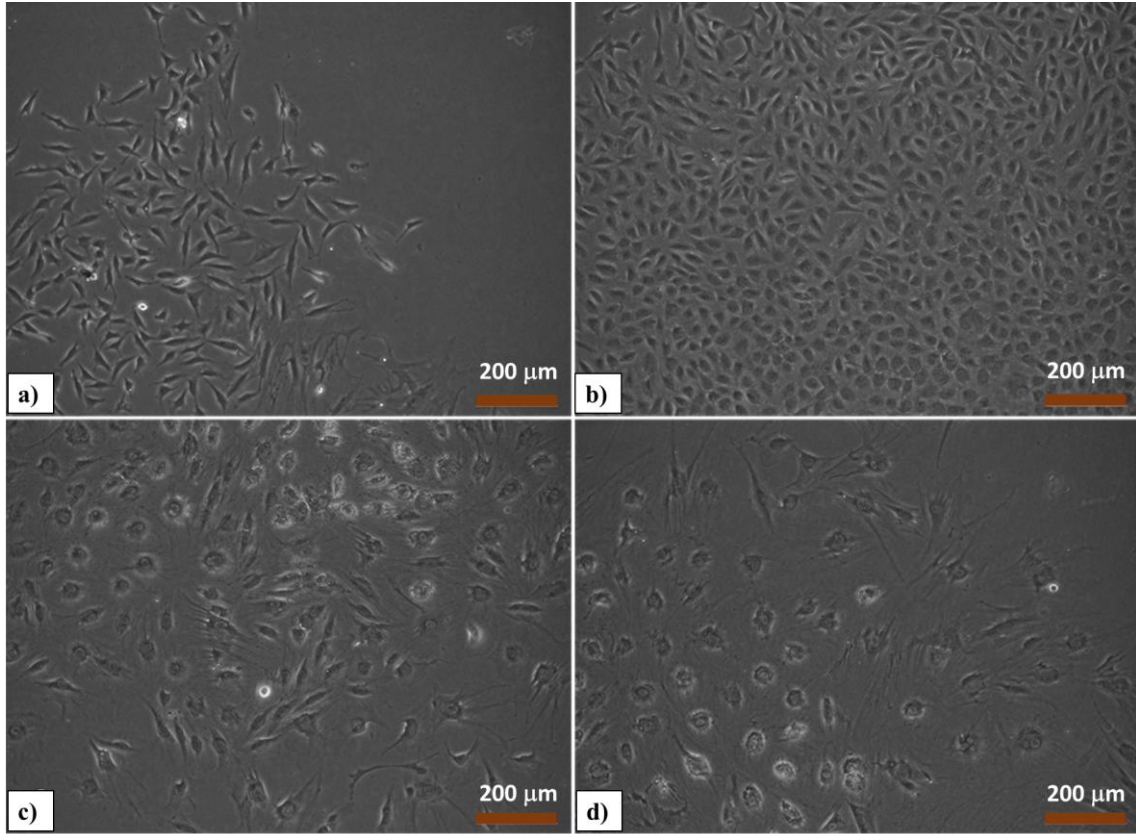
Steril koşullarda izole edilen hücreler, %10 FBS (fetal bovine serum), %1 antibiyotik-antimikotik çözelti (penisilin/stroptomisin 100x) içeren alfa-MEM vasatı içerisinde T-75 doku kültür kaplarında kültüre alınmıştır. Hücreler, çoğaltılarak tripsin-EDTA ile alt kültüre

alınmış ve çoğaltılmıştır (Şekil 5.27). Hücreler Leica DMIL LED faz kontrast mikroskobu ile takip edilmiştir.



Şekil 5.27. Wistar albino sıçanların femur kemik iliğinden izole edilen kiMKH a) P0, b) P1, c) P2 ve d) P3 aşamalarında faz kontrast mikroskobu ile takip edilen hücrelere ait fotoğraflar (X10)

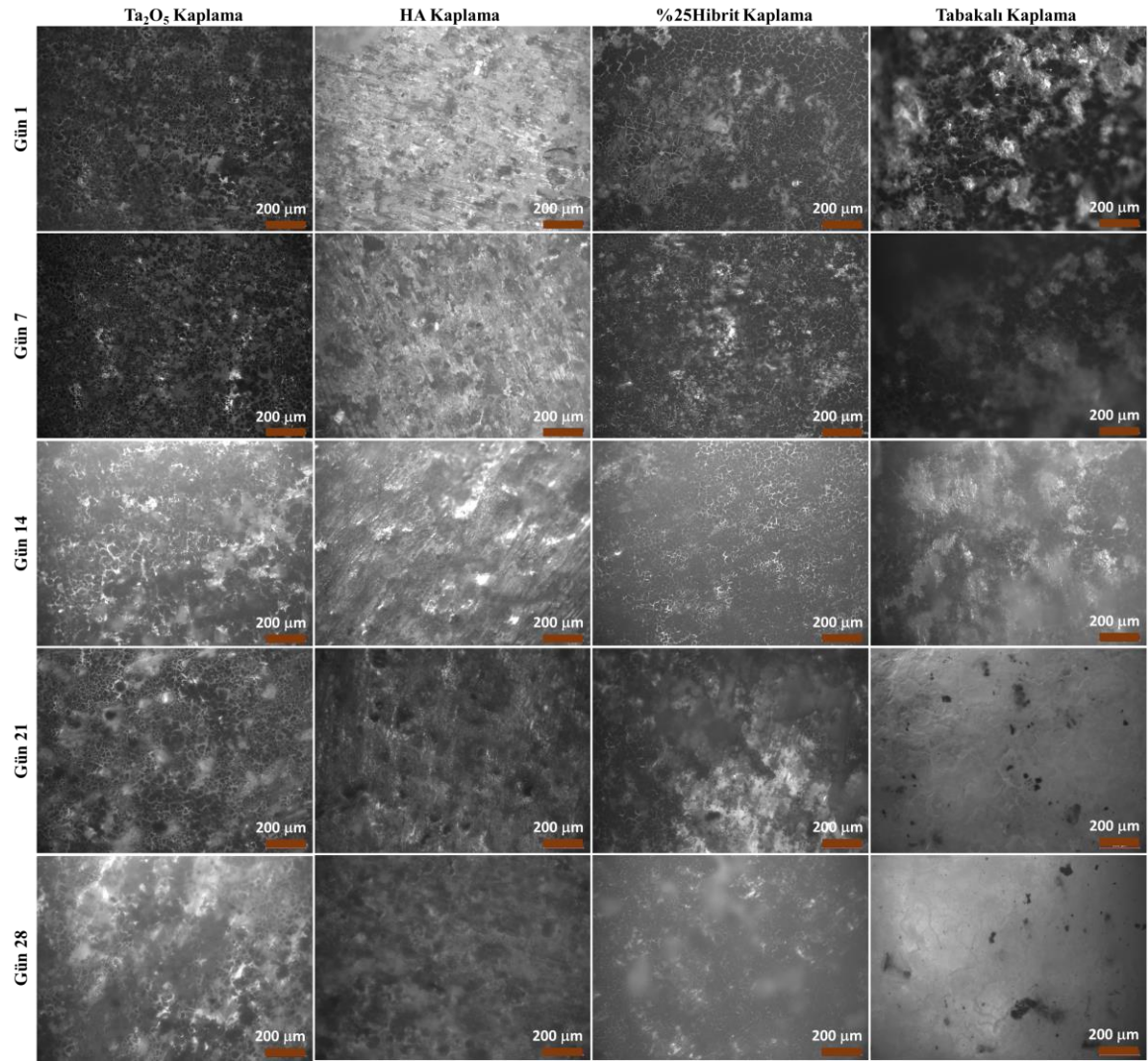
Doğrudan primer kaynaktan (Wistar Albino Sıçanı) izole edilen sıçan kalvaria osteoblast hücrelerinin pasajlama işlemi ile çoğaltılması sonucu elde edilen kontrol grubu hücreleri ise Şekil 5.28’de verilmiştir.



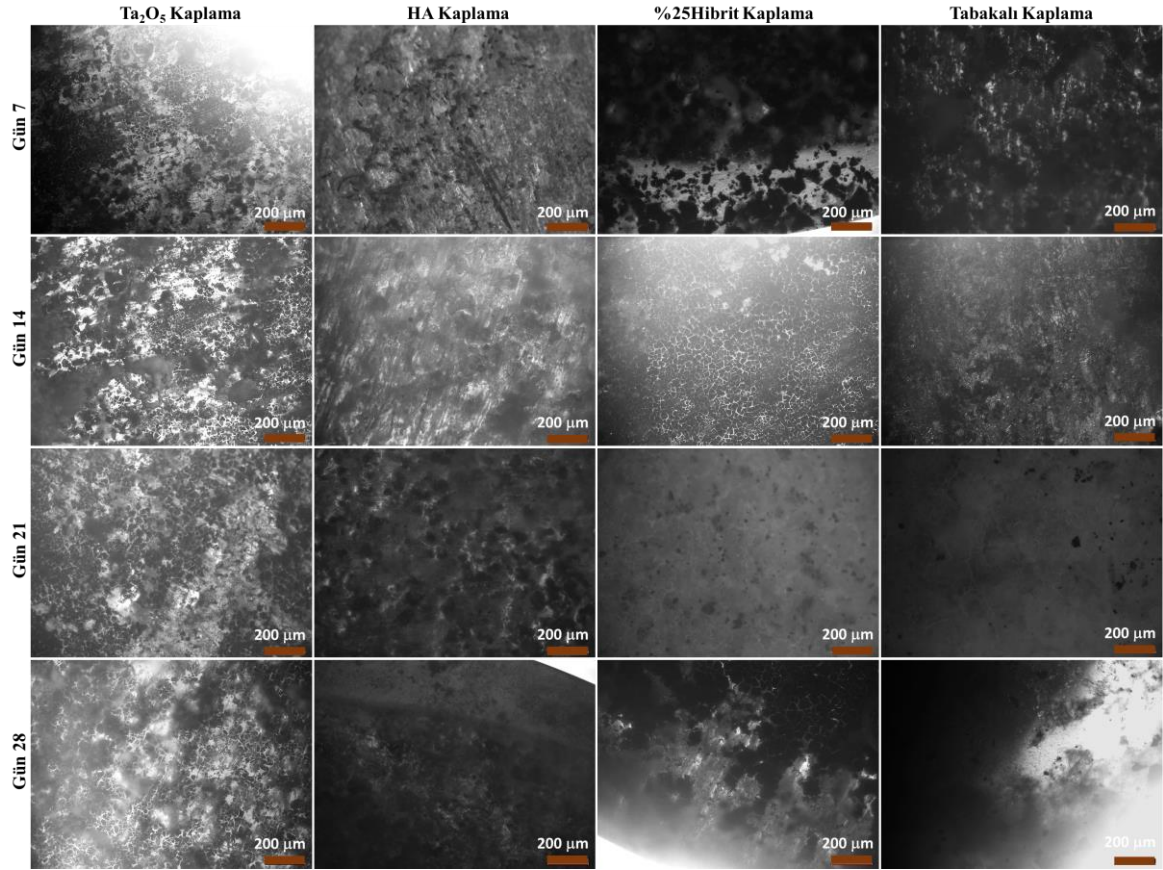
Şekil 5.28. Wistar albino sıçanların kalvaria kemiğinden izole edilen skOBH a) P0 3. Gün, b) P0 6. gün c) P1 ve d) P2 aşamalarında faz kontrast mikroskobu ile takip edilen hücrelere ait fotoğraflar (X10).

Mikroskobik incelemeler ve MTT analiz sonuçları

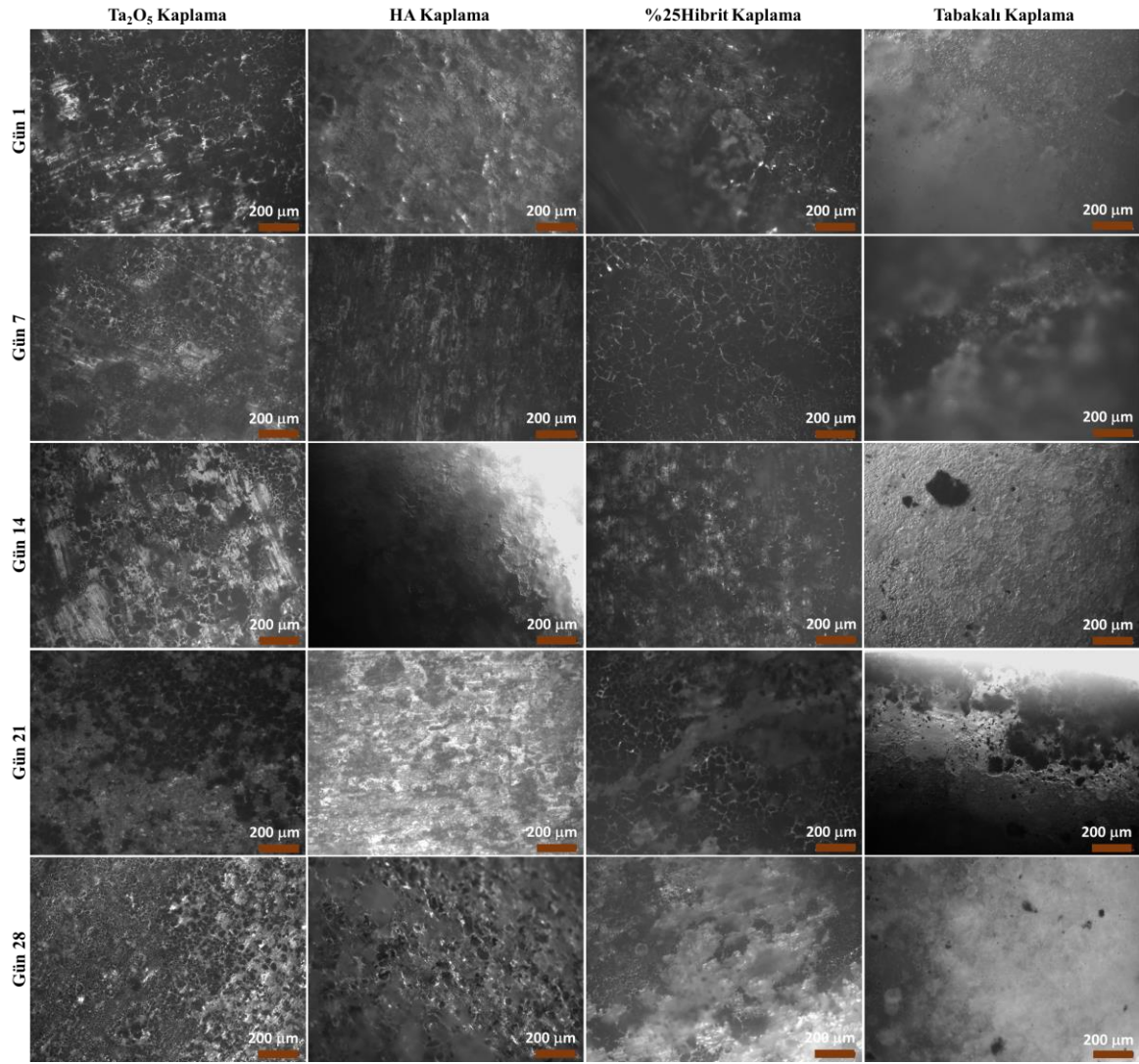
Kültürler gün aşırı ters faz kontrast mikroskobu ile takip edilmiş olup, hücre-malzeme etkileşimleri 7 günlük analiz zaman noktalarında MTT analizi sırasında fotoğraflanarak kayıt altına alınmıştır (Şekil 5.29, Şekil 5.30, Şekil 5.31 ve Şekil 5.32). HA kaplamada yüzeyin daha pürüzsüz ve açık renkli olduğu, yer yer çıkıntılı yapılar olduğu görülmüştür. Ta₂O₅ kaplamalarında ise yüzeyin adacıklar şeklinde olduğu belirlenmiştir. Tabakalı ve Hibrit yapılarda ise Ta₂O₅'ten kaynaklı olduğu düşünülen, yer yer çatlamış plakalar şeklindeki oluşumlar ile HA'dan kaynaklı olduğu düşünülen yer yer daha pürüzsüz alanlar dikkati çekmiştir. HA kaplanan numunelerde hücrelerin yüzeydeki gözeneklerde daha fazla tutunduğu, buna karşın Ta₂O₅ içeren kaplamalarda hücrelerin malzeme yüzeyinde birikme yaptığı ancak, yüzeyde malzeme ile bağlanmadan kapsül benzeri yapı oluşturduğu görülmüştür. OB hücreleri ile gerçekleştirilen kültürlerde numune yüzeyiyle etkileşimde olan hücre miktarının ve hücre kümelerinin daha fazla olduğu Şekil 5.29 ve Şekil 5.31'de verilen mikrograflardan açıkça görülmektedir.



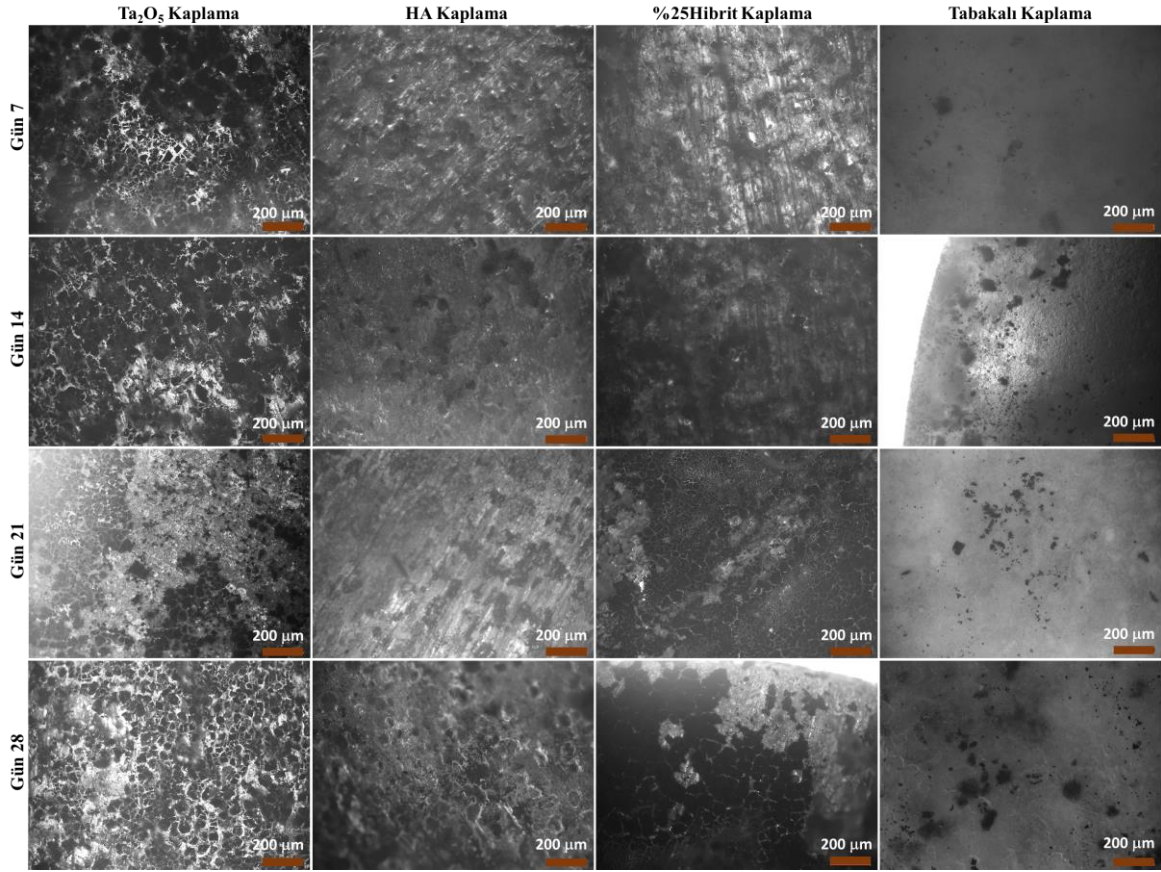
Şekil 5.29. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki değişimlerinin ve hücre-malzeme etkileşimlerinin ters faz kontrast mikroskobu ile incelenmesi



Şekil 5.30. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründe haftalık periyotlar ile gerçekleştirilen MTT analizi sonrasındaki formazan kristallerinin oluşumunun ters faz kontrast mikroskobu ile incelenmesi



Şekil 5.31. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki değişimlerinin ve hücre-malzeme etkileşimlerinin ters faz kontrast mikroskobu ile incelenmesi

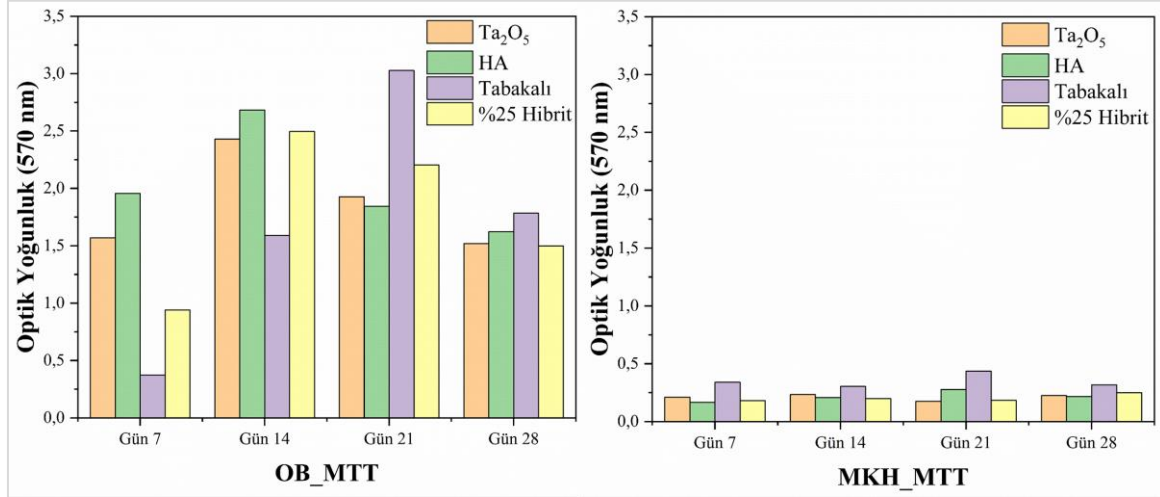


Şekil 5.32. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründe haftalık periyotlar ile gerçekleştirilen MTT analizi sonrasındaki formazan kristallerinin oluşumunun ters faz kontrast mikroskobu ile incelenmesi

Kültürlere uygulanan MTT testleri üç defa tekrarlanmış ve üç farklı ölçümün ortalama değeri alınarak günlere göre grafiğe geçirilmiş ve Şekil 5.33'te verilmiştir. MTT analizinde reaktif madde ile inkübasyon süresinin sonunda çekilen mikrograflar Şekil 5.30 ve Şekil 5.32'de sunulmuştur. Görüntülerde, özellikle HA kaplı numunelerin yüzeyinde formazan kristallerinin oluşumu net bir şekilde görülmektedir. Ta₂O₅ içeren numunelerde ise formazan kristallerinin oluşumu malzeme yüzeyindeki boşluklarda ya da mikrograflarda bulutsu şekilde görüntülenen yüzeydeki hücre kümelerinde tespit edilmiştir. Formazan kristallerinin Tabakalı ve Hibrit yapıların yüzeyinde ve mikrogözeneklerin içerisinde olduğu gözlenmiştir. Bunun yanısıra malzeme üzerine zayıf bağlanan hücrelerden zemine saçılanların civarında da formazan kristallerinin olduğu görülmektedir.

Yarı-kantitatif MTT analizlere göre, aynı hücre sayısı ile başlayan kültürlerde hücre canlılığı ve proliferasyon oranının OB ve MKH kültürlerinde haftalık bazda aynı deseni verdiği görülmüştür. Farklı olarak, OB hücre kültüründeki hücre proliferasyonu ve canlılık oranının

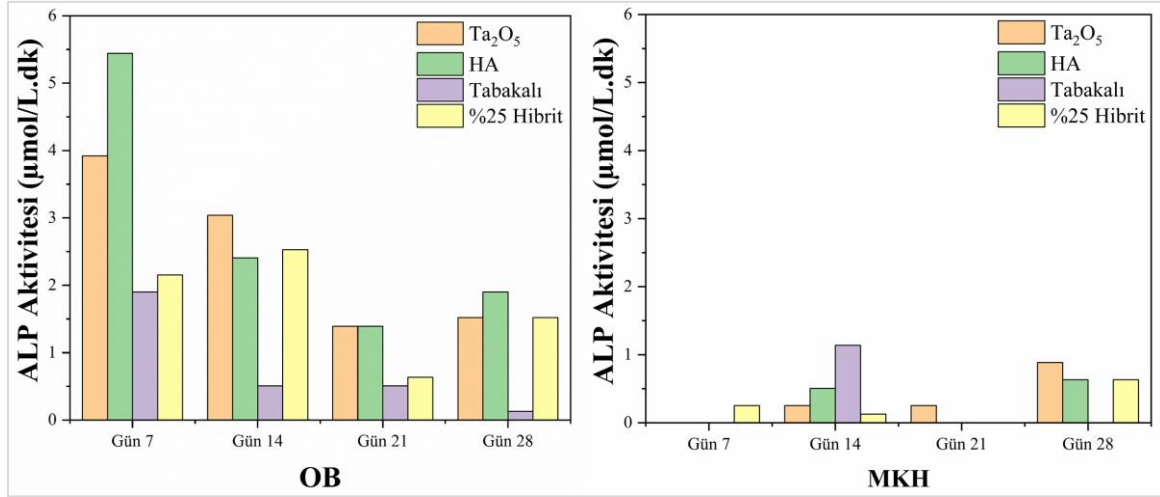
aynı hücre sayısı ile başlayan MKH kültürüne kıyasla yaklaşık %725 daha fazla olduğu ölçülmüştür. Her iki kültür ortamında da en yüksek proliferasyon hızı 21. günde tabakalı kaplamada gerçekleşmiştir. Diğer numunelerde maksimum canlılık ve proliferasyon hızı 14. günde ölçülmüştür (Şekil 5.33).



Şekil 5.33. OB ve MKH ile gerçekleştirilen kantitatif biyoyumluluk analizleri kapsamında mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı MTT analizi ile hücre canlılığı tespiti

ALP aktivitesinin tespiti

MKH ve OB hücre kültürlerinde haftalık zaman noktalarında gerçekleştirilen ALP aktivitesi analiz sonuçları Şekil 5.34'te sunulmuştur. Grafiklerden açıkça görüldüğü üzere OB hücre kültüründe net olarak ALP aktivitesi gözlenmesine karşın MKH kültürlerinde 7. günde sadece %25 Hibrit numunede (0,253 IU/L), 21. günde ise sadece Ta₂O₅ numunede düşük miktarda (0,253 IU/L) ALP aktivitesi gözlenmiştir. Sadece 14. günde tüm numune türlerinde ALP aktivitesi olduğu ve numunelerden sadece Ta₂O₅, HA ve %25 Hibrit örnekleri 28. gün sonunda düşük miktarlarda (sırasıyla 0,886, 0,633, 0,633 IU/L) ALP aktivitesi gösterdiği ancak Tabakalı numunelerde ALP aktivitesinin gözlenmediği belirlenmiştir.

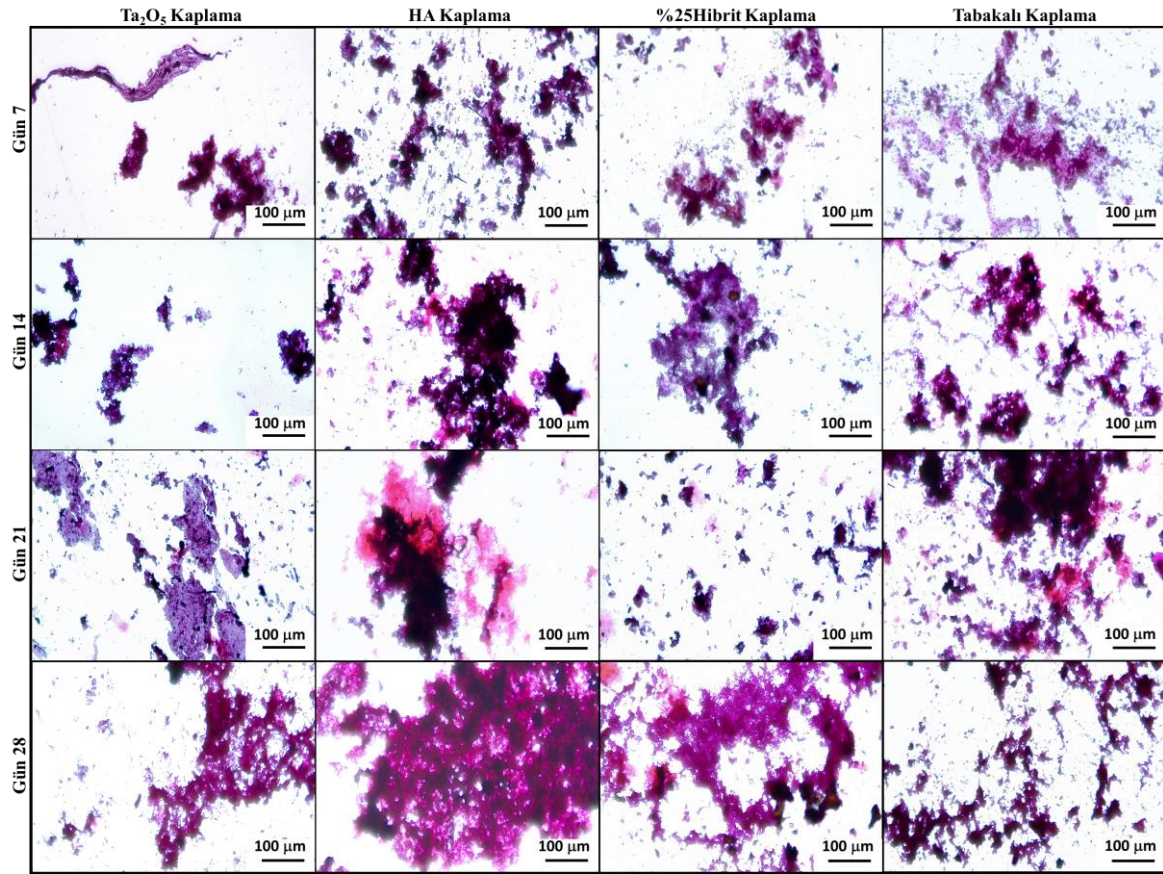


Şekil 5.34. OB ve MKH ile gerçekleştirilen kantitatif biyoyumluluk analizleri kapsamında hücrelerin osteojenik fenotipi alkalen fosfataz aktivitesini ölçmeye dayalı ALP analizi

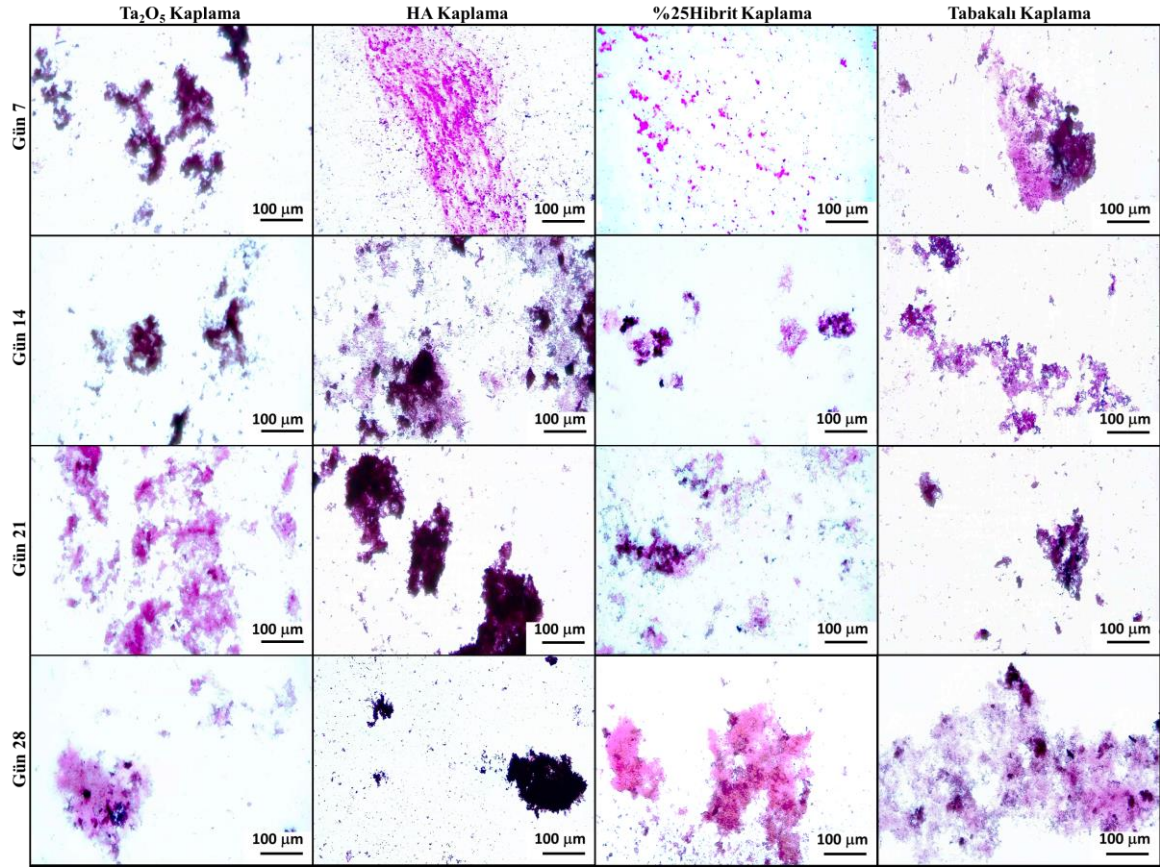
Histokimya analiz bulguları

Dondurarak kesit alma yöntemine göre hazırlanan örneklerde histolojik analizler; hücre proliferasyonunu göstermek amacıyla hematoksilin ve eosin (H&E) (Şekil 5.35 ve Şekil 5.36), osteojenik fenotipte kalsifikasyonu belirlemek için von Kossa (vK) (Şekil 5.37 ve Şekil 5.38) ile Alizarin Kırmızısı (AR) (Şekil 5.39 ve Şekil 5.40) ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir (40X).

