

**Selenyum Eklenmiş Hidroksiapatit ile Biyomimetik Metot
Kullanılarak Kaplanan, Anti-Kanser ve Anti-Bakteriyel
Amaçlı Ti6Al4V Ortopedik İmplant Üretimi, Mekanik,
Yapısal ve Biyolojik Açılardan İncelenmesi**

Proje No: 111M262

Doç. Dr. Zafer EVİS
Prof. Dr. Nezahat GÜRLER

OCAK 2014
ANKARA

ÖNSÖZ

TÜBİTAK tarafından desteklenen MAG 111M262 no'lu ve "Selenyum Eklenmiş Hidroksiapatit ile Biyomimetik Metot Kullanılarak Kaplanan, Anti-Kanser ve Anti-Bakteriyel Amaçlı Ti6Al4V Ortopedik İmplant Üretimi, Mekanik, Yapısal ve Biyolojik Açılardan İncelenmesi" adlı proje 01.12.2011-01.12.2013 tarihleri arasında, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Bölümü Biyomalzeme Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yürütülmüştür. Bu projede, sert dokuların tedavisi ve düzgün çalışmayan eklemlerin işlevlerinin yerine getirilmesi amacıyla ortopedik ve dental alanda sıklıkla kullanılan bir titanyum alaşımı olan Ti6Al4V plakaların üzerine geleneksel olarak kaplanan hidroksiapatitin yapısına, kaplamaya anti-kanser ve anti-bakteriyel özellikler kazandırmak için, selenyum eklenmesi gerçekleştirilmiştir.

Proje kapsamında 1 adet Science Citation Index-Expanded (SCI-EXP) kapsamında yayımlanan dergide makale, 2 adet uluslararası konferansta poster sunumu ve 1 adet ulusal konferansta sözlü sunum gerçekleştirilmiştir. Yayın çalışmalarına halen devam edilmektedir.

Proje ekibi, başta sağlanan maddi destek olmak üzere, projenin hayata geçirilmesinde ve yürütülmesinde sağlanan her türlü olanak ve yardımları için TÜBİTAK Mühendislik Araştırma Destek Grubu'na teşekkür eder. Ayrıca proje ekibi, bu projede danışman olarak görev yapan Doç. Dr. Ayşen Tezcaner ve Doç. Dr. Sreeparna Banerjee'ye değerli görüş ve katkılarından dolayı şükranlarını sunar.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Biyomalzeme olarak Ti6Al4V	2
2.2. Hidroksiapatit	3
2.3. Ortopedik Alanda Kanser ve Enfeksiyon	4
2.4. Biyomimetik Yöntem ile Hidroksiapatit Kaplama.....	6
2.5. Hidroksiapatit Yapısına İyon Eklenmesi ve Selenyumun Önemi.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Zımparalama.....	13
3.2. Ultrasonik Temizleme.....	13
3.3. Alkali ve Isı İşlemleri.....	14
3.4. Normal Kompozisyonda 1.5×SBF Hazırlanması	15
3.5. Selenat Eklenmiş 1.5×SBF Hazırlanması.....	16
3.6. Plakaların Selenat Eklenmiş ve Normal 1.5×SBF'de Bekletilerek Kaplanması	17
3.7. Yüzey ve Yapı Analizleri	17
3.8. Sterilizasyon	18
3.9. Hücre Kültürü	18
3.9.1. Osteoblast (hFOB 1.19) Kültürü	18
3.9.2. Osteosarkom (Saos-2) Kültürü	19
3.10. Hücre Canlılık Testleri	19
3.10.1. Selenyum Çözeltilerinin Hazırlanması	20
3.10.2. Selenyum Çözeltilerinin Hücre Canlılık Testi	20
3.10.3. Selenat Eklenmiş ve Normal 1.5×SBF'de Bekletilerek Kaplanan Plakaların Hücre Canlılık Testi	22
3.11. Saos-2 Hücrelerin SEM Görüntülemesi İçin Plakalar Üzerine Ekilmesi	23
3.12. Saos-2 Hücrelerinin Plakalar Üzerinde Konfokal Mikroskopta İncelenmesi	24
3.13. Bakteri Kültürü	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	26
4.1. SEM ve EDS Sonuçları	26
4.1.1. Ön-işlemin Etkileri	26
4.1.2. Normal Kompozisyondaki 1.5xSBF ile Kaplama.....	26
4.1.3. Selenat Eklenmiş 1.5xSBF ile Kaplama	30

4.2. XRD Sonuçları	32
4.2.1. Normal Kompozisyondaki 1.5xSBF ile Kaplama	32
4.2.2. Selenat Eklenmiş 1.5xSBF ile Kaplama	33
4.2.3. Sterilizasyon Etkisi	35
4.3. FTIR Sonuçları	36
4.3.1. Normal Kompozisyondaki 1.5xSBF ile Kaplama	36
4.3.2. Selenat Eklenmiş 1.5xSBF ile Kaplama	38
4.4. Raman Spektroskopi Sonuçları	39
4.5. Çizik Testi	41
4.6. ICP-MS Sonuçları	42
4.7. Hücre Canlılık Testleri	43
4.7.1. Selenyumun Sitotoksitesinin Belirlenmesi	43
4.7.2. Selenat Eklenmiş ve Normal 1.5xSBF'de Bekletilerek Kaplanan Plakaların Hücre Canlılık Testi	45
4.8. Saos-2 Hücrelerin Kaplanan Plakalar Üzerinde SEM ile Görüntülenmesi	47
4.9. Saos-2 Hücrelerin Kaplanan Plakalar Üzerinde Konfokal Mikroskop ile Görüntülenmesi	48
4.10. Bakteri Tutulumu ve Üremesi	49
5. SONUÇ	53
KAYNAKLAR	55

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kan plazması ve literatürdeki bazı SBF'lere ait iyonik konsantrasyonlar [mM]	8
Tablo 2. 1.5×SBF ve insan kan plazması içerisindeki iyon derişimleri (Bigi vd. 2000).	15
Tablo 3. 1.5×SBF Hazırlanmasında kullanılan kimyasallar, miktarları ve çözünme sıraları. .	16
Tablo 4. Selenat eklenmiş 1.5×SBF ve insan kan plazması içerisindeki iyon derişimleri.	17
Tablo 5. Sitotoksisite testi yapılan çözeltiler ve hücre kültür ortamına eklendiğinde ortamdaki selenyum miktarları.	20
Tablo 6. Hücre canlılık testinde kullanılan kaplamalar.....	22
Tablo 7. Normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait XRD pikleri.	33
Tablo 8. Selenat eklenmiş 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait XRD pikleri.....	34
Tablo 9. Normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait FTIR pikleri.....	37
Tablo 10. Selenat eklenmiş 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait FTIR pikleri.	39

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Hidroksiapatit kristal yapısı (Jones, 2001). 3
- Şekil 2.** Plakaların ultrasonik temizleme cihazına yerleştirilmesi.14
- Şekil 3.** Yüksek dereceli fırın.....14
- Şekil 4.** Hücre canlılık testi yapılan selenyum çözeltilerinin hücrelerin içerisinde buldukları ortamlara eklenmesi.21
- Şekil 5.** Selenyum eklenmiş ve saf hidroksiapatit ile kaplanan Ti6Al4V plakaların hücre canlılığı testi için hazırlanan kuyucuklar.....22
- Şekil 6.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış Ti6Al4V plakaların alkali ve ısıtım işlem sonrası yüzeylerine ait SEM görüntüleri: (a) 500x büyütme (b) 40.000x büyütme.26
- Şekil 7.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtım işlem görmüş Ti6Al4V plakaların normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin SEM görüntüleri (500x): (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.....27
- Şekil 8.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtım işlem görmüş Ti6Al4V plakaların normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin EDS analizleri: (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.29
- Şekil 9.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtım işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin SEM görüntüleri (500x): (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.30
- Şekil 10.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtım işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin EDS analizleri: (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.31
- Şekil 11.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtım işlem görmüş Ti6Al4V plakaların normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin XRD analizleri: (a) standart hidroksiapatit (ICDD kart no 1-1008); (b) 4. gün; (c) 7. gün; (d) 10. gün; (e) 14. gün; (f) 21. gün.....32
- Şekil 12.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtım işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin XRD analizleri: (a) standart hidroksiapatit (ICDD kart no 1-1008); (b) 4. gün; (c) 7. gün; (d) 10. gün; (e) 14. gün; (f) 21. gün.34
- Şekil 13.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtım işlem görmüş ve biyomimetik yöntemle kaplanmış Ti6Al4V plakaların XRD analizleri: (a) selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 14. Gün; (b) selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 14. gün, sterilizasyon sonrası; (c) normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 14. gün; (d) normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 14. gün, sterilizasyon sonrası.36
- Şekil 14.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtım işlem görmüş Ti6Al4V plakaların normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin FTIR analizleri: (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.37

- Şekil 15.** 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısı işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin FTIR analizleri: (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.38
- Şekil 16.** Selenat eklenmiş ve normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de kaplanan Ti6Al4V plakaların Raman spektrumları: (a) selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 14. gün; (b) selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 7. gün S7; (c) normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 14. gün ve (d) normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 7. gün.40
- Şekil 17.** Biyomimetik yöntemle kaplanmış Ti6Al4V plakaların çizik testi analizleri: (a) S10; (b) S14; (c) N10; (d) N14; (e) sterilizasyon sonrası S14.....41
- Şekil 18.** Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra elde edilen kaplamaların ICP-MS analizlerine göre selenyum miktarları. (a) 7. gün; (b) 10. gün; (c) 14. gün ve (d) 21. gün.42
- Şekil 19.** Farklı derişimlerde selenyum içeren ortamlar için PrestoBlue testi sonuçlarına göre hFOB 1.19 hücre canlılığı (hata çubukları: standart hata) (****p>0,05).43
- Şekil 20.** Farklı derişimlerde selenyum içeren ortamlar için PrestoBlue testi sonuçlarına göre Saos-2 hücre canlılığı (hata çubukları: standart hata) (****p>0,05).44
- Şekil 21.** Selenat eklenmiş ve normal 1.5xSBF'de bekletilerek kaplanan plakaların PrestoBlue testine göre hFOB 1.19 hücre canlılığına etkisi (hata çubukları: standart hata) (*, **, ***p>0,05).45
- Şekil 22.** Selenat eklenmiş ve normal 1.5xSBF'de bekletilerek kaplanan plakaların PrestoBlue testine göre Saos-2 hücre canlılığına etkisi (hata çubukları: standart hata) (*, **, ***p>0,05).46
- Şekil 23.** Saos-2 hücrelerinin, farklı plakalar üzerine ekilerek 7 gün inkübasyonundan sonra alınan SEM görüntüleri (2000x): (a) N7; (b) S7; (c) N14; (d) S14 (oklar hücrelere ait uzantıları göstermektedir).47
- Şekil 24.** Farklı altlıklar üzerine FITC ve PI ile işaretlenerek ekilmiş, hücrelerin 1 gün inkübasyon sonrası konfokal mikroskop görüntüleri: (a) N7; (b) S7; (c) Lamel.....48
- Şekil 25.** Farklı altlıklar üzerine FITC ve PI ile işaretlenerek ekilmiş, hücrelerin 1 gün inkübasyon sonrası konfokal mikroskop görüntüleri: (a) N14; (b) S14; (c) Lamel.....49
- Şekil 26.** Bakteri ekilen plaka (N7, N14, S7, S14) ve kontrol gruplarının bulunduğu ortamlardan 1, 4 ve 7 gün inkübasyon sonrası alınan örneklere ait ışık geçirgenlikleri.50
- Şekil 27.** *S. epidermidis* bakterisi ekilmiş plakaların 1, 4 ve 7 gün inkübasyon sonrası SEM görüntüleri: (a) N7, 1. gün; (b) N7, 4.gün; (c) N7, 7.gün; (d) N14, 1.gün; (e) N14, 4.gün; (f) N14, 7.gün ; (g) S7, 1.gün; (h) S7, 4.gün; (i) S7, 7.gün; (j) S14, 1.gün;(k) S14, 4.gün; (l) S14, 7.gün (Büyütme:1000x).51

ÖZET

Sert dokuların işlevlerini yerine getirmek üzere vücuda yerleştirilen implantların çevresinde kanser oluşumu ve enfeksiyonun önlenmesi için implant yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada, selenyumun etkili bir antioksidan, potansiyel bir anti-kanser ve anti-bakteriyel ajan olma özelliklerini, hidroksiapatitin yüksek biyouyumluluk ve biyoaktivitesi ile birleştirmek amacıyla, biyomimetik yöntem ile yapısına selenyum eklenmiş hidroksiapatit Ti6Al4V plakalar üzerine kaplanmıştır.

Bu projede, normal kompozisyondaki 1.5×SBF (1,5 kat yoğun yapay vücut sıvısı) ile, içerisine selenat (SeO_4^{2-}) iyonu eklenmiş 1.5×SBF üretilmiş ve plakalar, bu çözeltilerde bekletilerek saf halde veya yapısına selenyum eklenmiş hidroksiapatitle kaplanmıştır. Elde edilen kaplamaların yüzey ve mikro yapıları SEM, EDS, XRD, ICP-MS, FTIR ve Raman spektroskopisi ile incelenmiştir. SEM görüntülerinden, her iki çözeltide kaplanan yüzeylerde 4. günde çekirdeklenmenin başlamış olduğu, çözeltide bekleme süresi arttıkça çekirdeklerin etrafında çökeltmenin devam ettiği ve oluşan kalsiyum fosfat yapının küçük yarım kürecikler halinde büyüdüğü görülmüştür. Selenyum içeren kaplamaların, normal kompozisyondaki 1.5×SBF'den elde edilen kaplamalarda olduğu gibi, standart hidroksiapatit XRD pikleri verdiği saptanmıştır. FTIR spektrumlarında önemli bir farka rastlanmamış, ancak Raman spektrumlarında, yapısına selenyum eklenen kaplamada ekstra zayıf bir bant görülmüştür. Ayrıca, selenat eklenmiş 1.5×SBF'de bekletilme süreleri 4 ile 21 gün arasında değişen kaplamaların tamamında ICP-MS yöntemiyle selenyum tespit edilmiştir. Çizik testi sonuçlarına göre, kaplamaların kritik yanal kuvvetlerinin 60-80 mN arasında farklı değerler aldığı görülmüştür.

Ayrıca, sağlıklı insan kemik hücreleri (hFOB 1.19) ve osteosarkom hücreleri (Saos-2) ile hücre canlılık testleri yapılmıştır. Saos-2 hücrelerinin çoğalması baskılanırken, hFOB 1.19 hücre canlılığında artış görülmesi açısından, 1ml hücre kültür ortamına 5×10^{-8} g selenyum içeren 100µl çözelti eklemenin optimum selenyum derişimini sağladığı gösterilmiştir. Ancak saf veya selenyum içeren kaplamalar üzerine doğrudan ekilen iki farklı hücre tipi için de canlılığın, hücre kültür plastiği üzerine ekilen kontrol grubundan düşük olduğu tespit edilmiştir. Kaplamaların anti-bakteriyel özelliklerini araştırmak için *S. epidermidis* bakterisinin implant yüzeyi üzerindeki tutunma ve çoğalma davranışı tespit edilmiştir. Selenat eklenmiş 1.5×SBF'de 7. günde elde edilen kaplama üzerinde bakteri sayısının zamanla azaldığı gözlemlenmiştir.

ABSTRACT

In order to prevent the occurrence of cancer and infection around the implants, which are placed in the body to perform the functions of hard tissues, it is very important to functionalize the surface. In this study, to combine the effective antioxidant and potential anti-cancer and anti-bacterial properties of selenium with the high biocompatibility and bioactivity of hydroxyapatite, selenium was added to the structure of hydroxyapatite via biomimetic method and coated on Ti6Al4V plates.