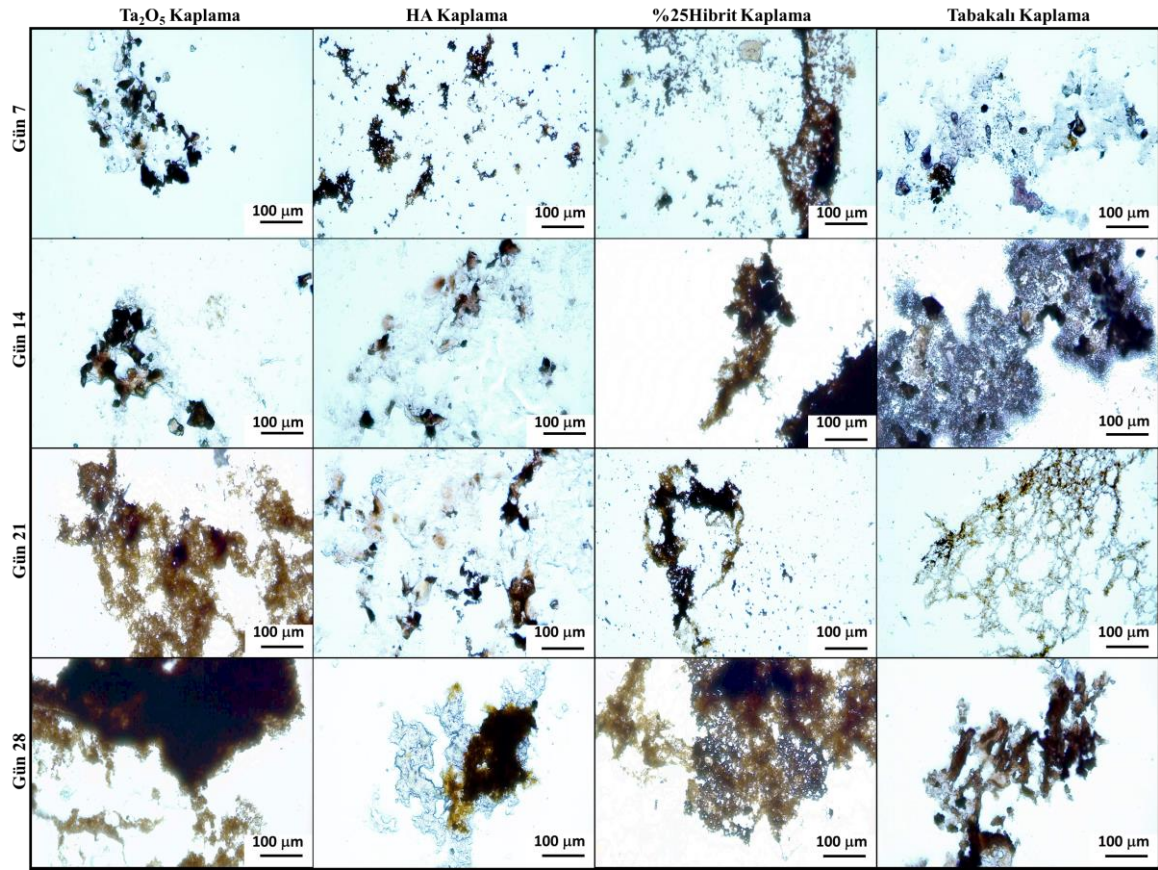
Histolojik bulgular genel olarak hücre proliferasyonunun MKH ve OB kültürlerinde, artan kültür günleri ile uyumlu şekilde ilerlediğini göstermiştir. Ayrıca, hücrelerin zamanla dağılmış görüntüden uzaklaşarak doku benzeri yapı oluşturmak üzere hücre kümeleri şeklinde bir araya geldikleri görülmüştür. Özellikle OB kültürlerinde hücre kümelerinin miktarının çok daha fazla olduğu (H&E) ve içerisinde kalsiyum mineralizasyonun gerçekleşerek kemik doku-benzeri yapıların oluştuğu (vK ve AR) tespit edilmiştir. Numuneler içerisinde doğal kemiğin yapısında bulunan HA içeren örneklerde numune yüzeyinde hücre tutunmasının ve mineralizasyonun daha fazla gerçekleştiği belirlenmiştir.



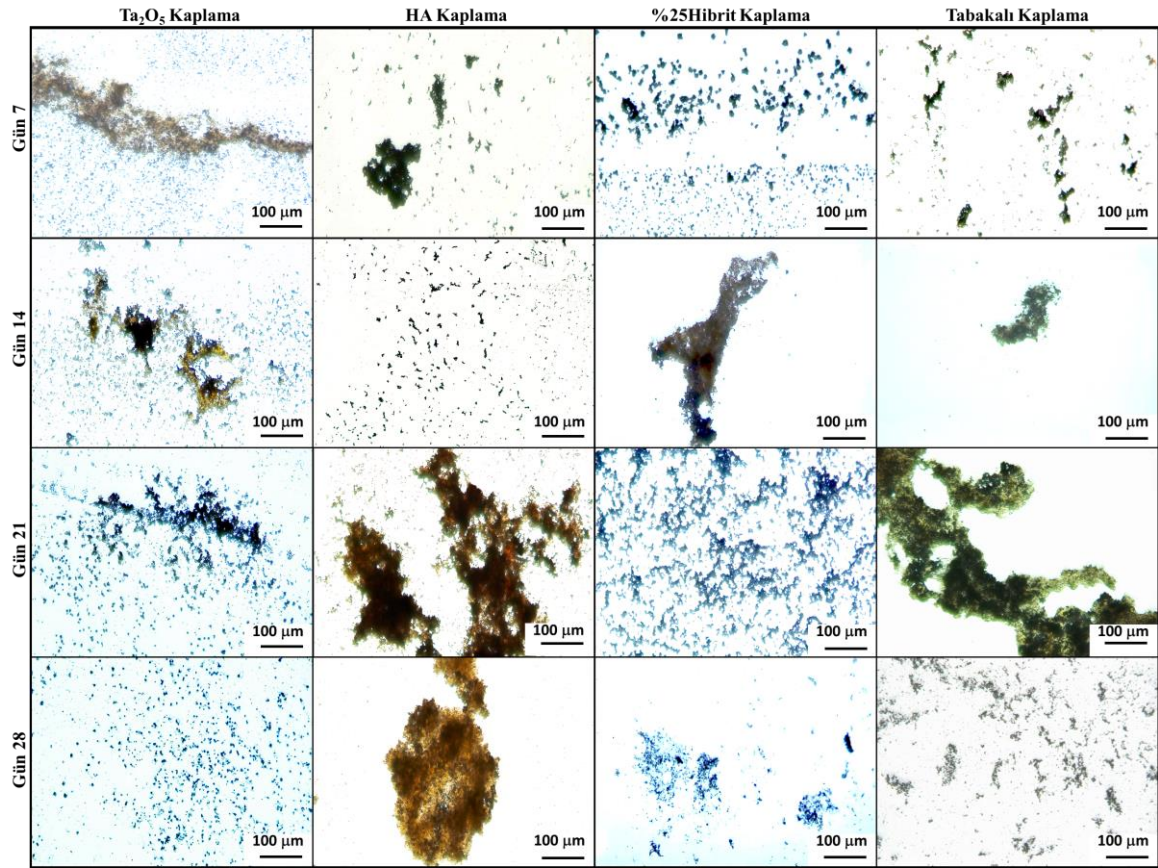
Şekil 5.35. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki canlı hücrelerin H&E histolojik boyama ile incelenmesi



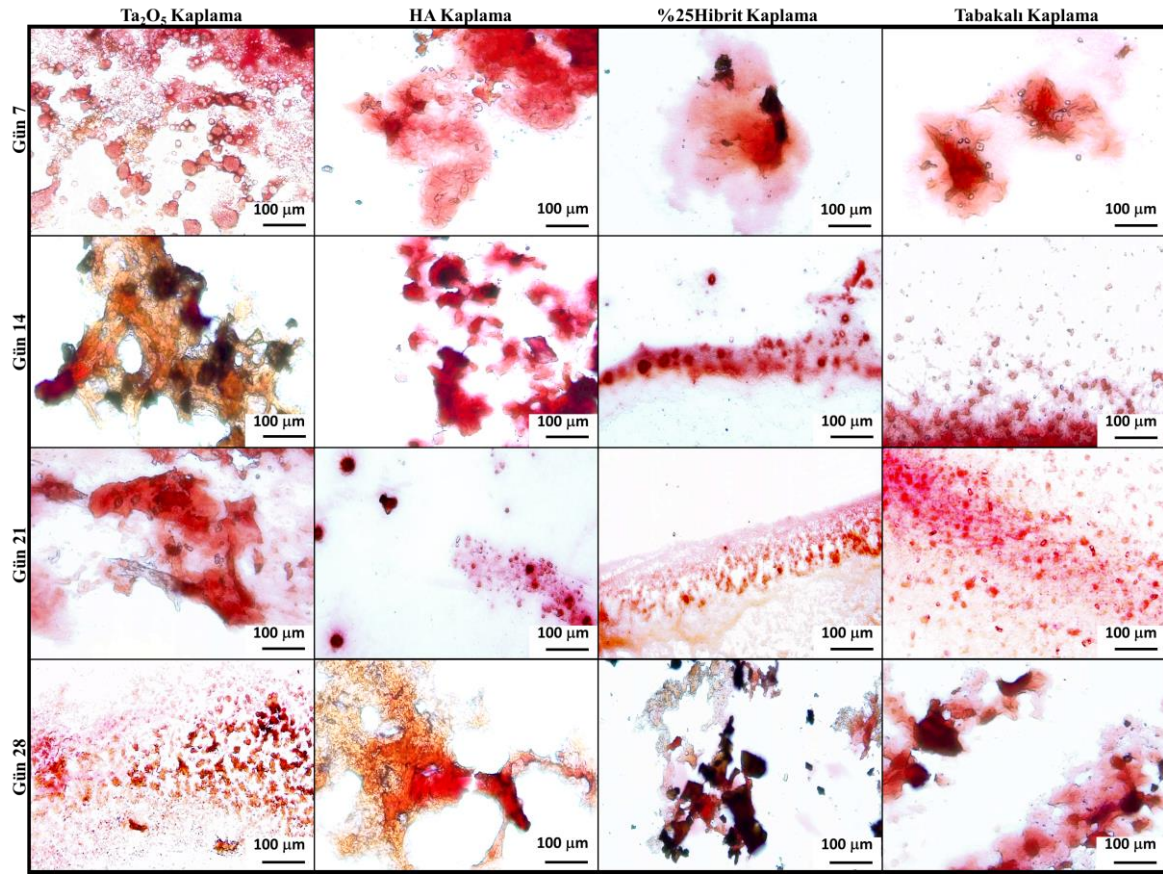
Şekil 5.36. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki canlı hücrelerin H&E histolojik boyama ile incelenmesi



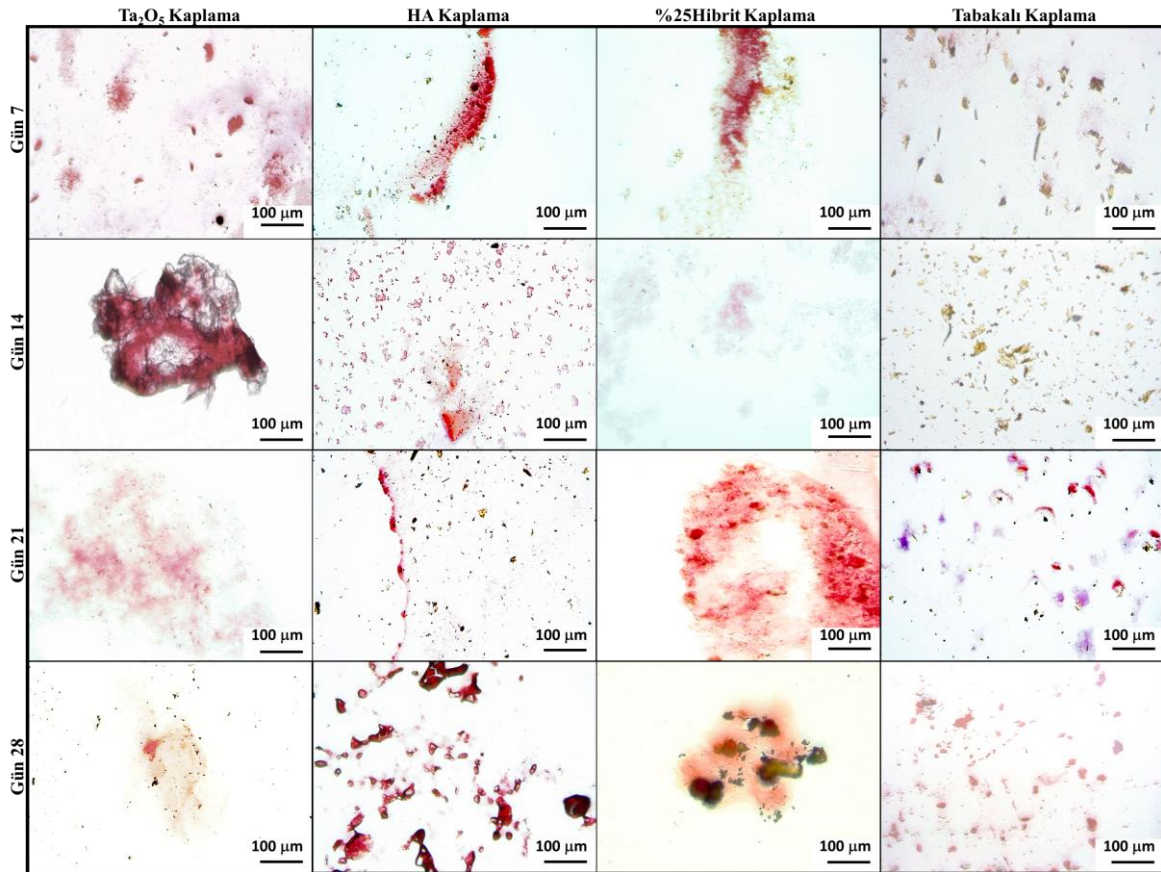
Şekil 5.37. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin vK histolojik boyama ile incelenmesi



Şekil 5.38. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin vK histolojik boyama ile incelenmesi



Şekil 5.39. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin AR histolojik boyama ile incelenmesi



Şekil 5.40. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin AR histolojik boyama ile incelenmesi

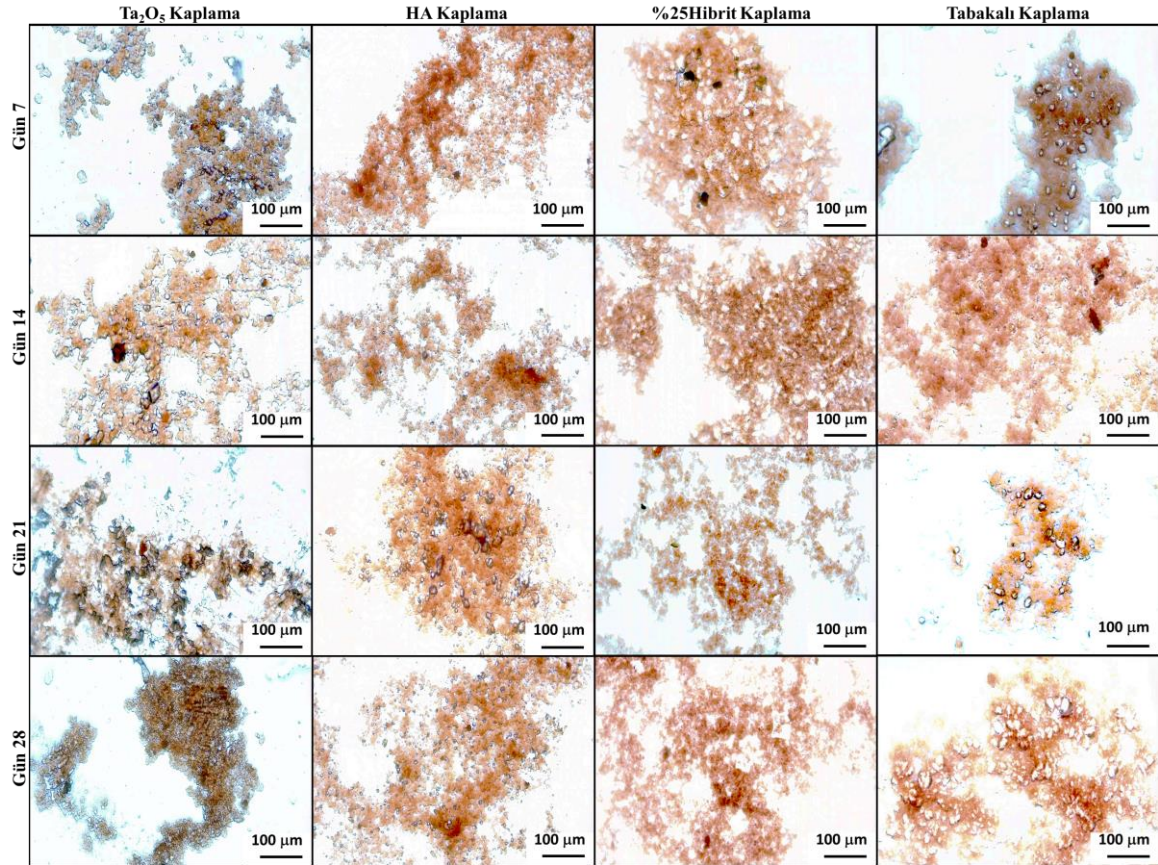
MKH kültürlerinde numuneler üzerinde hücre yoğunluğunun daha az olduğu histolojik boya yoğunluklarındaki azalma ile değerlendirilmiştir. Ayrıca AR ve vK boyamalarının tüm kesit alanı içerisinde sadece sınırlı alanlarda pozitif sonuç verdiği, buna karşın OB kültürün de boyama yoğunluğunun ve oranının tüm kesit alanında daha yüksek oranda gerçekleştiği görülmüştür.

İmmünohistokimya analiz bulguları

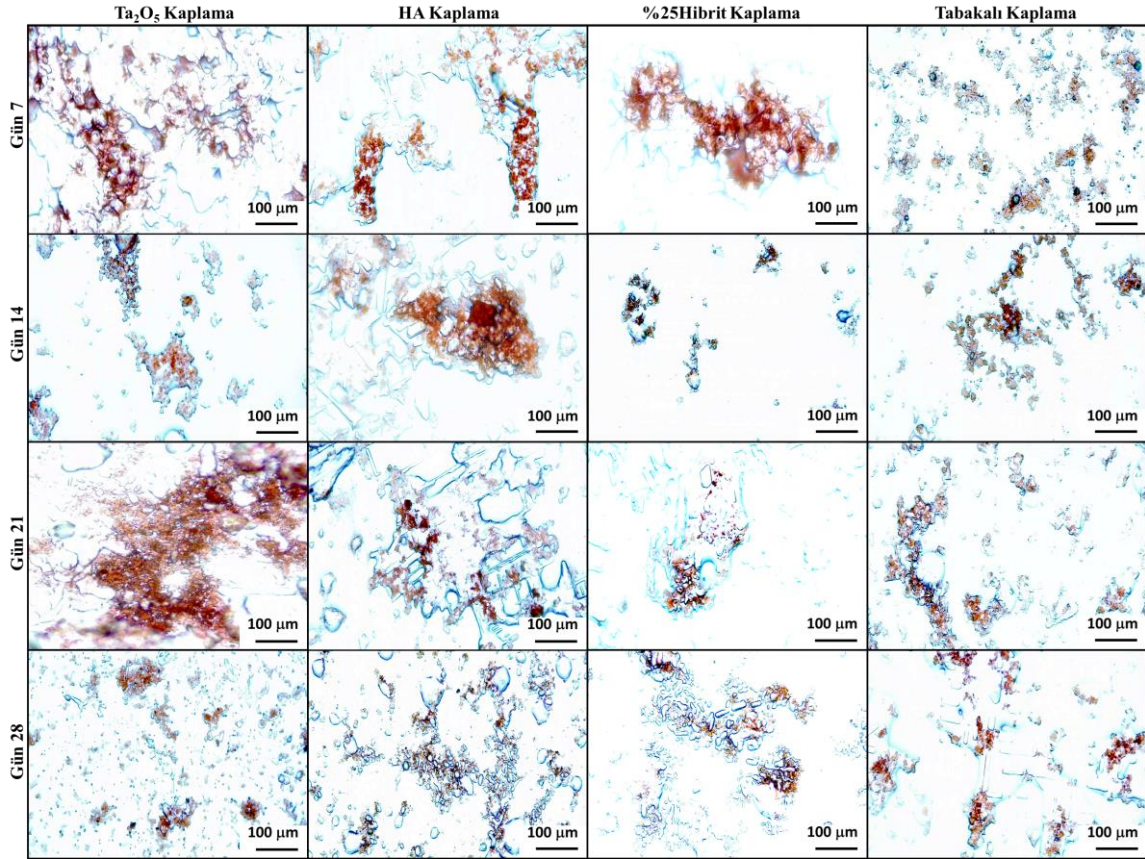
İmmünohistkimya analizi osteojenik fenotipi belirlemek için kemik dokusunun protein içeriğinde bulunan en önemli biyobelirteçlerden kollajen-tip-1 ve osteokalsin proteinleri için yapılmıştır.

Kolajen-tip-1 miktarını belirlemek için anti-kollajen-tip-1 antikoru ile yapılan boyamalarda, tüm numunelerde OB kültürlerinde 7. günden itibaren yoğun boyanmalar gözlenmiştir. Boyanan matriks yapısının, dolayısıyla kollajen-tip-1 sentezinin ilerleyen kültür günlerinde

tüm kesit alanı içerisinde artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.41). MKH kültürlerinde ise anti-kollajen-tip-1 boyamaların özellikle 7. Günde tüm numunelerde pozitif sonuç verdiği ve yoğun bir boyanma olduğu, ancak ilerleyen günlerde tüm numunelerde boyanma yoğunluğunda azalma olduğu ve dar alanlar içerisinde sınırlı bölgelerde renk yoğunluğunun olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.42).

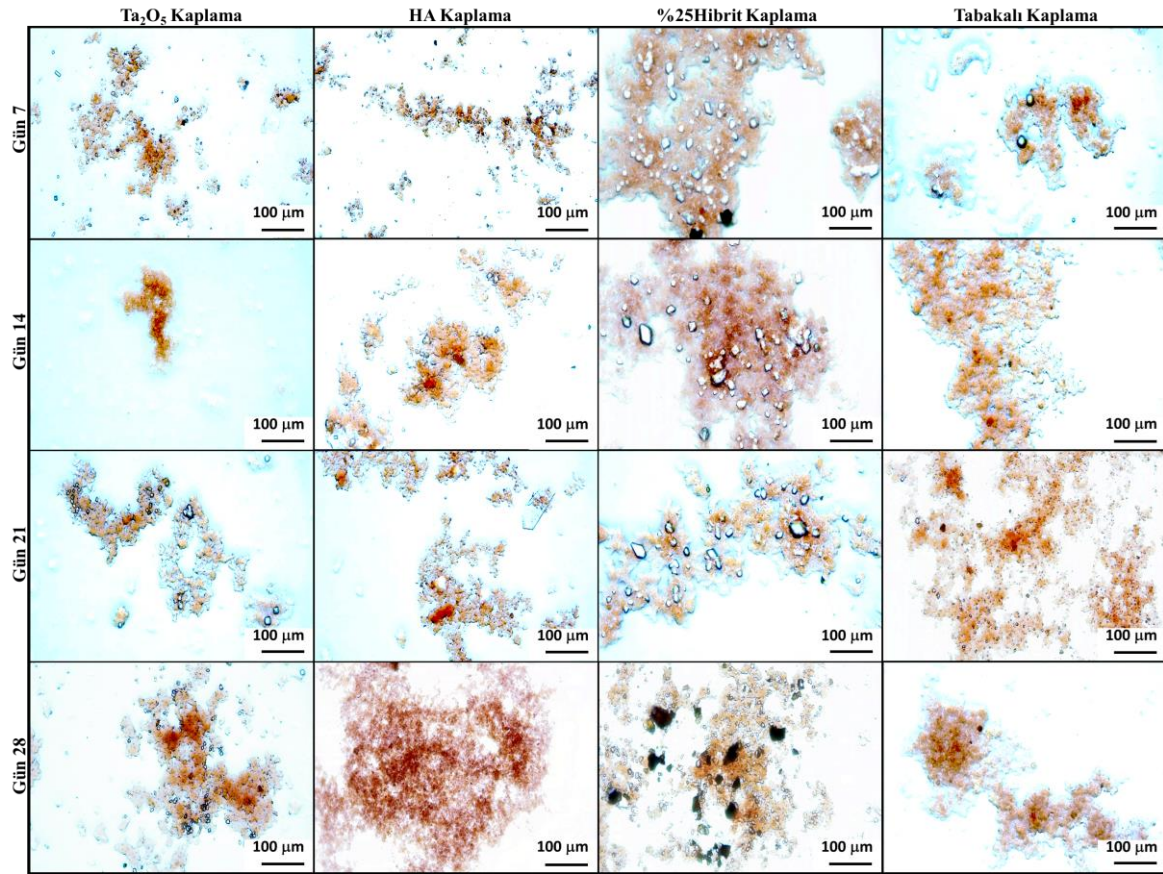


Şekil 5.41. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki kemiğe özgü kollajen-tip-1 sentezinin, Anti-Kollajen Tip-1 immünohistokimya boyaması ile incelenmesi

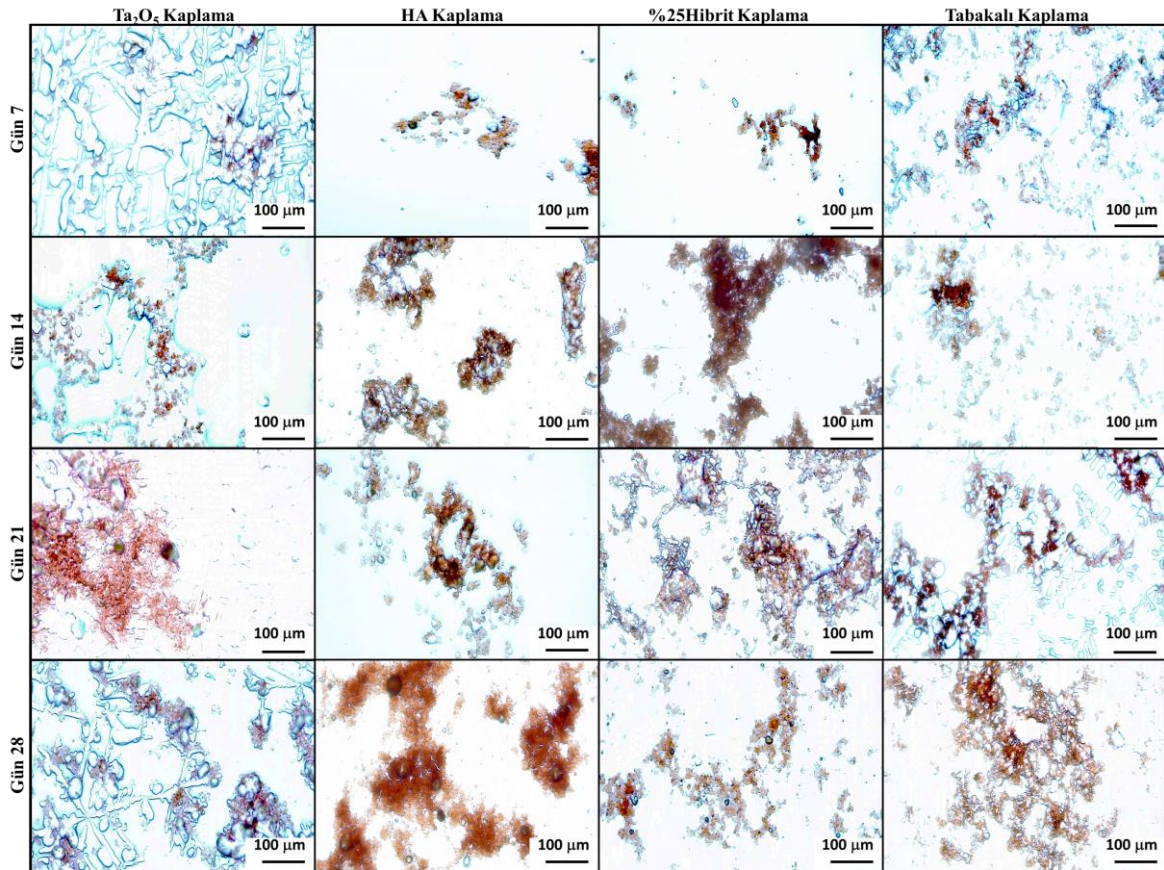


Şekil 5.42. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki kemiğe özgü kollajen-tip-1 sentezinin, Anti-Kollajen Tip-1 immünohistokimya boyaması ile incelenmesi

Işık mikroskobu ile alınan görüntülemelerde, OB kültürlerine ait tüm numunelerde yüksek oranda osteokalsin boyaması olduğu ve ilerleyen günlere göre boyama yoğunluğunun da arttığı belirlenmiştir. Osteojenik indüksiyon altında osteokalsin sentezinin Ta_2O_5 kaplamalarda da arttığı, bununla birlikte numunelerdeki artan HA oranında osteokalsin yoğunluğunun da yine arttığı belirlendi. (Şekil 5.43). MKH kültürlerinde ise osteokalsin için kısmen de olsa pozitif sonuç gözlenmiştir. Osteokalsin sentezinin OB kültürüne göre daha az miktarda ve tüm kültür içerisinde düşük yoğunlukta gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Numuneler içerisinde en düşük osteokalsin sentezinin Ta_2O_5 numunesinde olduğu, buna karşın tüm numunelerdeki artan HA oranında osteokalsin yoğunluğunun da arttığı belirlenmiştir (Şekil 5.44).



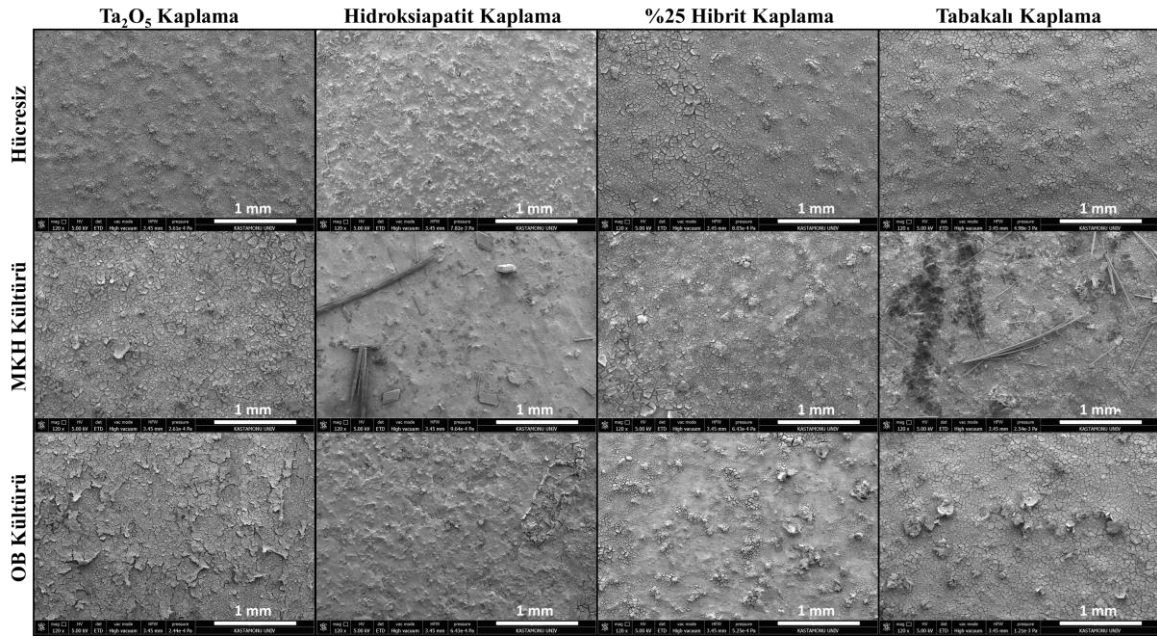
Şekil 5.43. Numunelerin 28 günlük in vitro OB hücre kültüründeki kemiğe özgü osteokalsin sentezinin, Anti-osteokalsin immünohistokimya boyaması ile incelenmesi



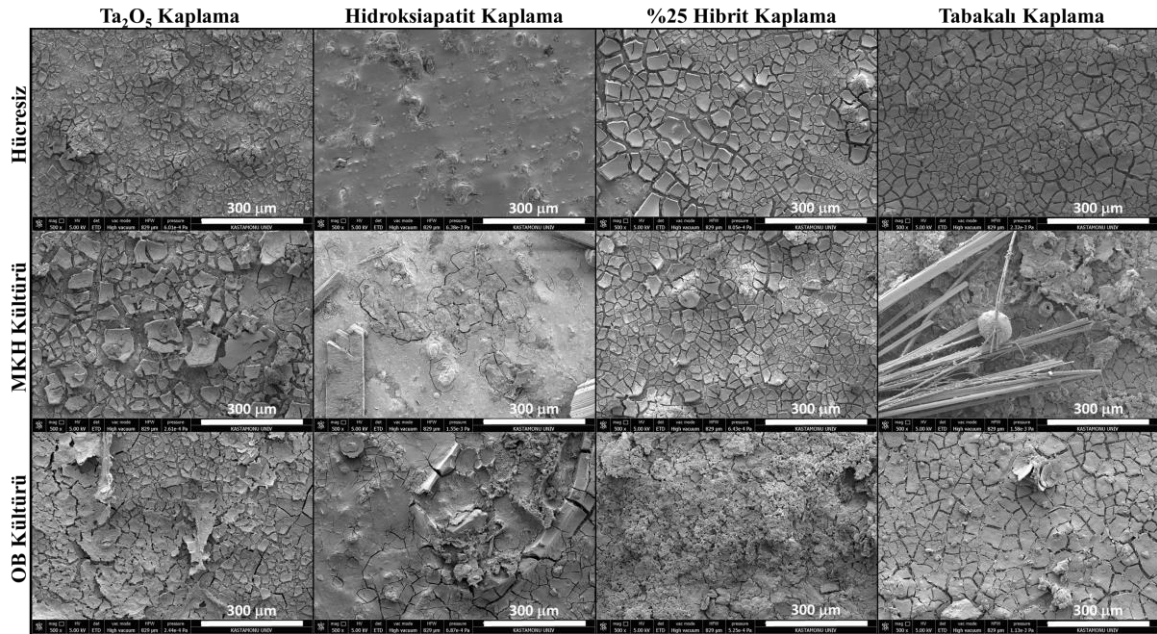
Şekil 5.44. Numunelerin 28 günlük in vitro MKH hücre kültüründeki kemiğe özgü osteokalsin sentezinin, Anti-osteokalsin immünhistokimya boyaması ile incelenmesi

SEM ile morfolojik analiz bulguları ve biyoaktivite tespiti

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile implant numunelerinin morfolojik analizleri, numuneler hücreler ile etkileştirilmeden önce ve tüm hücre kültürü grupları için 28. gün sonunda yapılmıştır. Bu sayede numuneler üzerinde hücrelerin tutunma ve doku oluşturabilme durumları belirlenmeye çalışılmıştır. Hücre-malzeme etkileşimlerine bağlı olarak implant numunelerinin biyoaktif ve/veya biyoinert olma durumları diğer analiz sonuçları da dikkate alınarak yorumlanmıştır. Numunelerin hücresiz, OB ve MKH ile kültürlerindeki görüntüleri Şekil 5.45 ve Şekil 5.46'da, farklı büyütme oranlarında (120X ve 500X) karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 5.45. Numunelerin hüresiz, 28 günlük in vitro MKH ve OB hücre kültüründeki davranışlarına ait morfolojik özelliklerin SEM ile incelenmesini gösteren mikrograflar (120X)



Şekil 5.46. Numunelerin hüresiz, 28 günlük in vitro MKH ve OB hücre kültüründeki davranışlarına ait morfolojik özelliklerin SEM ile incelenmesini gösteren mikrograflar (500X)

Hüresiz numunelerde;

Ta_2O_5 kaplı numunelerin yüzeyinde adacık şeklinde yapılar oluştuğu ve yüzeydeki kaplama görüntüsünün bir bütün halinde olmayıp çok sayıda küçük adacığın bir araya gelmesiyle

oluştugu görülmüştür. HA kaplı numunelerin yüzeyindeki kaplamanın bütün halinde olmakla birlikte, yüzeyde yer yer pürüzlülük olduğu görüldü. HA ve Ta₂O₅ kullanılarak üretilen %25 Hibrit ve Tabakalı örneklerinin her ikisinde de saf HA ve Ta₂O₅ kaplamalara benzer görüntüler bir arada tespit edilmiştir. %25 Hibrit örneklerinde adacık yapı görüntüsü ve aralarına serpiştirilmiş pürüzlülük bir arada gözlenmiştir. Pürüzlü kısımlar üzerinde çatlamlar olmamakla birlikte, tüm kaplama ile birleşim sınırlarında çatlamlar olduğu görülmüştür. Tabakalı örneklerinde yüzeydeki çatlaklıkların ve adacık dağılımının homojene yakın dağılımda olduğu, boyutlarının ise saf Ta₂O₅ örneklerine oranla nispeten daha büyük olduğu görülmüştür. Kaplamada yer yer HA varlığından kaynaklı olduğu düşünülen pürüzlerin olduğu ve bu tümseklik görüntüsündeki pürüzlerin üzerinde kaplama kalıntıları ve üzerinde çatlakların olduğu gözlenmiştir.

MKH-İmplant kültürlerine ait numunelerde;

Ta₂O₅ örnek yüzeyinde yer yer hücrelerin doku benzeri bir yapı oluşturarak, tabakalar halinde yüzeye yayıldığı görülmüştür. Ancak, hücre tabakaları ile malzeme yüzeyi arasında boşluklar olduğu, bağlanmaların olmadığı gözlenmiştir. HA örnekte ise yüzeyin hücre katmanı ile kaplandığı, ancak katman kalınlığının tümsek şeklindeki pürüzlerin seviyesinden daha az olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte yüzeyde inorganik yapıda olduğu anlaşılan kristal yapıların da olduğu görülmüştür. %25 Hibrit örneğinde yüzeyde bulunan çatlakların arasında ince tabakalar oluşmaya başladığı ve bu çatlakları kısmen kapattığı ancak yüzeyle tam bir entegrasyonun olmadığı görülmüştür. Oluşan bu katmanların tümseklikler üzerinde ve etrafında daha fazla olduğu ve doku-benzeri yapıların tümseklikler etrafında daha fazla miktarda olduğu belirlenmiştir. Tabakalı örneğinde %25 Hibrit örneğine benzer bir morfolojik değişim belirlenmiştir. Ancak, yüzeyde lifsi yapıda kristallerin olduğu gözlenmiştir.

OB-İmplant kültürlerine ait numunelerde;

Ta₂O₅ örneğinde doku-benzeri katmaların olduğu ve üst üste tabakalar halinde zemini kapladığı görülmüştür. Ancak, katmanların kesintiye uğradığı kısımlarda dokulaşmanın zeminle bağlanmadığı ve zeminin üstünde aralarında boşluk kalacak şekilde yerleştiği görülmüştür. HA örnekte tüm yüzeyde doku benzeri bir katman olduğu ve katman kalınlığının MKH kültürüne göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Yüzeyde ayrıca yeni

kristaller oluşumlar dikkat çekmiş olup, bu kristallerin yüzeyinde de hücresel katmaların olduğu görülmüştür. %25 Hibrit örneğinde yüzeydeki çatlakların büyük ölçüde hücresel oluşumlar ve/veya yeni seramik çöküntüler ile doldurulduğu görülmüştür. Özellikle HA kristallerinden kaynakladığı düşünülen tümseklikler üzerinde ve çevresinde hücre kümelerinin daha fazla olduğu, bununla birlikte yeni kristal yapıların yüzey üzerinde çöktüğü görülmüştür. Tabakalı örneğinde yüzey kaplamasından dışarı doğru çıkıntılar oluştuğu ve bunların üzerinde doku benzeri katmandan ziyade inorganik görünümlü apatit tabakaların oluştuğu görülmüştür.

5.6. İn Vivo Analizler

İn vivo analizlerin gerçekleştirilmesi için, in vitro çalışmalarda yenilikçi hedef olan örnekler (%25 Hibrit ve Tabakalı kaplanmış) seçilmiştir. Bu örnekler için kontrol grubu olarak ta kaplanmamış hali olan AZ91 Mg alaşımı örneği kullanılmıştır. Radyografi örneklerinde ise ayrıca piyasada kullanılan Ti6Al4V alaşımı da kontrol grubuna eklenmiştir.

5.6.1. Biyokimyasal parametre sonuçları

Biyokimyasal analiz bulguları Çizelge 5.8’de verilmiş olup numune grupları aşağıdaki gibidir:

Grup Ia (Negatif kontrol grubu): İmplant uygulanmayacak, 6. hafta sakrifikasyon

Grup Ib (Negatif kontrol grubu): İmplant uygulanmayacak, 12. hafta sakrifikasyon

Grup IIa (Referans grubu): Ti6Al4V, 6. hafta sakrifikasyon

Grup IIb (Referans grubu): Ti6Al4V, 12. hafta sakrifikasyon

Grup IIIa: AZ91 Magnezyum alaşımı, 6. hafta sakrifikasyon

Grup IIIb: AZ91 Magnezyum alaşımı, 12. hafta sakrifikasyon

Grup IVa: %25 Hibrit kaplanmış AZ91 Magnezyum alaşımı, 6. hafta sakrifikasyon

Grup IVb: %25 Hibrit kaplanmış AZ91 Magnezyum alaşımı, 12. hafta sakrifikasyon

Grup Va: Ta₂O₅/Hidroksiapatit Tabakalı kaplanmış AZ91 Magnezyum alaşımı, 6. hafta sakrifikasyon

Grup Vb: Ta₂O₅/Hidroksiapatit Tabakalı kaplanmış AZ91 Magnezyum alaşımı, 12. hafta sakrifikasyon

Tez çalışması kapsamında yapılan biyokimyasal analizlerin sonucuna göre, kanda kalsiyum seviyelerinin deney gruplarından Grup II, Grup IV ve Grup V'te 6. ve 12 hafta sonuçlarının Grup I, ve Grup III'e kıyasla oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçları üretilen %25 Hibrit ve Tabakalı kaplı örneklerin (Grup IV ve Grup V) referans madde olarak kullanılan Ti6Al4V (Titanyum-6-Alüminyum-4-Vanadyum) alaşımına (Grup II) yakın sonuçlar verdiğini, kanda kalsiyum seviyelerinde artışa neden olduğunu göstermiştir.

Diğer biyokimyasal parametrelere bakıldığında kanda sodyum, potasyum, klor ve üre azotu seviyelerinde 6. ve 12. hafta karşılaştırmasında hiçbir grupta anlamlı derecede bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir.

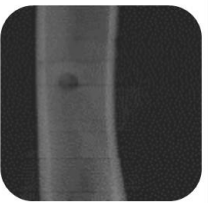
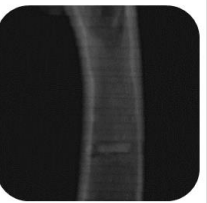
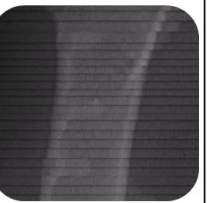
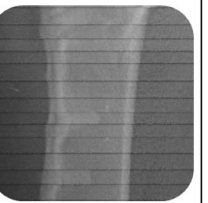
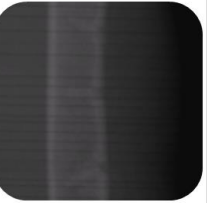
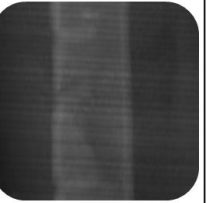
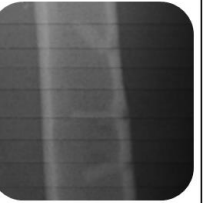
Çizelge 5.8. Test örneklerinin serum parametrelerine etkisi

Parametre	Sodyum (eEq/L)	Potasyum (eEq/L)	Klorür (mEq/L)	Kalsiyum (mg/dL)	Üre azotu (mg/dL)	Magnezyum (mg/L)
Grup Ia (Kontrol grubu)	4122.04±168.47	41.62±1.53	59.34±8.12	3.23±0.41	20.19±1.45	0.27±0.16
Grup Ib (Kontrol grubu)	4208.21±126.41	41.82±1.34	57.18±5.13	3.13±0.42	21.57±1.48	0.26±0.08
Grup IIa (Referans grubu)	4713.22±140.16	33.75±1.68	49.04±9.42	3.48±0.38	24.82±2.13	0.24±0.05
Grup IIb (Referans grubu)	4924.32±148.15	32.22±1.19	50.08±9.41	5.67±2.39	23.07±2.61	0.25±0.04
Grup IIIa	4392.34±103.17	33.75±1.24	55.18±3.17	3.13±1.22	17.01±2.53	0.22±0.07
Grup IIIb	4418.61±107.21	32.26±4.39	54.43±7.26	3.19±1.13	17.98±0.36	0.41±0.09
Grup IVa	3093.05±196.51	34.17±3.21	52.76±3.18	2.71±0.32	11.43±0.65	0.21±0.26
Grup IVb	3156.17±102.05	35.23±1.16	53.72±3.21	3.06±0.58	11.96±0.77	0.30±0.09
Grup Va	3892.04±71.13	31.26±2.08	50.18±3.13	3.26±0.35	14.26±0.61	0.23±0.06
Grup Vb	3982.14±97.61	31.54±1.42	50.23±4.13	4.25±0.47	13.37±1.28	0.29±0.02

Mg içerikli implantların kanda Mg değerlerine etkisi ve böbrek üzerinde herhangi bir toksikasyona neden olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan magnezyum ölçümlerinde, en yüksek seviyede yükselmenin Grup III'te olduğu, bunu Grup IV ve Grup V'in takip ettiği görülmüştür. Ancak elde edilen verilerin daha önce yapılan literatür bilgileri göz önünde bulundurulduğunda kanda ve böbrekte herhangi bir toksikasyonu gösterir nitelikte olmadığı belirlenmiştir (Ilhan vd., 2014).

5.6.2. Radyografi ve histogram

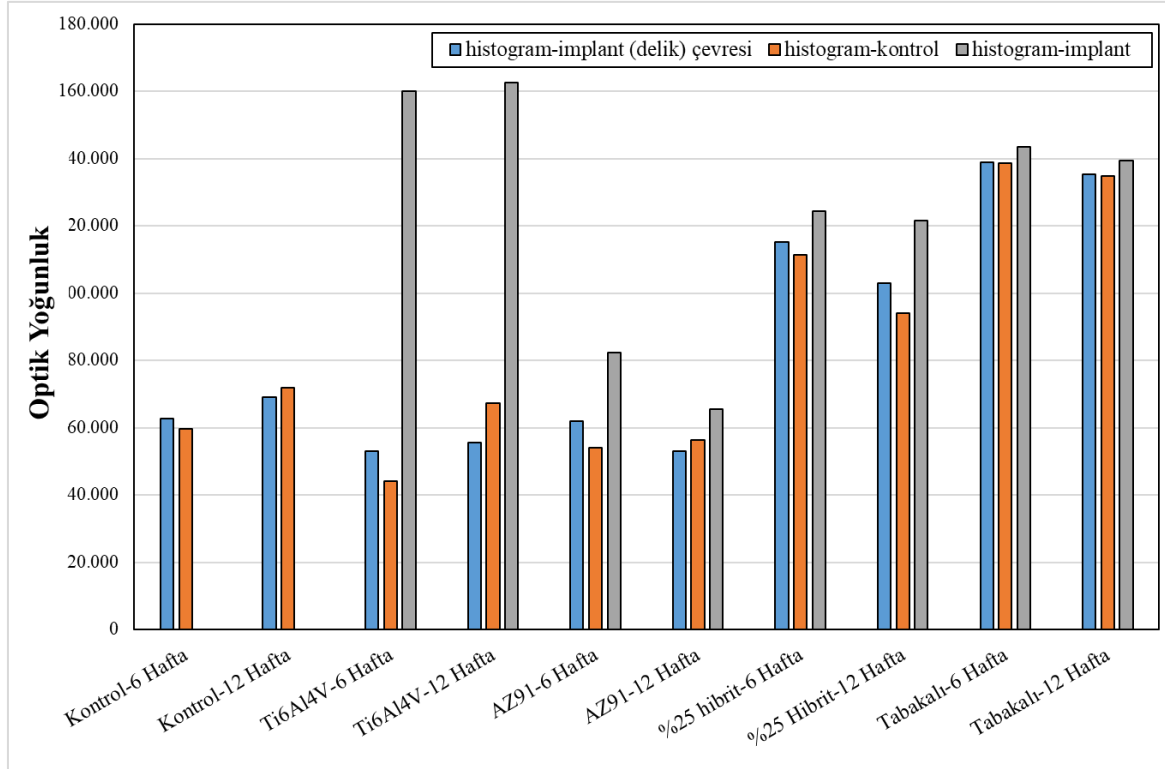
Sakrifiye edilmeden önce deneklerden alınan röntgen görüntüleri Şekil 5.47’de verilmiştir. Bu görüntülerde implantların görünürlükleri ve çevresinde bulunan dokularda gözlenen değişimler histogram grafiğine aktarılmış ve Şekil 5.48’de verilmiştir. Radyolojik görüntülerde üretilen tüm implantların görüntülenebilir olması yeterlidir. Fakat kendi aralarında değerlendirilecek olursa Şekil 5.47’de 6 haftalık numuneler için hemen hemen her bir implant radyoopaklık bakımından yeterince görülebilir haldedir. Ancak 12 haftalık röntgenlere bakıldığında özellikle AZ91 ve Tabakalı kaplı örnekler için görüntülenebilirliğin yeterince iyi olmadığı gözlenmektedir. Ayrıca AZ91 örneğinde 6 haftalık süre sonunda implant çevresinde doku kaybı olduğu görüntülenmektedir. Bu örneklerin aksine %25 Hibrit kaplı numune hem 6 hem de 12 haftalık sürecin sonunda halen çok iyi bir radyoopaklık sergilemiştir. Kontrol amaçlı implante edilen Titanyumdan sonra en görünür implant %25 Hibrit kaplı örnek olmuştur. 6 ve 12 hafta için %25 Hibrit kaplı numune birbirine yakın optik yoğunluk değeri sergilemiştir. Bu durumda bu implantın radyoopaklık açısından diğer numunelerden daha iyi görüntülenebilir özellikte olduğu açıkça görülmektedir.

	Ti6Al4V	Negatif Kontrol	AZ91	Tabakalı	%25 Hibrit
6 Hafta					
12 Hafta					

Şekil 5.47. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası deneklerden alınan röntgen görüntüleri

Histogram grafiğinde mavi renk sütunlar implantın çevresindeki dokunun histogram değerini, turuncu sütun ise kontrol amaçlı implantın uzak bölgesinden alınan histogram değerini ve gri sütun ise implantın histogram değerini vermektedir. İncelenen yapının görüntü dansitesi ile ilgili değerleri veren histogram analizlerine (Şekil 5.48) göre, implant kullanılmayan ve kemiklerin sadece delindiği negatif kontrol grubu ile AZ91 implantların çevresindeki kemiğin histogram değerleri kendi içlerinde birbirine yakındır. Kemik içine

Ti6Al4V implantların yerleştirildiği örneklerde ise implant çevresindeki kemiğin 6. hafta ile 12. hafta histogram değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Bunların aksine, AZ91 ve %25 Hibrit kaplı implantın çevresinin 6. hafta ile 12. Haftada implant çevresindeki kemiğin fraktal değerleri biraz farklılık göstermektedir. Bu farkın, aynı materyalden mamül implantlar olsa da farklı dansiteye (farklı mimariye) sahip kemiklere yerleştirilmesinden ve görüntü alınırken farklı açıdan implantın görüntülenmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında step-wedge kullanılarak yapılan kıyaslamalı histogram değerlendirmesinde aynı materyalden mamül implant veya sadece delik oluşturulan kemik çevresi bölgeleri histogram değerleri birbirleriyle tutarlılık göstermektedir. Bu numunelerden farklı olarak Tabakalı ve %25 Hibrit kaplı numunelerin histogram değerleri Ti6Al4V kontrol grubunun değerlerine yakın değerler vermiştir. Bu durumun bu kaplamalardaki tantal içeriği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Tüm örneklerde, implant/delik çevresi fraktal değerler sağlıklı uzak bölge kemik fraktal değerlerine göre daha düşüktür, bu sonuç işlem gören bölgelerdeki (implant/delik) kemiğin çevresinin içsel mikroyapısal özelliğinin azalma yönünde değiştiği şeklinde yorumlanabilir. Ancak özellikle %25 Hibrit kaplı numune için 6 ve 12 haftalık süre sonunda implant çevresinden alınan fraktal değerler, sağlıklı uzak bir noktadan alınan dokunun fraktal değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumda doku kaybı olmayıp yeni doku oluşumunun meydana geldiği düşünülmektedir.



Şekil 5.48. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası röntgen görüntülerinden elde edilen kontrol doku ve implant çevresinden alınan histogramlar

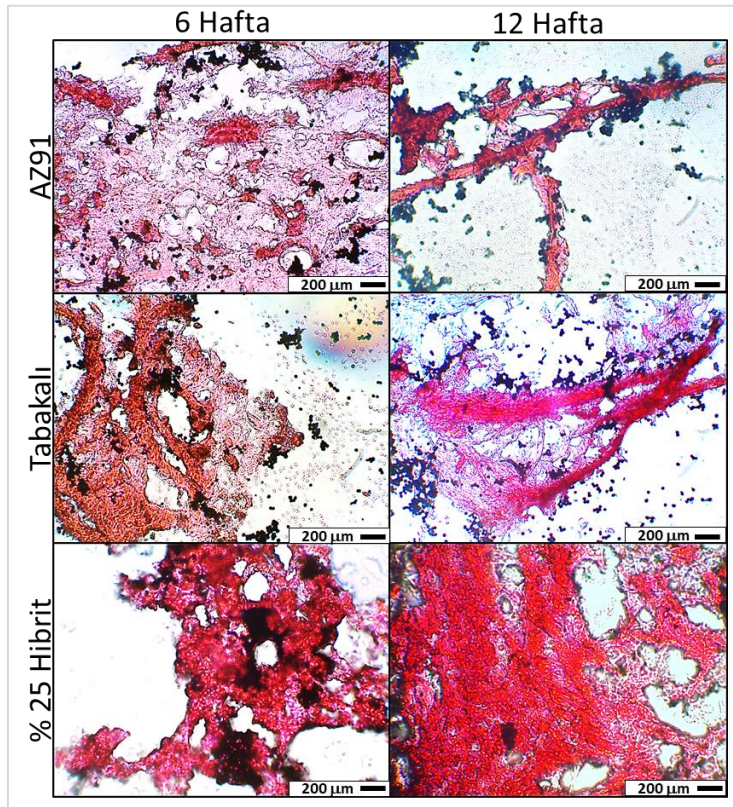
İmplantların kullanıldığı örneklerde veya sadece delik oluşturulan örneklerde, bu implant ve delikler çevresindeki histogram değerleri, aynı örneğin sağlıklı uzak bir bölgesinden elde edilen histogram değerleri ile genelde yakın değerler göstermiştir. Bu sonuçlar, yerleştirilen implant çevresindeki kemiğin farklı haftalardaki radyografik değerlendirmesinin farklı örnekler üzerinde yapıldığı bu çalışma için tutarlı olmuştur. Tüm numuneler ve kontrol numuneleri değerlendirilecek olursa hem röntgen hem de implantların histogram verilerinden, Tabakalı ve Hibrit numunelerinin radyoopaklığının Ti6Al4V ile çok daha yakın olduğu net bir şekilde anlaşılmaktadır. Bu durum literatürde de benzer şekilde Titanyum implanlatın Tantal ve Tantal oksit kaplanarak radyoopaklığının iyileştirildiği Yang vd. (2019) yaptığı çalışmada da mevcuttur (Yang vd., 2019). Yine başka bir çalışmada Ni-Ti alaşımının Tantal kaplanarak radyopak özelliklerinin artırıldığı kaydedilmiştir (Park vd., 2016).

5.6.3. Histokimya analiz bulguları çalışmaları

Denekler kurban edildikten sonra, kemiğe yerleştirilen implant bölgesinden kazınarak alınan doku örnekleri dondurarak kesit hazırlama yöntemi ile hazırlanmış ve histoloji

boyamaları gerçekleştirilmiştir. Histokimya analizleri standart hematoxilen-eosin (Şekil 5.49), Safranin-O (Şekil 5.50), Alcian Mavisi (Şekil 5.51), Alizarin Kırmızısı (Şekil 5.52) ve von Kossa (Şekil 5.53) yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Bu boyama yöntemleri hazırlanan implantın osteojenik kapasitesini belirlemek amacıyla malzeme yüzeyinde oluşan kemik mineralizasyonunu ışık mikroskobunda görüntüleyerek gerçekleştirilmiştir.

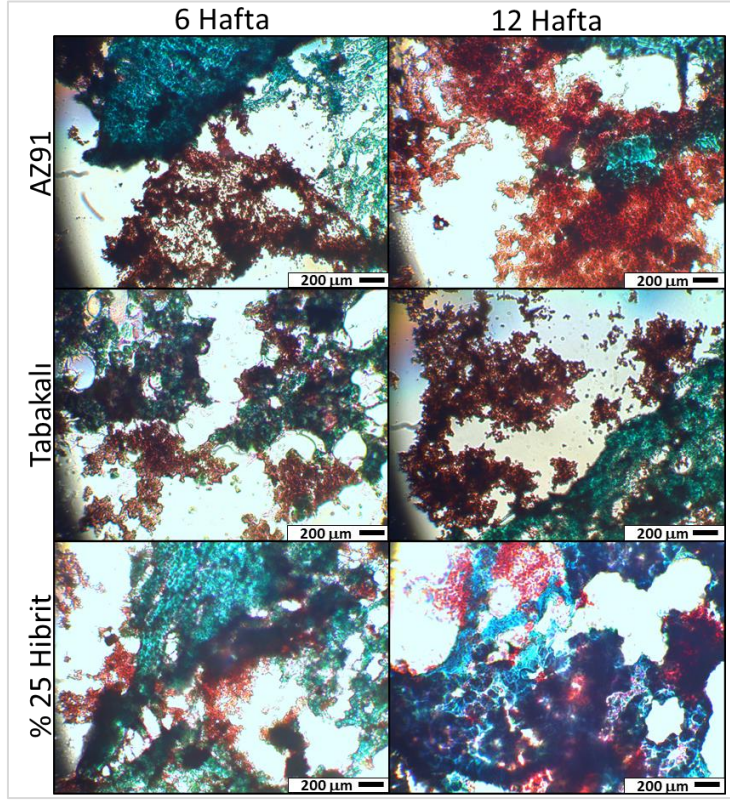
Şekil 5.49’da verilen H&E boyamaları implant üzerinden toplanan doku örneklerindeki canlı hücreleri göstermektedir. Hem 6 hem de 12 haftalık periyotlarda en fazla boyamanın %25 Hibrit örneğinde olduğu görülmektedir. Boyamalardaki renk yoğunluğunun fazla olması pozitif yönde yorumlanmıştır.



Şekil 5.49. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen dokulardaki canlı hücrelerin H&E histolojik boyama yöntemi ile ışık mikroskobu altında incelenmesi (40X)

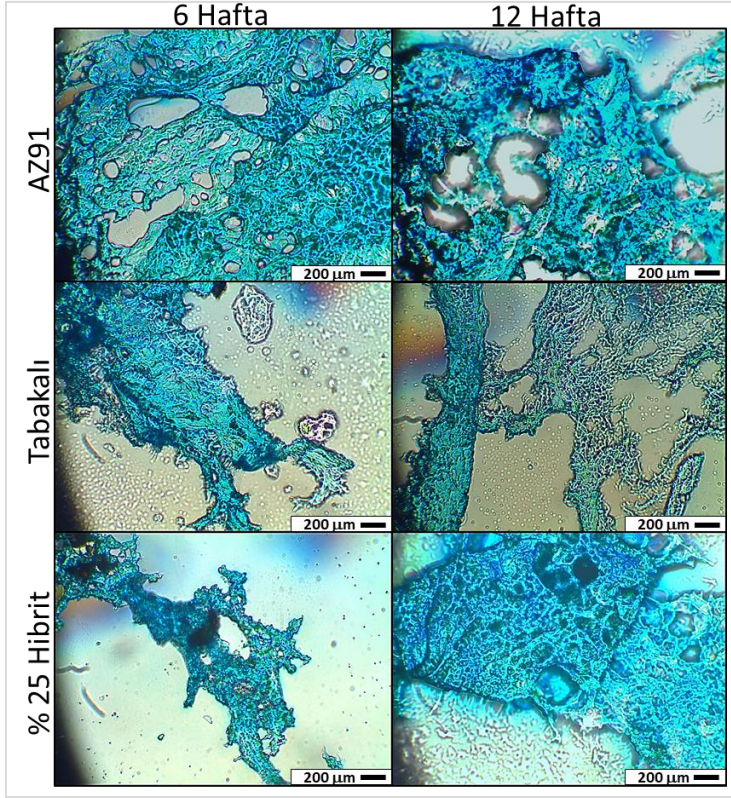
Hücreler farklılaşmaya başladıklarında kendi HDM’lerini oluşturmaya başlarlar. Yeni HDM oluştururken kolajen molekülleri hücre içerisinde sentezlenmeye başlar ve daha sonra hücre dışarısına taşınır. İlerleyen günlerde ise üretilen kolajen lifler hücrelerarası bölgede (intertiritorial matrikste) sınırlandırılmış olurlar. Safranin-O ile yapılan histoloji boyamaları kolajen varlığını tespit etmede kullanılır. Hücre çekirdekleri siyah, sitoplazma gri-yeşil ve

hücre granülleri yani kolajen molekülleri ise turuncu-kırmızı tonlarında boyanırlar. Şekil 5.50’de örneklerin Safranin-O ile etkileşimi verilmiştir. Her bir örnek için hem yeşil hem kırmızı tonları fazlasıyla açığa çıkmıştır.



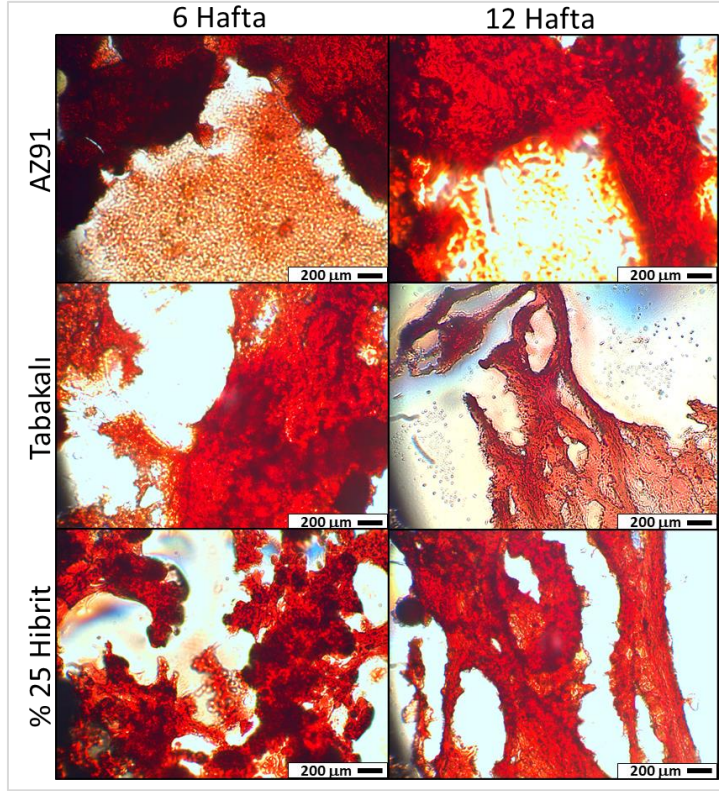
Şekil 5.50. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen dokulardaki kolajen moleküllerinin Safranin-O histolojik boyaması ile incelenmesi

Şekil 5.51’de ise HDM yapısında yer alan proteoglikanların varlığını Mavi renge dönüştürerek tespit eden Alcian Mavisi boyaması görülmektedir. Proteoglikan molekülleri hücre içerisinde sentezlendikten sonra hücre dışına çıkarılarak HDM yapısına katılırlar ve HDM içerisinde genel olarak hücre çevresinde (teritoryal matrikste) lokalize olurlar. Proteoglikanlar insan bağ dokusundaki zemin maddesinde bulunurlar. Kıkırdakta sentezlenebilirler ve hücrelerarası dolgu maddesi olan hayvansal hücre dışı matriksinin büyük bir bileşenidir. %25 Hibrit kaplanmış örnekte etkili bir boyama söz konusu olup özellikle Tabakalı kaplı örnekte daha zayıf bir boyama söz konusu olmuştur.