In this project, 1.5×SBF with normal concentration (1.5 times denser simulated body fluid, SBF) and selenate (SeO_4^{2-}) ion added 1.5×SBF were prepared and the plates were coated with pure or selenium added hydroxyapatite by immersing them into these solutions. The surface and micro-structure of the resulting coatings were characterized by SEM, EDS, XRD, ICP-MS, FTIR and Raman spectroscopy. From SEM micrographs, it was observed that the nucleation had already started on the 4th day of immersion, the precipitation continued around the nucleation sites with increasing immersion time and the calcium phosphate precipitate grew in the form of small half-spheres in both of the solutions. Selenium-containing coatings, as the coatings obtained from the normal 1.5×SBF, exhibited the standard hydroxyapatite XRD peaks. There were no significant differences observed in the FTIR spectra, however, there was an extra weak band in the Raman spectrum of the selenate added coating. Additionally, selenium was detected in all of the coatings with different immersion times ranging from 4 to 21 days via ICP-MS method. According to the scratch test results, the critical lateral forces of the coatings varied between 60 and 80 mN.

In addition, cell viability tests were performed by using normal human osteoblasts (hFOB 1.19) and osteosarcoma cells (Saos-2). It was determined that adding 100µl solution, which contains 5×10^{-8} g selenium, into 1ml of the cell culture media provided the optimum concentration of selenium in terms of inhibiting the growth of Saos-2 cells while promoting the growth of hFOB 1.19 cells. However, the cell viability of both of the cell types, which were seeded directly on the pure or selenium containing coatings, were less than the control group, which is seeded on tissue culture plastic. In order to evaluate the anti-bacterial property of the coatings, the adhesion and proliferation behavior of *S. epidermidis* bacteria was studied. It was shown that the number of bacteria was decreased on the coating which is obtained from the selenate added 1.5×SBF at 7th day of immersion.

1. GİRİŞ

Günümüzde, çözüm bekleyen sağlık sorunları içerisinde kanser, en önemli hastalık olarak öne çıkmaktadır. İkincil kanser olguları arasında en sık görülenlerden biri olan kemik kanseri de akademik çevrelerin ortopedi alanında ilgisini yoğunlaştırdığı bir konu haline gelmiştir. Kemik kanseri tedavisinde ortopedik implant kullanımının önemi büyüktür. Ancak, tümörün alınmasını takiben yapılan implant uygulamalarıyla yeni sorunlar meydana gelebilmektedir. İmplant çevresinde tekrar kanser oluşumu ve cerrahi müdahaleye bağlı enfeksiyon bu sorunların başlıcalarıdır.

Metalik ortopedik implantlar, uzun yıllardır, iskelet sistemindeki hasarları gidermek ve düzgün çalışmayan eklemlerin işlevlerini yerine getirebilmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ortopedik implant malzemeleri içerisinde titanyum (Ti) ve alaşımı (Ti6Al4V), mekanik özellikler açısından sert dokularla eşleşebilmeleri, vücut sıvılarında korozyona karşı dirençli olmaları ve hafiflik gibi kendine has özellikleri sayesinde en sık kullanılan biyomalzemeler olarak nitelendirilebilir. Ancak, Ti veya daha iyi mekanik özelliklere sahip olan Ti4Al6V, kemik dokusuyla implant entegrasyonu açısından istenilen biyoaktivite özelliğini gösterememektedir. Bu nedenle, bu malzemelerde yapılan implantların yüzeyleri, mükemmel biyouyumluluğu ve biyoaktivitesinden yararlanabilmek amacıyla hidroksiapatit (HA) ile kaplanabilmektedir. Ancak, hidroksiapatit kaplamalar, yapısına iyon eklenerek fonksiyonelleştirilmedikçe, kanser oluşumunu ve tekrarlamasını engelleme, enfeksiyon riskini azaltma gibi özelliklerden yoksundur.

Bu çalışmada, hidroksiapatitin yapısına selenyum ekleyerek, anti-kanser ve anti-bakteriyel özellik kazandırılıp Ti6Al4V yüzeylere kaplanması ile yeni ve üstün nitelikli bir implant üretmek hedeflenmiştir. Bu amaçla, Ti6Al4V plakalar, biyomimetik yöntem kullanılarak saf ve selenyum eklenmiş hidroksiapatit ile kaplanmıştır. Elde edilen kaplamaların mikro yapıları, topografileri ve elemental oranları, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elemental oranlar enerji dağılım spektroskopisi (EDS) ile; kaplamada oluşan fazlar X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi ile; bağlar ise Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) ve Raman spektroskopisi ile belirlenmiştir. Endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile Se elementinin kaplama içerisindeki miktarı tespit edilmiştir. Kaplamanın mekanik özellikleri açısından fikir sahibi olabilmek için nano-çizik testi uygulanmıştır. Ayrıca, sağlıklı kemik hücreleri ve osteosarkom hücreleri ile sitotoksitenin belirlenmesi açısından kültür çalışması yapılmıştır. Kaplamaların anti-bakteriyel özelliklerini araştırmak için *S. epidermidis* bakterisinin implant yüzeyi üzerindeki davranışı tespit edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Biyomalzeme olarak Ti6Al4V

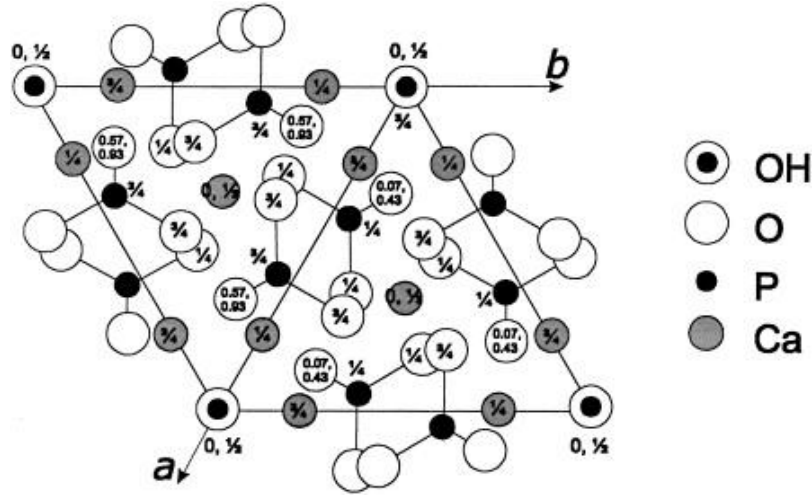
Titanyum ve titanyum alaşımları, uygun mekanik özellikleri, şekillendirilebilir ve işlenebilir olmaları, korozyona karşı dayanıklı olmaları ve biyouyumlulukları nedeniyle biyomedikal alanda özellikle iskelet sistemi implant malzemesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel anlamda, paslanmaz çelik ve kobalt-krom alaşımlarını da kapsayan metalik biyomalzemeler ise dental, maksillofasiyal, ortopedik, kalp-damar ve KBB'ye ilişkin alanlarda yararlanılan implantlarının üretiminde kullanılmaktadır (Conde vd., 2013). Ancak, paslanmaz çeliğe ve kobalt içeren alaşımlara göre, titanyum ve alaşımlarının daha düşük modül, daha yüksek biyouyumluluk ve korozyon dayanımına sahip olmaları, medikal uygulamalarda daha çok tercih edilmelerini sağlamıştır.

Titanyum ile alaşım yapabilen elementler üç kategoriye ayrılmaktadır: (1) Al, O, N, C gibi α -stabilizatörler, (2) Mo, V, Nb, Ta, Fe, W, Cr, Si, Co, Mn, H gibi β -stabilizatörler, (3) Zr gibi nötrler. Titanyum alaşımlarından α ve α -yakın olanlar, yüksek korozyon direnci gösterirler ancak düşük sıcaklıklarda dayanımları sınırlıdır. β titanyum alaşımları ise düşük elastik modülüs ve yüksek korozyon direncine sahiptir. Diğer yandan, Ti6Al4V gibi $\alpha+\beta$ titanyum alaşımlarının hem α hem de β fazını içermeleri sebebiyle dayanımları çok yüksektir (Liu vd. 2004).

Yukarıda belirtildiği gibi, optimal mekanik özelliklere ve yüksek biyouyumluluğa sahip oluşuyla ideal bir implant malzemesi olarak nitelendirilen titanyum alaşımı Ti6Al4V, ortopedik cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, her ne kadar Ti6Al4V bu alanda vazgeçilmez bir malzeme olsa da, doğrudan kemik-implant teması sağlansa bile, kemik ile kimyasal bağ yapabilme yeteneğine sahip değildir (Wu vd., 2008). Kısaca, Ti6Al4V alaşımının biyoaktivite özelliği yoktur. Diğer taraftan, operasyon sonrası hastanın iyileşme süresindeki riskleri minimuma indirmek için implant yüzeylerinin biyoaktif olması istenmektedir ve bu amaçla yüzeyin hidroksiapatit ile kaplanması yaygın olarak uygulanmaktadır (Başpınar vd., 2009). Böylelikle, doğal kemiğin yapısında da bulunan ancak, kırılabilirliği sebebiyle ortopedik alanda tek başına kullanımı sınırlı olan hidroksiapatitin, kusursuz biyoaktivite ve biyouyumluluk özelliklerinden faydalanabilmek için olanak yaratılabilmektedir. Günümüzde, bu amaçla yürütülen çalışmalar, hidroksiapatiti Ti6Al4V yüzeyine kaplayabilmenin yanı sıra, çözünürlük, kristallik ve mukavemet gibi özelliklerini de istenilen düzeylere çekebilmek için, kimyasal bileşimi ve mikro yapısı üzerinde değişiklik yapabilmeyi hedeflemektedir.

2.2. Hidroksiapatit

İnsan iskelet sisteminde doğal olarak var olan apatit ile benzer kimyasal bileşime ve kristal yapıya sahip olan hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, bu benzerliği ile klinik uygulamada bir implant malzemesi olarak büyük ilgi toplamıştır. Kemik dokusu, zengin bir kalsiyum ve fosfat ortamının varlığında hidroksiapatit yüzeyi boyunca hızlıca büyüebilir ve bu yüzeyle doğrudan kuvvetli kimyasal bağlar oluşturabilir (Wang vd., 2008). Kemik matrisi, inorganik, organik ve su şeklinde üç ana bileşenden oluşur. İnorganik faz hemen hemen tümüyle hidroksiapatit olup kemik ağırlığının %66'sını ve hacimce %50'sini oluşturmaktadır (An ve Draughn, 2000). Hidroksiapatitin kristal yapısı Şekil-1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Hidroksiapatit kristal yapısı (Jones, 2001).

Yukarıda da bahsedildiği gibi, doğal kemiğin inorganik yapısı büyük oranda hidroksiapatit ile benzerlik göstermektedir, ancak doğal kemikte saf hidroksiapatitten farklı olarak F^- , Mg^{+2} , CO_3^{-2} , Cl^- , Na^+ , K^+ , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} gibi iyonlar bulunmaktadır (Tavares vd., 2010). Ayrıca, hidroksiapatitin kristal yapısı çeşitli iyonik ve kimyasal gruplar dahil edilerek değiştirilmeye müsaittir.

Buradan yola çıkarak, istenilen yapısal, mekanik ve biyolojik özellikleri kazandırabilmek için, hidroksiapatit içerisine çeşitli iyonların ilave edilmesi fikri ortaya çıkmıştır ve son dönemde bu yönde gerçekleşen başarılı uygulamalar, konunun biyomalzeme bilimi çevrelerince ilgi çekmesine sebep olmuştur. Örneğin, stronsiyumun osteoporoz tedavisinde kullanılması (Renaudin vd., 2008), gümüşün antibiyotik özellikte olması (Park vd. 2005), çinkonun kemik oluşumunu olumlu yönde etkilemesi (Miao vd., 2005), bu elementlerin, ortopedik uygulamalarda kullanılmak üzere üretilen hidroksiapatitin yapısına eklenmesini amaçlayan çalışmalarda kullanılmasını sağlamıştır.

Ayrıca literatürde, normalde insan vücudunda bulunmasa da, farklı sebeplerle hidroksiapatit içerisine eklenen itriyum, lantan, indiyum, bizmut gibi elementler de vardır (Mróz vd., 2010). Çeşitli iyon veya iyonlar eklenmiş hidroksiapatitin, Ti6Al4V implantlar üzerine kaplanmasıyla, çözünme, sertlik, kırılabilirlik gibi mekanik özellikleri istenilen düzeye getirilmiş, yüksek biyouyumlu, biyoaktif, anti-bakteriyel veya tüm bu özellikleri bir arada taşıyan ortopedik implant üretimi mümkün olabilir.

2.3. Ortopedik Alanda Kanser ve Enfeksiyon

Günümüzün en önemli sağlık sorunu olarak tanımlanan kanser üzerine yeni ilaç ve tedavi geliştirme çalışmaları tüm dünyada devam ederken, ortopedik biyomalzeme alanında, özellikle kemik kanserini hedef alan çalışmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Oysaki, birincil olarak çok sık görülmemesine rağmen, akciğer ve karaciğer kanserlerinden sonra, metastatik tümör için üçüncü en sık rastlanan kanser çeşidi olan kemik kanseri (Chowdhry vd., 2009) hastalar için büyük problem teşkil etmeye devam etmektedir. Bu kanserin tedavisinde, kemikteki tümörün cerrahi müdahale ile çıkarılması sonrasında oluşan alana implant yerleştirilmesi, özellikle uzun kemiklerde, en yaygın çözümlerden biridir (Graci vd., 2010). Ancak, bazı durumlarda kanserli hücrelerin ortamdan tamamen uzaklaştırılamaması sebebiyle, kalan kanser hücreleri implant yerinde tekrar kanser oluşumuna yol açabilmektedir (Tran vd., 2010b).

Bunun yanında, literatürde, doğrudan metalik implant malzemelerden kaynaklanan tümör gelişimi hakkında birçok vaka rapor edilmiştir (Visuri vd., 2006). Örneğin, çeşitli biyomalzemelerin tümör geliştirme ihtimalinin araştırıldığı bir çalışmada, titanyum diskler diğer malzemelere göre en düşük oluş sıklığına sahip olsa da; 2 yıl içinde, bu disklerin uygulandığı bölgenin %12'sinin sarkom geliştirdiği tespit edilmiştir (Kirkpatrick vd., 2000). Her iki durum, implant malzemelerinin anti-kanser özellik kazanabilmesinin ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Bu noktada, birçok kanser çeşidinin önlenmesi, tedavisi ve yeniden oluşumunun engellenmesi açısından umut veren selenyumun (Letavayova vd., 2006; Navarro- Alarcon ve Cabrera-Vique, 2008; Combs,2001) hidroksiapatit yapısında kullanılması fikri ortaya çıkmıştır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, kemik kanserinin, birincil olarak çok sık rastlanmadığı ancak, başka bir organdaki kanserden metastaz yoluyla oluşan kanserler arasında en sık görülenlerden biri olduğu bilinmektedir (Tran vd., 2010b; Cecen ve Bolaman, 2010). Buna rağmen, Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society, 2014) tarafından yayınlanan istatistiklere göre, ABD'de 2013 yılında, 1.680'i erkek ve 1.330'u kadın olmak üzere toplam

3.010 bireye birincil kemik ve eklem kanseri tanısı koyulacağı; bu bireylerden 1.440'ının hayatını kaybedeceği tahmin edilmiştir. Diğer yandan, geçmiş çalışmalarda, ABD'de her yıl meydana gelen 1,2 milyon yeni kanser vakasının yaklaşık 300.000'inde ikincil kemik kanseri geliştiği bildirilmiştir (Chowdhry vd., 2009). Tıbbi çevrelerce, kansere bağlı ölüm vakalarında, ölüm sebebi kemiğe yayılım yapan ilk organ kanseri ile ilişkilendirildiği için, ikincil kemik kanserine bağlı ölümlere ait veriler gerçeğinden az olarak bildirilmekte ve istatistiklere bu şekilde yansımaktadır (Tran vd., 2010b). Ancak, yapılan otopsi çalışmaları, meme ve prostat kanseri olan hastaların %70'inde iskelet sistemi metastazı geliştiğini göstermiştir. Bu oran, tiroid (%40), böbrek (%35), bronş (%35) ve rektal (%10) kanserlerde de önem taşımaktadır (Chowdhry vd., 2009).

Kemik kanserinde sıklıkla uygulanan tedavi yöntemlerinden biri kanserli dokunun cerrahi yöntemlerle alınmasını takiben ortopedik implantın, alınan dokunun işlevini kısmen yerine getirebilmek üzere yerleştirilmesidir (Tran vd., 2010c). Ancak, bu yöntemle kanser hücrelerinin tamamıyla ortamdaki uzaklaştırılmadığı durumlarda, implant çevresinde tekrar kanser oluşumu görülebilmektedir.