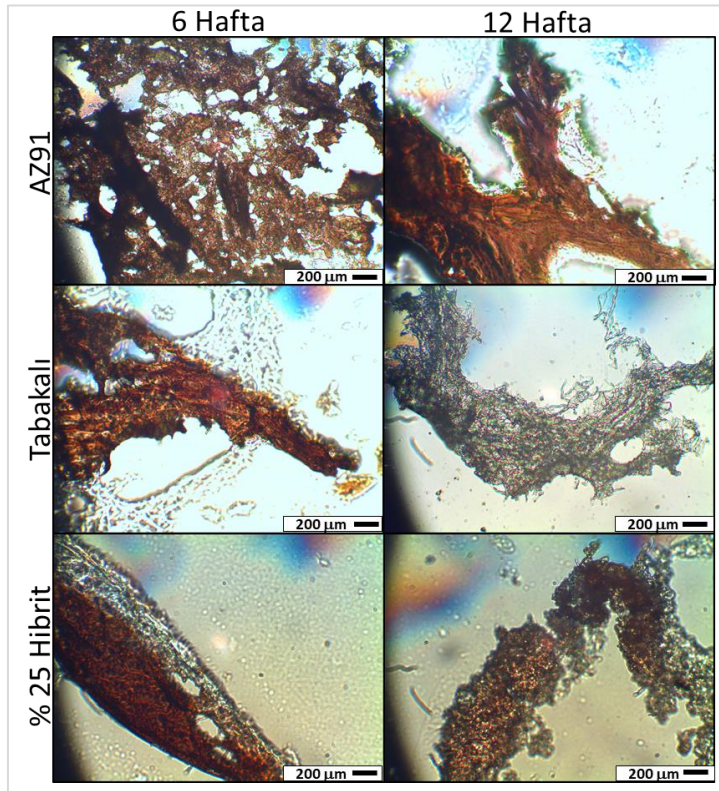


Şekil 5.51. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen kesitlerde HDM'deki proteoglikanların Alcian Blue histolojik boyama yöntemi ile ışık mikroskobu altında incelenmesi (40X)

Dokulardaki kalsiyum birikimi ise iki farklı boyamatürü ile Şekil 5.52'de Alizarin Kırmızısı ve Şekil 5.53'te von Kossa ile verilmiştir. Burada kalsiyum mineralizasyonun gerçekleşerek kemik doku-benzeri yapıları oluşturduğu tespit edilmiştir. %25 Hibrit kaplı örnekte Tabakalı kaplı örneğe kıyasla özellikle de 12. Hafta için hücre tutunmasının ve mineralizasyonun daha fazla gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 5.52. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen dokulardaki kalsiyum birikiminin AR histolojik boyama ile incelenmesi



Şekil 5.53. 6 ve 12 haftalık implantasyon sonrası elde edilen dokulardaki kalsiyum birikiminin vK histolojik boyama ile incelenmesi

6. TARTIŞMA

Yürütülen tez çalışmasında ilk hedef altlık malzeme üzerine kaplamaların farklı parametrelerde uygulanarak test edilebilmesi olmuştur. Altlıklar için AZ91 Mg alaşım tozları toz metalurji metoduyla daha önce belirlenen optimum parametrelere göre üretilmiştir. AZ91 Mg alaşım tozları 400°C sıcaklık ve 350 MPa basınç uygulanarak inert atmosferde preslenerek %99,7 teorik yoğunlukta elde edilmiştir. Kaplamalar için Ta₂O₅ ve HA ile sol-jel yöntemi için uygun kimyasal çözeltilerin geliştirilmesi ve bunların istenen yapıda elde edilebilmesi önem taşımaktadır. Bu noktada çeşitli kimyasal çözeltiler denenerek istenen yapının elde edilip edilemediği bazı analizlerle (XRD, FTIR gibi) tespit edilmeye çalışılmıştır. Nitekim elde edilen çözeltiler kristalleşme sıcaklığında kalsine edilerek doğru yapı olup olmadığı araştırılmış ve doğruluğu tespit edildikten sonra altlık numunelerin kaplaması gerçekleştirilmiştir. Kaplanan numuneler SEM-EDS analizleri yapılarak morfolojik açıdan incelenmiş ayrıca kesitlerinden görüntü alınarak hem kaplama kalınlığı hem de kaplamadaki elementlerin varlığı tespit edilmiştir. Sonuçlar HA'nın çok ince bir tabaka halinde (3-4 µm) kaplandığını gösterirken, Ta₂O₅ ve Hibrit kaplı numunelerin benzer kalınlıklarda ve 9-15 µm aralığında seyrettiğini, Tabakalı kaplamanın ise 55-60 µm civarında olduğunu göstermiştir. Üretim tamamlandıktan sonra kaplamaların malzeme açısından karakterize edilmesi ve uygun görülen numuneler ile tezin ikinci aşaması olan in vitro ve in vivo çalışmalara geçilmesi uygun görülmüştür. HA, Ta₂O₅, Tabakalı ve %5-10-25 Hibrit kaplamaların her biri için kaplama dayanıklılığını ölçmek adına çizik ve vücut içi kullanım ortamını simüle eden farklı tampon çözeltilerdeki korozyon davranışlarını incelemek için de potansiyodinamik elektrokimyasal korozyon testleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizik testlerinden alınan en iyi sonucun tabakalı kaplı numuneye ait olduğunu ve bu durumun özellikle kesitten alınan SEM görüntüleri ile kolaylıkla açıklanabilir olduğu görülmektedir. Bu numunelerden alınan çizik testinde çizilme sırasında altlık malzemeye ulaşılmadığı, kaplama tabakasında çizilme gerçekleştiği görülmüştür. Diğer numunelerde ise çok hızlı şekilde altlığa ulaşıldığı ve kalıcı deformasyon gözlemlendiği söylenebilir. Aynı numunelerin 3 farklı tampon çözeltide yapılan korozyon testleri sonucu her bir ortama göre korozyon sonuçlarının farklılık gösterdiği ve korozyon miktarının en fazla HBSS çözeltisinde gerçekleştiği görülmüştür. DMEM ve DMEM+%10 FBS çözeltilerinde ise birbirine yakın ve daha iyi korozyon dayanımı sergilemelerinin sebebinin bu medyumların içeriğine bağlı olduğu düşünülmektedir. DMEM ortamına FBS ilave edilmesi özellikle proteinlerin yüzeye yapışmasını ve korozyona karşı bir bariyer oluşturmasını sağlamaktadır.

Proteinlerin yüzey tarafından adsorblanması yüzeyin pH değişiminden etkilenmesini engellediğinden korozyon hızını azaltmaktadır (Gu vd., 2009). Yapılan pek çok çalışmada da buna vurgu yapılmaktadır. Örneğin Gu vd.'nin (2009) çalışmasında yine aynı bu üç farklı ortamda yapılan korozyon deneyleri sonucunda içeriğe atfederek DMEM+FBS çözeltisinde yüzeyde oluşan filmin diğerlerine kıyasla daha kararlı ve dirençli olması nedeni ile korozyon hızının bu ortamda düşük çıkmasından bahsedilmektedir. Bunun dışında bir diğer sebep olarak klorür konsantrasyonunun daha düşük olmasına da atfedilmektedir. Özellikle Mg olan altlıkta klorürün konsantrasyonuna bağlı olarak korozyonun hızlanmasının söz konusu olduğuna, hidrokarbonatların ise yüzeyde pasivizasyon sağlayarak korozyonu azalttığına vurgu yapılmaktadır (Gu vd., 2009). Xin vd. (2008) de yaptığı çalışmada klorürün çukurcuk korozyonunu artırırken fosfat iyonlarının ise yüzeyde bir pasivasyon tabakası oluşturarak korozyonu yavaşlattığı sonucuna varmıştır (Xin vd., 2008).

HBSS, DMEM ve DMEM+%10 FBS'de korozyon sonrası SEM görüntülerinden yukarıda bahsedildiği gibi HBSS dışındaki ortamlarda yapılan korozyon deneyleri sonucu yüzeyden alınan SEM görüntülerinde (EK-1) farklı yapıların homojen olarak dağıldığı ve buna benzer bir yapının HBSS'te gözlenmediği net bir şekilde görüntülenmiştir. Ayrıca HBSS'te test edilen numunelerin yüzeylerinde diğerlerinden farklı olarak korozyon ürünlerinde daha heterojen yapılanmaların söz konusu olduğu ve kaplamaların fazlaca kalktığı görüntülenirken, DMEM esaslı ortamlarda test edilen numunelerin yüzeyindeki kaplamaların daha az bozunduğu halen mevcutta bulunduğu görüntülenmiştir. DMEM içerikli ortamlarda numune yüzeylerinde ortalama 10 mikron ve daha küçük boyutlarda pitting noktalarının olduğu görülmektedir. Bu noktalardan ve yüzeye homojen dağılmış olan küçük yapıların ise Ca ve P'ce zengin olduğu EK-1'de verilen EDS analizlerinden anlaşılmaktadır. Yüzeyi sardığı için pasivasyon tabakası oluşturduğu düşünülen proteinlerin, kaplamaların arasında yer alan kılcal çatlakları doldurduğu ve bu nedenle de korozyona karşı daha dirençli hale geldiği düşünülmektedir.

Vücut içi uygulamalara yönelik üretilen kalıcı ya da geçici implant malzemelerin biyouyumluluk analizlerinde canlı hücreler ile etkileşimleri ve biyokimyasal aktiviteleri malzemenin kullanılabilirliğinin tespitinde önemlidir. Tıbbi cihazların güvenilirliklerini düzenleyen ve ülkemizde de kabul gören EN-ISO 10993 numaralı standart kapsamında bir biyomalzemenin canlılarda kullanılabilirliğinin onaylanması biyomalzemenin fiziksel, kimyasal, mekaniksel ve biyolojik uyumunun tespit edilmesi ile elde edilen sonuçların

mevzuatta belirlenen kabul edilebilir sınırlarda kalması gereklidir. Belirtilen standart biyoyoumluluk analizlerinin detaylarını belirten ve TSE tarafından kabul gören 20 alt başlıktan oluşmaktadır (Henüz TSE’de yayınlanmamış alt başlıkları da mevcuttur). Standart kapsamında önerilen test stratejisi non-biyolojik analizlerle başlamakta olup, biyolojik analizlerde, ex vivo, in vitro ve deneklerde in vivo (ve/veya in situ) analizler sırasını takip etmektedir. Malzemenin türüne göre biyolojik analizlerin hepsi ya da bir kısmının yapılması yeterli olarak kabul edilmektedir. Biyolojik uyum analizlerinin içerisinde en önemli analizlerden biri olan ve ilk olarak yapılması tavsiye edilen analizlerden in vitro sitotoksitate analizleri, malzemenin canlı hücreler ile etkileşimini belirlemede önemli bilgiler vermektedir.

MTT, 1983 yılında memeli hücrelerinin hayatta kalmalarını ve proliferasyonlarını belirlemek için kantitatif kolorimetrik bir ölçüm olarak Mosmann tarafından önerilmiştir. Günümüzde, in vitro biyoyoumluluk analiz standartlarını belirleyen in vitro hücre canlılığını belirlemeye dayalı EN-ISO 10993-5 standardı kapsamında hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz aktivitelerini ölçmeye dayalı sitotoksitate analizlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Mosmann, 1983). MTT testinin temelini, proliferen olan hücrelerin durgun fazdaki hücrelerden daha yüksek mitokonriyal dehidrogenaz aktivitesi göstermesi oluşturur. Ayrıca reaksiyon, mitokondrisi bozulmamış, yaşayan ve yeterli oksijeni bulunan hücrelerde gerçekleşir. Bundan dolayı bu test hücrelerin farklı metabolik oranlarını ölçmek için uygundur (Höper, 1997). Hücrelerin canlılığının fazla olması, mitokondriyal aktivitenin artmasına neden olacağından, hücre canlılığını takip etmek içinde kullanılan bir yöntemdir. Bu nedenle in vitro araştırmalarda, örnek içerisindeki artan hücre sayısını belirlemek için uygulanabilir.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen MTT analizlerinde implant numunelerinin hepsinin hücre proliferasyonunu desteklediği görülmektedir. Ancak, aynı hücre sayısı ile başlanan MKH ve OB kültürlerinde canlılık oranlarının grafiksel olarak aynı deseni oluşturmakla birlikte farklı seviyelerde olduğu görülmüştür. Bu durum genel olarak ilik içeren kemiğin anatomik ve sitolojik yapısı ile uyum göstermektedir. Kemik dokusu, dış kısımda dokuya şeklini veren mineralize hücre dışı matriks (HDM) içerisine gömülü osteojenik hücrelerden (osteoblast, osteosit, osteoklast) oluşmaktadır (İnsal ve Pişkin, 2017). İç kısmında ise bir boşluk bulunmakta ve bu kavite içerisinde kemik iliği bulunmaktadır. Kemik iliği kök hücreler ve progenitör hücreler bakımından zengin bir içeriğe sahiptir. Kan

hücreleri, kemik iliğinde yoğun olarak bulunan hematopoetik kök hücrelerden kemik iliğinde üretilerek kan akımına verilmektedir. Ayrıca, nispeten daha az miktarda bulunan stromal (mezankimal) kök hücreleri de kemik iliğinde kök hücre nişi içerisinde lokalize olmuştur ve hücre döngüsünde durgun fazda bulunur. MKH'ler bağ dokusu hücrelerine farklılaşabilen multipotent özellikte kök hücrelerdir. Uyarılmaları halinde asimetrik bölünme ile çoğalarak bir kısmı ihtiyaç olan dokuya giderken, kalan kısmı niş içerisinde durgun fazda lokalize olarak varlığını korur. Bu nedenle MKH ilik içerisinde ve kemik dokuya yakın belirli bölgelerde sınırlı sayıda bulunmaktadır. Kök hücre nişi, MKH'leri fenotipik farklılaşmaya uğramadan durgun fazda yaşamsal faaliyetlerine devam etmeleri için koruyucu bir görev üstlenir (Emin, 2012).

Yürütülen çalışmalarda MKH kültürlerinde hücre proliferasyonun fazla artış göstermemesi doğal süreçle benzerlik göstermektedir. Hücreler kendi niş ortamlarını oluşturup, bölünmek için uyarılmadıkları sürece durgun fazda kalma eğilimindedir. Durgun fazda ise mitokondriyal aktivite minimum seviyededir (Höper, 1997). Grafikselsel olarak aynı deseni oluşturan osteojenik indüksiyon altında OB kültüründe hücre canlılığının tüm numunelerde arttığı görülmüş olup, AZ91 alaşımlarına uygulanan kaplamaların hücrelerin fenotipik özelliklerini destekleyerek çoğalmalarını ve 28 günlük kültürde dokulaşmalarını teşvik ettiğini göstermektedir.

Vücut içi implant çalışmalarında, biyolojik sabitlemeyi desteklemesi, doku-malzeme arayüzey uyumunu artırması nedeniyle doku ile arasında bağ oluşumunu destekleyen ve doku ile temasta bulunan ara yüzeyinde spesifik tepkimeler yoluyla kuvvetli bağlar oluşturabilen biyoaktif malzemelerin kullanımı tercih edilmektedir (Davies, 1991; Hench ve Ethridge, 1982). Hidroksiapatit ve biyoaktif camlar, biyoaktif seramik malzemeler olarak kemik dokuya yönelik biyomalzeme üretiminde yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu yaklaşımdan yola çıkarak hazırlanan malzemelerin yüzeylerinde, kemiğe fiziksel ve kimyasal olarak benzerlik gösteren yapıları oluşturmak amacıyla HA kaplamalar kullanılmıştır. Ayrıca, implantasyon sonrasında radyolojik takibi mümkün kılması ve antimikrobiyal özelliği nedeniyle Ta₂O₅, hibrit kaplama içerisinde HA ile birlikte kullanılmıştır. Kontrol olarak da saf Ta₂O₅ ve saf HA kaplamalar da oluşturulmuş ve test edilmiştir. Numunelerin fizyolojik tampon çözeltiler içerisindeki davranışları PBS ve HBSS çözeltileri ile test edilmiştir. Bu testler sırasında ortam pH'sinin 3 ila 6 saat aralığında 7,4'ten 14'e kadar bazik yönde değiştiğinden bulgular bölümünde bahsedilmiştir. Alkali ortam

kemik mineralizasyonunu teşvik etmekle birlikte aşırı alkali ortam hücre canlılığına zarar verebilmektedir. Farklı nedenlerle plazma pH değerinin 7,2-7,4 aralığına düşmesine bağlı olarak kemik dokunun asidoza uğraması ile doku pH'sının 7'nin altına düşmesi, kemik dokuda osteoklast aktiviteyi artırarak doku yıkımına neden olmaktadır. Asidik pH, osteoklastları aktive ederek kemikte demineralizasyonu ve doku yıkımını artırmaktadır (Chen vd., 2020; Frassetto vd., 2018; Galow vd., 2017). Buna karşın ortam pH değerinin 7,4-7,6 aralığında olması durumunda ise ALP aktivitesinde artış olduğu, demineralizasyonun nerdeyse gözlenmediği bulunmuştur. Yüksek pH değerlerinde kemik rezorbsiyonunun azaldığı ve osteoblastik aktivitenin artarak kollajen sentezini uyardığı bulunmuştur. Bu bakımdan pH değerinin asidoz ya da alkaloz altında olması kemik dokunun metabolizması için düzenleyici etki gösterir. Yapılan araştırmalarda vücuttaki birçok dokuda olduğu gibi kemik dokunun alkaloz altında olmasının ortam pH'ını düzenleyerek asit-baz dengesini sağladığı bildirilmiştir. Bu mekanizmada ise organizmadaki karbonat tamponlarının etkin rol aldığı gösterilmiştir (Arnett, 2008; Frassetto vd., 2018; Galow vd., 2017). Ortam pH değerinin alkali olmasında diyetle alınan kalsiyum iyonlarının etkisi de önemli olup, kalsiyum-fosfat yapılarının alkali pH'larda çözünürlüğünün düşük olması da osteogenezi teşvik etmektedir (Arnett, 2008; Chen vd., 2020).

Numunelerin ön çalışma olarak hücre ile etkileşimleri sırasındaki ortam değişimleri dikkate alınarak, numunelerin daha fazla organik katkı içeren temel besin sıvısı DMEM-LG içerisindeki davranışı 28 gün süreyle takip edilmiştir. Bu süreçte numune yüzeyindeki çökeltilerin diğer fizyolojik tamponlardaki oluşumlardan daha az olduğu, numune bütünlüğünün korunduğu ve pH değişimin maksimum 11,2 olarak değiştiği görülmüştür. pH değişimin ortamdaki iyonlar ve su ile numune kaplamalarının reaksiyonu sonucu ortama salınan bazik iyonlardan kaynaklandığı, çökeltilerin FTIR spektrumları ile örtüşmektedir (Şekil 5.23 ve Şekil 5.24). FTIR spektrumlarında karbonat ve fosfat yapılarının numune yüzeyinde çökelti oluşturduğu daha önceden tespit edilmiş olup, bu sonuç pH değişimin nedenini açıklamaktadır. Ayrıca, ICP-OES ile iyon salım konsantrasyonlarındaki değişim de bu sonuçlarla örtüşmektedir. Bunun yanısıra ortam pH değerinin alkali değerlerde olmasının, literatürle uyumlu olarak hücresel çalışmalarda osteogenezi daha fazla desteklediği fenotip belirleme analiz sonuçları ile desteklenmektedir. Hücresel çalışmalarda, ortamın tamponlama kapasitesini 24 saatlik sürede genel olarak korunduğu çözeltideki pH indikatörü ile tespit edilmiştir. Bu durumun oluşan serbest iyonların hücreler tarafından matriks

yapısında kullanılmak üzere emildiğinden, ortamdaki iyon derişiminin azalmasından kaynaklandığı düşünölmektedir.

DMEM-LG içerisinde 28 gün inkübe edilen örneklerden 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerde numuneler alınarak ortamda bulunabilecek önemli elementler dikkate alınarak Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Al^{+3} , PO_4^{-3} , Zn^{+2} iyonları için iyon salım takibi yapılmıştır. Doğal kemik dokusunda hidroksiapatitin yüzeyindeki iyonlar hidrate edildiğı için kristalin etrafı su ve iyonlardan oluşmuş bir tabaka ile kaplanmıştır. Hidratasyon kabuğı adı verilen bu tabaka vücut sıvıları ile kristal arasındaki iyon alışverişinin gerçekleşmesini sağlar. Bu bakımdan HA içerisinde bulunduğı bilinen iyonların belirli oranlarda ortama salındığı tespit edilmiştir. Ortamda serbest olarak tespit edilen sodyum iyon miktarının diğeri iyonlara kıyasla yüksek konstrasyonlarda bir salım kinetiğı göstermesinde HA içerisindeki kristal örgüde yer alan zengin sodyum içeriğı rol almaktadır (Davies, 1991; Tanahashi vd., 1994). Diğeri numunelerden özellikle Ta_2O_5 numunelerinde sodyum içeriğinin fazla olmasının, kaplama işleminden önce altlık malzemelere uygulanan ön işlemlerde kullanılan sodyumlu bileşiklerden kaynaklandığı düşünölmektedir.

AZ91 içerisinde %9 alüminyum bulunmaktadır. Bu bakımdan ortama salınabilecek Al^{+3} iyonları (sulu ortamda $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$ şeklinde hidratlaşmış olarak çözünür) ayrıca test edilmiştir. Sağlıklı bir insanda vücuttaki toplam alüminyum seviyesi 30-40 mg kadardır. Genel olarak alüminyum gıdalarla alınmakta olup, sadece % 0,5-1'i emilime uğradıktan sonra kalan büyük kısmı gaita ile atılır. Emilen Al'nin %80'i transferin taşıyıcısı proteinine bağlanmakta, serbest kısım ise glomerüllerden filtre edilerek atılmaktadır. Sindirim sisteminden direk kana geçen alüminyum miktarı %1'den azdır. Alüminyum normal yollarla sindirim sisteminden alındıktan sonra serumda çok az miktarlarda bulunmaktadır (0,002 ppm). Alüminyumun büyük bir kısmı kemik ve akciğer olmak üzere çeşitli dokularda depolanmaktadır (Bakar ve Baba, 2009; Karakullukçu vd., 1994; Malluche ve Faugere, 1985). Alüminyumun dokulardaki toksikolojik etkisi en fazla sinir sistemi ve beyinle ilişkilendirilmiştir (Bakar ve Baba, 2009; Freundlich vd., 1985; Krewski vd., 2007). Bununla birlikte uzun süreli alüminyum maruziyetinde, kemikte birikme gösteren alüminyum kemik dokuda da toksik etki göstermektedir. Alüminyumun kemik dokuda birikmesi osteomalasiye neden olmakta ve bu durumda kemik kitlesinde azalma, lamellar osteodin hacminde artış, düşük osteoblastik ve osteoklastik indeks, düşük mineral birikim hızı, düşük kemik oluşum hızı gelişmektedir (Malluche ve Faugere, 1988; Winterberg vd., 1984). Yürütelen tez

kapsamında AZ91 alaşımının farklı seramik malzemelerle kaplaması ile üretilen implant numunelerindeki Al^{+3} iyon konsantrasyonu sadece 1. gün örneklerinde tespit edilmiştir. Tespit edilen salınım miktarıda 500 μl 'lık toplam çözelti hacminde Ta_2O_5 için gözlenmezken, HA için 0,016 ppm, %25 Hibrit için 0,101 ppm, Tabakalı için 0,334 ppm olup, kan serum düzeyiyle karşılaştırıldığında tolere edilebilir dozdadır. Ayrıca, diğer zaman noktalarında herhangi bir Al^{+3} iyon salımı gerçekleşmemiştir ve bu durumun kronik bir iyon salımına bağlı toksisiteye neden olmayacağı aşikârdır. Ayrıca, kemik dokuda alüminyum birikmesine bağlı olarak bildirilen semptomlar, 28 günlük MKH ve OB kültürlerinde izlenmemiştir.

İnsan vücudunda toplam magnezyum oranı yaklaşık 20-28 gramdır. Magnezyum esas olarak kemiklerde depolanmaktadır ve plazmada bulunan magnezyuma dönüşemez. Depo magnezyumun %60'ı kemikte kalsiyum ve fosfatla beraber bulunur (Görmüş ve Ergene, 2004; Stahl vd., 2017). Magnezyumun iyon salım değerlerine bakıldığında 1. günde yüksek miktarda salınmasına karşın ilerleyen günlerde çözünmüş Mg^{+2} seviyesinin düştüğü görülmektedir. Bu durumun, literatür ile uyumlu olarak magnezyumun Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonları ile birlikte tutulduğu ve çökerek numune yüzeyinde birikmesinden ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca, magnezyum ve çinko iyonları ALP enziminin kofaktörü olup, enzim aktivitesi için gereklidir. Ortamdaki magnezyum iyonları sadece malzemeden kaynaklı olup, bu durum ALP aktivitesinin oluşmasını desteklemektedir.

Ca^{+2} iyonlarının ve PO_4^{-3} iyonlarının analizlerinde, bu iyonların örneklerden ortama salımının olduğu, bununla birlikte vasatta bulunan çözünmüş türlerinin ise çökerek ayrıldığı köre göre değerlendirilmiştir. Bu durumda Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarının çözünürlüğünde dinamik bir denge kurulduğunu, denge yönünün ise katı madde oluşumu yönünde baskın olduğunu göstermektedir. Bu durum numune yüzeylerinde yeni seramik çöküntülerin oluşmasını açıklamaktadır. SBF kullanılarak apatit çekirdeklenmesi uygulamalarında, altlık malzemelerin mikro ve mezo gözenekliliğe sahip olmasının ve de negatif yüklü gruplar içermesinin apatit çekirdeklenmesini kolaylaştırdığı bulunmuştur (Pereira vd., 1995; Pereira ve Hench, 1996). Ayrıca, moleküler seviyede de olabilecek yüzey kusurlarının yine apatit oluşumunu indüklediği ileri sürülmektedir (Hench, 1991). Yapılan çalışmalarda, ortamdan Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarının çekilerek numune yüzeyinde ve çatlak bölgeler civarında yoğun olarak çökmesi literatürle benzerlik göstermektedir. Ayrıca, kalsiyum fosfat bileşikleri doğal kemiğin yapısında bulunmaktadır ve izole hücreler kültüre alındıkları ilk günden itibaren

indüksiyona alındıklarında kendi HDM'lerini oluşturmaya başlamaktadır (Declercq vd., 2005; Ito vd., 2015). Kemik benzeri dokuların oluşmasında mineralizasyon son derece önemli olup, kemik matriksinin oluşması için gereklidir (İnsal ve Pişkin, 2017). Ortamdaki serbest iyonlardan çöken kalsiyum fosfat yapılarının kemik-benzeri dokuyu oluşturmak üzere kullanıldığı kalsiyum birikimi için erken dönem markörü olan ALP ile geç dönem markörü olan vK boyamaları ile de doğrulanmaktadır (Chen vd, 2020). Ayrıca, osteokalsin proteinlerinin oluşumu da ortamdaki Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarının doku içerisine emilimini uyardığını göstermektedir.

Osteogeneizde biyomarkör olarak kullanılan alkalen fosfataz (ALP), kemik sialoproteini II, osteonektin ve kemik morfojenik proteini-2 öncü olarak sentezlenirken, osteopontin ve osteokalsin sonraki evrelerde sentezlenmektedir (Jaiswal vd., 1997; Zhu vd., 2001). ALP, kemik metabolizmasında osteoblastların farklılaşmasıyla bağlantılı olan kemik matriks enzimidir. Kemikte bulunan ALP, ortama serbest fosfat iyonları açığa çıkartarak matriks oluşumu sırasında kalsifikasyon metabolizmasında rol almaktadır (Stein vd., 1990). Bu nedenle ALP aktivitesi, osteoblast farklılaşması ve osteojenik özelliklerinin belirlenmesinde en sık incelenen parametre olup, osteojenik aktivitenin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Chen vd., 2020; Ohbayashi vd., 1999). ALP analiz sonuçlarında OB ve MKH kültürlerinde grafiksel olarak benzer bir desen elde edilmiştir. Bu durum implant numunelerinin ALP aktivitesini uyarmada uyarıcı ilk unsur olduğunu göstermekle birlikte, kontrasyon artışının dolayısıyla kemikleşmenin teşvikinde tam osteojenik indüksiyon uygulanması gerektiğini göstermektedir. Analizlere göre OB kültürlerinde tüm numunelerin kemik mineralizasyonunu uyardığını ancak HA, Ta_2O_5 ve %25 Hibrit numunelerde daha fazla olduğunu göstermektedir. Ayrıca implant numuneleri haricinde ortamda herhangi bir osteojenik indüksiyon kullanılmayan MKH kültürlerinde de kısmen ALP aktivitesi görülmesi, geliştirilen implant numunelerinin osteojenik fenotipi desteklediğini ve osteoindüktif etkiye sahip olduklarını göstermektedir. ALP, bazik sistemlerde fosfat monoesterlerin hidrolizini katalizleyerek aktivite sağlayabilmesi için magnezyum ve çinkoya ihtiyaç duyan glikoprotein yapıda membran bağlı bir metalloenzimdir (Warnes, 1972). ICP-OES sonuçlarına göre malzemeden ortama salınan Mg ve Zn iyonları osteoindüktif ajan olarak etkiyerek ALP aktivitesi üzerinden kemikleşmeyi desteklemektedir.

Biyomalzeme olarak üretilen implantların osteojenik kapasitesini belirlemede malzeme yüzeyindeki ve yüzeyde oluşan doku benzeri yapıdaki mineralizasyonu belirlemek en güvenilir yöntemlerden birisidir. Bu amaçla Alizarin Kırmızı (AR) ve von Kossa boyaması gibi histokimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (Baykan vd., 2014; Koç vd., 2008). AR ve vK boyaları mineral kristallerine spesifik olarak bağlanabilmektedir. Yapılan analizlerde AR ve vK boyamalarının haftalık periyotlarla uyumlu olarak OB ve MKH kültürlerinde artış gösterdiği, dolayısıyla doku benzeri yapılarda mineralizasyonun arttığı görülmüştür. Ancak bu mineralizasyonun OB kültürlerinde belirgin olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Kemiğin organik yapısında önemli olarak kollajen proteinleri ve non-kollajen proteinler bulunmaktadır. Protein bileşenlerden en önemlisi ana kollajen bileşeni olan kollajen-tip-1 olup, kollajenden sonra kemik matriksinde en fazla bulunan (%10-20) ve non-kollajen protein olan osteokalsin gelmektedir (İnsal ve Pişkin, 2017; Park vd., 2013). Osteokalsin küçük bir protein olup, yapısında karboksillenmiş üç glutamik asit kalıntısı içermesi nedeniyle kemik gama-karboksiglutamik asit içeren protein (BGLAP) olarak da adlandırılmaktadır. Kollajene ve HA'ya bağlanabilmektedir. Osteoblastlar, odontoblastlar tarafından sentezlenmektedir ve kemik dokunun hidroksiapatit oluşturmak üzere kalsiyum ve mineral bağlamasında ve iyon dengesinin sağlanmasında görev almaktadır. Bu nedenle kemikleşmenin başlaması ve kemik dokunun yenilenmesinde görev almaktadır. Osteokalsin miktarındaki artış kemik doku mineralizasyonun artışına işaret etmektedir (Koç vd., 2008, 2014; Namıduru ve Tarakçıoğlu, 2011; Park vd., 2013). Yürütülen çalışmalarda OB ve MKH gruplarının her ikisinde de anti-kollajen-tip-1 boyamasından pozitif sonuçlar alınmış, bunlardan OB kültürlerinde boyama yoğunluğu periyodik zaman noktaları ile uyumlu bir artış gösterirken MKH kültürlerinde sadece ilk haftalarda ve belirli bölgelerde bir boyama yoğunluğu tespit edilebilmiştir. OB kültürlerinde kollajen-tip-1 miktarındaki artış doğrudan kemik doku gelişimiyle ilişkilendirilerek literatürle uyumluluk göstermektedir (Arnett, 2008; Chen vd., 2020; İnsal ve Pişkin, 2017). Osteokalsin sentezinin de OB ve MKH kültürlerinde kollajen-tip-1 sentezine benzer şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Osteokalsin miktarındaki artış doğrudan ALP aktivitesi ile kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonundaki düşüş ile ilişkilendirilebilir. Artan ALP aktivitesi, fosfat iyonlarının hücreler tarafından tutulmasına yardımcı olurken osteokalsin proteini, yapısındaki gama-karboksiglutamik asit sayesinde konformasyonel değişim göstererek kalsiyum iyonlarının fosfat iyonları ile birlikte hidroksiapatit benzeri yapılar oluşturmak üzere doku üzerinde

kollajen molekülleri ile bağlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu aşamada magnezyum iyonları da kalsiyum iyonları ile birlikte yapıya alınmakta, iyonik yapıların çözünürlük dengesi ICP sonuçlarında görüldüğü gibi, dinamik dengede tutulmaktadır.