Yalnız vd. (2008) tarafından, ülkemizde yapılan bir çalışmada, 1997-2007 yılları arasında alt ve üst ekstremitelerde kemik tümörlerine yönelik 'geniş parça alımı' ve çimentolu tümör endoprotezi ile yeniden yapılandırma uygulanan 23 hasta geriye dönük olarak incelenmiştir. Söz konusu hastaların 12'sinde (%52,2) metastatik, 11'inde (%47,8) primer tümör gelişmiş olduğu belirtilmiştir. Cerrahi müdahale sonrası, yapılan son kontrollerde, 23 hastanın 11'inin tümöre bağlı nedenlerle öldüğü, 3 hastada uzak metastaz olduğu, 9 hastanın ise tümör bulgusu olmadan yaşayabildiği saptanmıştır. Ölen hastaların, 10'unun metastatik tümörlü, birinin ise primer tümörlü gruptan olduğu rapor edilmiştir. Tedavi sonrası en sık rastlanan komplikasyon ise %13 oranıyla aynı bölgede tekrar tümör oluşumu (lokal nüks) olarak bildirilmiştir.

Bunun dışında, ortopedik cihazlarda kullanılan biyomalzemelerin genellikle toksik olmadığı kabul edilse de, bu cihazların bazı bileşenlerinin, yapılan hayvan çalışmalarında potansiyel kanserojen olabileceği gösterilmiştir. İnsanlarda ise, ortopedik implant ilişkili malignite gelişme durumu nadir olsa da, bu alandaki en ciddi komplikasyondur (Keel vd., 2001).

Ayrıca, kanser gelişiminden bağımsız olarak, cerrahi fiksasyonda en sık görülen komplikasyonlardan biri implant çevresi enfeksiyonlarıdır. İmplant yüzeyinin enfeksiyona açık olmasının ana nedeni yüzeyde biyofilm oluşumu ve implant-doku arayüzünde bağışıklığın düşmüş olmasıdır. Biyofilmler, mikrobik sebepli, substrata, arayüze veya birbirlerine

dönüşümsüz olarak bağlanmış, kendi ürettikleri hücre-dışı (ekstraselüler) polimerik matris içerisine gömülü olan ve büyüme hızı ve gen transkripsiyonu açısından bozulmuş bir fenotip sergileyen hücrelerle karakterize edilen sesil (yerleşik) bir topluluk olarak tanımlanmaktadır. Biyofilm oluşumu yüzeye bağlanmış olan bakterilerin bağışıklık sisteminden korunmasına yardımcı olur. Lokal savunma sistemi cerrahi travmadan dolayı hayli zarar görmüş olduğundan implantasyondan sonra erken aşama enfeksiyon açısından en tehlikeli zamandır (Zhao vd., 2009).

İmplant çevresi enfeksiyonlarının üçte ikisinin sebebi stafilokoklardır (Tetrycz vd., 2010). Dört çeşit selenyum bileşiğinin, bir stafilokok olan *Staphylococcus aureus* bakterisinin çoğalması üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılmış olan bir çalışmada, selenyumun bu bakterinin çoğalmasını engellemede başarılı olduğu görülmüştür (Xi vd., 2002). Ayrıca, ortopedik implant çevresinde oluşan enfeksiyonların önlenmesini amaçlayan çalışmalar, antibiyotik yüklü kaplamalar ile bölgesel ilaç salımı üzerinde yoğunlaşmaktadır (Moriarty vd., 2010). Bu durum, bu projede kullanılan selenyumun, antibiyotik bir ajan olarak, implant yüzeyine uygulanmasının mümkün olabildiğini ve önemini ortaya koymaktadır.

Son yıllardaki teknolojik ilerlemeler ile biyoloji ve malzeme biliminde moleküler seviyede gerçekleşen gelişmeler sayesinde, ortopedik implantlara, daha iyi sonuçlar elde edebilmek için, bir takım özellikler kazandırılabilir hale gelmiştir. Örneğin, canlı kemik dokusu ile entegrasyonu aktif olarak teşvik edebilen biyoaktif özellikteki malzemeler, sağlıklı kemik hücrelerinin yayılması, çoğalması ve tutunabilmesi gibi olgularda başarı sağlamaktadırlar. Ayrıca, özellikle ağız içi uygulamalarda kullanılan biyomalzemelerin bakteri ve biyofilm oluşumunu önleyebilmeleri için çeşitli yüzey uygulamaları ile adhezyona karşı direçli veya çeşitli ajanlarla anti-bakteriyel hale getirilmeleri mümkündür.

2.4. Biyomimetik Yöntem ile Hidroksiapatit Kaplama

Ortopedik alanda kullanılan ve biyoaktif olduğu bilinen malzemelere en yaygın örnek olarak hidroksiapatit verilebilir (Gupta ve Kumar, 2008). İnsan iskelet sisteminde doğal olarak var olan apatit ile benzer kimyasal bileşime ve kristal yapıya sahip olan hidroksiapatit, bu benzerliği ile klinik uygulamada bir implant malzemesi olarak büyük ilgi toplamıştır. Kemik dokusu, zengin bir kalsiyum ve fosfat ortamının varlığında hidroksiapatit yüzeyi boyunca hızlıca büyüyebilir ve bu yüzeyle doğrudan kuvvetli kimyasal bağlar oluşturabilir (Wang vd., 2008). Bununla beraber, kemik dokularla göstermiş olduğu mükemmel biyouyumluluk ve biyolojik bağa rağmen, süneklik ve tokluk gibi mekanik özellikleri hidroksiapatitin yük taşıyan uygulamalarda tek başına kullanımı kısıtlamaktadır. Bu sebeple, hidroksiapatit genellikle

titanyum ve titanyum alaşımları gibi metal yüzeylere, metalik bileşenin üstün mekanik performansı ve hidroksiapatitin mükemmel biyolojik cevaplarını bir arada kullanabilmek için kaplanmaktadır (Wang vd., 2008).

Hidroksiapatit kaplı implantlar, ilk kez 1985 yılında, Furlong ve Osborn tarafından klinik çalışmalar için kullanılmıştır (Yang, 2010). Laboratuvar araştırmaları ve klinik uygulamalı çalışmalar halen artan bir ilgi ile devam etmektedir. Bugün, metalik implantlar üzerine hidroksiapatit kaplama için çeşitli teknikler uygulanabilir durumdadır. Bu tekniklere, plazma püskürtme, elektrolitik çöktürme, darbeli lazer kaplama, saçılma, sol-gel ve biyomimetik metodu ile kaplama örnek verilebilir (You vd., 2001; Ak Azem ve Çakır, 2008; Yang vd., 2005).

Bu teknikler arasında, plazma püskürtme kolay ve ekonomik olması sebebiyle, günümüzde dünya çapında kullanılan en yaygın yöntemdir. Ancak, bu yöntemle yapılan hidroksiapatit kaplamanın, kalınlığında, yoğunluğunda ve yapısında sapmalar, ayrıca, metal arayüzünde oluşturduğu bağın kuvvetinde de yer yer farklılıklar olduğu bildirilmiştir (Yang vd., 2005; Besu, 2007). Bu sorunlara ek olarak, plazma püskürtme, 'görüş açısı'na bağlı bir yöntem olduğundan, üç boyutlu karmaşık implant yüzeylerinin kaplanmasında kullanımı uygun değildir (Besu, 2007).

Bu noktada, metalik implantın fizyolojik sıcaklık ve pH'da yapay vücut sıvısı (SBF-Simulated Body Fluid) içerisinde bırakılmasını temel alan, biyomimetik yöntem umut verici alternatif sunmaktadır. Biyomimetik yaklaşımın dört ana avantajı vardır: (i) düşük sıcaklıkta gerçekleştiği için ısıya duyarlı yüzeylere uygulanabilir, (ii) yüksek biyoaktivite ve iyi rezorpsiyon özelliklerine sahip kemiksi apatit kristallerinin üretimine olanak tanır, (iii) gözenekli veya karmaşık implant geometrilerinin kaplanmasını mümkün kılar, (iv) kemik büyüme faktörleri kaplamaya dahil edilebilir (Habibovic vd., 2002).

Biyomimetik yöntemle hidroksiapatit üretimi; yapay vücut sıvısı hazırlanması, biyoyumlu ortamda içinde (insan vücut sıcaklığı 37°C ve pH=7.4 şartlarında) kimyasal çöktürme metodu kullanılarak hidroksiapatit üretme işlemi, kimyasal işlem ve ısı işlem aşamalarından oluşmaktadır (Pasinli vd., 2010).

İnsan vücut sıvılarının kimyasal analizi ile uyum içinde hazırlanan Yapay Vücut Sıvısı, insan kan plazma inorganik bileşenleriyle neredeyse eşit iyon konsantrasyonlarına sahiptir ve ilk olarak Kokubo ve ark. tarafından bazı cam-seramik kompozisyonların in vitro ve in vivo davranışları arasındaki benzerliği kanıtlamak için kullanılmıştır (Taş, 2000). Kokubo

tarafından önerilen ilk formülasyondan bu yana, birçok farklı kompozisyonlar teklif edilmiştir. İnsan kan plazması ve birkaç farklı SBF çözeltisine ait iyon konsantrasyonlarının (mmol/l) karşılaştırılması Tablo1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kan plazması ve literatürdeki bazı SBF'lere ait iyonik konsantrasyonlar [mM] .

Çözelti	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ⁻²	SO ₄ ⁻²
İnsan Kan Plazması (Bigi vd., 2005)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
Orijinal SBF (Takadama vd., 2004)	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0
Düzeltilmiş (c-SBF) (Cui vd., 2010)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Tas-SBF (Taş, 2000)	142,0	5,0	1,5	2,5	125,0	27,0	1,0	0,5
Bigi-SBF (Bigi vd., 2005)	141,5	5,0	1,5	2,5	124,5	27,0	1,0	0,5
Gözden Geçirilmiş SBF (r-SBF) (Oyane vd., 2003)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
Modifiye SBF (m-SBF) (Oyane vd., 2003)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	10,0	1,0	0,5
İyonize SBF (i-SBF) (Oyane vd., 2003)	142,0	5,0	1,0	1,6	103,0	27,0	1,0	0,5
Geliştirilmiş SBF (n-SBF) (Takadama vd., 2004)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5
SBF×5 (Habibovic vd., 2002)	714,8	0	7,5	12,5	723,8	21,0	5,0	0

Tablo 1'de de gösterildiği gibi, Orijinal SBF'nin insan kan plazmasında bulunan SO₄⁻² iyonlarından yoksun olduğuna dikkat edilmelidir. Bu durum daha sonra c-SBF olarak giderilmiş ve birçok araştırmacı tarafından yalnızca 'SBF' olarak kullanılmıştır. Ancak, c-SBF insan kan plazmasına göre Cl⁻ iyonu yönünden daha zengin HCO₃⁻ iyonunca daha fakirdir (Kokubo ve Takadama, 2006). Bu farkı düzeltmek amacıyla araştırmacılar, kan plazmasına eşit iyon yoğunluğunda r-SBF ve i-SBF, ayrıca kan plazmasına HCO₃⁻ iyon konsantrasyonu hariç eşit iyon konsantrasyonunda m-SBF hazırlamışlardır (Oyane vd., 2003). Ancak, r-SBF ve i-SBF apatit ve kalsit çöktürmek için güçlü eğilimleri nedeniyle uzun süreli kararlılıktan yoksundur. 2004 yılında, Takadama vd. (2004), c-SBF'ye eşit HCO₃⁻ iyon konsantrasyonunda, ancak Cl⁻ iyon konsantrasyonu insan kanı plazma seviyesine indirilmiş, yeni bir SBF (n-SBF) önermiştir. Bu gelişmiş SBF (n-SBF), kararlılık ve sentetik malzemeler

üzerinde apatit oluşumu açısından tekrarlanabilirlik özellikleri bakımından Round Robin testi uygulanarak c-SBF ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, n-SBF'nin c-SBF'den kararlılık ve tekrarlanabilirlik açısından farklı olmadığı teyit edilmiştir (Kokubo ve Takadama, 2006; Takadama vd., 2004).

Biyomimetik yöntemi ile hidroksiapatitin metalik implant yüzeylerine kaplandığı, yakın zamanda yapılmış çok sayıda çalışma vardır. Pasinli vd. (2010) tarafından yapılan bir araştırmada, içerdiği Ca^{+2} , Na^+ , Mg^{+2} , K^+ , HPO_4^{-2} , HCO_3^- , Cl^- , ve SO_2^- iyon konsantrasyonları, insandaki kan plazması ile aynı olan bir yapay vücut sıvısı kullanılarak, biyomimetik yöntem ile Ti6Al4V yüzeyleri kaplanmıştır. Kaplama kalınlıkları 4 μm olarak ölçülmüştür. Çizik testi ile ölçülen kaplamaların yüzeye bağlanma kuvveti, kaplama öncesi Ti6Al4V plakalara uygulanan işlemlere göre 9 mN veya 3 mN olarak farklılık göstermiştir. Ca^{+2} ve HPO_4^{-2} açısından geleneksel olarak kullanılan solüsyonlardan daha zengin solüsyonlar kullanıldığında, kaplama süresinin kısaldığı rapor edilmiştir.

Chakraborty vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, 316L paslanmaz çelik yüzeyler biyomimetik yöntem kullanılarak hidroksiapatit ile kaplanmış ve morfolojik değişimle birlikte kristalinitedeki kademeli gelişim, geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Yapay vücut sıvısında altıncı gün sonrasında, hidroksiapatit kristallerinde 20nm kristal boyutundan 50 nm kristal boyutuna kademeli büyüme tespit edilmiştir. X ışını kırınımı (XRD) çalışmaları ise, biyomimetik yöntemle üretilen hidroksiapatitin kaplama yapısındaki tek faz olduğunu göstermiştir.

2.5. Hidroksiapatit Yapısına İyon Eklenmesi ve Selenyumun Önemi

Hidroksiapatit içerisine çeşitli iyonların ilave edilmesi ile fonksiyon kazandırılması son yıllarda biyomalzeme alanında artarak ilgi görmektedir. İyon eklenmiş hidroksiapatit, saf hidroksiapatite kıyasla, fonksiyonel kaplamalara sahip ortopedik implant üretimine olanak vermesi açısından daha avantajlıdır. Stronsiyum eklenmiş hidroksiapatit ile kaplanan titanyum implantların, overleri çıkarılmış sıçan modeli üzerinde denenmesini amaçlayan, Li vd. (2010) tarafından yapılan araştırma, alanında önemli bir örnek olarak gösterilebilir. Bu çalışmada, implantasyondan 12 hafta sonra, stronsiyumun kemik oluşumunu destekleme ve kemik rezorpsiyonunu azaltma özellikleri sayesinde, yalnızca %10 oranında stronsiyum eklenmiş hidroksiapatit ile kaplanmış implantların, osteoporotik kemik ile entegrasyonunun normalden daha fazla olduğu kanıtlanmıştır.

Ancak, yukarıda bahsedildiği gibi, kanser oluşumunun engellenmesi veya kanserli hücrelerin çoğalmasının önüne geçilmesini amaçlayan implant yüzeyi çalışmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Bu durum gerçekleştiğinde, sistemik yollarla ilaç vermenin zorluklardan biri olan, ilacın uygun miktarda ve kolayca amaçlanan hedefe ulaşmamasının da önüne geçilebilecektir. Bir ilaç dağıtım sistemi olarak implantın kendisini kullanmak, şu anda kullanılan implantlarda yaşanan sorunları azaltabilmek için mantıklı bir yöntem olacaktır (Tran vd., 2009). Bu aşamada, selenyum ve selenyumun mevcut hidroksiapatit kaplı implantlara entegre edilmesi gelecek vadede bir uygulamadır.