MKH kültürlerindeki gözlemlenen kollajen sentezinin ise diğer analiz sonuçları da dikkate alındığında iki şekilde yorumlanmıştır. Birincisi; kollajen tip-1 molekülleri yaygın olarak hem bağ dokusunda hem de diğer dokularda bulunmaktadır. Çok sayıda somatik hücreye farklılaşma kapasitesine sahip MKH'lerin de kollajen sentezleyebileceği ve kendisine in vitro ortamda niş oluşturmak üzere bir matriks sentezi yapabilmesi literatürle uyumludur. MKH'ler eşlenik hücrelerin yer aldığı hücreli nişte ya da sadece MKH'lerin kollajen lifler ve proteoglikanlardan oluşan bir matriks içerisinde bulunduğu HDM nişinde lokalize olur. Bilindiği üzere MKH'ler, niş ortamında durgun fazda bulunduklarından çoğalma döngüsüne, uyarılmadıkları sürece girmemektedirler (Li ve Xie, 2005). Bu durumda diğer metabolik faaliyetlerini de yerine getiremediklerinden azalan mitokondriyal aktivite nedeniyle matriks sentezinin dokulaşma boyutunda devam etmemesi ve MTT ile H&E boyaması sonuçlarındaki gibi hücre proliferasyonunun düşük seviyede kalması olağandır. İkinci durumda ise implant malzemelerinin osteojenik indüksiyon özelliklerinin bulunduğu ALP, AR, vK ve anti-osteocalcin boyamaları ile açıkça gösterilmiştir. Plastisitesi yüksek olan MKH'lerde hücre ekim anında uyarıldıklarından proliferasyona başlamış olup, bu aşamada belirli bir kısmının osteojenik olarak farklılaştığı fenotip belirlemeye yönelik analizlerle belirlenmiştir. Bu durumda farklılaşabilen hücreler belirli oranda osteojenik aktivite göstererek kemiğe özgü markörlerin sentezini gerçekleştirmiştir. Ancak, bu farklılaşma diğer ortam koşulları ile desteklenmediğinden kısıtlanmış ve dokulaşma tamamlanmamıştır. Sınırlı bölünme yeteneği olan primer hücreler, MKH'lerden in vitro koşullarda farklılaşma ile elde edildiklerinde, hücreler proliferasyonunun biyokimyasal olarak desteklenmemesi durumunda in vitro kültürlerde sınırlı bir süre canlı kalabilmektedir. Bu nedenle de ilerleyen zaman noktalarında hücre sayılarında azalma ile markör moleküllerin miktarında düşüş gözlenmektedir.

Biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler, farklı tekniklerle hazırlanan implant malzemelerin osteoindüktif etki gösterdiğini ve hücreler için sitotoksik olmadığını açıkça göstermiştir. Ayrıca, potansiyel kemik implantı olarak kullanılması planlanan malzemelerin hem kemik iliği hem de doğal kemik dokusu ile etkileşimde olacağı düşünülerek deney planı oluşturulmuştur. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar malzemelerin hepsinin kiMKH ile

uyumlu olduğunu ve sınırlı bir kısmı hariç onları farklılaştırma prosesine sokmadan, kendi nişlerini oluşturmalarını desteklediğini göstermiştir. Ayrıca sıçan kalvaria kemiğinden izole edilen OB hücrelerini, yeni kemik dokusu oluşturmak üzere teşvik ettiği ve kollajen-tip-1 sentezi ile HDM'nin organik fazını oluştururken osteokalsin sentezini artırarak mineralizasyonu teşvik ettiği gösterilmiştir.

AZ91 alaşımlarının Ta₂O₅ ve HA ile kaplanması sonucu üretilen ve karşılaştırmalı olarak analizlenen implant malzemelerin SEM analizlerinde, HA ve Ta₂O₅ kaplamaların farklı morfolojilere sahip olduğu belirlenmiştir. Morfolojik farklılıkları hücreler ile olan davranışlarının takibini kolaylaştırmıştır. Söz konusu seramiklerden Ta₂O₅'in hücreler ile doğrudan bağlanmazken HA'nin bağlanabildiği SEM mikrograflarında açıkça görülmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda Ta₂O₅ biyoinert yapıda olup, etrafında hücrel bir kapsül oluşmaktadır. Ta₂O₅ hücrelerle interaksiyonu açısından biyoinert olarak sınıflandırılabilmesine karşın osteoindüktif etkisi açısından biyoaktiftir. HA seramikleri yoğunlukları ve fiziksel şekillerine bağlı olarak hücrelerle etkileşimleri açısından hem biyoinert hem biyoaktif hem de biyobozunur özellikte olabilir. Tez kapsamında üretilen HA yüzeylerde ise hücrelerin yüzeye bağlanarak malzeme yüzeyinde dokulaşabildiği, ICP-OES sonuçlarına göre de çözünür olmadığı sonuç olarak biyoaktif yapıda olduğu belirlenmiştir. Yapılan biyokimyasal ve histopatolojik analizler açıkça göstermektedir ki üretilen HA yüzeyler etkin bir osteoindüktif etkiye sahiptir.

İn vitro çalışmalarının tamamlanması ile kimyasal, fiziksel ve mekanik karakterizasyonu yapılarak özellikleri yeterli görülen %25 Hibrit ve Tabakalı kaplanmış AZ91 numuneleri, biyolojik uyumluluk testleri sonucunda da biyoyumlu olarak belirlenmiştir. Ayrıca, Ta₂O₅ ve HA kullanılarak üretilen tabakalı ve hibrit kaplamalarda, bu malzemelerin tek başlarına kullanılmalarından kaynaklı olumsuzlukları giderildiği düşünülmektedir. Bu bağlamda Ta₂O₅ yapının antimikrobiyal özelliklerini iyileştirirken HA, malzemenin biyoaktif özelliğini artırmıştır. Tabakalı ve %25 Hibrit kaplamalarda benzer sonuçlar alınmakla birlikte, olumlu özelliklerdeki artışın %25 Hibrit kaplamalarda bir miktar fazla olduğu tespit edilmiştir.

İn vitro sonrası daha ileri biyoyumluluk analizleri için önceki çalışmaların genelinde en iyi performansı sergileyen numuneler (%25 Hibrit ve Tabakalı kaplı) ve bunun kontrol numuneleri (kaplanmamış AZ91, Ti6Al4V ve Negatif kontrol) için in vivo çalışmalar New

Zealand erkek tavşanlara implantasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Postoperatif 6 ve 12 haftalık zaman periyotlarında takip edilerek *in vivo* biyouyumluluk (yerel etkiler, sistemik toksisite, irratasyon vd) ve radyolojik olarak görünebilirlikleri (radyopaklık) test edilmiştir. Elde edilen implant materyallerin radyopaklıkları röntgen sonuçları ve bunlardan hesaplanan histogram bulguları ile değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda standart Ti6Al4V implant materyali ile kıyaslandığında %25 Hibrit ve Tabakalı örneklerin her ikisinin de röntgende net bir şekilde görüntülenebildiği ancak histogram analizlerine göre Tabakalı örneğin daha radyopak olduğu gözlenmiştir. AZ91 Mg alaşımı ise biyobozunurluğuna bağlı olarak radyopasitesinin düşük olduğu düşünülmektedir. Histogram bulguları ve röntgen görüntüleri beraber değerlendirildiğinde özellikle implant çevresindeki doku ile sağlıklı uzak bir bölgedeki doku dansite olarak kıyaslandığında en olumlu davranış sergileyen grup özellikle 6 haftalık AZ91 ve 12 haftalık %25 Hibrit kaplı örnek olmuştur. Bu numunelerde implant çevresindeki dokuda kayıp olmadığı gibi doku yoğunluğunda artış söz konusu olmuştur. Esasında Tabakalı örnek radyopaklıkta %25 Hibrit örneğinden daha görünür olsa da kar-zarar dengesine bakıldığında %25 Hibrit örneği yeterli bir görünürlüğün yanı sıra doku iyileşmesinde de oldukça etkili bir davranış sergilemiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan biyokimyasal analizlerin sonucuna göre, kanda kalsiyum seviyelerinin kontrol Ti6Al4V, %25 Hibrit ve Tabakalı örneklerde 6. ve 12. hafta sonuçlarının Negatif kontrol ve kaplanmamış AZ91 örneklerine kıyasla oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer biyokimyasal parametrelere bakıldığında kanda sodyum, potasyum, klor ve üre azotu seviyelerinde 6. ve 12. hafta karşılaştırmasında hiçbir grupta anlamlı derecede bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Mg içerikli implantların kanda Mg değerlerine etkisi ve böbrek üzerinde herhangi bir toksikasyona neden olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan magnezyum ölçümlerinde, en yüksek seviyede yükselmenin kaplanmamış AZ91 örneğinde olduğu, bunu %25 Hibrit örneğinin ve Tabakalı örneğin takip ettiği görülmüştür. Ancak elde edilen verilerin daha önce yapılan literatür bilgileri göz önünde bulundurulduğunda kanda ve böbrekte herhangi bir toksikasyonu gösterir nitelikte olmadığı belirlenmiştir (Ilhan vd., 2014).

Yapılan *in vivo* deneyler sonrasında alınan doku örneklerinin histopatolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Bu amaçla standart H&E, AR, vK boyamaları ve bunların yanı sıra Safranin o ve Alcian Blue boyamaları da gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı ve proliferasyonu için yapılan H&E boyama sonucunda en fazla ve yoğun boyama %25 Hibrit örneğinde görülmüştür. Kalsiyum birikimi için erken ve geç dönem markörü olan AR ve vK

boyamalarına bakıldığında özellikle de 12. haftanın sonunda yine %25 Hibrit kaplamada Tabakalıdan daha yoğun bir boyanma söz konusu olmuştur. HDM yapısında yer alan proteoglikanların varlığını Mavi renge dönüştürerek tespit eden Alcian Blue boyamasının %25 Hibrit örneğinde çok daha yoğun olduğu görülmüştür. Proteoglikan molekülleri hücre içerisinde sentezlendikten sonra hücre dışına çıkarılarak HDM yapısına katılırlar ve HDM içerisinde genel olarak hücre çevresinde (teritoryal matrikste) lokalize olurlar. Proteoglikanlar insan bağ dokusundaki zemin maddesinde bulunurlar. Kıkırdakta sentezlenebilirler ve hücrelerarası dolgu maddesi olan hayvansal ekstraselular matriksinin büyük bir bileşenidir. %25 Hibrit kaplanmış örnekte etkili bir boyama söz konusu olup özellikle Tabakalı kaplı örnekte daha zayıf bir boyama söz konusu olmuştur. Kolajen varlığını tespit etmede Safranin-O ile yapılan histoloji boyamaları kullanılmıştır. Hücreler farklılaşmaya başladıklarında kendi HDM'lerini oluşturmaya başlarlar. Yeni HDM oluştururken kolajen molekülleri hücre içerisinde sentezlenmeye başlar ve daha sonra hücre dışına taşınır. İlerleyen günlerde ise üretilen kolajen lifler hücrelerarası bölgede (intertitoryal matrikste) sınırlandırılmış olurlar. Hücre çekirdekleri siyah, sitoplazma gri-yeşil ve hücre granülleri yani kolajen molekülleri ise turuncu-kırmızı tonlarında boyanırlar. Safranin-O ile etkileşen her bir örnek için hem yeşil hem kırmızı tonları fazlasıyla açığa çıkmıştır.

Zaman periyotlarında alınan kan örnekleri, radyolojik incelemeler ve histopatolojik analizler değerlendirildiğinde, önceki çalışmalarda da diğerlerine nazaran optimum performans sergileyen %25 Hibrit kaplı numune in vivo deneylerde de son derece iyi davranış sergilemiş ve diğer analizlerle de orantılı sonuçlar elde edilmiştir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasının altlık malzemeleri AZ91 Mg alaşım tozlarından toz metalürji yöntemi ile sıcak preste 350 MPa basınç ve 400°C sıcaklıkta inert ortamda %99,7 teorik yoğunlukta üretilmişlerdir. Kaplama işlemleri için üretilmeye seçilen basınç ve sıcaklık parametresi kullanılarak devam edilmiştir. Ta₂O₅ kaplı, HA kaplı, Tabakalı ve %5-10-25 Hibrit kaplı AZ91 Mg alaşımları optimum kaplama parametreleri tespit edilerek kaplanmıştır. Yapılan kaplamalardan Ta₂O₅ kaplı, HA kaplı, Tabakalı ve %5-10-25 Hibrit kaplı numuneler istenildiği şekilde yüzeyde elde edilebilmiştir. Tüm kaplama tabakaları min. 4 mikron kalınlığında olup yüzeylerde en az 3-6 katman kaplamalar yapılarak, HA kaplı numunede ≈4 mikron, Ta₂O₅ kaplı numunede ≈15 mikron, hibrit kaplamalarda ortalama ≈15 mikron ve tabakalı kaplı numunede ise ≈55 mikron kalınlıkta kaplamalar elde edilmiştir.

Yapılan SEM analizlerinde, kaplama yüzeylerinin homojen karakteristikte olduğu, Mg alaşımlarının yüzeylerini tamamen kapladığı gözlemlenmiştir. Kaplama yüzeylerinde termal gerilmeler ve kurutma ve kalsinasyon sırasında çözücülerin uçması sebepleriyle çatlaklı bölgelerin olduğu ancak birden fazla daldırma sayısı ile yüzeyler kaplandığı için çatlak bölgelerin sonraki daldırmada kaplama çözeltisi ile kaplandığı gözlemlenmiştir. Böylece altlık alaşım ile ortam ilişkisinin kesildiği tespit edilmiştir. Kesitlerden alınan SEM ve EDS analizlerinde, kaplama tabakalarına ait elementlerin beklenen şekilde tespit edildiği, kaplama tabakaları arasında artan daldırma sayısının herhangi bir olumsuz etkisinin gözlemlenmediği görülmüştür. Ta₂O₅ kaplı ve HA kaplı numuneler, Tabakalı ve %25 Hibrit kaplı numuneler ile karşılaştırıldığında, en iyi arayüzey uyumunun Tabakalı ve %25 Hibrit kaplamalarda gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Kaplama çözeltileri, kaplama koşullarında amorf yapıda elde edileceğinden, hazırlanan çözeltilerin doğrulanması ve oluşacak yapının teyit edilmesi için çözeltiler ayrıca kalsine edilerek kristalize edilmiş ve XRD analizleri yapılarak literatürdeki çalışmalar ve ICDD pdf kart numaraları ile eşleştirilmiştir. Antibakteriyel özellik sağlanabilmesi için Ta₂O₅ yapısının amorf yapıda elde edilmesi gerekmektedir ve işlem sıcaklığı olan 400°C’de Ta₂O₅ amorf yapıda elde edilmektedir. FTIR analizleri ile kaplama yapılarında ve arayüzeylerde elde edilen bağlar da doğrulanmıştır.

Çizik testleri sonucunda kaplamaların mekanik özellikleri belirlenmiş ve SEM analizleri ile ölçülen kaplama kalınlıkları penetrasyon derinlikleri karşılaştırılarak çizik testleri ile doğrulanmıştır. Oluşan çizik izlerinden SEM görüntüleri ve EDS analizleri alınarak uygulanan yük karşısında kaplama tabakalarının aşınıp altlık malzemeye geçişin sağlandığı kritik yük değerleri tespit edilmiştir. Mekanik özellik bakımından karşılaştırıldığında max 5 N uygulanan yük ile, ortalama 55 mikron kalınlığa sahip tabakalı kaplamada altlık malzemeye geçiş gözlemlenmemiş, diğer numunelerde ise Ta₂O₅ kaplı numunede 1,08 N, HA kaplı numunede 0,8 N, %5 hibrit kaplı numunede 1,16 N, %10 hibrit kaplı numunede 0,6 N ve %25 hibrit kaplı numunede ise 1,3 N ortalama kritik yük değerlerinde geçiş gözlemlenmiştir. Bu durumda tabakalı kaplamanın penetrasyon derinliğinin kaplama tabakasını aşmadığı ve mekanik özelliklerinin diğer numunelere göre 5 kattan daha fazla üstün olduğu tespit edilmiştir. Çizik izleri incelendiğinde HA kaplı numunenin en derin ve geniş iz genişliğine sahip olması nedeniyle plastik deformasyonun en fazla görüldüğü numune olduğu tespit edilmiştir. Ta₂O₅ bir miktar daha az olsa da plastik deformasyonun yaygın bir şekilde gözlemlendiği fakat %25 Hibrit ve Tabakalı kaplamalarda iz genişlik ve derinliklerinin daha az olduğu tespit edilmiştir.

Gram-pozitif *S. Aureus* ve Gram-negatif *E. Coli* bakterilerine ait kültürler tüm numunelere yapılan bakteri testleri ile gözlemlenmiştir. Ta₂O₅ kaplı numune hariç diğer numunelerde inhibisyon zonu ölçülebilir kaydadeğer sonuçlar vermemiştir. Özellikle üst tabakada HA bulunan numunelerde inhibisyon zonu gözlemlenmemiştir. Ancak hibrit numunelerde, numune etrafını tam çevrelemeyecek şekilde kısmi zonlar mevcut olsa da kabul edilebilir ve ölçülebilir değildir. Ta₂O₅ kaplı numunede ise *E. Coli* bakterisinde 12 mm ve *S. Aureus* için ise 14 mm'lik zon gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Korozyon testleri sonucunda farklı medyum kullanılması çözeltilerin tamponlama kapasitesine bağlı olarak, sonuçları doğrudan etkilediği gözlemlenmiştir. HBSS, DMEM ve DMEM+%10FBS medyumları arasından tamponlama kapasitesi en düşük olan HBSS çözeltisi olduğundan ortam iyon konsantrasyonunun agresifleşmesine ve pH değişimlerine neden olduğundan korozyon hızlarının tüm numunelerde HBSS'te daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Tamponlama kapasitesi daha yüksek olan DMEM ve DMEM+%10FBS çözeltilerinde ise korozyon hızları benzer seyretmiş olup FBS içerikli çözeltide yüzeyde koruyucu etki sağlayarak korozyon hızını daha da düşürmüştür. Ayrıca ortamın tamponlama kapasitesinin artması korozyon hızları arasındaki farkın azalmasını sağlamıştır. En agresif

ortam olan HBSS içinde numuneler kendi arasında karşılaştırıldığında en yüksek korozyon hızının 17,68 mm/yıl değeri ile kaplanmamış AZ91 Mg alaşımında numunede gözlemlendiği tespit edilmiştir. HA kaplı numune 13,47 mm/yıl ile % 23 oranında, Ta₂O₅ kaplı numunede 3,54 mm/yıl ile %80 oranında, %5 hibrit kaplı numunede 3,77 mm/yıl değeri ile %78 oranında, %10 hibrit kaplı numunede 4,48 mm/yıl ile %74 oranında, %25 hibrit kaplı numunede 3,08 mm/yıl değeri ile %82 oranında ve son olarak tabakalı kaplı numunede 2,05 mm/yıl korozyon hızı değeri ile %89 oranında azalma kaydedilmiştir. DMEM çözeltisi içinde yapılan korozyon testlerinde, kaplanmamış AZ91 Mg alaşımının korozyon hızı 13,07 mm/yıl ölçülmüş olup, korozyon hızında HA kaplamada %98, Ta₂O₅ kaplamada %34, hibrit kaplamalarda ortalama %83 ve tabakalı kaplamada ile korozyon hızında %99,7 oranında bir azalma tespit edilmiştir. DMEM+%10 FBS çözeltisi içinde ise minimum korozyon hızı değerleri gözlenmiş olup, kaplanmamış AZ91 Mg alaşımının korozyon hızı 2,32 mm/yıl ölçülmüştür. Korozyon hızlarındaki azalma ise HA kaplı numune için %50, Ta₂O₅ kaplı numune için %24, hibrit kaplamalarda ortalama %13 ve tabakalı kaplamada ise %76 olarak ölçülmüştür. Korozyon test sonuçlarına göre tüm medyumlar değerlendirildiğinde korozyona en dayanıklı kaplamanın tabakalı kaplama olduğu tespit edilmiştir. Tabakalı kaplamada korozyon sonrası alınan SEM görüntülerinde de korozyon türünün homojene yakın tespit edildiği ve kaplama tabakasının bütünlüğünü daha iyi koruyabildiği gözlenmiştir.

Numunelerin ön çalışma olarak hücre ile etkileşimleri sırasındaki ortam değişimleri dikkate alınarak, numunelerin daha fazla organik katkı içeren temel besin sıvısı DMEM-LG içerisindeki davranışı 28 gün süreyle takip edilmiştir. Bu süreçte numune yüzeyindeki çökeltilerin diğer fizyolojik tamponlardaki oluşumlardan daha az olduğu, numune bütünlüğünün korunduğu ve pH değerinin maksimum 11,2 olarak ölçüldüğü görülmüştür. pH değişimin ortamdaki iyonlar ve su ile numune kaplamalarının reaksiyonu sonucu ortama salınan bazik iyonlardan kaynakladığı, çökeltilerin FTIR spektrumları ile örtüşmektedir. FTIR spektrumlarında karbonat ve fosfat yapılarının numune yüzeyinde çökelti oluşturduğu daha önceden tespit edilmiş olup, bu sonuç pH değişimin nedenini açıklamaktadır. Ayrıca, ICP-OES ile iyon salınım konsantrasyonlarındaki değişimde bu sonuçlarla örtüşmektedir. Bunun yanı sıra ortam pH değerinin alkali değerlerde olmasının, literatürle uyumlu olarak hücresel çalışmalarda osteogenezi daha fazla desteklediği fenotip belirleme analiz sonuçları ile desteklenmektedir. Hücresel çalışmalarda, ortamın tamponlama kapasitesini 24 saatlik sürede genel olarak korunduğu çözeltideki pH indikatörü ile tespit edilmiştir.

Yapılan hücre kültür incelemelerinde biyouyumluluk ve sitotoksiste analizlerinde kullanılacak hücrelerin, primer kaynaktan izolasyonu sağlanmıştır. Osteoblast hücreleri hazır satın almak yerine pasajlama yapılarak çoğaltılması yoluna gidilmiş ve doğrudan primer kaynaktan (Wistar Albino Sıçanı) izole edilen sıçan kalvaria osteoblast hücrelerinin pasajlama işlemi ile çoğaltılması sonucu istenen sayıda hücre elde edilmiştir.

Yapılan analizlerde AR ve vK boyamalarının haftalık periyotlarla uyumlu olarak OB ve MKH kültürlerinde artış gösterdiği, dolayısıyla doku benzeri yapılarda mineralizasyonun arttığı görülmüştür. Ancak bu mineralizasyonun OB kültürlerinde belirgin olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, deneysel tasarımda asıl hedefin kemik iliğini başkalaştırmadan kemik gelişimini desteklemek olduğu için, MKH kültüründe osteojenik indükleyici bir ortam kullanılmazken, OB kültüründe osteojenik indüktif özellikte bir ortam kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Böylece MKH hücrelerinin başkalaşmadan canlı kalabildiklerini, sıçan kalvaria kemiğinden izole edilen OB hücrelerinin ise yeni kemik dokusu oluşturmak üzere teşvik edildiği ve kollajen-tip-1 sentezi ile HDM'nin organik fazını oluştururken osteokalsin sentezini artırarak mineralizasyonunun teşvik edildiği ALP, AR, vK ve anti-osteocalcin boyamaları ile açıkça görülmüştür.

Ta₂O₅, HA, %25 Hibrit ve Tabakalı kaplanmış AZ91 numuneler, biyolojik uyumluluk testleri sonucunda biyouyumlu olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, Ta₂O₅ ve HA kullanılarak üretilen tabakalı ve hibrit kaplamalarda, bu malzemelerin tek başlarına kullanımından kaynaklı olumsuzlukların giderildiği, yapının Ta₂O₅ ile antimikrobiyal özelliklerinin iyileştiği ve HA ile biyoaktif özellik kazandığı değerlendirilmiştir. Tabakalı ve %25 Hibrit kaplamalarda benzer sonuçlar alınsa da, olumlu özelliklerin %25 Hibrit kaplamalarda bir miktar fazla olduğu değerlendirilmiştir.

Daha ileri biyouyumluluk analizleri için önceki çalışmaların genelinde en iyi performansı sergileyen numuneler (%25 Hibrit ve Tabakalı kaplı) ve kontrol numuneleri için New Zealand erkek tavşanlar 6 ve 12 haftalık zaman periyotlarında in vivo analizler, femur kemiğine implantasyon ile in situ olarak gerçekleştirilmiştir. İn vivo deneyler kapsamında biyokimyasal analizlerin sonucuna göre, kanda kalsiyum seviyelerinin deney gruplarından Ti6Al4V, %25 Hibrit ve Tabakalı kaplı implantlarda 6. ve 12 hafta sonuçlarının örneklere kıyasla oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Üretilen %25 Hibrit ve Tabakalı kaplanmış numunelerin referans olarak kullanılan Ti6Al4V alaşımına yakın sonuçlar verdiğini, kanda

kalsiyum seviyelerinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Diğer biyokimyasal parametrelere bakıldığında ise kanda sodyum, potasyum, klor ve üre azotu seviyelerinde 6. ve 12. hafta karşılaştırmasında hiçbir grupta anlamlı derecede bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Mg içerikli implantların kanda Mg değerlerine etkisi ve böbrek üzerinde herhangi bir toksikasyona neden olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan magnezyum ölçümlerinde, en yüksek seviyede yükselmenin AZ91 Mg alaşımlarında olduğu, bunu %25 Hibrit kaplı ve Tabakalı kaplı numunelerin takip ettiği görülmüştür. Ancak elde edilen verilerin daha önce yapılan literatür bilgileri göz önünde bulundurulduğunda kanda ve böbrekte herhangi bir toksikasyonu gösterir nitelikte olmadığı belirlenmiştir.

6 ve 12 haftalık süreç sonunda elde edilen radyografi sonuçlarına göre optik yoğunluğa bağlı olarak en iyi görünürlüğün Tabakalı ve %25 Hibrit kaplamada olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca %25 Hibrit kaplamanın Tabakalıya kıyasla doku kaybından ziyade doku iyileşmesini teşvik edici etkiye sahip olduğu histogram bulgularından belirlenmiştir.

Yapılan in vivo deneyler sonrasında alınan doku örneklerinin histopatolojik değerlendirmelerine göre H&E, AR, vK boyamaları ve bunların yanısıra Safranin-O ve Alcian Blue boyamalarında en belirgin boyamanın %25 Hibrit kaplı örneklerde olduğu gözlenmiştir.

Zaman periyotlarında alınan kan örnekleri, radyolojik incelemeler ve histopatoloji sonuçları değerlendirildiğinde, önceki çalışmalarda da çok iyi performansı sergileyen %25 Hibrit ve Tabakalı kaplı numune in vivo deneylerde de oldukça iyi performans sergilemiş ve diğer tüm analizlerle orantılı sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışması sonucunda, AZ91 Mg alaşımı HA ve Ta₂O₅ ile Hibrit ve Tabakalı şekilde başarıyla kaplanmıştır. Özellikle %25 Hibrit kaplanmış olan AZ91 Mg alaşımının korozyon, in vitro ve in vivo çalışmaları sonucunda kalıcı protez olarak kullanılma potansiyelinin olduğu değerlendirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, ALEDA makine, NORMMED ve BONEARTS gibi ortopedi firmalarıyla görüşülerek daha kapsamlı çalışmaları içeren ve prototip ürün ortaya konulabilecek klinik öncesi bir projeye dönüştürülebilir. Bu amaçla Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (TÜSEB) proje önerilebilir. Bu sayede, ortopedik implant olarak kullanılmakta olan diğer (Ti, Co alaşımları ve paslanmaz çelik gibi)

metallerin ağır olması nedeniyle meydana gelen doku-implant uyumsuzluğun, ara yüzeyde meydana gelen enfeksiyonların, implantın değiştirilmesi ve/veya çıkarılması gibi olumsuzlukların kaynaklı ortadan kaldırılması için bir seçenek ortaya çıkabilir. Dolayısıyla hem ekonomik kazanım sağlanmış olur hem de yerli bir ürün ortaya konulmuş olur

KAYNAKLAR

- Abdal-Hay, A., Barakat, N. A. M., and Lim, J. K. (2013). Hydroxyapatite-doped poly(lactic acid) porous film coating for enhanced bioactivity and corrosion behavior of AZ31 Mg alloy for orthopedic applications. *Ceramics International*, 39, 183–195.
- Agarwal, S., Curtin, J., Duffy, B., and Jaiswal, S. (2016). Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications : A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Materials Science and Engineering C*, 68, 948–963.
- Ahmadkhaniha, D., Sohi, M. H., Salehi, A., and Tahavvori, R. (2016). Formations of AZ91/Al₂O₃ nano-composite layer by friction stir processing. *Journal of Magnesium and Alloys*, 4, 314–318.
- Aktug, S. L., Kutbay, I., and Usta, M. (2017). Characterization and formation of bioactive hydroxyapatite coating on commercially pure zirconium by micro arc oxidation. *Journal of Alloys and Compounds*, 695, 998–1004.
- Almeida Alves, C. F., Calderón, S. V., Dias, D., and Carvalho, S. (2016). Influence of Oxygen content on the electrochemical behavior of Ta1-xOx coatings. *Electrochimica Acta*, 211, 385–394.
- Almeida Alves, C. F., Cavaleiro, A., and Carvalho, S. (2016). Bioactivity response of Ta1-xOx coatings deposited by reactive DC magnetron sputtering. *Materials Science and Engineering C*, 58, 110–118.
- Aparicio, M., Jitianu, A., and Klein, L. C. (2012). *Sol-gel processing for conventional and alternative energy*. (1st Edition). New York: Springer Science-Business Media, 217-237.
- Arnett, T. R. (2008). Extracellular pH regulates bone cell function. *The Journal of Nutrition*, 138(2), 415-418.
- Arnould, C., Denayer, J., Planckaert, M., Delhalle, J., and Mekhalif, Z. (2010). Bilayers coating on titanium surface: The impact on the hydroxyapatite initiation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341, 75–82.
- Arnould, C., Volcke, C., Lamarque, C., Thiry, P. A., Delhalle, J., and Mekhalif, Z. (2009). Titanium modified with layer-by-layer sol-gel tantalum oxide and an organodiphosphonic acid: a coating for hydroxyapatite growth. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336(2), 497–503.
- Arslan, Y. (2005). *Dubleks yüzey işleme uygulanmış AISI 316L çeliğinin mekanik ve tribolojik özelliklerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Askarnia, R., Fardi, S. R., Sobhani, M., and Staji, H. (2021). Ternary hydroxyapatite/chitosan/graphene oxide composite coating on AZ91D magnesium alloy by electrophoretic deposition. *Ceramics International*, 47(19), 27071–27081.

- Bakar, C. ve Baba, A. (2009). *Metaller ve İnsan Sağlığı Yirminci Yüzyıldan Bugüne ve Geleceğe Miras Kalan Çevre Sağlığı Sorunu*. 1. Tıbbi Jeoloji Çalıştayı, Ürgüp - Nevşehir, Turkey, 162–185.
- Bakhsheshi-Rad, H. R., Hamzah, E., Ismail, A. F., Sharer, Z., Abdul-Kadir, M. R., Daroonparvar, M., Saud, S. N., and Medraj, M. (2015). Synthesis and corrosion behavior of a hybrid bioceramic-biopolymer coating on biodegradable Mg alloy for orthopaedic implants. *Alloys and Compounds*, 648, 1067–1071.
- Bakhsheshi-Rad, H. R., Ismail, A. F., Aziz, M., Hadisi, Z., Omid, M., and Chen, X. (2019). Antibacterial activity and corrosion resistance of Ta₂O₅ thin film and electrospun PCL/MgO-Ag nanofiber coatings on biodegradable Mg alloy implants. *Ceramics International*, 45, 11883–11892.
- Balagna, C., Faga, M. G., and Spriano, S. (2012). Tantalum-based multilayer coating on cobalt alloys in total hip and knee replacement. *Materials Science and Engineering C*, 32, 887–895.
- Balagna, C., Faga, M. G., and Spriano, S. (2014). Tribological behavior of a Ta-based coating on a Co-Cr-Mo alloy. *Surface and Coatings Technology*, 258, 1159–1170.
- Balla, V. K., Banerjee, S., Bose, S., and Bandyopadhyay, A. (2010). Direct laser processing of a tantalum coating on titanium for bone replacement structures. *Acta Biomaterialia*, 6, 2329–2334.
- Barranco, V., Carmona, N., Galván, J. C., Grobelny, M., Kwiatkowski, L., and Villegas, M. A. (2010). Electrochemical study of tailored sol-gel thin films as pre-treatment prior to organic coating for AZ91 magnesium alloy. *Progress in Organic Coatings*, 68, 347–355.
- Baykan, E., Koc, A., Eser Elcin, A., and Murat Elcin, Y. (2014). Evaluation of a biomimetic poly(ϵ -caprolactone)/ β -tricalcium phosphate multispiral scaffold for bone tissue engineering: in vitro and in vivo studies. *Biointerphases*, 9(2), 29011.
- Biesiekierski, A., Lin, J., Li, Y., Ping, D., Yamabe-Mitarai, Y., and Wen, C. (2016). Investigations into Ti-(Nb,Ta)-Fe alloys for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 32, 336–347.
- Bronzino, J.D., and Peterson, D.R. (2015). *The Biomedical Engineering Handbook: Four Volume Set*. (4th Edition). Boca Raton: CRC Press, 28-33.
- Calabrese, G., Petralia, S., Franco, D., Nocito, G., Fabbi, C., Forte, L., Guglielmino, S., Squarzone, S., Traina, F., and Conoci, S. (2021). A new Ag-nanostructured hydroxyapatite porous scaffold: Antibacterial effect and cytotoxicity study. *Materials Science and Engineering C*, 118, 111394.
- Callister, W. D., and Rethwisch, D. G. (2007). *Materials Science and Engineering*. (7th Edition). New York: Wiley, 621-660.
- Carter, C. B., and Norton, M. G. (2013). *Ceramic Materials Science and Engineering*. (2nd Edition). New York: Springer, 659-673.