Selenyum insanlarda ve hayvanlarda selenoproteinlerin yapısında doğal olarak bulunan ve anti-oksidan savunma sistemleri, tiroit hormon metabolizması ve hücre reaksiyonları redoks kontrolü için önemli rol oynayan bir elementtir (McDowell, 2003). İnsanlar için esansiyel elementlerden biri olan selenyumun vücuttaki işlevleri arasında; metabolizmayı düzenlemek, bağışıklığı desteklemek, serbest radikallere karşı direnç sağlamak, bazı ağır metallerin detoksifikasyonunu sağlamak ve kanserden korunmaya yardımcı olmak sayılabilir (Yang vd., 2009). Selenyum eksikliği ile akciğer, meme, prostat, lenf ve mide-barsak gibi birçok kanser arasındaki ilişki, bilim adamları tarafından çok çalışılmış bir konudur. Geçmiş çalışmalarda, kanserli hastalarda kan selenyum düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Aynı şekilde, kesin mekanizmanın henüz tam olarak belirlenememesine rağmen, gıdalardan alınan selenyumun, potansiyel kanser önleyici ve yeniden oluşumunu engelleyici bir ajan olduğu bildirilmiştir (Hiraoka vd., 2001). Bu nedenle, kanser tedavisi ve önlenmesi bakımından selenyum umut verici bir potansiyele sahiptir.

Kanser önlemedeki asıl etki mekanizması tam olarak bilinmese de, selenyumun DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonu üzerinde etkisi olduğu raporlanmıştır (Jiang vd., 1992). Bazı çalışmalarda da selenyumun apoptoz; yani hücrenin kendini imha etmek üzere programlanmasında rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır (Lanfear vd., 1994). Buradan yola çıkarak, Hiraoka vd. (2001) tarafından, selenyumun ağızdan ilaç olarak verilmesi yöntemiyle osteosarkom üremesini engelleme amaçlı bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, selenyumun, farelerde kemik tümörünün büyümesini baskıladığı ve normal dokularda hiçbir sitotoksik değişiklik görülmediği belirtilmiştir.

Selenyum, metaloidler arasında en toksik olan olarak bilinir (Hiraoka vd., 2001). Bu nedenle, yüzeyden salınımı kontrollü olarak sağlanmalıdır. Webster ve ekibi tarafından, hem bunu sağlamak, hem de nano boyutta engebeli bir yüzey oluşturabilmek için selenyumu doğrudan ortopedik implant yüzeyine biriktirme yoluyla uygulayan bazı araştırmalar yapılmıştır (Tran vd., 2010b; Tran vd., 2010c; Tran vd., 2009; Tran vd., 2010a; Perla ve Webster, 2005;

Tran vd., 2008). Bu çalışmalara, preslenmiş silindirik selenyum yapıların veya titanyum üzerine kaplanmış nano-küme selenyumun, in vitro olarak sağlıklı kemik hücreleri ve osteosarkom hücreleri üzerindeki etkilerin incelenmesi ve elemental selenyum salınım profilinin belirlenmesi örnek verilebilir. Bu çalışmalardan üç tanesinin ortak noktası, selenyum nano-kümelerinin koloidal bir oluşum sergilemek üzere titanyum yüzeyler üzerinde biriktirilmesini takiben yapılan yüzey karakterizasyonu ve hücre yoğunluğu testleridir. Selenyum biriktirme işlemi, glutatyon ve sodyum selenit karışımına titanyum altlıkların daldırılması ile gerçekleştirilmiştir.

2009 tarihli ilk çalışmada, söz konusu yüzey geliştirilmiş ve bu yüzeyde mevcut olan selenyumun, sağlıklı osteoblast hücrelerinin fonksiyonlarını teşvik ederken, kanserli osteoblastların fonksiyonlarını baskıladığı görülmüştür (Tran vd., 2010b). 2010 tarihli ikinci çalışmada ise, sağlıklı kemik hücresi ve osteosarkom hücreleri birlikte kültür ortamında çalışılmış ve selenyum nano-kümelerle kaplanmış titanyum yüzeyinde, kanserli kemik hücrelerinin rekabete dayalı çoğalması engellemiştir (Tran vd., 2010a). Ekibin bu konuda 2010 yılında yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, birlikte ve ayrı ayrı osteosarkom ve sağlıklı kemik hücre kültürlerinin yanı sıra, implant enfeksiyonuna sebep olan en önemli bakterilerden olan *S. epidermidis*'in, bu malzeme üzerindeki davranışı incelenmiş ve selenyum içeren ortamdaki bakteri sayısının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu kanıtlanmıştır (Tran vd., 2010c). İmplant çevresinde oluşan bakteri enfeksiyonu, implantın başarısız olmasında ve hastadan cerrahi operasyonla geri alınmasında önde gelen nedenlerden biri olduğu için, bu çalışma ile gösterilen selenyumun anti-bakteriyel özelliğe sahip oluşu, bu elementin ortopedik amaçlı kullanımının iyi bir seçim olduğunu başka bir yönden daha kanıtlamaktadır. Ancak, bu çalışmalarda üretilen potansiyel implant malzemeleri, yüksek biyouyumluluğu ve biyoaktivitesi sebebiyle neredeyse Ti6Al4V implantlar ile özdeşleşen hidroksiapatit kaplamaların avantajlarından yararlanabilmeyi mümkün kılmamaktadır.

Bu projenin başladığı tarihten sonra, Rodriguez-Valencia vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, darbeli lazer yığma (PLD) yöntemi ile ticari olarak mevcut haldeki hidroksiapatit ile selenyum tozları (farklı atomik oranlarda), titanyum ve silisyum üzerine kaplanmıştır. Elde edilen kaplamalar, MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin yüzeyde tutunma ve üreme açılarından değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmada, selenit (SeO_3^{-2}) gruplarının karbonatlı hidroksiapatitin yapısındaki karbonat (CO_3^{-2}) grupları ile yer değiştirdiği, %0,6 atomik oranda eklenen selenyumun preosteoblast hücreleri üzerinde toksisite göstermediği, yapısına selenyum eklenen hidroksiapatitin *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterilerinin biyofilm oluşturmasını engellediği öne sürülmüştür. Bu çalışma selenyumun hidroksiapatitin yapısına

eklenmesi açısından önem taşısa da, PLD yönteminin, film üzerinde sıçrama veya partikül birikimi ve lazerle buharlaştırılan fazın altlık yüzeyi üzerinde açığa bağlı olarak düzgün olmayan bir şekilde kaplanması gibi dezavantajları vardır (Bao vd., 2005).

Sonuç olarak, literatürde ortopedik implantların yüzeylerini kaplanmak veya tek başına kullanılmak üzere biyomimetik yöntemle hidroksiapatit içerisine selenyum eklemeyi amaçlayan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen kaplamayla anti-kanser, anti-bakteriyel, yeni nesil bir ortopedik implant üretilmeye çalışılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Boyutları 2mm×90cm×100cm olan bir levha halinde, ASTM B265-10 standardına uygun olarak üretilmiş, titanyum alaşımı Ti6Al4V (Grade 5, ELI) temin edilmiştir. Bu levha, Trumpf Trumatic L4050 lazer kesme makinesi ile 2mm×20mm×20mm boyutlarında küçük kare plakalar halinde kestirilmiştir. Elde edilen plakalar, kaplama işleminde altlık (substrat) olarak kullanılmıştır.

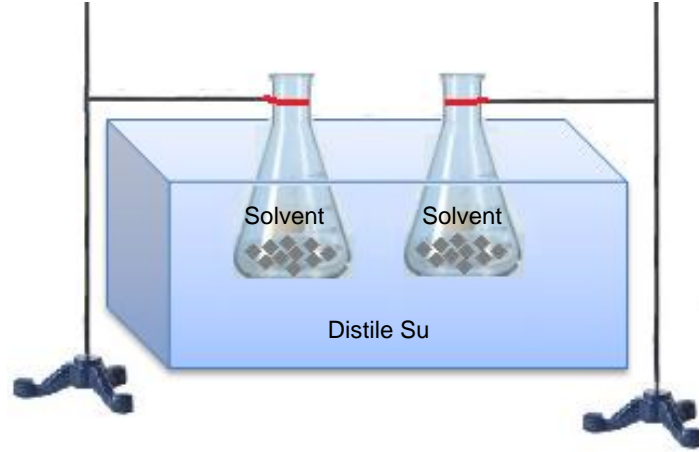
3.1. Zımparalama

Zımparalama işlemi yüzey topografisini değiştirmek için uygulanabilecek fiziksel yöntemlerden bir tanesidir. Bu işlem sayesinde, yapay vücut sıvısı içerisindeki Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonları metal yüzeyinde daha kolay yapışabilir ve düz yüzeylere göre daha iyi bir 'mekanik kilitleme' sağlanabilir (Zhao vd., 2011).

İki farklı yüzey topografisi elde edilmesi ve zımparalama işleminin etkilerinin daha sonra karşılaştırılabilmesi için, 400 ve 1200 numaralı olmak üzere değişik Silikon karbid (SiC) zımparalar kullanılmıştır. 400 numara SiC zımpara 20-23 µm arasında parçacık boyutuna sahiptir, 1200 numara SiC zımparanın parçacık büyüklüğü ise ortalama olarak 2.5 µm'dir. 400 numara SiC zımpara ile daha pürüzlü yüzey elde edilmiş, kaplamada daha başarılı olduğu düşünüldüğünden projenin ilerleyen aşamalarında 400 numara SiC zımpara tercih edilerek aşındırma işlemi yapılmıştır. Plakalar, Buehler Metaserv 2000 yatay sulu zımpara makinesi kullanılarak zımparalanmıştır.

3.2. Ultrasonik Temizleme

Ultrasonik temizleme, Bandelin Sonorex RK100 sonikatör ile, sırasıyla %70 etanol, aseton ve distile su kullanılarak üç ayrı aşamada gerçekleştirilmiştir. Her temizleme işleminde 10 adet zımparalanmış plaka ayrı ayrı 2 erlene koyularak, üzerlerine solvent (etanol, aseton veya distile su) eklenmiştir. Erlenler üçayaklı standı tutturulmuş ve distile su ile dolu sonikatörün haznesine Şekil 2'deki gibi yerleştirilmiştir.



Şekil 2. Plakaların ultrasonik temizleme cihazına yerleştirilmesi.

3.3. Alkali ve Isı İşlemleri

Ultrasonik temizlemenin ardından, Ti6Al4V plakaların yüzeyleri, kaplanmadan önce, alkali ve ısı ile işlem görmüştür. Bu aşamada, plakalar 80°C'de 5M sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde 3 gün boyunca bekletilmiştir. Sonrasında, alkali çözeltiden çıkarılan plakalar nazikçe distile su ile yıkanmış ve 1 gece boyunca 40°C'de kurutma fırınında kurutulmaya bırakılmıştır. Isı işlemi için, plakalar 1 saat boyunca yüksek dereceli fırında (Şekil 3, Protherm PLF 140/5) 600°C'de bekletilmiş, yavaşça soğuyabilmesi için 1 gece boyunca fırının içerisinde bırakılmıştır. Plakalar, kaplanmadan önce ağzı parafin filmle sarılmış, hava almayan kaplar içerisinde saklanmıştır.



Şekil 3. Yüksek dereceli fırın.

3.4. Normal Kompozisyonda 1.5×SBF Hazırlanması

Daha önce bahsedildiği gibi SBF, insan kan plazmasının inorganik kısmına iyonik konsantrasyonlar açısından çok benzeyen ama proteinler, glikoz, hormonlar ve hücreler gibi kan bileşenlerinin içermeyen yapay vücut sıvısıdır. SBF genellikle, biyomalzemelerin apatit oluşturabilme anlamında biyoaktivitesini test etmek için kullanıldığı gibi biyomimetik yöntemle malzemelerin apatit ile kaplanmasında da kullanılmaktadır. Bu projede, biyomimetik kaplama için kullanılacak SBF'nin hazırlanmasında, yapay vücut sıvısı formülasyonunun ilk sahibi olan Kokubo vd. (2006) tarafından verilen orijinal kimyasal miktarları ve hazırlama metodu kullanılmıştır. Ancak bu formülasyon ile hazırlanan SBF'de bekletilerek kaplanan plakalarda yapılan yüzey ve yapı analizleri sonucunda, SBF'den 1,5 kat daha yoğun olarak hazırlanan 1.5×SBF'de bekletilerek kaplanan plakaların, kaplama morfoloji ve yapısı açısından daha başarılı olduğu ve biyomimetik sürecin oldukça hızlandığı gözlemlenmiştir. SBF'de 21 gün süre ile bekletilen plakalarda apatit çekirdeklenme oluşumunun yeni başladığı görüldüğünden, kaplama için kullanılması uygun bulunmamış ve sonuçlar burada gösterilmemiştir.

Böylelikle bu projede, apatit çekirdeklenme zamanının kısaltılması için, SBF'ye göre daha yoğunlaştırılmış, ancak 5×SBF veya 10×SBF'ye göre daha kararlı olan 1.5×SBF kullanılarak devam edilmiştir. Normal kompozisyondaki 1.5×SBF ve insan kan plazması içerisindeki iyon derişimleri aşağıdaki Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. 1.5×SBF ve insan kan plazması içerisindeki iyon derişimleri (Bigi vd. 2000).

İyonlar (mM)	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Cl ⁻	HPO ₄ ⁻²	SO ₄ ⁻²	HCO ⁻³
1.5×SBF	212,3	7,5	2,3	3,8	186,8	1,5	0,75	40,5
Kan	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	0,5	27,0

1.5×SBF hazırlanmasında, 1000ml çözelti için 36,5±1,5°C'deki 700 ml iyon-değişimli distile suya, Tablo 3'de verilen kimyasallar birinciden sekizinciye kadar verilen sırada eklenerek çözülmüştür. Daha sonra, çözeltinin miktarı iyon-değişimli (ion-exchanged) distile su ile 1000ml'ye tamamlanmıştır. Bu sırada, çözeltinin pH'ının 2,0±1,0 aralığında ve sıcaklığının 36,5±1,5°C'de olmasına dikkat edilmiştir. Bu koşullar sağlandığında, pH değişimine çok özen göstererek azar azar TRIS eklenmiştir. 1.5×SBF hazırlanmasında, ani çökelmeleri engellemek için son pH 7,20'ye ayarlanmıştır (Bigi vd. 2000). Çözeltinin son pH'ı 7,20 olduğunda TRIS eklenmesi durdurulmuştur. pH ayarlama sürecinde, son pH 7,20 olarak sabitlenmesi için, gerekli olduğunda şırınga ile 1M HCl ve çok az miktarda TRIS değişimli olarak çözeltiye eklenebilmektedir.

Tablo 3. 1.5×SBF Hazırlanmasında kullanılan kimyasallar, miktarları ve çözünme sıraları.

Sıra	Kimyasal	Miktar	Saflık (%)	Formül ağırlığı (g/mol)
1	NaCl	10,003 g	99,5	58,4430
2	NaHCO ₃	3,419 g	99,5	84,0068
3	KCl	0,337 g	99,5	74,5515
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,346 g	99,0	228,2220
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,467 g	98,0	203,3034
6	1,0M HCl	50 ml	—	—
7	CaCl ₂	0,438 g	95,0	110,9848
8	Na ₂ SO ₄	0,108 g	99,0	142,0428
9	TRIS	Uygun miktarda	99,0	121,1356
10	1,0M HCl	0–5 ml	—	—

1.5×SBF apatit açısından aşırı doymuş olduğundan, dikkatsiz bir hazırlama çözelti içinde apatit çökmesine neden olabilir. Bu sebeple, hazırlanan çözeltinin her zaman renksiz ve şeffaf olmasına, beherin dibinde veya yan yüzeylerinde hiçbir çökelti olmamasına dikkat edilmiştir. Çözeltinin hazırlanmasında, cam beherlerin yüzeyi veya olası çizikler apatit çekirdeklenmesine sebep olabileceği için, bunun yerine düzgün yüzeyli ve yüzeyinde herhangi bir çizik olmayan plastik beherler (polipropilen, PP) kullanılmıştır. Kimyasallar, birlikte değil, bir önceki (eğer varsa) tamamen eridikten hemen sonra çözeltiye eklenmiştir. Nem çekici (higroskopik) maddelerin ağırlık ölçümlerinde (KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂, Na₂SO₄ gibi) olabildiği kadar hızlı davranılmış, bu maddeler tartımdan sonra bekletilmemiştir.

3.5. Selenat Eklenmiş 1.5×SBF Hazırlanması

Selenat eklenmiş 1.5×SBF hazırlanırken, normal kompozisyondaki 1.5×SBF için Tablo 2’de verilen iyon derişimleri sabit tutularak, 0,15mM selenat iyonu çözelti kompozisyonuna eklenmiştir. 1.5×SBF hazırlanması ile aynı metot takip edilmiş ve ancak kullanılan kimyasallarda 4. sırada sodyum selenat (Na₂SeO₄) eklenmiş ve diğer kimyasalların miktarları, iyon derişimlerinin sabit kalması için uygun şekilde ayarlanmıştır. Böylelikle, selenat eklenmiş 1.5×SBF içerisindeki iyon derişimleri Tablo 4’de verildiği gibi olmuştur.

Tablo 4. Selenat eklenmiş 1.5×SBF ve insan kan plazması içerisindeki iyon derişimleri.

İyonlar (mM)	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Cl ⁻	HPO ₄ ⁻²	SO ₄ ⁻²	HCO ⁻³	SeO ₄ ⁻²
Selenat eklenmiş 1.5×SBF	212,3	7,5	2,3	3,8	186,7	1,5	0,75	40,5	0,15
Kan	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	0,5	27,0	-

Bu projede ayrıca, selenat derişimi daha önce hazırlananın selenat eklenmiş 1.5×SBF'dekinin 100 katına çıkarılarak (bkz. Tablo 4), kaplama yapısına giren selenyumun miktarındaki değişim test edilmek istenmiştir. Bu sebeple, aynı yöntem ile 15 mM selenat iyonu eklenen 100×Se 1.5×SBF hazırlanmış, bu çözelti ile de biyomimetik kaplama denenmiştir.

3.6. Plakaların Selenat Eklenmiş ve Normal 1.5×SBF'de Bekletilerek Kaplanması

Alkali ve ısı işlem görmüş Ti6Al4V plakalar, ağzı kapaklı ve tabanı düz olan plastik şişeler içerisine yerleştirildikten sonra, üzerlerine, 50ml çözelti/cm² plaka olacak şekilde, selenat eklenmiş veya normal kompozisyondaki 1.5×SBF eklenmiştir. Her 2 günde bir, yeni çözelti hazırlanmış ve plakaların içinde bulunduğu SBF'ler tazelenmiştir. Çözeltilerim değişimlerinde şişe çeperinde çökme olabileceği düşünülerek plastik şişeler temizleri ile değiştirilmiştir. Plakaların içerisinde bulunduğu SBF'leri 37°C'de tutabilmek için Nüve ST402 çalkalamalı su banyosu kullanılmıştır. Plakalardan, 4., 7., 10., 14. ve 21. günlerde örnekler alınmıştır. Bu örnekler çözeltiden çıkarıldıklarında, üzerlerinde kalabilecek olan kaplamaya bağlanmamış çökeltiyi uzaklaştırabilmek için, hafifçe saf su ile yıkanmış ve sonrasında 37°C'de bir gece boyunca kurumaya bırakılmıştır.

3.7. Yüzey ve Yapı Analizleri

Ti6Al4V plakalara ait yüzeylerin SEM görüntüleri, Quanta 400F Field Emission-SEM yüksek çözünürlüklü alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile çekilmiştir ve elemental oranların EDS ile spektrumları alınmıştır.

XRD analizleri, Rigaku Ultima-IV cihazı ile, 40 kV ve 30 mA'de Cu-K_α radyasyonu kullanılarak yapılmıştır. İlgili fazlar The International Centre for Diffraction Data (ICDD) kart numaraları ile belirlenmiştir. Ayrıca, XRD analizlerinde, boş numune olarak (blank sample), zımparalandıktan sonra alkali ve ısı işleme tabi tutulan Ti6Al4V plakalar kullanılmış ve boş numuneye ait veriler çıkarılmıştır.

FTIR analizleri ise, Bruker IFS 66/S ile buna ait Hyperion 1000 mikroskopundan oluşan bileşik sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler, orta-IR (MIR) aralığında (4000 – 400 cm⁻¹) incelenmiştir. XRD analizlerinde olduğu gibi, boş numune olarak, 400 no'lu SiC ile zımparalandıktan sonra alkali ve ısı işleme tabi tutulan Ti6Al4V plakalar cihaza tanıtılmıştır.

Dispersif Raman spektrometre çalışmaları, Renishaw inVia Raman spektrometre cihazı ile 532 nm argon iyon lazer kullanılarak yapılmıştır.

Çizik (scratch) testi ise Shimadzu SST-W101 cihazında, yük 0 mN'dan başlayıp 98 mN'a kadar, kazıma hızı ise 5 micrometre/sn ve çizik mesafesi 1mm olacak şekilde yapılmıştır. Test, her numune için 5 kez tekrarlanmış ve kritik değerlerin hesaplanmasında 5 değer ortalaması alınmıştır.

İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrofotometre (ICP-MS) analizleri, Thermo Electron X7 cihaz ile yapılmıştır. ICP-MS analizlerinin yapılabilmesi için, Ti6Al4V plakaların yüzeyindeki kaplama, spatül kullanılarak kazınmış ve %2'lik nitrik asit (HNO₃) içerisinde çözülmüştür.

3.8. Sterilizasyon

Yüzeyi selenyum eklenmiş ve normal halde 1.5×SBF içerisinde bekletilerek kaplanmış Ti6Al4V plakalar üzerinde hücre ve bakteri kültürü deneyleri yapılabilmesi için, plakaların kaplandıktan sonra sterilize edilmesi gerekmektedir. Söz konusu deneylere yönelik olarak, kaplanmış Ti6Al4V plakalar, fırın içerisinde 200°C'de 2 saat bekletilerek sterilize edilmiştir. Sterilize edilen plakalar yavaşça soğumaları için gece boyunca fırında bırakılmıştır.

3.9. Hücre Kültürü

3.9.1. Osteoblast (hFOB 1.19) Kültürü

Sağlıklı osteoblast hücreleri (NH₄Ost, CC-2538, Lonza Inc., Walkersville, ABD) T-75 flask içerisinde çoğalan halde (≥500.000 hücre) temin edilmiştir. Hücreler, 500 ml osteoblast bazal besi yerine (OBM, Lonza), 50 ml fetal sığır serumu (FBS), 0,5 ml askorbik asit, 0,5 ml gentamisin amfoterisin B (GA-1000) içeren OGM SingleQuots (Lonza, ABD) eklenmesi ile elde edilen tam büyüme ortamında çoğaltılmıştır. Proliferatif NH₄Ost primer hücreler, üretici tarafından üçüncü veya dördüncü pasajda sevk edilmektedir. Temin edildikten sonra ikinci pasajda hücrelerin farklılaştıkları ışık mikroskopunda gözlemlenmiştir. Büyüme oranı, biyolojik yanıt ve fonksiyonlarında bozulmalar olabileceği düşünülerek, hücre kültür deneylerinde bu hücreler kullanılmamıştır.

Normal insan kemik hücresi olarak, SV40 büyük T antijeni ile transfekte edilmiş osteoblast hFOB 1.19 (CRL-11372, ATCC, Rockville, ABD) hücre hattı cryo tüp içerisinde temin edilmiştir. Tüp kuru buzdan çıkarılır çıkarılmaz, elle hafif döndürülerek 37°C'deki su banyosu içerisinde çözülmüştür. Bu hücre hattı için baz kültür ortamı Ham's F12 Medium ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ortamlarının 2.5 mM L-glutamin içeren (fenol kırmızısı içermeyen) 1:1 karışımlarıdır. Bu karışım ticari olarak hazır formda (Thermo Scientific HyClone, ABD) satın alınmıştır. Bu hücre kültür ortamına 0,3 mg/ml G418 (Thermo Scientific HyClone, ABD) ve %10 fetal sığır serumu (FBS, Biochrom AG, Almanya) eklenmiştir. Çözülen hücreler 9,0 mL hücre kültür ortamına alındıktan sonra 1500 rpm'de 5dk boyunca santrifüj edilmiştir. Çöken hücreler tekrar kültür ortamında dağıtılarak hücre kültür flaskına alınmıştır. Üreticinin sağlamış olduğu bilgilerde bu hücre hattının 34°C'de en yüksek üreme hızını gösterse de, insan vücut ısısı ve diğer hücre tipinin de aynı ısı şartlarına maruz kalması açısından 37°C (5% CO₂, nemli) etüvde inkübe edilmiştir.

Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında, kültür ortamı alınarak, 37°C'deki fosfat tamponu (phosphate buffered saline, PBS) çözeltisi ile yıkanmış, ve flasktan 37°C'deki %0,25 tripsin/EDTA (Biochrom AG, Almanya) ile kaldırılmıştır. Tripsin, hücre kültür ortamı ile nötrleştirildikten sonra hücreler 1500 rpm'de 5dk süreyle santrifüj edilerek, 1:4 oranında yeni flaslara ekilmiştir. Her 2 veya 3 günde bir hücre kültür ortamı yenilenerek hücrelerin üremesi sağlanmıştır.

3.9.2. Osteosarkom (Saos-2) Kültürü

İnsan kanserli kemik hücreleri (osteosarkom, Saos-2, ATCC, HTB-85) dondurulmuş olarak temin edilmiştir. Osteoblast kültürüne benzer şekilde, dondurulmuş hücreler 37°C'deki su banyosu içerisinde çözüldükten sonra, %10 FBS (Biochrom AG, Almanya) ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin, Biochrom AG, Almanya) içeren McCoy's 5a modified medium (PAA, Fransa) eklenerek T-75 flasklar içerisinde 37°C (5% CO₂, nemli) etüvde inkübe edilerek çoğaltılmıştır.

3.10. Hücre Canlılık Testleri

PrestoBlue, canlı hücrelerin indirgeme gücünü kullanarak hücrelerin çoğalmasını kantitatif olarak ölçmede kullanılan, kısaca hücre canlılığı göstergesi olarak işlev gören resazurin bazlı bir çözeltidir. Mavi renkte, neredeyse hiç floresan özellik göstermeyen ve hücre içerisine girebilen bir bileşik içerir. Kültür ortamına ilave edildiğinde, PrestoBlue hücrelerin indirgeme

ortamı tarafından değiştirilebilir ve kırmızı renge döner. Bu floresan renk, floresans veya absorpsiyon ölçümleri ile tespit edilebilir (Life Technologies Corporation, 2014b).

PrestoBlue bu çalışmada, saf veya selenyum eklenmiş hidroksiapatit ile kaplanan Ti6Al4V plakalar üzerine ekilen Saos-2 ve hFOB 1.19 hücrelerinin kolorimetrik olarak canlılıklarının ölçülmesinde kullanılmıştır. Sonuçlar, kaplamaların hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirleyebilmek için kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, selenyumun sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için, farklı derişimlerde selenyum içeren çeşitli çözeltiler hazırlanmış ve hücre canlılığına etkileri yine PrestoBlue indikatörü ile ölçülmüştür.

3.10.1. Selenyum Çözeltilerinin Hazırlanması

Selenyumun sitotoksitesinin değerlendirilebilmesi için, 10ml PBS içerisinde 1.3160g Na_2SeO_4 çözülerek, test edilmek istenilen derişimden $100.000\times$ yoğunluğunda stok solüsyonu hazırlanmış ve PBS ile seyreltilerek 5 farklı derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. Her çözeltilerden $100\mu\text{l}$ alınarak hücrelerin içerisinde buldukları 1ml tam hücre kültür ortamına eklendiğinde, ortamda bulunan selenyum miktarı Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Sitotoksitesite testi yapılan çözeltiler ve hücre kültür ortamına eklendiğinde ortamdaki selenyum miktarları.

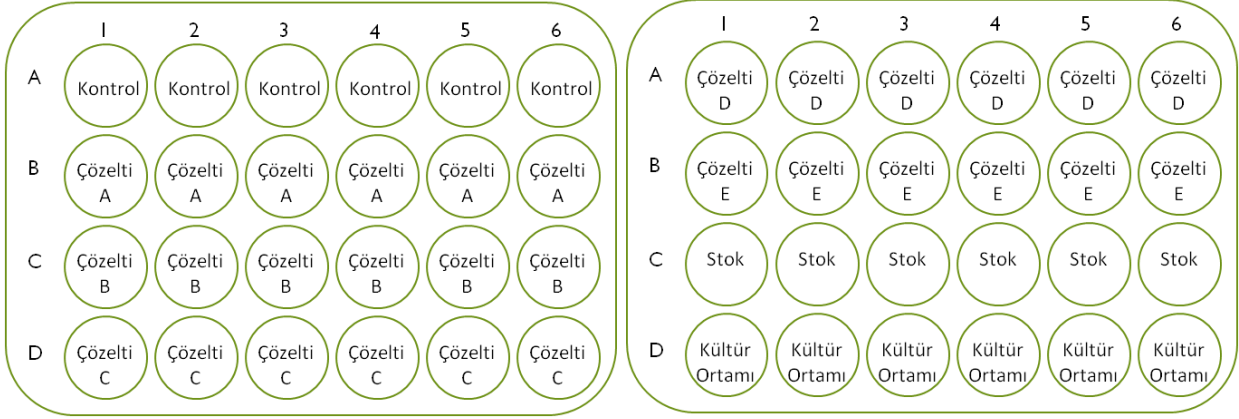
Çözeltiler	Kontrol	Stok	Çözeltiler A	Çözeltiler B	Çözeltiler C	Çözeltiler D	Çözeltiler E
	PBS	$100.000\times$	$1000\times$	$100\times$	$10\times$	$1\times$	$0.1\times$
Se Miktarı	0	5×10^{-3} g	5×10^{-5} g	5×10^{-6} g	5×10^{-7} g	5×10^{-8} g	5×10^{-9} g

3.10.2. Selenyum Çözeltilerinin Hücre Canlılık Testi

McCoy's 5a modified medium içerisinde çoğaltılan Saos-2 hücreleri $90-95$ yoğunluğa ulaştığında 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 2 adet 24 kuyucuklu hücre üretme kabına ekilmiştir. Fenol kırmızısız, 10% FBS ve 1% penisilin/streptomisin içeren DMEM (Biochrom AG, Almanya) 37°C (5% CO_2 , nemli) etüvde inkübe edilmiştir. Benzer şekilde, hFOB 1.19 hücreleri de 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 2 adet 24 kuyucuklu hücre üretme kabına ekilmiştir. $0,3$ mg/ml G418 ve 10% FBS içeren 1:1 Ham's F12/DMEM (fenol kırmızısız) hücre kültürü ortamında 37°C (5% CO_2 , nemli) etüvde inkübe edilmiştir.

24 kuyucuklu hücre üretme kabına 1ml hücre kültür ortamında ekilen hücrelere ilk anda, selenyum içeren çözeltiler $100\mu\text{l}$ olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol grubuna ise yalnızca aynı miktarda steril PBS eklenmiştir. Her iki hücre tipi için de aynı olan 24 kuyucuklu kapların

test konfigürasyonu Şekil 4'te verilmiştir. Bu deneyde birbirini tekrarlayan kuyucuk sayısı 6'dır ve deney farklı zamanlarda bağımsız olarak 2 kez tekrarlanmıştır (n=2).



Şekil 4. Hücre canlılık testi yapılan selenyum çözeltilerinin hücrelerin içerisinde buldukları ortamlara eklenmesi.

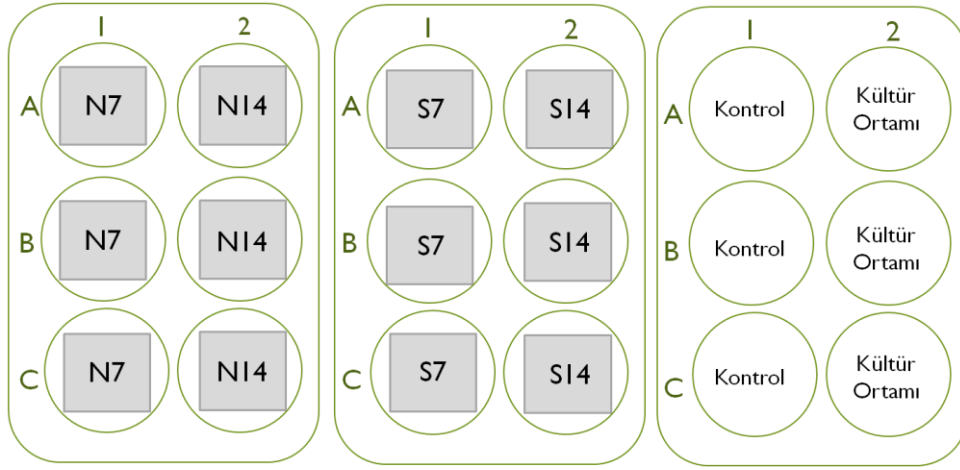
Hücreler bu ortamlar içerisinde 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra, 10× çözelti halinde temin edilen PrestoBlue çözeltilerinden 9:1 oranında (122 µl/kuyucuk) hücre kültür ortamlarına eklenmiştir. 2 saat süreyle inkübe edilen hücrelerin, hücre kültür ortamı aspire edilerek temiz 24 kuyucuklu kaplara alınmıştır. Daha sonra, hücrelerin bulunduğu kuyucuklara, yeni hücre kültür ortamları ve selenyum çözeltileri eklenerek 37°C (5% CO₂, nemli) etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 3. ve 5. gününde bu işlem tekrarlanarak indirgenen PrestoBlue absorbansları ölçülmüştür.