- Chang, Y.-Y., Huang, H.-L., Chen, H.-J., Lai, C.-H., and Wen, C.-Y. (2014). Antibacterial properties and cytocompatibility of tantalum oxide coatings. *Surface and Coatings Technology*, 259, 193–198.
- Chang, Y. Y., Huang, H. L., Chen, H. J., Lai, C. H., and Wen, C. Y. (2014). Antibacterial properties and cytocompatibility of tantalum oxide coatings. *Surface and Coatings Technology*, 259, 193–198.
- Chen, B., Yin, K.-Y., Lu, T.-F., Sun, B.-Y., Dong, Q., Zheng, J.-X., Lu, C., and Li, Z.-C. (2016). AZ91 Magnesium Alloy/Porous Hydroxyapatite Composite for Potential Application in Bone Repair. *Journal of Materials Science and Technology*, 32(9), 858–864.
- Chen, C.-S., Chang, J.-H., Sriraneepong, V., Wen, J.-Y., Tung, O.-H., Yang, C.-H., Lin, H.-C., Lee, T.-H., Han, Y., and Huang, H.-H. (2020). Improving the in vitro cell differentiation and in vivo osseointegration of titanium dental implant through oxygen plasma immersion ion implantation treatment. *Surface and Coatings Technology*, 399, 126125.
- Chen, J., Zeng, R. C., Huang, W. J., Zheng, Z. Q., Wang, Z. L., and Wang, J. (2008). Characterization and wear resistance of macro-arc oxidation coating on magnesium alloy AZ91 in simulated body fluids. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18, 361–364.
- Chen, Q., and Thouas, G. A. (2015). Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 87, 1–57.
- Chen, S., Zhang, C., Xiao, D., Shi, F., Liu, K., Wan, Y., Duan, K., Weng, J., Feng, G., and Yin, Y. (2021). Magnesium-incorporated sol-gel Ta₂O₅ coating on Ti6Al4V and in vitro biocompatibility. *Surface and Coatings Technology*, 426, 127769.
- Chen, X. B., Birbilis, N., and Abbott, T. B. (2012). Effect of [Ca²⁺] and [PO₄³⁻] levels on the formation of calcium phosphate conversion coatings on die-cast magnesium alloy AZ91D. *Corrosion Science*, 55, 226–232.
- Chen, Y., Xu, Z., Smith, C., and Sankar, J. (2014). Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants. *Acta Biomaterialia*, 10, 4561–4573.
- Cheng, Y., Cai, W., Li, H. T., and Zheng, Y. F. (2006). Surface modification of NiTi alloy with tantalum to improve its biocompatibility and radiopacity. *Journal of Materials Science*, 41, 4961–4964.
- Cheon, K.-H., Park, C., Kang, M.-H., Kang, I.-G., Lee, M.-K., Lee, H., Kim, H.-E., Jung, H.-D., and Jang, T.-S. (2021). Construction of tantalum/poly(ether imide) coatings on magnesium implants with both corrosion protection and osseointegration properties. *Bioactive Materials*, 6(4), 1189–1200.
- Cheon, K.-H., Park, C., Kang, M.-H., Park, S., Kim, J., Jeong, S.-H., Kim, H.-E., Jung, H.-D., and Jang, T.-S. (2021). A combination strategy of functionalized polymer coating with Ta ion implantation for multifunctional and biodegradable vascular stents. *Journal of Magnesium and Alloys*, 9(6), 2194–2206.

- Chunyan, Z., Lan, C., Jiajia, L., Dongwei, S., Jun, Z., and Huinan, L. (2022). In vitro evaluation of degradation, cytocompatibility and antibacterial property of polycaprolactone/hydroxyapatite composite coating on bioresorbable magnesium alloy. *Journal of Magnesium and Alloys*, 10(8), 2252–2265.
- Citradewi, P. W., Hidayat, H., Purwiandono, G., Fatimah, I., and Sagadevan, S. (2021). Derived From Cockle Shell As Antibacterial Material. *Chemical Physics Letters*, 769, 138412.
- Daroonparvar, M., Farooq Khan, M. U., Saadeh, Y., Kay, C. M., Gupta, R. K., Kasar, A. K., Kumar, P., Misra, M., Menezes, P. L., and Bakhsheshi-Rad, H. R. (2020). Enhanced corrosion resistance and surface bioactivity of AZ31B Mg alloy by high pressure cold sprayed monolayer Ti and bilayer Ta/Ti coatings in simulated body fluid. *Materials Chemistry and Physics*, 256, 123627.
- Davies, J. E. (1991). *Bone-Biomaterial Interface*. Toronto: University of Toronto Publication, 308-333.
- Declercq, H. A., Verbeeck, R. M. H., De Ridder, L. I. F. J. M., Schacht, E. H., and Cornelissen, M. J. (2005). Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials*, 26(24), 4964–4974.
- Dhandapani, P., Devanesan, S., Arulprakash, A., AlSalhi, M. S., Paramasivam, S., and Rajasekar, A. (2020). Bio-approach synthesis of nanosilver impregnation on calcium hydroxyapatite by biological activated ammonia from urinary waste. *Arabian Journal of Chemistry*, 13, 5878–5889.
- Dhinasekaran, D., Kaliaraj, G. S., Jagannathan, M., Rajendran, A. R., Prakasarao, A., Ganesan, S., and Subramanian, B. (2021). Pulsed laser deposition of nanostructured bioactive glass and hydroxyapatite coatings: Microstructural and electrochemical characterization. *Materials science and engineering. C, Materials for biological applications*, 130, 112459.
- Ding, H.-Y., Li, H., Wang, G.-Q., Liu, T., and Zhou, G.-H. (2018). Bio-Corrosion Behavior of Ceramic Coatings Containing Hydroxyapatite on Mg-Zn-Ca Magnesium Alloy. *Applied Sciences*, 8(4), 569.
- Ding, Z., Wang, Y., Zhou, Q., Ding, Z., Liu, J., He, Q., and Zhang, H. (2020). Microstructure, wettability, corrosion resistance and antibacterial property of Cu-MTa₂O₅ multilayer composite coatings with different Cu incorporation contents. *Biomolecules*, 10(68), 1–16.
- Dowling, N. E. (2012). *Mechanical Behavior of Materials*. (4th Edition). New Jersey: Pearson, 100-159.
- Eaton, R. H. (1977). Plasma alkaline phosphatase assay: interconversion of results by two methods. *Clinical chemistry*, 23(11), 2148–2150.
- Egorov, K. V., Lebedinskii, Y. Y., Markeev, A. M., and Orlov, O. M. (2015). Full ALD Ta₂O₅-based stacks for resistive random access memory grown with in vacuo XPS monitoring. *Applied Surface Science*, 356, 454–459.

- Emin, N. (2012). *Yapay Niş Mikroçevrede Doku Gelişim Modeli Oluşturulması*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Enderle, J., and Bronzino, J. (2012). *Introduction to Biomedical Engineering*. (3rd Edition). Burlington: Elsevier, 219-271.
- Esmaily, M., Mortazavi, N., Svensson, J. E., Halvarsson, M., Jarfors, A. E. W., Wessén, M., Arrabal, R., and Johansson, L. G. (2016). On the microstructure and corrosion behavior of AZ91/SiC composites produced by rheocasting. *Materials Chemistry and Physics*, 180, 29–37.
- Esmaily, M., Svensson, J. E., Fajardo, S., Birbilis, N., Frankel, G. S., Virtanen, S., Arrabal, R., Thomas, S., and Johansson, L. G. (2017). Fundamentals and advances in magnesium alloy corrosion. *Progress in Materials Science*, 89, 92–193.
- Ferraris, S., Yamaguchi, S., Barbani, N., Cristallini, C., Gautier di Confiengo, G., Barberi, J., Cazzola, M., Miola, M., Vernè, E., and Spriano, S. (2020). The mechanical and chemical stability of the interfaces in bioactive materials: The substrate-bioactive surface layer and hydroxyapatite-bioactive surface layer interfaces. *Materials Science and Engineering C*, 116, 111238.
- Fintová, S., and Kunz, L. (2015). Fatigue properties of magnesium alloy AZ91 processed by severe plastic deformation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 42, 219–228.
- Franco, D., Calabrese, G., Petralia, S., Neri, G., Corsaro, C., Forte, L., Squarzone, S., Guglielmino, S., Traina, F., Fazio, E., and Conoci, S. (2021). Antimicrobial effect and cytotoxic evaluation of MG-doped hydroxyapatite functionalized with au-nano rods. *Molecules*, 26, 1–12.
- Frandsen, C. J., Brammer, K. S., Noh, K., Johnston, G., and Jin, S. (2014). Tantalum coating on TiO₂ nanotubes induces superior rate of matrix mineralization and osteofunctionality in human osteoblasts. *Materials Science and Engineering C*, 37(1), 332–341.
- Frassetto, L., Banerjee, T., Powe, N., and Sebastian, A. (2018). Acid Balance, Dietary Acid Load, and Bone Effects-A Controversial Subject. *Nutrients*, 10(4), 517.
- Freundlich, M., Zilleruelo, G., Abitbol, C., Strauss, J., Faugere, M. C., and Malluche, H. H. (1985). Infant formula as a cause of aluminium toxicity in neonatal uraemia. *Lancet*, 2(8454), 527–529.
- Galow, A.-M., Rebl, A., Koczan, D., Bonk, S. M., Baumann, W., and Gimsa, J. (2017). Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 17–25.
- Gao, F., Xu, C., Hu, H., Wang, Q., Gao, Y., Chen, H., Guo, Q., Chen, D., and Eder, D. (2015). Biomimetic synthesis and characterization of hydroxyapatite/graphene oxide hybrid coating on Mg alloy with enhanced corrosion resistance. *Materials Letters*, 138, 25–28.

- Geetha, M., Singh, A. K., Asokamani, R., and Gogia, A. K. (2009). Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science*, 54(3), 397–425.
- Gladczuk, L., Patel, A., Singh Paur, C., and Sosnowski, M. (2004). Tantalum films for protective coatings of steel. *Thin Solid Films*, 467(1), 150–157.
- Gopi, D., Bhalaji, P. R., Ramya, S., and Kavitha, L. (2015). Evaluation of biodegradability of surface treated AZ91 magnesium alloy in SBF solution. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 23, 218–227.
- Gopi, D., Murugan, N., Ramya, S., and Kavitha, L. (2014). Electrodeposition of a porous strontium-substituted hydroxyapatite/zinc oxide duplex layer on AZ91 magnesium alloy for orthopedic applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 5531–5540.
- Görmüş, I. Z. S. ve Ergene, N. (2004). Magnezyumun klinik önemi. *Genel Tıp Dergisi*, 14(2), 69–75.
- Gray, J. E., and Luan, B. (2002). Protective coatings on magnesium and its alloys—a critical review. *Journal of Alloys and Compounds*, 336, 88–113.
- Gu, X. N., Li, N., Zhou, W. R., Zheng, Y. F., Zhao, X., Cai, Q. Z., and Ruan, L. (2011). Corrosion resistance and surface biocompatibility of a microarc oxidation coating on a Mg-Ca alloy. *Acta Biomaterialia*, 7, 1880–1889.
- Gu, X. N., Zheng, Y. F., and Chen, L. J. (2009). Influence of artificial biological fluid composition on the biocorrosion of potential orthopedic Mg-Ca, AZ31, AZ91 alloys. *Biomedical Materials*, 4(6), 065011.
- Gupta, M., and Sharon, N. M. L. (2011). *Magnesium, Magnesium Alloys, and Magnesium Composites*. (1st Edition). New Jersey: Wiley, 233–248.
- Güven, Ş. Y. (2014). Biyouyumluluk ve biyomalzemelerin seçimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2(3), 303–311.
- Harun, W. S. W., Asri, R. I. M., Alias, J., Zulkifli, F. H., Kadirgama, K., Ghani, S. A. C., and Shariffuddin, J. H. M. (2018). A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials. *Ceramics International*, 44(2), 1250–1268.
- Heimann, R. B. (2013). Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. *Surface and Coatings Technology*, 233, 27–38.
- Hench, L. L. (1991). Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7), 1487–1510.
- Hench, L. L., and Ethridge, E. C. (1982). *Biomaterials: an interfacial approach*. (1st Edition). New York: Academic Press, 216–258.
- Hiromoto, S., Inoue, M., Taguchi, T., Yamane, M., and Ohtsu, N. (2015). In vitro and in vivo biocompatibility and corrosion behaviour of a bioabsorbable magnesium alloy coated with octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 11, 520–530.

- Hiromoto, S., and Tomozawa, M. (2011). Hydroxyapatite coating of AZ31 magnesium alloy by a solution treatment and its corrosion behavior in NaCl solution. *Surface and Coatings Technology*, 205, 4711–4719.
- Hiromoto, S., and Yamamoto, A. (2009). High corrosion resistance of magnesium coated with hydroxyapatite directly synthesized in an aqueous solution. *Electrochimica Acta*, 54, 7085–7093.
- Höper, J. (1997). Spectrophotometric in vivo determination of local mitochondrial metabolism by use of a tetrazolium salt. *Physiological Measurement*, 18(1), 61–66.
- Hornberger, H., Virtanen, S., and Boccaccini, A. R. (2012). Biomedical coatings on magnesium alloys - A review. *Acta Biomaterialia*, 8, 2442–2455.
- Hu, J., Wang, C., Ren, W. C., Zhang, S., and Liu, F. (2010). Microstructure evolution and corrosion mechanism of dicalcium phosphate dihydrate coating on magnesium alloy in simulated body fluid. *Materials Chemistry and Physics*, 119, 294–298.
- Hu, W., Xu, J., Lu, X., Hu, D., Tao, H., Munroe, P., and Xie, Z. H. (2016). Corrosion and wear behaviours of a reactive-sputter-deposited Ta₂O₅ nanoceramic coating. *Applied Surface Science*, 368, 177–190.
- Huang, H.-L., Chang, Y.-Y., Chen, H.-J., Chou, Y.-K., Lai, C.-H., and Chen, M. Y. C. (2014). Antibacterial properties and cytocompatibility of tantalum oxide coatings with different silver content. *Journal of Vacuum Science and Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 32(2), 2-117.
- Huang, H. L., Tsai, M. T., Lin, Y. J., and Chang, Y. Y. (2019). Antibacterial and biological characteristics of tantalum oxide coated titanium pretreated by plasma electrolytic oxidation. *Thin Solid Films*, 688, 137268.
- Huang, Y., Qiao, H., Nian, X., Zhang, X., Zhang, X., Song, G., Xu, Z., Zhang, H., and Han, S. (2016). Improving the bioactivity and corrosion resistance properties of electrodeposited hydroxyapatite coating by dual doping of bivalent strontium and manganese ion. *Surface and Coatings Technology*, 291, 205–215.
- Hussein, A. H., Gepreel, M. A., Goudo, M. K., Hefnawy, A. M., and Kandil, S. H. (2016). *Biocompatibility of new Ti-Nb-Ta base alloys*. 61, 574–578.
- Ibrahim, M. Z., Sarhan, A. A. D., Yusuf, F., and Hamdi, M. (2017). Biomedical materials and techniques to improve the tribological, mechanical and biomedical properties of orthopedic implants – A review article. *Journal of Alloys and Compounds*, 714, 636–667.
- Ilhan, M., Ergene, B., Süntar, I., Ozbilgin, S., Saltan Çitoğlu, G., Demirel, M. A., Keleş, H., Altun, L., and Küpeli Akkol, E. (2014). Preclinical Evaluation of Antiurolithiatic Activity of *Viburnum opulus* L. on Sodium Oxalate-Induced Urolithiasis Rat Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2014, 578103.
- İnsal, B., ve Pişkin, İ. (2017). Kemik Dokusunun Fizyolojisi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1), 28–32.

- Internet: The Basics of Fetal Bovine Serum Use. URL 1: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media/fbs-basics.html>, Son Erişim Tarihi: 22.11.2023.
- Internet: Hank's Balanced Salt Solution Preparation and Recipe. URL 2: <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/hbss-hanks-balanced-salt-solution>, Son Erişim Tarihi: 22.11.2023.
- Internet: Dulbecco's Modified Eagle Medium. URL 3: https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/dmem.html?ef_id=77d4f92c3fce1f3dcda59f325308826a:G:s&s_kwcid=AL!3652!10!77447015197813!77446999429121&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_bng_nt_pur_con, Son Erişim Tarihi: 16.04.2024.
- Iqbal, N., Iqbal, S., Iqbal, T., Bakhsheshi-Rad, H. R., Aalsakkaf, A., Kamil, A., Abdul Kadir, M. R., Idris, M. H., and Raghav, H. B. (2020). Zinc-doped hydroxyapatite—zeolite/polycaprolactone composites coating on magnesium substrate for enhancing in-vitro corrosion and antibacterial performance. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 30(1), 123–133.
- Ito, T., Sasaki, M., and Taguchi, T. (2015). Enhanced ALP activity of MG63 cells cultured on hydroxyapatite-poly(ethylene glycol) hydrogel composites prepared using EDTA-OH. *Biomedical Materials*, 10(1), 15025.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., and Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64(2), 295–312.
- Jamesh, M. I., Wu, G., Zhao, Y., McKenzie, D. R., Bilek, M. M. M., and Chu, P. K. (2015). Electrochemical corrosion behavior of biodegradable Mg-Y-RE and Mg-Zn-Zr alloys in Ringer's solution and simulated body fluid. *Corrosion Science*, 91, 160–184.
- Jia, S. Q., Jia, S. S., Sun, G. X., and Yao, J. (2005). The Corrosion Behaviour of Mg Alloy AZ91D/TiCp Metal Matrix Composite. *Materials Science Forum*, 488, 705–708.
- Jiang, D., Li, Q. K., Liu, Y. Z., Xiao, Z., Xia, B. H., Li, S. Q., Zhang, F., Cui, L. Y., and Zeng, R. C. (2022). Polyphosphate assisted hydrothermal synthesis of hydroxyapatite coating on Mg alloys: Enhanced mechanical properties and corrosion resistance. *Surface and Coatings Technology*, 432, 128033.
- Jin, W., Wang, G., Lin, Z., Feng, H., Li, W., Peng, X., Qasim, A. M., and Chu, P. K. (2017). Corrosion resistance and cytocompatibility of tantalum-surface-functionalized biomedical ZK60 Mg alloy. *Corrosion Science*, 114, 45–56.
- Jin, W., Wang, G., Peng, X., Li, W., Qasim, A. M., and Chu, P. K. (2018). Tantalum nitride films for corrosion protection of biomedical Mg-Y-RE alloy. *Journal of Alloys and Compounds*, 764, 947–958.
- Kamieniak, K., and Malik, M. A. (2015). The Influence of Reinforcement Purity on Corrosion Resistance of AM50/SiC Composites. *Corrosion and Surface Engineering*, 227, 43–46.

- Kandala, B. S. P. K., Zhang, G., LCorriveau, C., Paquin, M., Chagnon, M., Begun, D., and Shanov, V. (2021). Preliminary study on modelling, fabrication by photo-chemical etching and in vivo testing of biodegradable magnesium AZ31 stents. *Bioactive Materials*, 6(6), 1663–1675.
- Kannan, M. B. (2016). Electrochemical deposition of calcium phosphates on magnesium and its alloys for improved biodegradation performance: A review. *Surface and Coatings Technology*, 301, 36–41.
- Karakullukçu, F., Küçük, M., Polat, H. ve Onsun, K. (1994). Kronik Renal Yetmezlikli Hastalarda Alüminyum Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *İstanbul Tıp Dergisi*, 1, 1–8.
- Kayhan, S. M., Tahmasebifar, A., Koç, M., Usta, Y., Tezcaner, A., and Evis, Z. (2016). Experimental and numerical investigations for mechanical and microstructural characterization of micro-manufactured AZ91D magnesium alloy disks for biomedical applications. *Materials and Design*, 93, 397–408.
- Kiahosseini, S. R., Afshar, A., and Larijani, M. M. (2017). Structural and corrosion characterization of hydroxyapatite/zirconium nitride-coated AZ91 magnesium alloy by ion beam sputtering. *Applied Surface Science*, 401, 172–180.
- Kirkland, N. T., Birbilis, N., and Staiger, M. P. (2012). Assessing the corrosion of biodegradable magnesium implants: A critical review of current methodologies and their limitations. *Acta Biomaterialia*, 8, 925–936.
- Klein, L., Aparicio, M., and Jitianu, A. (Editors). (2018). *Handbook of sol-gel science and technology*. (2nd Edition). Cham: Kluwer Academic Publishers, 1121-1151.
- Koç, A., Emin, N., Elçin, A. E., and Elçin, Y. M. (2008). In Vitro Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells in a Microgravity Bioreactor. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23(3), 244–261.
- Koç, A., Finkenzeller, G., Elçin, A. E., Stark, G. B., and Elçin, Y. M. (2014). Evaluation of adenoviral vascular endothelial growth factor-activated chitosan/hydroxyapatite scaffold for engineering vascularized bone tissue using human osteoblasts: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomaterials Applications*, 29(5), 748–760.
- Kokubo, T. (Editor). (2008). *Bioceramics and their clinical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing, 165-182.
- Kokubo, T., Kim, H., and Kawashita, M. (2003). Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24, 2161–2175.
- Krebs, R. E. (2006). *The History and Use of our Earth's Chemical Elements: A Reference Guide*. (2nd Edition). Westport: Greenwood Press, 124-128.
- Krewski, D., Yokel, R. A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A. M., and Rondeau, V. (2007). Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B: Critical Reviews*, 10, 1–269.

- Kukli, K., Aarik, J., Aidla, A., Siimon, H., Ritala, M., and Leskelä, M. (1997). In situ study of atomic layer epitaxy growth of tantalum oxide thin films from Ta(OC₂H₅)₅ and H₂O. *Applied Surface Science*, 112, 236–242.
- Kumar, R. M., Kuntal, K. K., Singh, S., Gupta, P., Bhushan, B., Gopinath, P., and Lahiri, D. (2016). Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coating on Mg-3Zn alloy for orthopaedic application. *Surface and Coatings Technology*, 287, 82–92.
- Lenis, J. A., Rico, P., Ribelles, J. L. G., Pacha-Olivenza, M. A., González-Martín, M. L., and Bolívar, F. J. (2020). Structure, morphology, adhesion and in vitro biological evaluation of antibacterial multi-layer HA-Ag/SiO₂/TiN/Ti coatings obtained by RF magnetron sputtering for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 116(July), 111268.
- Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 605–631.
- Li, X., Chu, C., and Chu, P. K. (2016). Effects of external stress on biodegradable orthopedic materials : A review. *Bioactive Materials*, 1, 77–84.
- Li, X., Wang, L., Yu, X., Feng, Y., Wang, C., Yang, K., and Su, D. (2013). Tantalum coating on porous Ti6Al4V scaffold using chemical vapor deposition and preliminary biological evaluation. *Materials science and engineering. C, Materials for biological applications*, 33(5), 2987—2994.
- Lide, D. R. (2003). *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press.
- Liu, G. Y., Hu, J., Ding, Z. K., and Wang, C. (2011a). Bioactive calcium phosphate coating formed on micro-arc oxidized magnesium by chemical deposition. *Applied Surface Science*, 257, 2051–2057.
- Liu, G. Y., Hu, J., Ding, Z. K., and Wang, C. (2011b). Formation mechanism of calcium phosphate coating on micro-arc oxidized magnesium. *Materials Chemistry and Physics*, 130, 1118–1124.
- Liu, G. Y., Hu, J., Ding, Z. K., and Wang, C. (2011c). Bioactive calcium phosphate coating formed on micro-arc oxidized magnesium by chemical deposition. *Applied Surface Science*, 257(6), 2051–2057.
- Liu, J., Chang, L., Liu, H., Li, Y., Yang, H., and Ruan, J. (2017). Microstructure, mechanical behavior and biocompatibility of powder metallurgy Nb-Ti-Ta alloys as biomedical material. *Materials Science and Engineering C*, 71, 512–519.
- Ma, J., Thompson, M., Zhao, N., and Zhu, D. (2014). Similarities and differences in coatings for magnesium-based stents and orthopaedic implants. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2, 118–130.
- Ma, Z., Xie, H., Wang, B., Wei, X., and Zhao, D. (2016). A novel Tantalum coating on porous SiC used for bone filling material. *Materials Letters*, 179, 166–169.

- Maho, A., Detriche, S., Delhalle, J., and Mekhalif, Z. (2013). Sol–gel synthesis of tantalum oxide and phosphonic acid-modified carbon nanotubes composite coatings on titanium surfaces. *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), 2686–2697.
- Majumdar, J. D., Bhattacharyya, U., Biswas, A., and Manna, I. (2008). Studies on thermal oxidation of Mg-alloy (AZ91) for improving corrosion and wear resistance. *Surface and Coatings Technology*, 202, 3638–3642.
- Malluche, H. H., and Faugere, M.-C. (1985). Aluminum: Toxin or Innocent Bystander in Renal Osteodystrophy. *American Journal of Kidney Diseases*, 6(5), 336–341.
- Malluche, H. H., and Faugere, M. C. (1988). Aluminum-related bone disease. *Blood Purification*, 6(1), 1–15.
- Manivasagam, G., Dhinasekaran, D., and Rajamanickam, A. (2010). Biomedical implants: corrosion and its prevention - A Review. *Recent Patents on Corrosion Science*, 2, 40–54.
- Manjakkal, L., Zaraska, K., Cvejic, K., Kulawik, J., and Szwagierczak, D. (2016). Potentiometric RuO_2 - Ta_2O_5 pH sensors fabricated using thick film and LTCC technologies. *Talanta*, 147, 233–240.
- Mannequin, C., Tsuruoka, T., Hasegawa, T., and Aono, M. (2016). Identification and roles of nonstoichiometric oxygen in amorphous Ta_2O_5 thin films deposited by electron beam and sputtering processes. *Applied Surface Science*, 385, 426–435.
- Matson, D. W., McClanahan, E. D., Rice, J. P., Lee, S. L., and Windover, D. (2000). Effect of sputtering parameters on Ta coatings for gun bore applications. *Surface and Coatings Technology*, 133, 411–416.
- Matsuno, H., Yokoyama, A., Watari, F., Uo, M., and Kawasaki, T. (2001). Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*, 22(11), 1253–1262.
- McCafferty, E. (2010). *Introduction to Corrosion Science*. New York: Springer, 95–117.
- Mingo, B., Arrabal, R., Mohedano, M., Pardo, A., and Matykina, E. (2017). Corrosion and wear of PEO coated AZ91/SiC composites. *Surface and Coatings Technology*, 309, 1023–1032.
- Moldovan, M., Weyant, C. M., Johnson, D. L., and Faber, K. T. (2004). Tantalum oxide coatings as candidate environmental barriers. *Journal of Thermal Spray Technology*, 13(1), 51–56.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.

- Mukhametkaliyev, T. M., Surmeneva, M. A., Vladescu, A., Cotrut, C. M., Braic, M., Dinu, M., Vranceanu, M. D., Pana, I., Mueller, M., and Surmenev, R. A. (2017). A biodegradable AZ91 magnesium alloy coated with a thin nanostructured hydroxyapatite for improving the corrosion resistance. *Materials Science and Engineering C*, 75, 95–103.
- Murugan, G., Raghukandan, K., Pillai, U. S., Pai, B. C., and Mahadevan, K. (2009). High cyclic fatigue characteristic of gravity cast AZ91 magnesium alloy subjected to transverse load. *Materials and Design*, 30, 2636–2641.
- Namıduru, E. S. ve Tarakçıoğlu, M. (2011). K Vitamini ve Osteoporoz. *Gaziantep Tıp Dergisi*, 17(1), 1–7.
- Niu, B., Shi, P., Wei, D., Shanshan, E., Li, Q., and Chen, Y. (2016). Effects of sintering temperature on the corrosion behavior of AZ31 alloy with Ca-P sol-gel coating. *Journal of Alloys and Compounds*, 665, 435–442.
- Ohbayashi, E., Matsushima, K., Hosoya, S., Abiko, Y., and Yamazaki, M. (1999). Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *Journal of Endodontics*, 25(1), 30–33.
- Ono, H., and Koyanagi, K. I. (2000). Infrared absorption peak due to Ta=O bonds in Ta₂O₅ thin films. *Applied Physics Letters*, 77(10), 1431–1433.
- Oshida, Y. (2007). *Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials* (2nd Edition). London: Elsevier, 139-168.
- Öztürk, F. ve Kaçar, İ. (2012). Magnezyum alaşımları ve kullanım alanlarının incelenmesi. *Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 1, 12–20.
- Pan, Y., He, S., Wang, D., Huang, D., Zheng, T., Wang, S., Dong, P., and Chen, C. (2015). In vitro degradation and electrochemical corrosion evaluations of microarc oxidized pure Mg, Mg-Ca and Mg-Ca-Zn alloys for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 47, 85–96.
- Park, C., Kim, S., Kim, H. E., and Jang, T. S. (2016). Mechanically stable tantalum coating on a nano-roughened NiTi stent for enhanced radiopacity and biocompatibility. *Surface and Coatings Technology*, 305, 139–145.
- Park, J.-S., Yim, K. H., Jeong, S., Lee, D. H., and Kim, D. G. (2019). A Novel High-Visibility Radiopaque Tantalum Marker for Biliary Self-Expandable Metal Stents. *Gut and Liver*, 13(3), 366–372.
- Park, K.-D., Lee, B.-A., Piao, X.-H., Lee, K.-K., Park, S.-W., Oh, H.-K., Kim, Y.-J., and Park, H.-J. (2013). Effect of magnesium and calcium phosphate coatings on osteoblastic responses to the titanium surface. *The Journal of Advanced Prosthodontics*, 5(4), 402–408.
- Pasinli, A. ve Aksoy, R. S. (2010). Yapay kemik uygulamaları için hidroksiapatit. *Journal of BioTechnology*, 1, 41–51.

- Pereira, M. M., Clark, A. E., and Hench, L. L. (1995). Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. *Journal of the American Ceramic Society*, 78(9), 2463–2468.
- Pereira, M. M., and Hench, L. L. (1996). Mechanisms of hydroxyapatite formation on porous gel-silica substrates. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 7(1), 59–68.
- Rafieerad, A. R., Bushroa, A. R., Nasiri-Tabrizi, B., Vadivelu, J., Baradaran, S., Mesbah, M., and Zavareh, M. A. (2016). Mechanical properties, corrosion behavior and in-vitro bioactivity of nanostructured Pd/PdO coating on Ti-6Al-7Nb implant. *Materials and Design*, 103, 10–24.
- Rahmati, B., Sarhan, A. A. D., Zalnezhad, E., Kamiab, Z., Dabbagh, A., Choudhury, D., and Abas, W. A. B. W. (2015). Development of tantalum oxide (Ta-O) thin film coating on biomedical Ti-6Al-4V alloy to enhance mechanical properties and biocompatibility. *Ceramics International*, 42, 466–480.
- Rahmati, B., Sarhan, A. A., Zalnezhad, E., Kamiab, Z., Dabbagh, A., Choudhury, D., and Abas, W. B. (2016). Development of tantalum oxide (Ta-O) thin film coating on biomedical Ti-6Al-4V alloy to enhance mechanical properties and biocompatibility. *Ceramics International*, 42, 466–480.
- Rahmati, B., Zalnezhad, E., Sarhan, A. A. D., Kamiab, Z., Nasiri Tabrizi, B., and Abas, W. A. B. W. (2015). Enhancing the adhesion strength of tantalum oxide ceramic thin film coating on biomedical Ti-6Al-4V alloy by thermal surface treatment. *Ceramics International*, 41(10), 13055–13063.
- Rajendran, A., Barik, R. C., Natarajan, D., Kiran, M. S., and Pattanayak, D. K. (2014). Synthesis, phase stability of hydroxyapatite – silver composite with antimicrobial activity and cytocompatibility. *Ceramics International*, 40, 10831–10838.
- Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., and Leong, K. W. (2001). Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology*, 61, 1189–1224.
- Razavi, M., Fathi, M. H., and Meratian, M. (2010a). Bio-corrosion behavior of magnesium-fluorapatite nanocomposite for biomedical applications. *Materials Letters*, 64, 2487–2490.
- Razavi, M., Fathi, M. H., and Meratian, M. (2010b). Microstructure, mechanical properties and bio-corrosion evaluation of biodegradable AZ91-FA nanocomposites for biomedical applications. *Materials Science and Engineering A*, 527, 6938–6944.
- Razavi, M., Fathi, M., Savabi, O., Vashae, D., and Tayebi, L. (2015). In vivo assessments of bioabsorbable AZ91 magnesium implants coated with nanostructured fluoridated hydroxyapatite by MAO/EPD technique for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 48, 21–27.
- Ren, Y., Zhou, H., Nabiyouni, M., and Bhaduri, S. B. (2015). Rapid coating of AZ31 magnesium alloy with calcium deficient hydroxyapatite using microwave energy. *Materials Science and Engineering C*, 49, 364–372.

- Rojaee, R., Fathi, M., and Raeissi, K. (2013). Controlling the degradation rate of AZ91 magnesium alloy via sol-gel derived nanostructured hydroxyapatite coating. *Materials Science and Engineering C*, 33, 3817–3825.
- Rojaee, R., Fathi, M., and Raeissi, K. (2014). Comparing nanostructured hydroxyapatite coating on AZ91 alloy samples via sol-gel and electrophoretic deposition for biomedical applications. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 13, 409–414.
- Roncevic, I. S., Grubac, Z., and Metikos-Hukovic, M. (2014). Electrodeposition of hydroxyapatite coating on AZ91D alloy for biodegradable implant application. *International Journal of Electrochemical Science*, 9, 5907–5923.
- Roth, R. S., and Waring, J. L. (1970). Effect of Oxide Additions on the Polymorphism of Tantalum Pentoxide: II. "Stabilization" of the High Temperature Structure Type. *Journal of research of the National Bureau of Standards-Section A: Physics and chemistry*, 74, 477–484.
- Rudnev, V. S., Medkov, M. A., Lukiyanichuk, I. V., Steblevskaya, N. I., Kilin, K. N., and Belobeletskaya, M. V. (2014). Ta-containing coatings formed on titanium and stainless steel by plasma electrolytic oxidation and/or extraction pyrolysis. *Surface and Coatings Technology*, 258, 1232–1238.
- Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.-T., Dinpanah-Khoshdargi, E., and Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9, 7591–7621.
- Sahoo, B. N., and Panigrahi, S. K. (2016). Synthesis, characterization and mechanical properties of in-situ (TiC-TiB₂) reinforced magnesium matrix composite. *Materials and Design*, 109, 300–313.
- Sapra, S., Li, H., Wang, Z., and Suni, I. I. (2006). Voltammetry and Impedance Studies of Ta in Aqueous HF. *Journal of The Electrochemical Society*, 152(6), 193.
- Sathasivam, S., Williamson, B. A. D., Kafizas, A., Althabaiti, S. A., Obaid, A. Y., Basahel, S. N., Scanlon, D. O., Carmalt, C. J., and Parkin, I. P. (2017). Computational and Experimental Study of Ta₂O₅ Thin Films. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(1), 202–210.
- Shang, P., Xiong, S., Li, L., Tian, D., and Ai, W. (2013). Investigation on thermal stability of Ta₂O₅, TiO₂ and Al₂O₃ coatings for application at high temperature. *Applied Surface Science*, 285, 713–720.
- Singh, B., Singh, G., and Sidhu, B. S. (2019a). Analysis of corrosion behaviour and surface properties of plasma-sprayed composite coating of hydroxyapatite–tantalum on biodegradable Mg alloy ZK60. *Journal of Composite Materials*, 53(19), 2661–2673.
- Singh, B., Singh, G., and Sidhu, B. S. (2019b). In vitro investigation of Nb–Ta alloy coating deposited on CoCr alloy for biomedical implants. *Surface and Coatings Technology*, 377, 124932.

- Singh, B., Singh, G., Sidhu, B. S., and Bhatia, N. (2019). In-vitro assessment of HA-Nb coating on Mg alloy ZK60 for biomedical applications. *İçinde Materials Chemistry and Physics*, 231, 138–149.
- Soni, S. S., and Rodell, C. B. (2021). Polymeric materials for immune engineering: Molecular interaction to biomaterial design. *Acta Biomaterialia*, 133, 139–152.
- Sowa, M., and Simka, W. (2018). Electrochemical impedance and polarization corrosion studies of tantalum surface modified by DC Plasma electrolytic oxidation. *Materials*, 11, 545.
- Stahl, T., Falk, S., Rohrbeck, A., Georgii, S., Herzog, C., Wiegand, A., Hotz, S., Boschek, B., Zorn, H., and Brunn, H. (2017). Migration of aluminum from food contact materials to food-a health risk for consumers? Part I of III: exposure to aluminum, release of aluminum, tolerable weekly intake (TWI), toxicological effects of aluminum, study design, and methods. *Environmental Sciences Europe*, 29(1), 19.
- Staiger, M. P., Pietak, A. M., Huadmai, J., and Dias, G. (2006). Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials*, 27(9), 1728–1734.
- Stavrou, E., Zaug, J. M., Bastae, S., and Kunz, M. (2017). A study of tantalum pentoxide Ta₂O₅ structures up to 28 GPa. *Journals of Applied Physiscs*, 121(3), 1–6.
- Stein, G. S., Lian, J. B., and Owen, T. A. (1990). Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(13), 3111–3123.
- Stenlund, P., Omar, O., Brohede, U., Norgren, S., Norlindh, B., Johansson, A., and Palmquist, A. (2015). Bone response to a novel Ti-Ta-Nb-Zr alloy. *Acta Biomaterialia*, 20, 165–175.
- Sun, L., Berndt, C. C., Gross, K. A., and Kucuk, A. (2001). Material Fundamentals and Clinical Performance of Plasma- Sprayed Hydroxyapatite Coatings: A Review. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58, 570–592.
- Sun, Y. S., Chang, J. H., and Huang, H. H. (2013). Corrosion resistance and biocompatibility of titanium surface coated with amorphous tantalum pentoxide. *Thin Solid Films*, 528, 130–135.
- Surmeneva, M. A., and Surmenev, R. A. (2015). Microstructure characterization and corrosion behaviour of a nano-hydroxyapatite coating deposited on AZ31 magnesium alloy using radio frequency magnetron sputtering. *Vacuum*, 117, 60–62.
- Surmeneva, M. A., Tyurin, A. I., Mukhametkaliyev, T. M., Pirozhkova, T. S., Shuvarin, I. A., Syrtanov, M. S., and Surmenev, R. A. (2015). Enhancement of the mechanical properties of AZ31 magnesium alloy via nanostructured hydroxyapatite thin films fabricated via radio-frequency magnetron sputtering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 46, 127–136.

- Tahmasebifar, A., Kayhan, S. M., Evis, Z., Tezcaner, A., Çinici, H., and Koç, M. (2016). Mechanical, electrochemical and biocompatibility evaluation of AZ91D magnesium alloy as a biomaterial. *Journal of Alloys and Compounds*, 687, 906–919.
- Taleghani, M. A. J., and Torralba, J. M. (2013). The microstructural evolution of a pre-alloyed AZ91 magnesium alloy powder through high-energy milling and subsequent isothermal annealing. *Materials Letters*, 98, 182–185.
- Tan, L.-L., Wang, Q., Geng, F., Xi, X. S., Qiu, J. H., and Yang, K. (2010). Preparation and characterization of Ca-P coating on AZ31 magnesium alloy. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 20, 648–654.
- Tan, L., Yu, X., Wan, P., and Yang, K. (2013). Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. *Journal of Materials Science and Technology*, 29, 503–513.
- Tanahashi, M., Yao, T., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T., and Yamamuro, T. (1994). Apatite coated on organic polymers by biomimetic process: Improvement in its adhesion to substrate by NaOH treatment. *Journal of Applied Biomaterials*, 5(4), 339–347.
- Tang, H., and Gao, Y. (2016). Preparation and characterization of hydroxyapatite containing coating on AZ31 magnesium alloy by micro-arc oxidation. *Journal of Alloys and Compounds*, 688, 699–708.
- Tepehan, F. Z., Ghodsi, F. E., Ozer, N., and Tepehan, G. G. (1997). Determination of optical properties of amorphous Ta₂O₅ films deposited by spin- and dip-coating methods. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 46, 311–321.
- Tomozawa, M., Hiromoto, S., and Harada, Y. (2010). Microstructure of hydroxyapatite-coated magnesium prepared in aqueous solution. *Surface and Coatings Technology*, 204, 3243–3247.
- Tong, P., Sheng, Y., Hou, R., Iqbal, M., Chen, L., and Li, J. (2022). Recent progress on coatings of biomedical magnesium alloy. *Smart Materials in Medicine*, 3, 104–116.
- Toygun, Ş., Köneçoğlu, G., and Kalpaklı, Y. (2013). General Principles of Sol-gel. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31, 456–476.
- Tran, P. A., Fox, K., and Tran, N. (2017). Novel hierarchical tantalum oxide-PDMS hybrid coating for medical implants: One pot synthesis, characterization and modulation of fibroblast proliferation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 485, 106–115.
- Ullah, I., Siddiqui, M. A., Kolawole, S. K., Liu, H., Zhang, J., Ren, L., and Yang, K. (2020). Synthesis, characterization and in vitro evaluation of zinc and strontium binary doped hydroxyapatite for biomedical application. *Ceramics International*, 46, 14448–14459.
- Wang, D., and Bierwagen, G. P. (2009). Sol-gel coatings on metals for corrosion protection. *Progress in Organic Coatings*, 64, 327–338.
- Wang, H., Akid, R., and Gobara, M. (2010). Scratch-resistant anticorrosion sol-gel coating for the protection of AZ31 magnesium alloy via a low temperature sol-gel route. *Corrosion Science*, 52, 2565–2570.

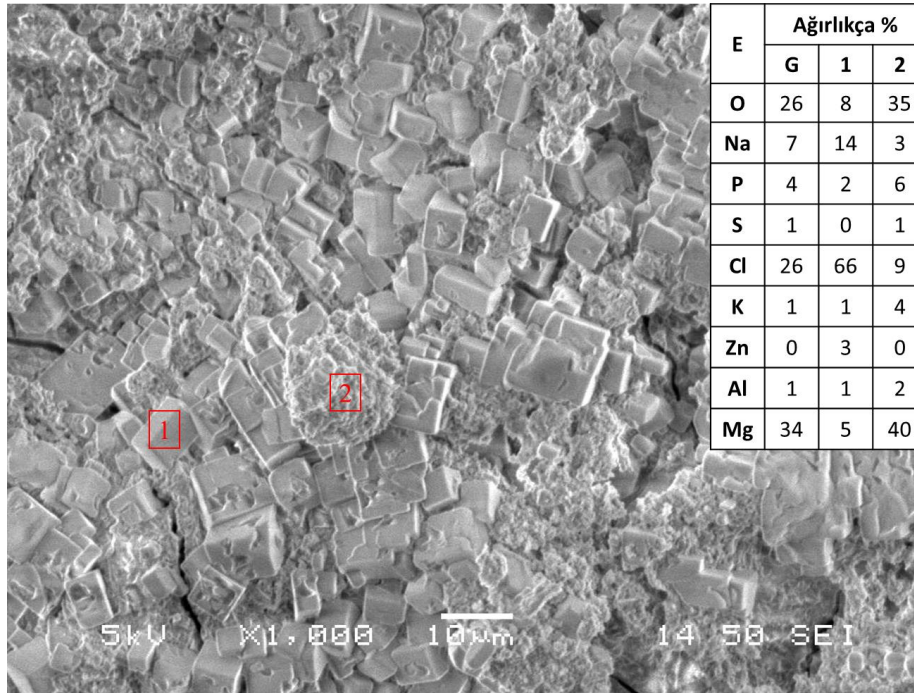
- Wang, H., Guan, S., Wang, Y., Liu, H., Wang, H., Wang, L., Ren, C., Zhu, S., and Chen, K. (2011). In vivo degradation behavior of Ca-deficient hydroxyapatite coated Mg – Zn – Ca alloy for bone implant application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, 254–259.
- Wang, M.-J., Chao, S.-C., and Yen, S.-K. (2016). Electrolytic calcium phosphate/zirconia composite coating on AZ91D magnesium alloy for enhancing corrosion resistance and bioactivity. *Corrosion Science*, 104, 47–60.
- Wang, M., Li, C., and Yen, S. (2013). Electrolytic MgO/ZrO₂ duplex-layer coating on AZ91D magnesium alloy for corrosion resistance. *Corrosion Science*, 76, 142–153.
- Wang, M., Li, M., Shao, Y., Zhu, Y., and Yang, S. (2021). Efficient antibacterial activity of hydroxyapatite through ROS generation motivated by trace Mn(III) coupled H vacancies. *Royal Society of Chemistry*, 9, 3401–3411.
- Wang, X. J., Hu, X. S., Liu, W. Q., Du, J. F., Wu, K., Huang, Y. D., and Zheng, M. Y. (2017). Ageing behavior of as-cast SiCp/AZ91 Mg matrix composites. *Materials Science and Engineering A*, 682, 491–500.
- Wang, X., Zeng, X., Wu, G., Yao, S., and Lai, Y. (2007). Effects of tantalum ion implantation on the corrosion behavior of AZ31 magnesium alloys. *Journal of Alloys and Compounds*, 437, 87–92.
- Warnes, T. W. (1972). Alkaline phosphatase. *Gut*, 13(11), 926–937.
- Wen, C., Guan, S., Peng, L., Ren, C., Wang, X., and Hu, Z. (2009). Characterization and degradation behavior of AZ31 alloy surface modified by bone-like hydroxyapatite for implant applications. *Applied Surface Science*, 255, 6433–6438.
- Williamson, T. (1972). A comparison between the phosphatase and phenyl phosphate methods of alkaline phosphatase assay. *Medical Laboratory Technology*, 29(2), 182–187.
- Winterberg, B., Lison, A. E., and Bertram, H. P. (1984). Aluminium intoxication. Treatment with desferrioxamine. *Trace Elements in Medicine*, 1(3), 111–114.
- Wolf, M. J., Roitsch, S., Mayer, J., Nijmeijer, A., and Bouwmeester, H. J. M. (2013). Fabrication of ultrathin films of Ta₂O₅ by a sol-gel method. *Thin Solid Films*, 527, 354–357.
- Wu, G., Ibrahim, J. M., and Chu, P. K. (2013). Surface design of biodegradable magnesium alloys—A review. *Surface and Coatings Technology*, 233, 2–12.
- Xin, Y., Hu, T., and Chu, P. K. (2010). Influence of Test Solutions on In Vitro Studies of Biomedical Magnesium Alloys. *Journal of The Electrochemical Society*, 157(7), 238.
- Xin, Y., Huo, K., Tao, H., Tang, G., and Chu, P. K. (2008). Influence of aggressive ions on the degradation behavior of biomedical magnesium alloy in physiological environment. *Acta Biomaterialia*, 4(6), 2008–2015.

- Xiong, Y., Lu, C., Wang, C., and Song, R. (2015). Degradation behavior of n-MAO/EPD bio-ceramic composite coatings on magnesium alloy in simulated body fluid. *Journal of Alloys and Compounds*, 625, 258–265.
- Xu, J., Hu, W., Xie, Z. H., and Munroe, P. (2016). Reactive-sputter-deposited β -Ta₂O₅ and TaON nanoceramic coatings on Ti-6Al-4V alloy against wear and corrosion damage. *Surface and Coatings Technology*, 296, 171–184.
- Xu, L., Pan, F., Yu, G., Yang, L., Zhang, E., and Yang, K. (2009). In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy. *Biomaterials*, 30, 1512–1523.
- Xu, Y. F., Xiao, Y. F., Yi, D. Q., Liu, H. Q., Wu, L., and Wen, J. (2015). Corrosion behavior of Ti-Nb-Ta-Zr-Fe alloy for biomedical applications in Ringer's solution. *Transaction of Nonferrous Metal Society China*, 25, 2556–2563.
- Yang, C., Li, J., Zhu, C., Zhang, Q., Yu, J., Wang, J., Wang, Q., Tang, J., Zhou, H., and Shen, H. (2019). Advanced antibacterial activity of biocompatible tantalum nanofilm via enhanced local innate immunity. *Acta Biomaterialia*, 89, 403–418.
- Yang, H., Wang, F., Liu, X., Wang, H., and Qu, T. (2020). Mesenchymal stem cells from human umbilical cord regulate the expression of major histocompatibility complex in human neural stem cells and their lineages. *Neuroscience Letters*, 738, 135359.
- Yang, R., Chen, F., Guo, J., Zhou, D., and Luan, S. (2020). Recent advances in polymeric biomaterials-based gene delivery for cartilage repair. *Bioactive Materials*, 5(4), 990–1003.
- Yanovska, A., Kuznetsov, V., Stanislavov, A., Danilchenko, S., and Sukhodub, L. (2012). Calcium-phosphate coatings obtained biomimetically on magnesium substrates under low magnetic field. *Applied Surface Science*, 258, 8577–8584.
- Yildirim, S., Ulutas, K., Deger, D., Zayim, E. O., and Turhan, I. (2005). Dielectric properties of sol-gel derived Ta₂O₅ thin films. *Vacuum*, 77(3), 329–335.
- Zein El Abedin, S., Welz-Biermann, U., and Endres, F. (2005). A study on the electrodeposition of tantalum on NiTi alloy in an ionic liquid and corrosion behaviour of the coated alloy. *Electrochemistry Communications*, 7(9), 941–946.
- Zhang, L., Zhang, J., Chen, C., and Gu, Y. (2015). Advances in microarc oxidation coated AZ31 Mg alloys for biomedical applications. *Corrosion Science*, 91, 7–28.
- Zhang, S., Zhang, X., Zhao, C., Li, J., Song, Y., Xie, C., Tao, H., Zhang, Y., He, Y., Jiang, Y., and Bian, Y. (2010). Research on an Mg-Zn alloy as a degradable biomaterial. *Acta Biomaterialia*, 6, 626–640.
- Zhang, S., Zou, X., Liu, N., Wang, H., Xia, C., and Liang, C. (2022). In situ preparation of a novel Ta₂O₅/MAO composite coating on magnesium for anti-corrosion protection. *Surface and Coatings Technology*, 430, 128003.

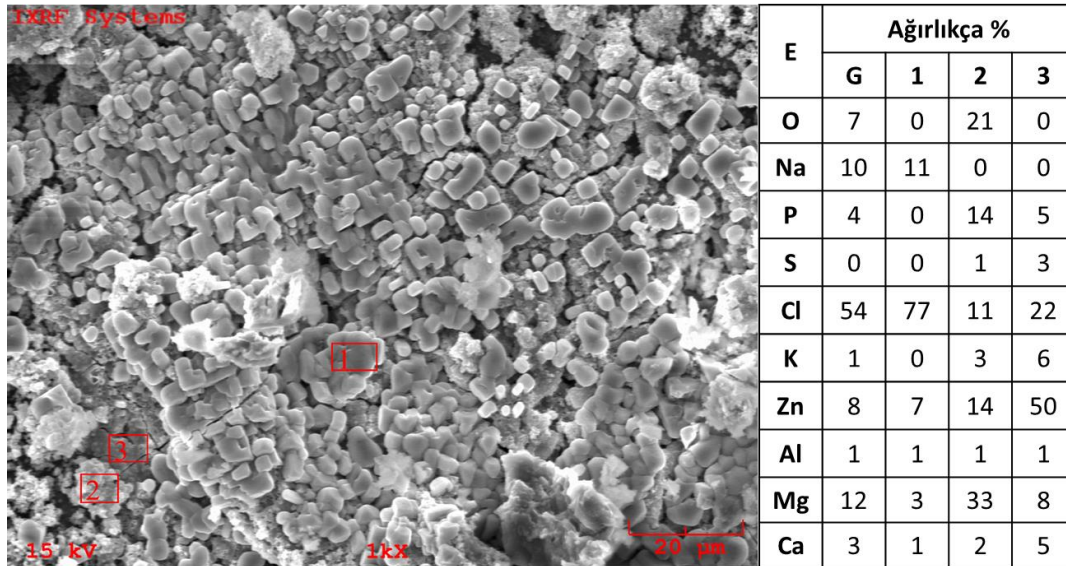
- Zhang, Z., Yu, H., Chen, G., Yu, H., and Xu, C. (2011). Correlation between microstructure and tensile properties in powder metallurgy AZ91 alloys. *Materials Letters*, 65, 2686–2689.
- Zheng, Y. F., Gu, X. N., and Witte, F. (2014). Biodegradable metals. *Materials Science and Engineering R*, 77, 1–34.
- Zhou, Y., Li, M., Cheng, Y., Zheng, Y. F., Xi, T. F., and Wei, S. C. (2013). Tantalum coated NiTi alloy by PIIID for biomedical application. *Surface and Coatings Technology*, 228, 2–6.
- Zhu, J. X., Sasano, Y., Takahashi, I., Mizoguchi, I., and Kagayama, M. (2001). Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *The Histochemical Journal*, 33(1), 25–35.

EKLER

EK-1. Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

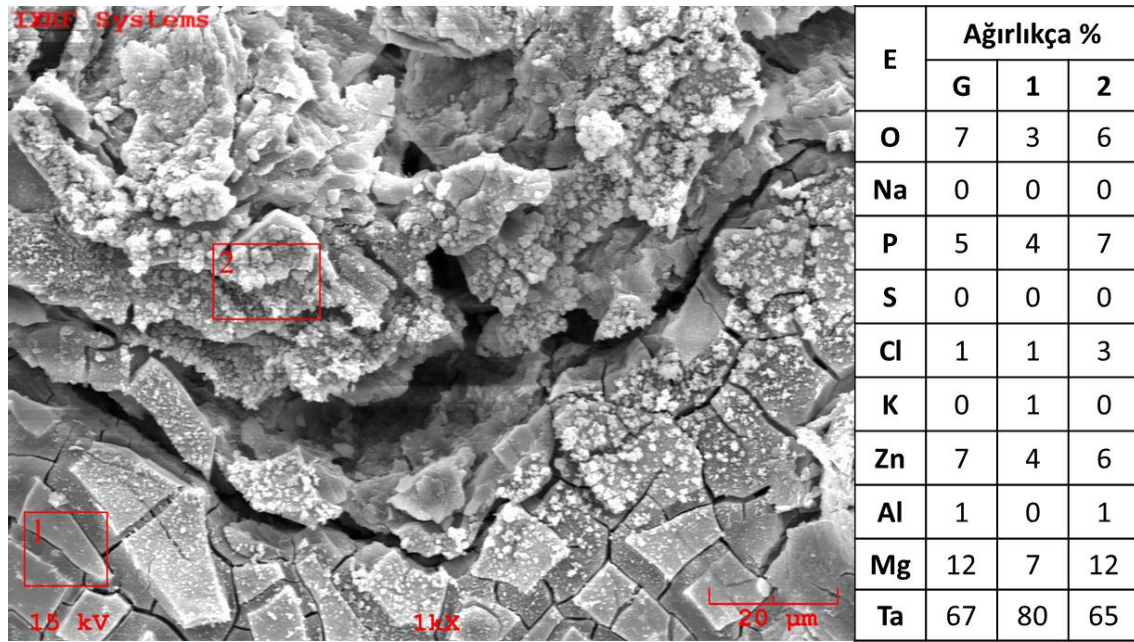


Şekil 1.1. Kaplanmamış AZ91 numunesine ait HBSS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

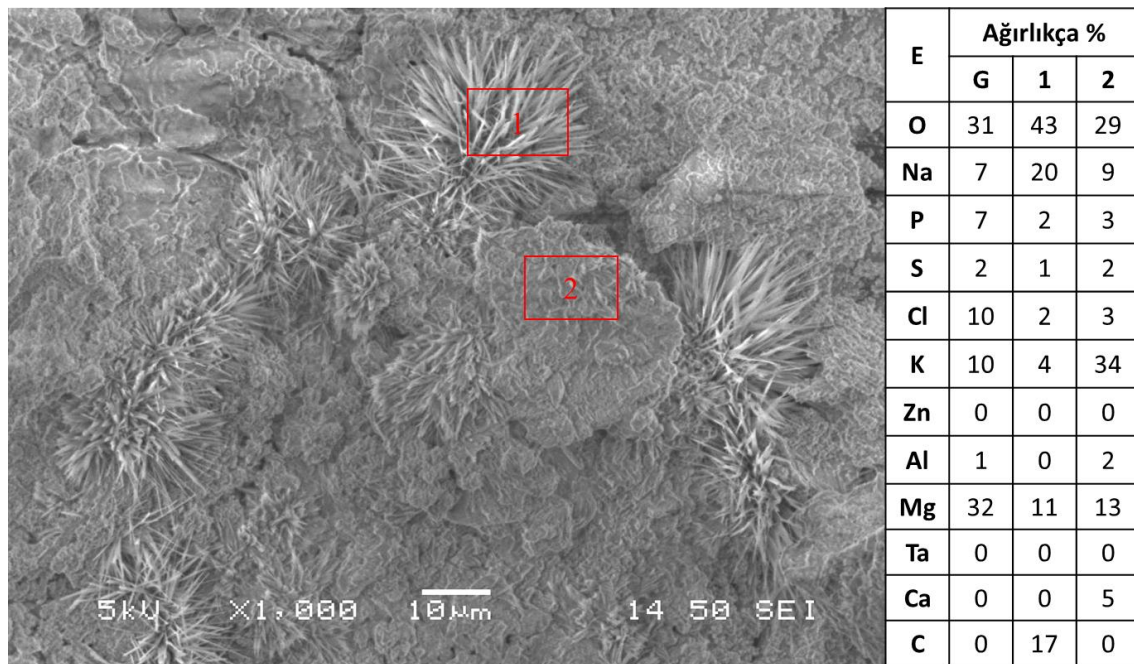


Şekil 1.2. HA kaplı numuneye ait HBSS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

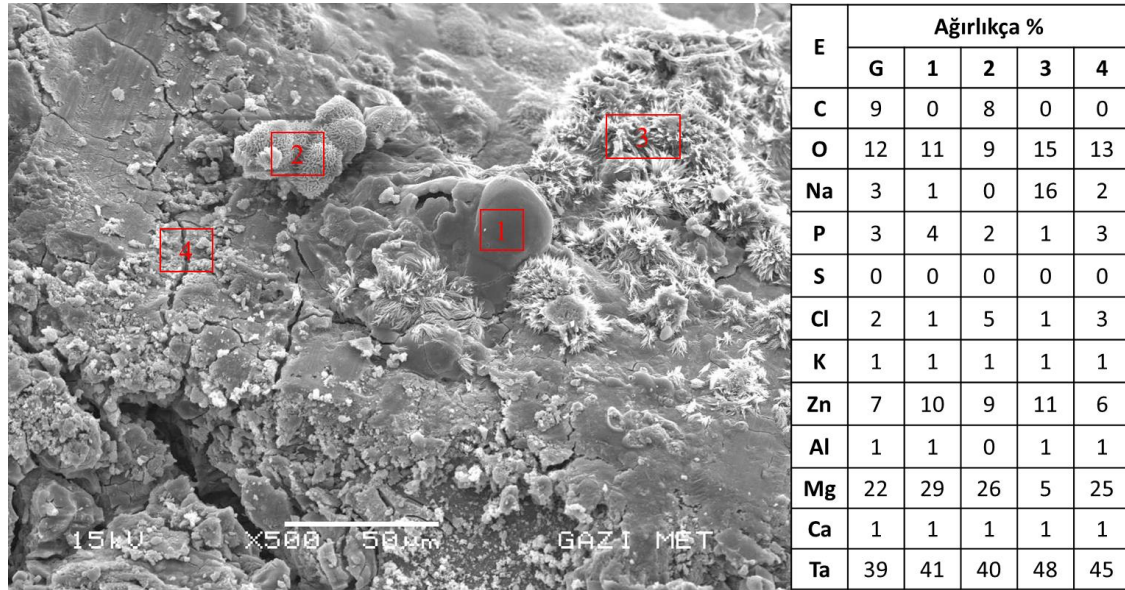


Şekil 1.3. Ta₂O₅ kaplı numuneye ait HBSS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

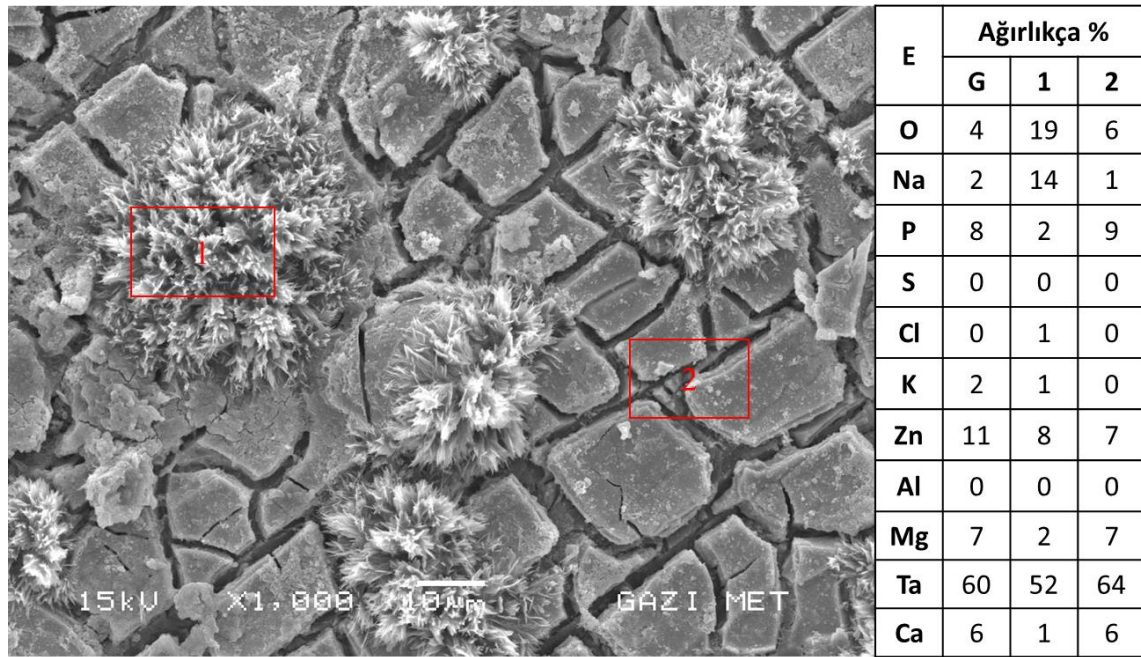


Şekil 1.4. %5 Hibrit kaplı numuneye ait HBSS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

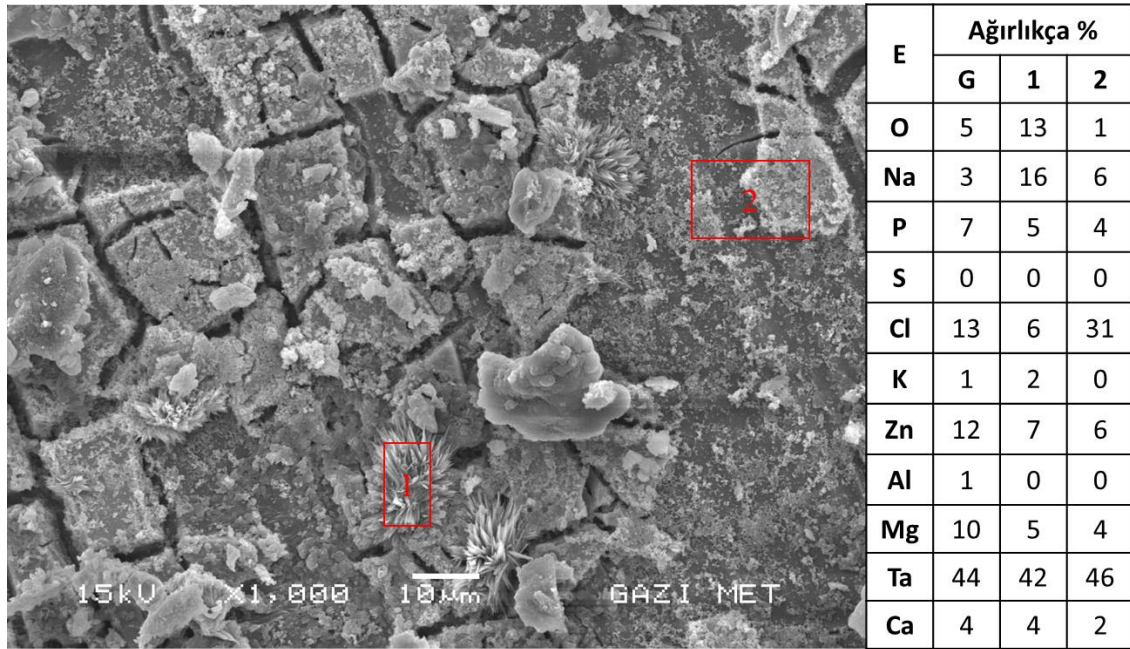


Şekil 1.5. %10 Hibrit kaplı numuneye ait HBSS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X500) ve EDS analizi tablosu