Absorbans ölçümleri, 570 ve 600nm'de (referans) standart mQuant (BioTek, Vermont, ABD) elisa okuyucu ile yapılmıştır. Hücre kültür ortamının kendisinden kaynaklanan arkaplan absorbans değerinin çıkarılması için, hücre içermeyen ortamlar da elisa cihazında okutulmuştur. İlk olarak, her bir kuyu için, 600 nm'de ölçülen absorbans, 570 nm'de ölçülenden çıkarılmıştır. Daha sonra, sadece ortam içeren kuyucukların ortalaması alınmıştır ve elde edilen ortalama kontrol değeri, (her bir kuyucuk için) birinci adımda bulunan değerlerden çıkarılmıştır. Bunu yaparak, arkaplan (kültür ortamı) absorbansı giderilmiştir.

Elde edilen veriler, Mann Whitney U testi kullanılarak istatistiksel analiz yapılmış ve p<0,05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.10.3. Selenat Eklenmiş ve Normal 1.5×SBF’de Bekletilerek Kaplanan Plakaların Hücre Canlılık Testi

Selenyum içeren çözeltilerin hücre canlılık testine benzer şekilde, Saos-2 ve hFOB 1.19 hücreleri kaplanan plakalar üzerine 400.000 hücre/plaka (100.000 hücre/cm²) olacak şekilde ekilmiştir. Üzerlerine hücre ekilen plakalar 6 kuyucuklu hücre kaplarına yerleştirilmiştir. Kontrol grubu ise doğrudan kuyucuğa ekilmiştir. Her iki hücre tipi için de aynı olan 6 kuyucuklu kaplara plakaların yerleşimi ve test konfigürasyonu Şekil 5’te verilmiştir. Bu deneyde birbirini tekrarlayan kuyucuk sayısı 3’dür ve deney farklı zamanlarda bağımsız olarak 2 kez tekrarlanmıştır (n=2).



Şekil 5. Selenyum eklenmiş ve saf hidroksiapatit ile kaplanan Ti6Al4V plakaların hücre canlılığı testi için hazırlanan kuyucuklar.

Yukarıdaki şekilde gösterilen selenyum eklenmiş ve saf hidroksiapatit ile kaplanan Ti6Al4V plakaların isimlendirmeleri Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Hücre canlılık testinde kullanılan kaplamalar.

No	İsim	Kaplamada Kullanılan SBF	Kaplama süresi
1	N7	Normal 1.5×SBF	7 gün
2	S7	Selenat eklenmiş 1.5×SBF	7 gün
3	N14	Normal 1.5×SBF	14 gün
4	S14	Selenat eklenmiş 1.5×SBF	14 gün

Plakalar üzerine ekilen hücrelerin ilk anda yüzeye tutunmalarının sağlanması için 30 dk boyunca 37°C (5% CO₂, nemli) etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında ise her kuyucuğa 2,5ml hücre kültür ortamı eklenmiştir ve 24 saatlik inkübasyon için etüve bırakılmıştır.

24 saat sonrasında, her kuyucuğa 277µl (9:1 oranında) PrestoBlue eklenerek hücreler 4saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, mor-mavi renk alan hücre kültür ortamları aspire edilerek temiz 6 kuyucuklu kaplara alınmıştır. Daha sonra, hücrelerin bulunduğu kuyucuklara, yeni hücre kültür ortamları eklenerek 37°C (5% CO₂, nemli) etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 3. ve 5. gününde bu işlem tekrarlanarak indirgenen PrestoBlue absorbansları ölçülmüştür.

Absorbans ölçümleri, 570 ve 600nm'de (referans) standart elisa okuyucu ile yapılmıştır. Daha önce belirtildiği gibi, ilk olarak, her bir kuyu için, 600 nm'de ölçülen absorbans, 570 nm'de ölçülenden çıkarılmıştır. Daha sonra arkaplan (kültür ortamı) absorbansını gidermek için, sadece ortam içeren kuyucukların ortalaması alınmıştır ve elde edilen ortalama kontrol değeri, (her bir kuyucuk için) birinci adımda bulunan değerlerden çıkarılmıştır. Elde edilen veriler, Mann Whitney U testi kullanılarak istatistiksel analiz yapılmış ve p<0,05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.11. Saos-2 Hücrelerin SEM Görüntülemesi İçin Plakalar Üzerine Ekilmesi

Saos-2 hücrelerinin saf ve selenyum eklenmiş hidroksiapatiti ile kaplanan plakalar üzerine yapışma davranışlarının incelenmesi için SEM ile görüntülenmeleri amaçlanmıştır. Bu amaçla, hücreler, T-75 flasklarda çoğaltıldıktan sonra %90–95 konflüansa geldiklerinde, PBS ile yıkayıp 0,25% tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak hücre üretme kabından kaldırılmıştır. Hücreler, sayılarak her plakaya 100.000 hücre olacak şekilde %10 FBS ve %0,5 antibiyotik içeren McCoy's 5a modified medium içerisinde plakalar üzerine ekilmiştir. Plakalar 6 gözlü hücre üretme kaplarında 1 gün ve 7 gün boyunca 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreler sonrasında, hücrelerin içinde buldukları ortam aspire edilmiş ve her plaka 2 kez PBS ile yıkamıştır. Hücreler, %4 paraformaldehit çözeltisi içerisinde 15 dk boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası, hücreler 2 kez daha PBS ile yıkandıktan sonra, etanol serisi kullanılarak kurutulmuştur. Bunun için plakalar öncelikle %30, %50, %70, %80, %90 ve %100 etanolde, her biri için 10 dk boyunca kurutulmuştur. Plakaların, tamamıyla kuruması için, üzerlerine hexamethyldisiloxane (HMDSO, Sigma, USA) damlatılarak 10 dk laminar akım kabiniinde beklemeleri sağlanmıştır. Son olarak, SEM görüntülemesi için, plakalar platin kaplanmıştır.

3.12. Saos-2 Hücrelerinin Plakalar Üzerinde Konfokal Mikroskopta İncelenmesi

Saos-2 hücreleri, T-75 flasklarda çoğaltıldıktan sonra %90–95 yoğunluğa geldiklerinde, PBS ile yıkanıp 0,25% tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak hücre üretme kabından kaldırılmıştır. Hücreler sayılarak her plakaya 50.000 hücre olacak şekilde %10 FBS ve %0,5 antibiyotik içeren McCoy's 5a modified medium içerisinde plakalar üzerine ekilmiştir. Plakalar 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında 1 gün ve 3 gün boyunca 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Falloidin, ölümcül Amanita phalloides mantarından izole edilen bir peptiddir. Floresan falloidin ise, falloidin yeşil floresan boya fluoresin (FITC) ile konjuge edilmiş halidir, yüksek afiniteli bir f-aktin probudur ve aktin boyamada yüksek kontrastlı ayırım sağlar. Propidyum iyodür (PI) ise, sıklıkla kullanılan kırmızı floresan bir çekirdek ve kromozom boyasıdır (Life Technologies Corporation, 2014a). Bu projede, plakalar üzerine ekilen Saos-2 hücrelerinin floresan mikroskopta görüntülenebilmesi için her iki boya birlikte kullanılmıştır. Böylelikle, hem çekirdek hem de hücre iskeletini oluşturan aktin yapılarının işaretlenmesi amaçlanmıştır.

Normal kompozisyondaki ve selenyum eklenmiş 1.5×SBF'de 7 ve 14 gün süre ile bekletilerek kaplanan plakalar üzerine öncelikle 100.000 hücre/plaka ekilmiştir. Plakalar üzerinde 1 gün ve 3 gün boyunca inkübe edilen hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit çözeltisi içerisinde 15 dk boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra tekrar PBS ile yıkanan hücrelerin geçirgenliğini sağlamak için PBS içerisinde %0,1'lik Triton X-100 hazırlanmış ve hücreler 5 dk boyunca oda sıcaklığında Triton X-100 içerisinde bekletilmiştir. Bu süre sonunda, Triton X-100 aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile tekrar yıkanmıştır. Hücre boyalarının nonspesifik bağlanmalarını engellemek için PBS içerisinde %1'lik sığır serum albümini (BSA) hazırlanmış ve hücreler bu solüsyonda 30 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin içerisinde bulunduğu BSA çözeltisi aspire edildikten sonra, her bir plaka üzerine, 5 µl FITC içeren 200 µl %0,1 BSA-PBS çözeltisi koyulmuştur ve 1 saat 37°C'de etüvde inkübe edilmiştir.

FITC ile boyanan hücreler, 1 saat sonunda etüvden alınarak PBS ile yıkanmıştır. Hücreler, 0,3 M sodyum klorür (NaCl) ve 0,03 M sodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇) içeren ve pH 7,0 olan 2×SSC çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra, hücreler, 2×SSC içerisinde 100 µg/ml (DNase içermeyen) RNase ile 20 dk boyunca 37°C'de bekletilmiştir. Bu süre sonunda, hücreler, birer dk boyunca 3 defa 2×SSC ile yıkanmıştır. 1 mg/ml (1,5 mM) olarak hazırlanan PI stok çözeltisi 2×SSC ile 1:3000 oranında seyreltilerek her plaka için 300 µl bu çözümden

koyulmuş ve 5 dk bekletilmiştir. Boyama işlemi tamamlanan hücreler 2×SSC ile yıkanmış ve bekletilmeden konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.13. Bakteri Kültürü

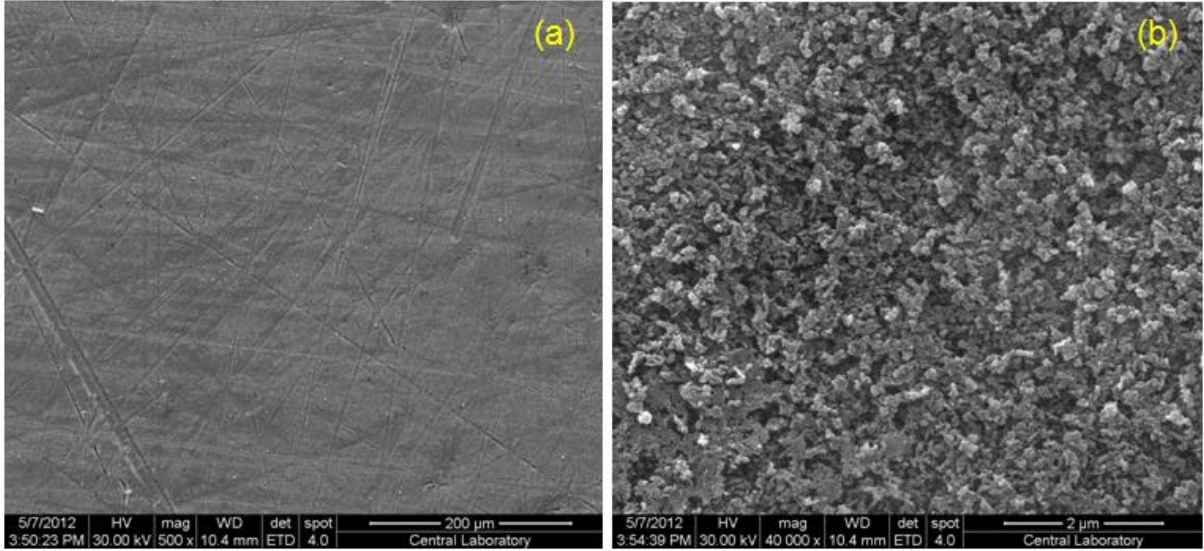
Kaplanan plakalara *S. epidermidis* bakterisinin tutulumu için bakteri kültürü çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle, besiyeri olarak 1000 ml distile su, 10 g kazein, 5 g maya ekstresi, 5 g NaCl içeren Luria broth (LB), hazırlanmış ve pH 7.0'a ayarlanarak sterilize edilmiştir (Atlas, 1993). Selenat eklenmiş veya normal kompozisyondaki 1.5×SBF'de bekletilerek kaplanmış plakaların her birinden üçer adet hazırlanmış ve 6 kuyucuklu hücre üretme kabının her kuyucuğuna birer adet yerleştirilmiştir. Plakaların isimlendirmeleri, daha önce Tablo 6'da verilmiştir. Triptik soy agar besiyerinde 24 saatlik kültürü yapılan *S. epidermidis*'den, steril cam tüplere 6'şar ml dağıtılan Luria Broth besiyerine 1.5×10^8 koloni oluşturan bakteri/ml (0,5 McFarland standardında) olacak şekilde ekim yapılmıştır. Her kuyucuğa 5'er ml koyularak, yedi gün 35°C'de normal atmosferde inkübe edilmiştir. 1., 4. ve 7. günlerde, hücre üretme kapları 250 rpm'de santrifüj edilerek her örnekten küvetlere 1 ml koyulmuş ve UV/Visible spektrofotometre ile (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech, Uppsala, İsveç) 562 nm'de analiz edilmiştir. Kontrol grubu olarak lamel camı kullanılmıştır ve steril Luria Broth ortamı kör örnek olarak isimlendirilmiştir. İnkübasyonun 1., 4. ve 7. günlere plakalar üzerindeki bakteri yoğunluğunu/tutulumunu saptamak üzere taramalı elektron mikroskopunda 1000× büyütme ile görüntüleme yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. SEM ve EDS Sonuçları

4.1.1. Ön-işlemin Etkileri

Yüzey topografisini değiştirerek metal yüzeyle kaplama arasındaki 'mekanik kilitlemeyi' artırmak amacıyla gerçekleştirilen zımparalama işlemi sonrasında plakalardan alınan SEM görüntüleri Şekil 6'da verilmiştir.

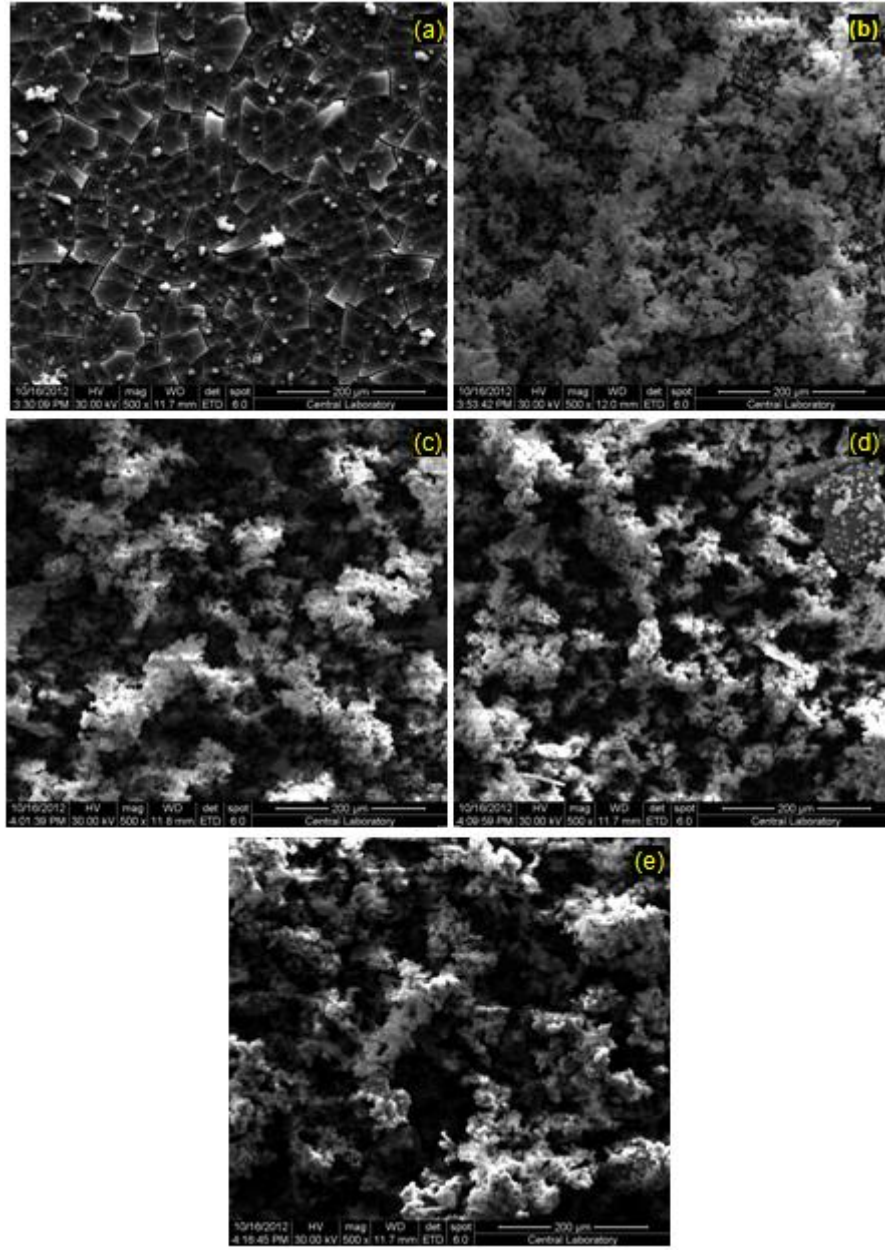


Şekil 6. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış Ti6Al4V plakaların alkali ve ısıl işlem sonrası yüzeylerine ait SEM görüntüleri: (a) 500x büyütme (b) 40.000x büyütme.

SEM görüntülerinden de anlaşılacağı gibi, 80°C'de 5M sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu içerisinde 3 gün bekletildikten sonra 600°C'de 1 saat ısıya maruz bırakılan Ti6Al4V plakaların yüzeylerinin mikrogözenekli ve gevşek bir yapı kazandıkları görülmüştür. Alkali işlemde oluşan titanyum oksit tabakanın stabilitesinin artırılması için plakalar 600°C'de 1 saat ısıtılmıştır. Isıl işlem sırasında, 600°C'den yüksek sıcaklıklara çıkılırsa, daha kararlı bir yüzey elde edileceği ancak sodyum salımı az olduğundan daha az TiOH grubu oluşacağı (Kim vd., 1997) ve 700°C'ye ısıtılan plakalar üzerinde SBF'den apatit çökmesi olmayabileceği bilindiğinden (Wei vd., 2002) daha yüksek derecelere çıkılmamıştır.

4.1.2. Normal Kompozisyondaki 1.5xSBF ile Kaplama

Alkali ve ısıl işlem gördükten sonra, normal kompozisyondaki 1.5xSBF solüsyonunda 4, 7, 10, 14 ve 21 gün süreyle bekletilen Ti6Al4V plakaların yüzeylerine ait SEM görüntüleri Şekil 7'de verilmiştir.



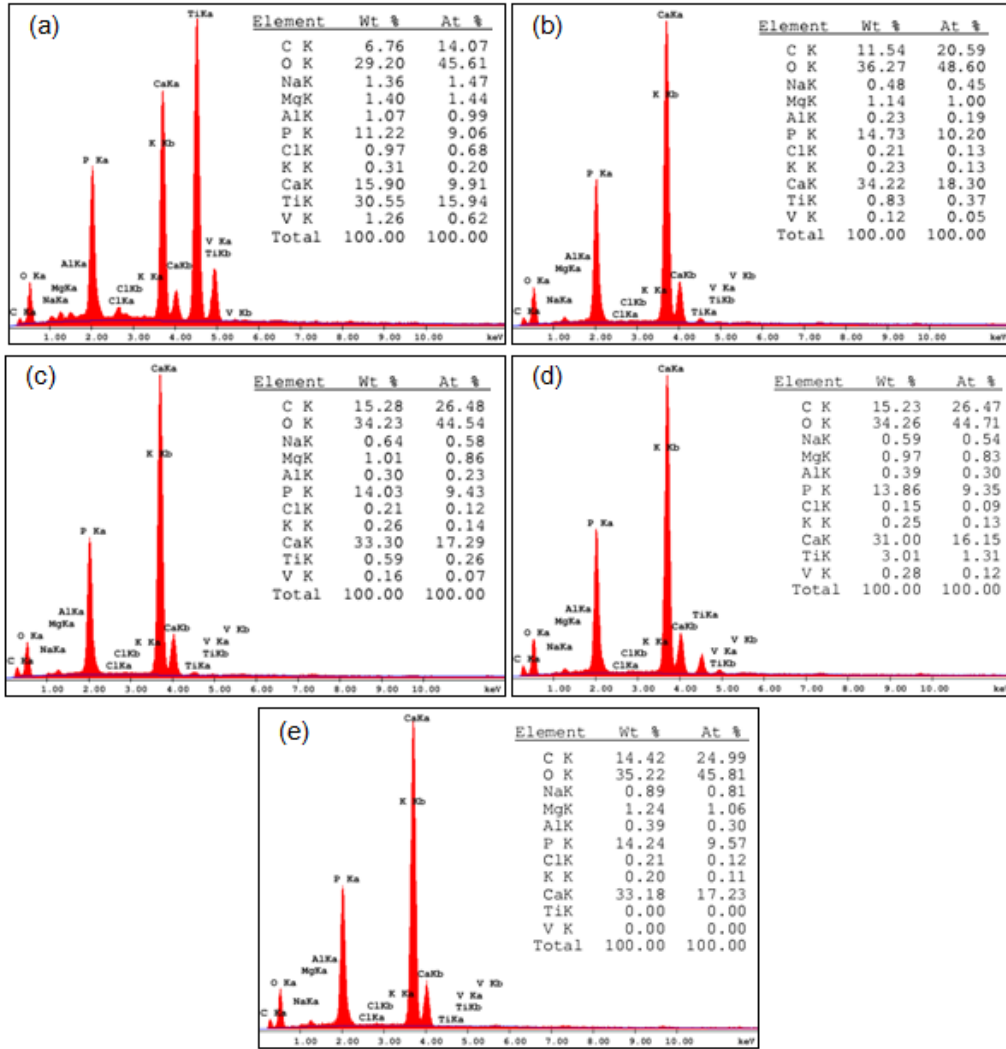
Şekil 7. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıl işlem görmüş Ti6Al4V plakaların normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin SEM görüntüleri (500×): (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.

Yukarıdaki şekilde verilen SEM görüntülerinden, 1.5xSBF içerisinde 4. günde kalsiyum fosfat çekirdeklenmesinin başlamış olduğu ve SBF içerisinde bekleme süresi arttıkça kalsiyum fosfat yapının büyümekte olduğu gözlemlenmiştir. Yüzeyin, SBF'de 10. günden sonra, çok sayıda ve neredeyse küresel yapıda tanecikli çökelti ile kaplı olduğu görülmektedir.

Bu yapının oluşmasında ön-işlem olarak uygulanmış olan alkali ve ısı işleminin Ti6Al4V yüzeye sağlamış olduğu biyoaktivitenin önemi büyüktür. Bu yöntem ilk olarak Kim vd. (1996) ve Kokubo vd. (1996) tarafından, titanyum ve alaşımlarının biyoaktivitesini arttırmak için uygulanmıştır. Bu işlem sayesinde, sodyum hidroksit çözeltisindeki hidroksil grupları ile yüzeydeki TiO₂ tabakanın kısmen çözünmesi sağlanır. Reaksiyon titanyumun hidrasyonu ile devam eder ve yüzeyde negatif yüklü bir sodyum titanat hidrojel tabakası oluşur. Bu jel katman, kararsız bir yapıda olduğu için, kaplamanın mekanik olarak daha dayanıklı olması ve yoğunlaştırılması amacıyla plakalara ısı işlemi uygulanır.

SBF içerisinde bekletilme sırasında, plaka yüzeyindeki sodyum titanat tabakasından sodyum iyonları, SBF'deki H₃O⁺ ile iyon değişimi yolu ile yer değiştirerek ortama salınır. Oluşan Ti-OH tabakası negatif yüklü olduğundan seçici olarak pozitif yüklü Ca²⁺ ile birleşir ve kalsiyum titanat oluşturur. Sonuç olarak, pozitif yüklü hale gelen yüzey, SBF'deki negatif yüklü fosfat iyonları (PO₄³⁻) ile birleşerek kalsiyum fosfat oluşturur. Bu oluşum üzerine, apatit çekirdekler, kendiliğinden, SBF içerisindeki kalsiyum ve fosfat iyonlarını tüketerek büyür (Nour vd. 2010).

Şekil 7'de verilen SEM görüntüleri, bu süreç sonucunda gittikçe büyümüş olan kalsiyum fosfat tabakasını açıkça göstermektedir. Bu SEM görüntülerine ait EDS analizleri ve kaplamanın içerisindeki elementlere ait oranlar kütle ve atomik yüzde olarak Şekil 8'de sıralanmıştır.

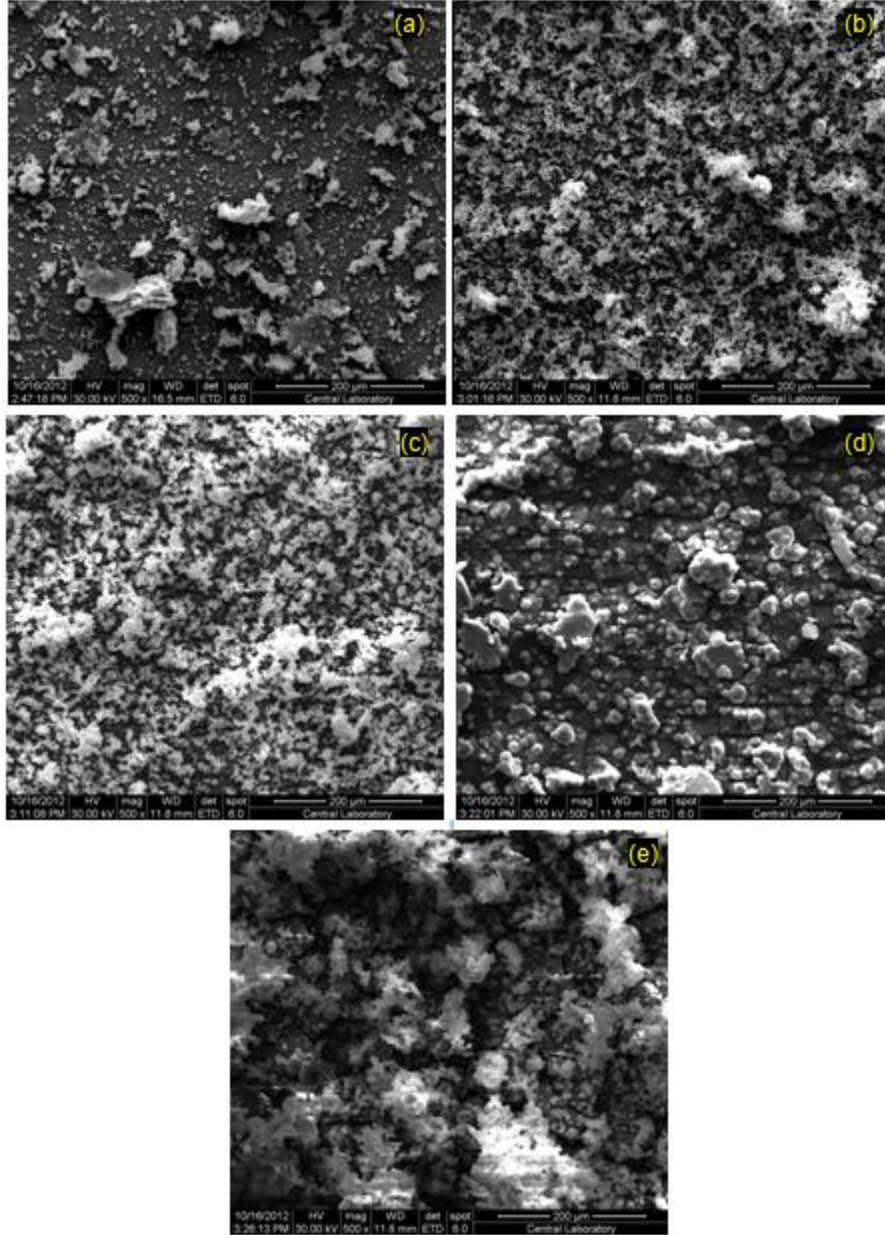


Şekil 8. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısı işlem görmüş Ti6Al4V plakaların normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin EDS analizleri: (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.

Şekil 8'de verilen EDS analizlerinden kaplamaya ait kalsiyum fosfat yapı açıkça anlaşılmaktadır. EDS analizlerine göre normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait Ca/P molar oranları sırasıyla; 4.günde 1,09, 7.günde 1,79, 10. günde 1,83, 14.günde 1,78 ve 21. günde ise 1,80 olarak hesaplanmıştır. Buradan Ca/P molar oranının SBF'de bekleme süresi ile arttığı görülmektedir.

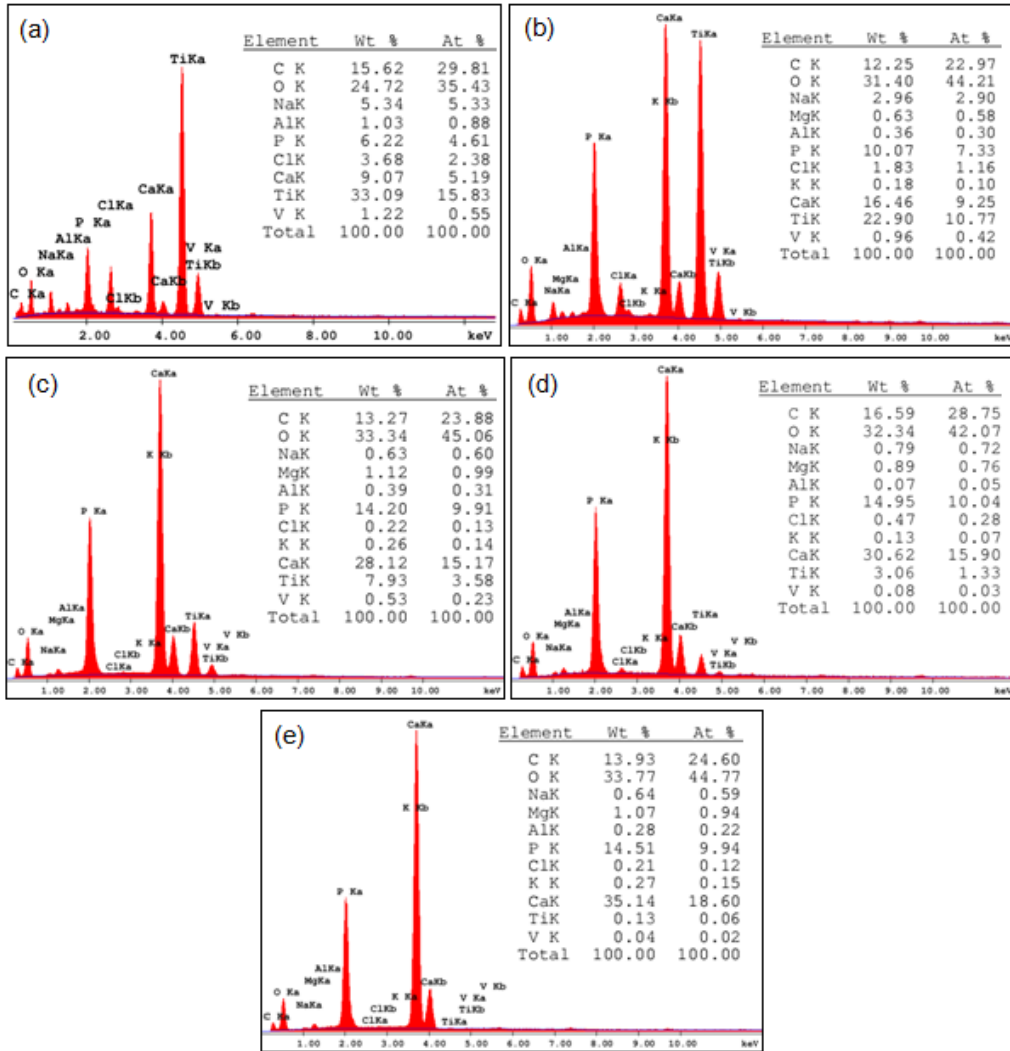
4.1.3. Selenat Eklenmiş 1.5xSBF ile Kaplama

Alkali ve ısıtma işlemi gördükten sonra, selenat eklenmiş 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 4, 7, 10, 14 ve 21 gün süreyle bekletilmiş olan Ti6Al4V plakaların yüzeylerine ait SEM görüntüleri Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtma işlemi görmüş Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin SEM görüntüleri (500x): (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.