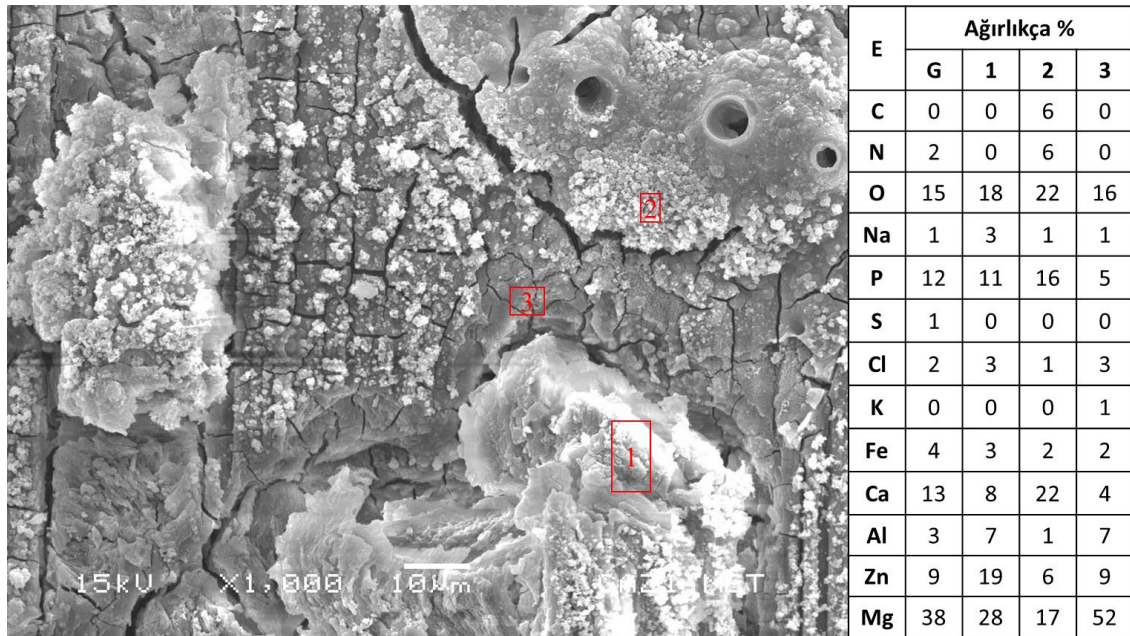


Şekil 1.6. %25 Hibrit kaplı numuneye ait HBSS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

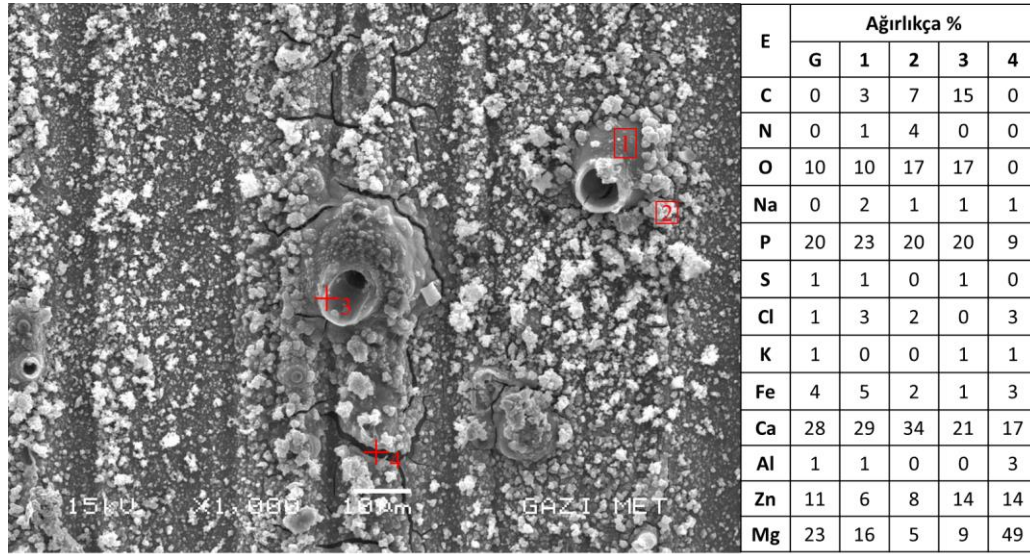


Şekil 1.7. Tabakalı kaplı numuneye ait HBSS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

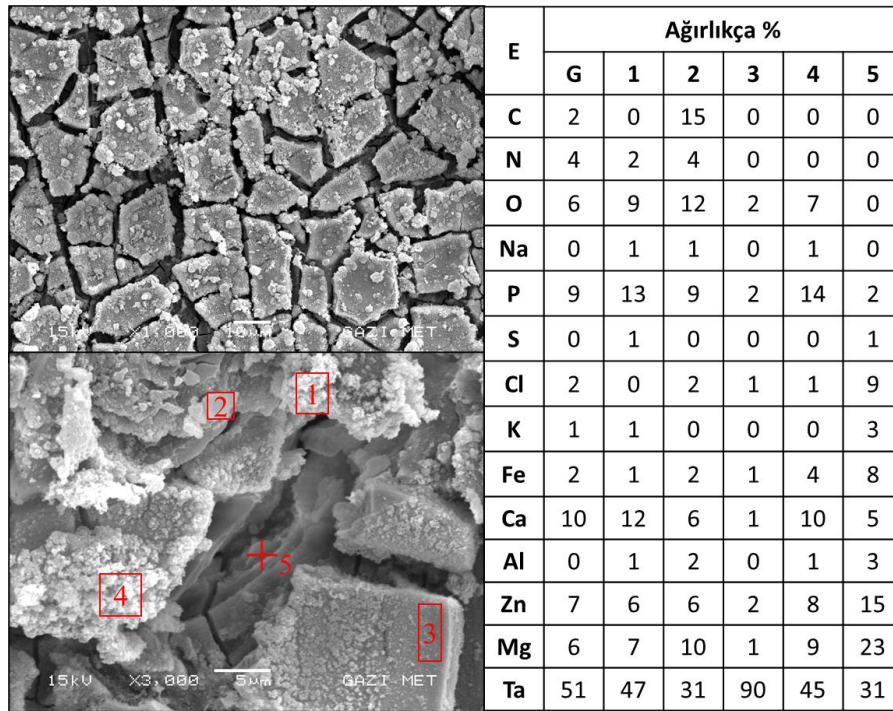


Şekil 1.8. Kaplanmamış AZ91 numunesine ait DMEM ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

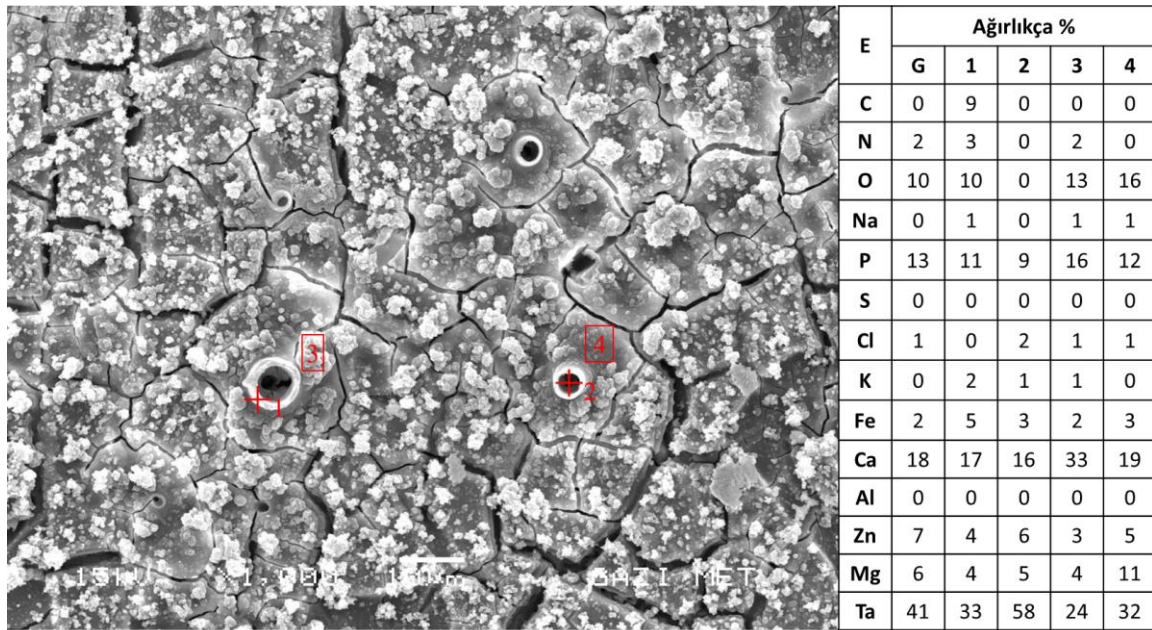


Şekil 1.9. HA kaplı numuneye ait DMEM ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

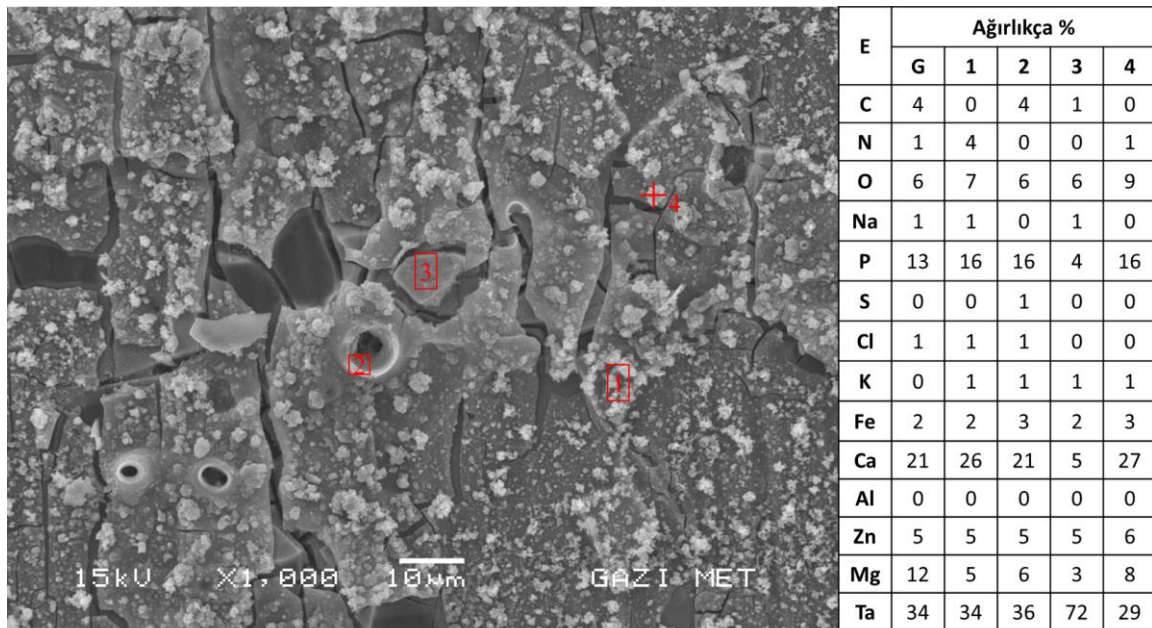


Şekil 1.10. Ta₂O₅ kaplı numuneye ait DMEM ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000, X3000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

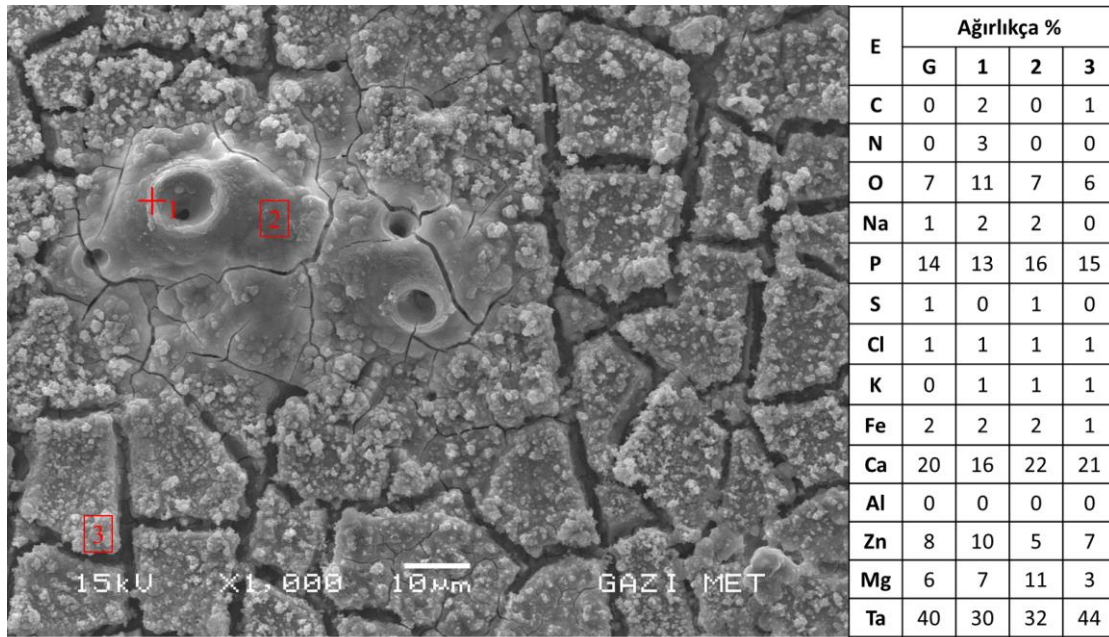


Şekil 1.11. %5 Hibrit kaplı numuneye ait DMEM ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

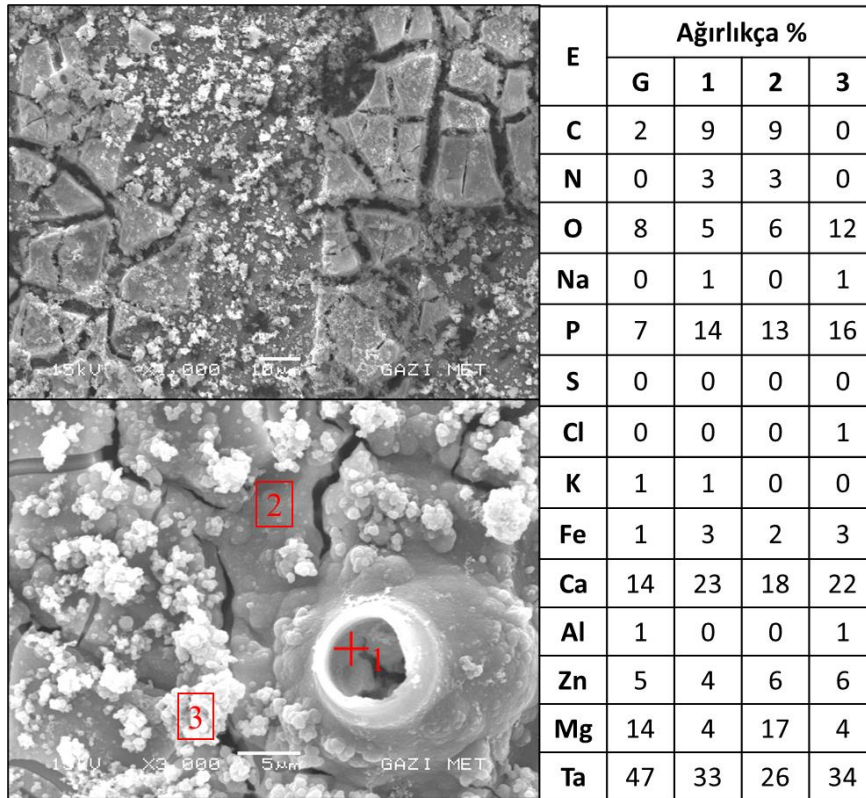


Şekil 1.12. %10 Hibrit kaplı numuneye ait DMEM ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

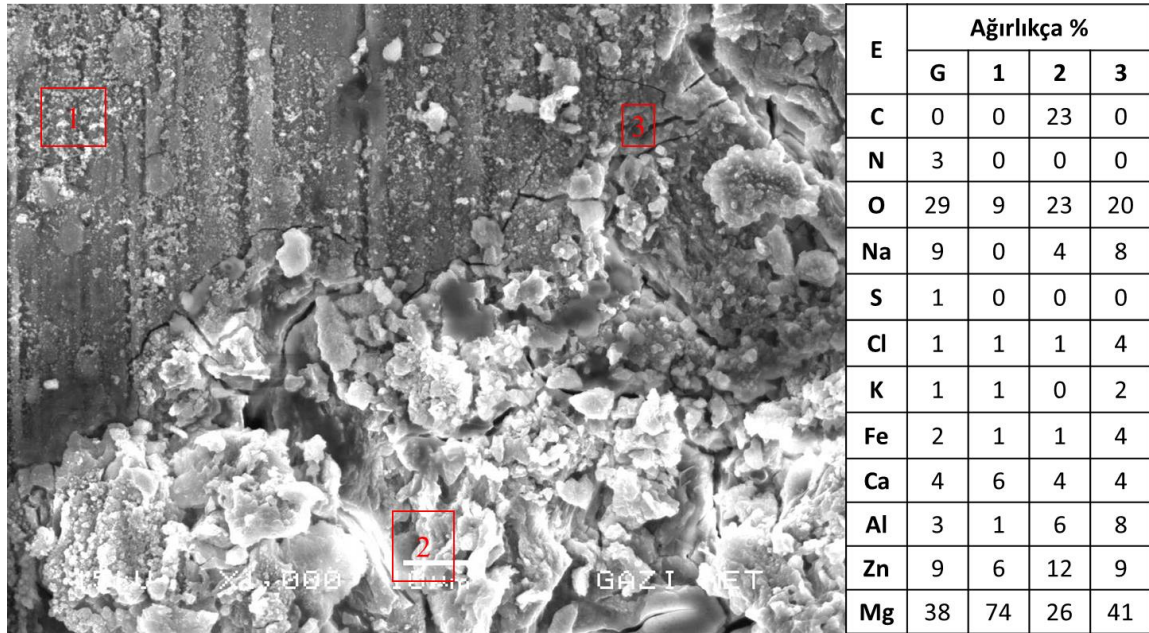


Şekil 1.13. %25 Hibrit kaplı numuneye ait DMEM ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

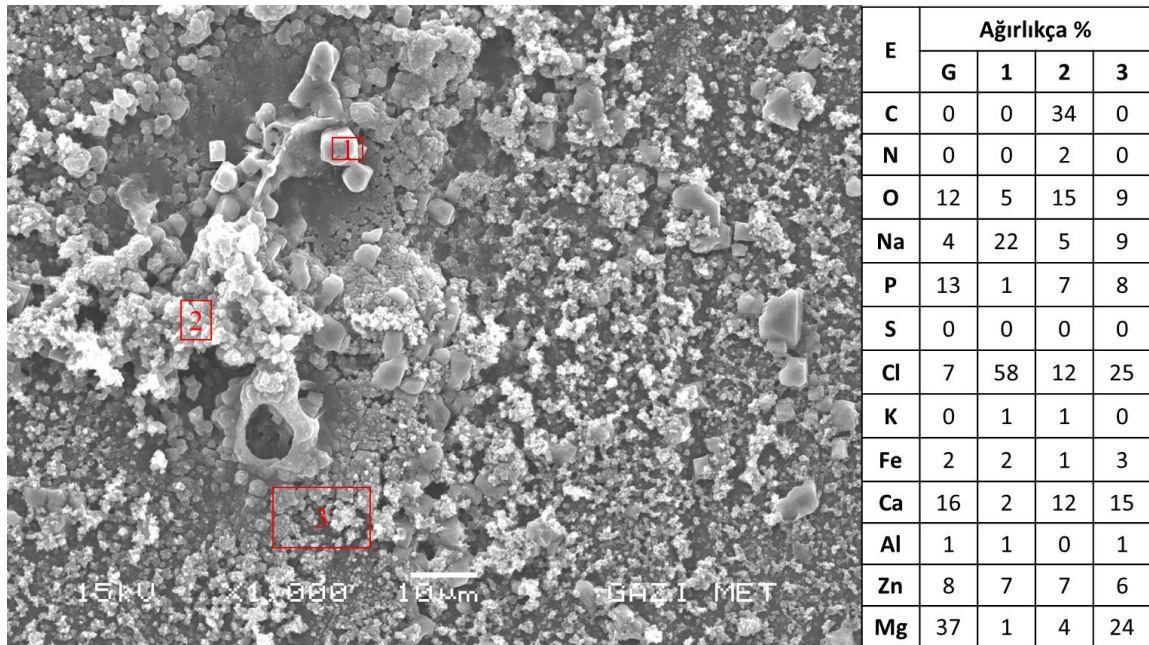


Şekil 1.14. Tabakalı kaplı numuneye ait DMEM ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000, X3000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

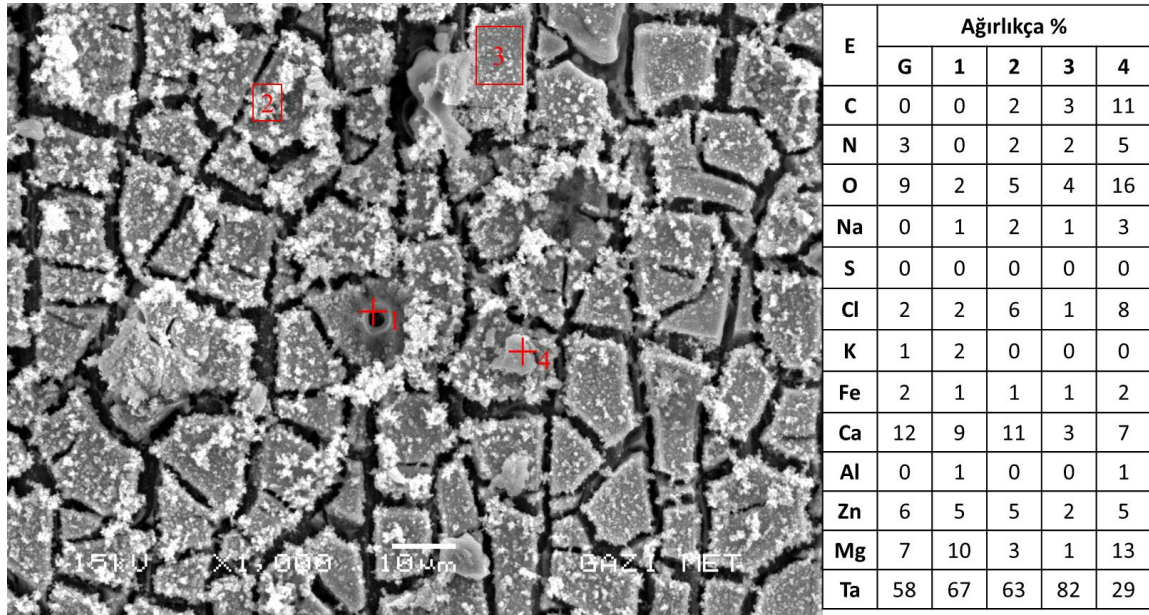


Şekil 1.15. Kaplanmamış AZ91 numunesine ait DMEM+%10 FBS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

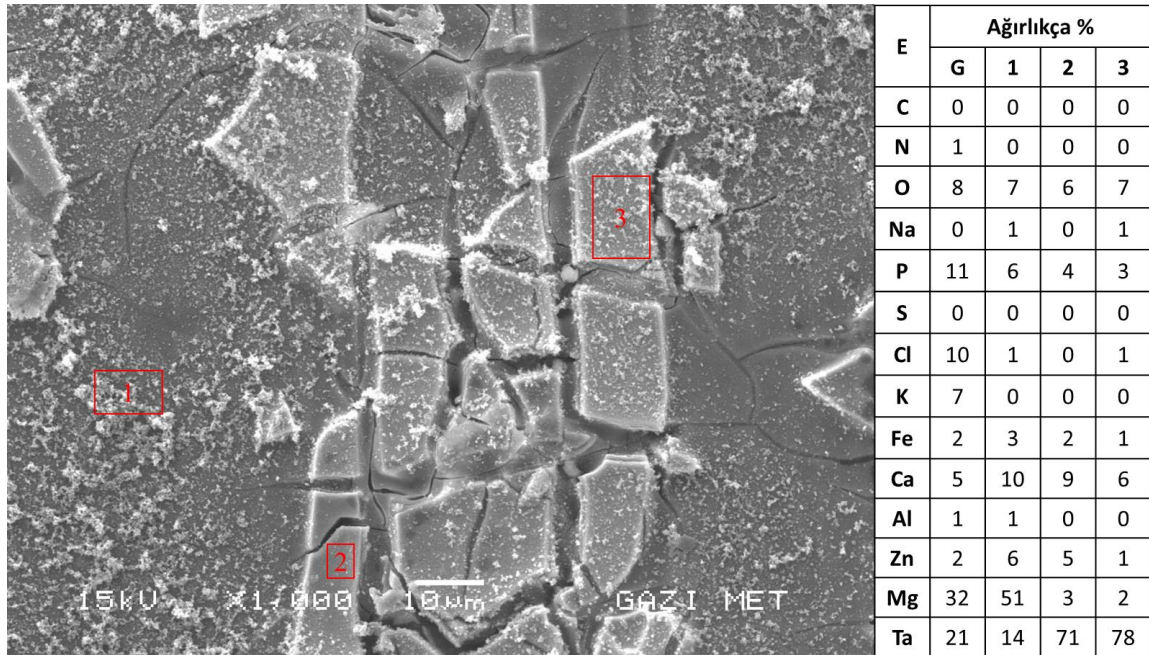


Şekil 1.16. HA kaplı numuneye ait DMEM+%10 FBS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

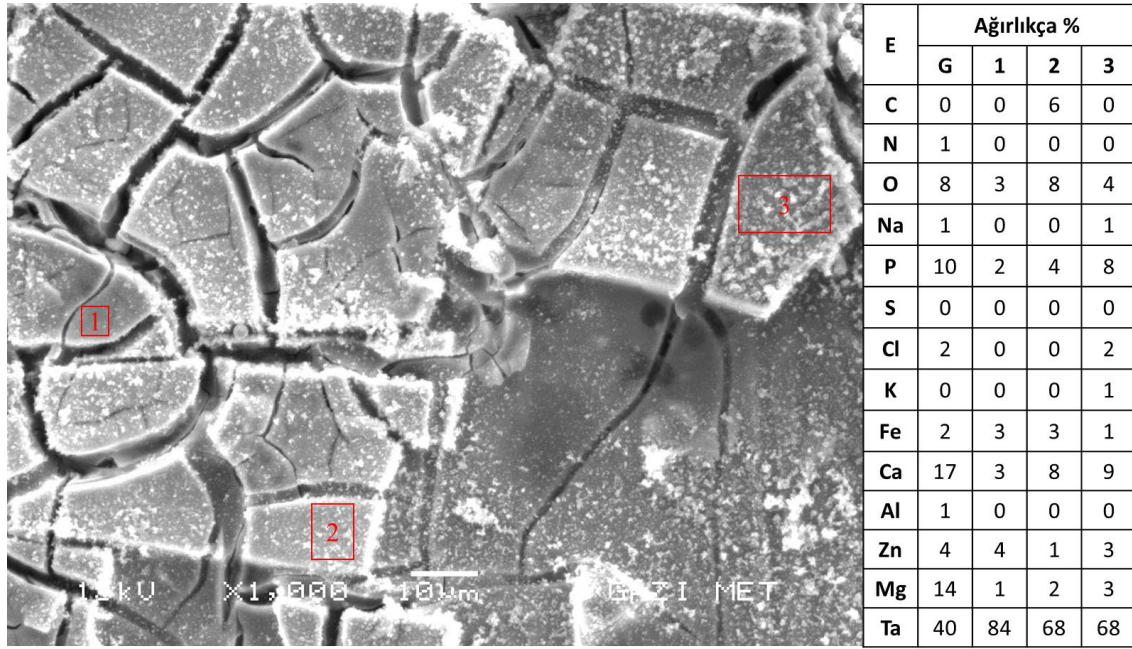


Şekil 1.17. Ta₂O₅ kaplı numuneye ait DMEM+%10 FBS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

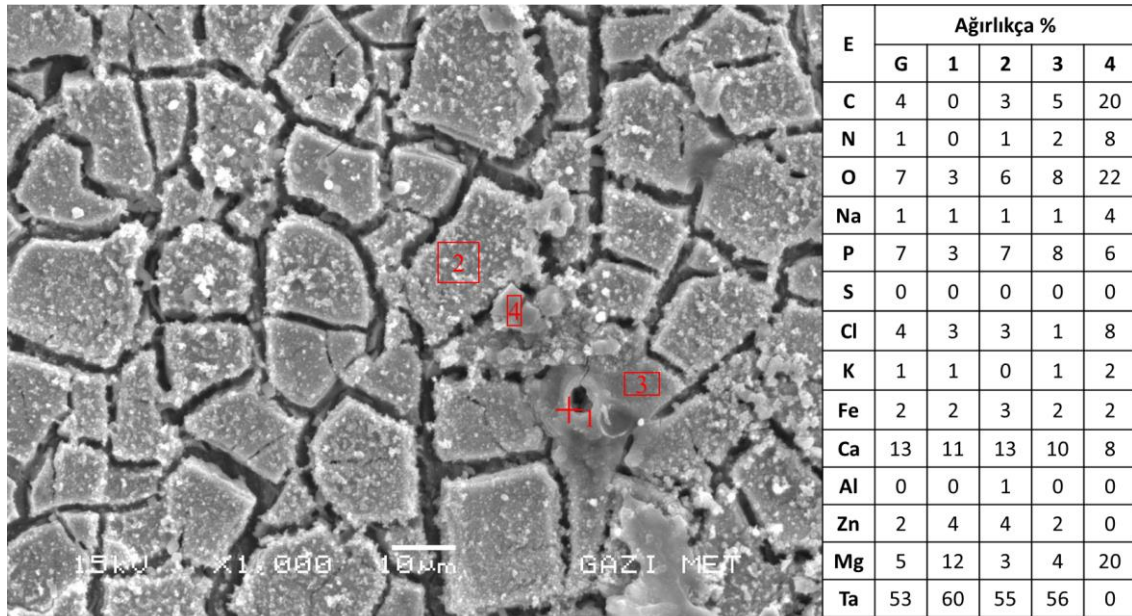


Şekil 1.18. %5 Hibrit kaplı numuneye ait DMEM+%10 FBS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri

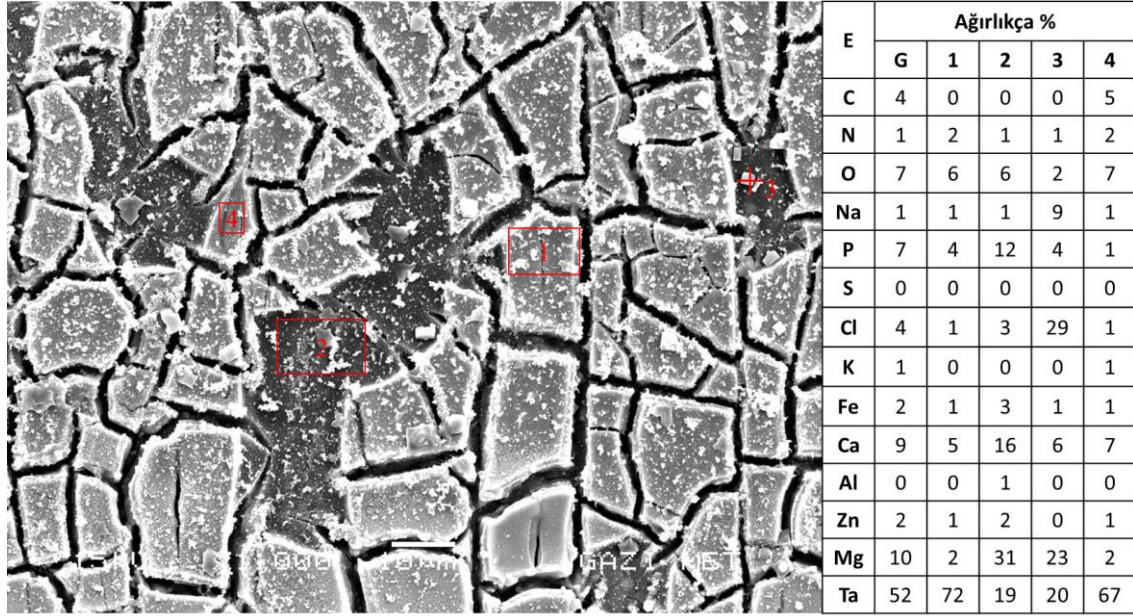


Şekil 1.19. %10 Hibrit kaplı numuneye ait DMEM+%10 FBS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu



Şekil 1.20. %25 Hibrit kaplı numuneye ait DMEM+%10 FBS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu

EK-1. (devam) Korozyon sonrası yüzeyden alınan eds verileri



Şekil 1.21. Tabakalı kaplı numuneye ait DMEM+%10 FBS ortamında yapılan korozyon testi sonrası yüzey SEM görüntüsü (X1000) ve EDS analizi tablosu



Gazili olmak ayrıcalıktır