Şekil 9'daki SEM görüntülerinden, tıpkı normal kompozisyondaki 1.5xSBF ile kaplanan yüzeylerde olduğu gibi 4. günde çekirdeklenmenin başlamış olduğu anlaşılmaktadır. Aynı şekilde, çözelti içerisinde bekleme süresi arttıkça çekirdeklenmenin etrafında çökeltme devam etmiş ve küçük yarım kürecikler halinde oluşan kalsiyum fosfat yapının büyüdükten sonra tekrar küçük kürecikler halindeki çökelti ile kaplanmış olduğu görülmektedir. Şekil 9'da verilen SEM görüntülerine ait EDS analizleri ve kaplamanın içerisindeki elementlere ait oranlar kütle ve atomik yüzde olarak Şekil 10'da sıralanmıştır.



Şekil 10. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıtılmış işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekleldikten sonra yüzeylerinin EDS analizleri: (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.

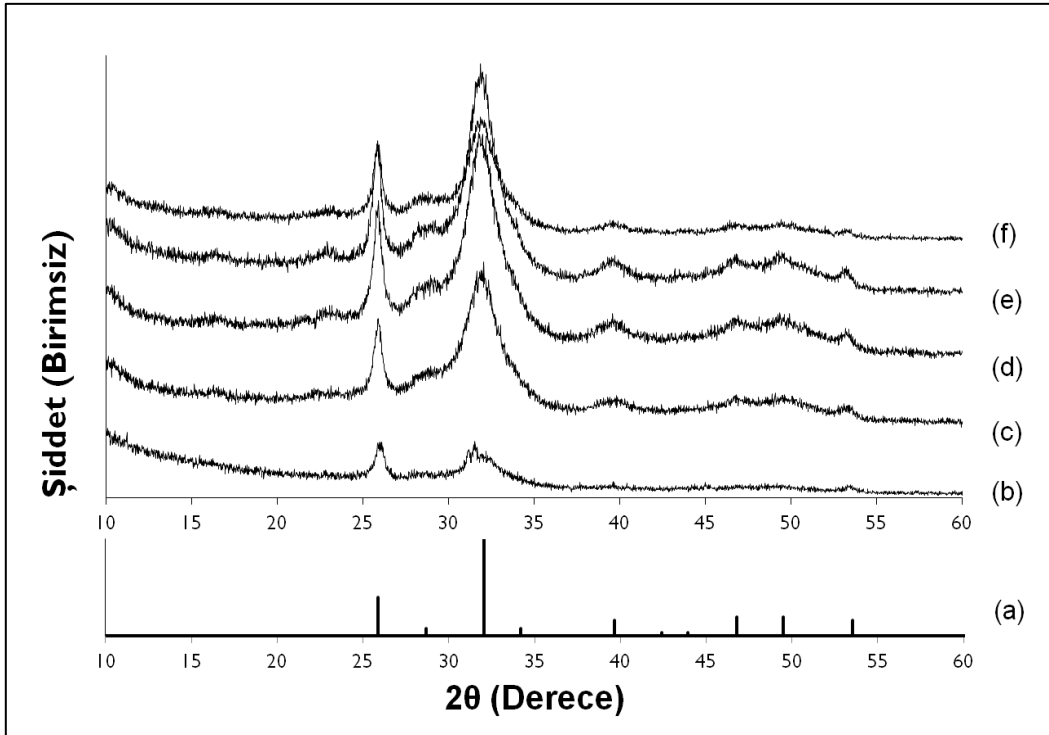
Selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletilerek elde edilen kaplamaların EDS analizlerine göre, Ca/P molar oranları bekleme süresine göre değişmektedir. SBF içerisinde 4.günde 1,13, 7.günde 1,26, 10. günde 1,53, 14.günde 1,58 ve 21. günde ise 1,87 olarak hesaplanmıştır.

Buradan, tıpkı normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletilerek elde edilen kaplamalarda olduğu gibi, Ca/P molar oranının SBF'de bekleme süresi ile arttığı görülmektedir. Ancak, EDS analizlerinden elde edilen Ca/P oranına bakılarak kaplamadaki ana fazın yorumlanması yerine, bu konuda XRD analizlerinin değerlendirilmesinin daha doğru olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan, kaplama kalınlığının artması ise, altlık plakasının bileşenlerinden olan titanyum, alüminyum ve vanadyuma ait elemental yüzdelerin SBF'de bekleme süresi arttıkça azalmasından anlaşılabilir. Örneğin, 4. günde elemental yüzdesi 15,83 olan alt plakaya ait titanyumun elemental yüzdesi giderek azalarak 21. günde 0,06'ya düşmüştür.

4.2. XRD Sonuçları

4.2.1. Normal Kompozisyondaki 1.5xSBF ile Kaplama

Alkali ve ısı işlem gördükten sonra, normal kompozisyondaki 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 4, 7, 10, 14 ve 21 gün süreyle bekletilmiş olan Ti6Al4V plakaların üzerlerinde oluşan kaplamalara ait XRD grafikleri, standart hidroksiapatit (ICDD kart no 1-1008) ile birlikte Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısı işlem görmüş Ti6Al4V plakaların normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin XRD analizleri: (a) standart hidroksiapatit (ICDD kart no 1-1008); (b) 4. gün; (c) 7. gün; (d) 10. gün; (e) 14. gün; (f) 21. gün.

Şekil 11’de de görüldüğü gibi normal kompozisyondaki 1.5xSBF’de Ti6Al4V plakaların bekletilmesiyle oluşan kalsiyum fosfat kaplamanın hidroksiapatit yapısında olduğu söylenebilir. Kaplamalar, standart hidroksiapatit (ICDD kart no 1-1008) XRD pikleri vermektedir. Normal kompozisyondaki 1.5xSBF’de oluşan kaplamalara ait XRD pikleri Tablo 7’de listelenmiştir.

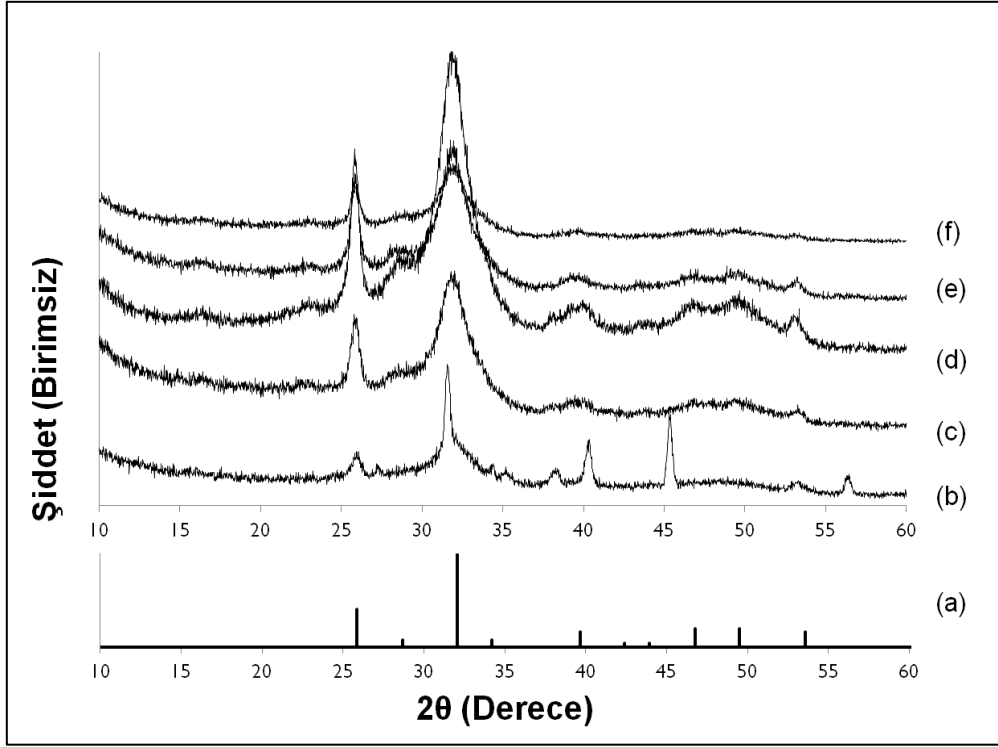
Tablo 7. Normal kompozisyondaki 1.5xSBF’de oluşan kaplamalara ait XRD pikleri.

Kaplama süresi	4.gün	7.gün	10.gün	14.gün	21.gün
XRD Pikleri 2θ (Derece)	25,98	25,89	25,72	25,73	25,71
	32,04	32,06	32,18	32,16	32,14
	39,60 (zayıf)	39,80	39,58	39,54	39,60
	-	46,64	46,62	46,60	46,74
	-	49,80	49,20	49,16	49,20
	53,46	53,44	53,18	53,22	53,24

SBF’de bekleme süresi fark etmeksizin, kaplamalar temel olarak 2 theta açısı 25,8 ve 32,1 civarında güçlü pikler vermektedir. SBF’de bekleme süresi arttıkça, kaplamanın kalınlığının artmasına bağlı olarak XRD pikleri kuvvetlenmiştir. Şekil 11 (f)’de verilen 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 21 gün süreyle bekletilmiş olan Ti6Al4V plakaların üzerlerinde oluşan kaplamadaki piklere ait XRD şiddetlerinin, 10 ve 14 gün beklemiş olan kaplamalardan düşük olması, yüzeyde oluşan kalın kaplamadan dökülmelerin olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan XRD analizlerinden, normal kompozisyondaki 1.5xSBF’de oluşan kaplamalardan 10 ve 14 gün süreyle solüsyon içerisinde bekletilmiş olanların birbirine çok benzer paterne sahip oldukları ve diğerlerine göre en yüksek pikleri vermekte oldukları gözlemlenmiştir.

4.2.2. Selenat Eklenmiş 1.5xSBF ile Kaplama

Alkali ve ısı işlem gördükten sonra, selenat eklenmiş 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 4, 7, 10, 14 ve 21 gün süreyle bekletilmiş olan Ti6Al4V plakaların üzerlerinde oluşan kaplamalara ait XRD grafikleri, standart hidroksiapatit (ICDD kart no 1-1008) ile birlikte Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısı işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin XRD analizleri: (a) standart hidroksiapatit (ICDD kart no 1-1008); (b) 4. gün; (c) 7. gün; (d) 10. gün; (e) 14. gün; (f) 21. gün.

Şekil 12'de görüldüğü gibi selenat eklenmiş 1.5xSBF'de Ti6Al4V plakaların bekletilmesiyle oluşan kalsiyum fosfat kaplamanın hidroksiapatit yapısında olduğu söylenebilir. Kaplamalar, normal kompozisyondaki 1.5xSBF'den elde edilen kaplamalarda da olduğu gibi, standart hidroksiapatit (ICDD kart no 1-1008) XRD pikleri vermektedir. Selenat eklenmiş 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait XRD pikleri Tablo 8'de listelenmiştir.

Tablo 8. Selenat eklenmiş 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait XRD pikleri.

Kaplama süresi	4.gün	7.gün	10.gün	14.gün	21.gün
XRD Pikleri 2θ (Derece)	25,95	25,84	25,84	25,88	25,98
	31,51	28,60	28,86	28,50	28,60(zayıf)
	38,18	32,02	32,14	32,02	32,10
	40,35	39,46	39,77	39,54	39,42
	45,31	49,49	49,40	49,10	-
	53,30	53,28	53,13	53,24	53,36
	56,35	-	-	-	-

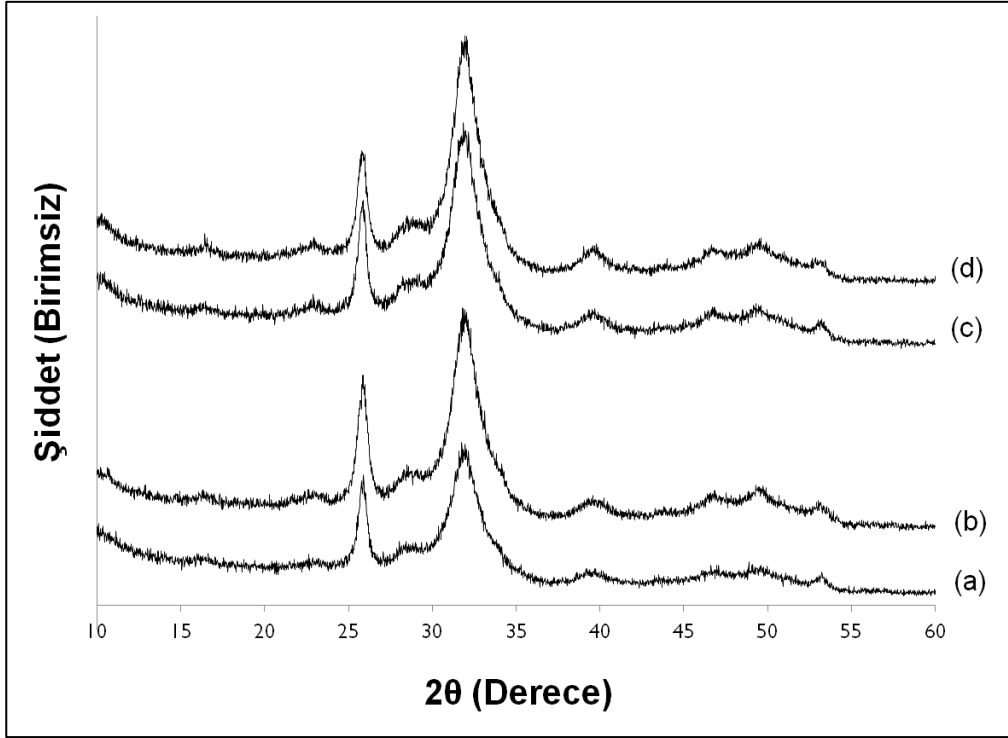
Şekil 12(b)'de görüldüğü gibi, selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 4. gündeki kaplamada altlık plakaya ait 2 theta açısı 38,18, 40,35 ve 56,35 olan pikler alınmıştır. Bunun sebebi, birbirinden uzak kürecikler halinde çekirdeklenmenin henüz başlamış olmasıdır. Diğer yandan, selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 7, 10, 14 ve 21. günde oluşan kaplamalardan tipik hidroksiapatit pikleri dışında farklı bir faza ait pikler gelmemektedir. Tıpkı, normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletilen kaplamalarda olduğu gibi, Şekil 12 (f)'de verilen, selenat eklenmiş 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 21. günde elde edilmiş olan kaplamadaki piklere ait XRD şiddetlerinin, 10 ve 14 gün beklemiş olan kaplamalardan düşük olması, yüzeyde oluşan kalın kaplamadan dökülmelerin olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan XRD analizlerinden, selenat eklenmiş 1.5xSBF'de oluşan kaplamalardan 10. günde alınan kaplamanın, diğerlerine göre en yüksek pikleri vermekte olduğu gözlemlenmiştir.

4.2.3. Sterilizasyon Etkisi

Saf halde ve yapısına selenat eklenerek elde edilen hidroksiapatit kaplamaların in-vitro biyouyumluluk deneylerinin gerçekleştirilebilmesi için üretilen kaplamaların sterilize edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, hücre kültürü deneylerinden bağımsız olarak, vücuda yerleştirilen tüm implantların sterilizasyon işlemine tabi tutulması gerekmektedir.

Genel olarak biyomalzemeler için uygulanan sterilizasyon yöntemleri arasından, buhar sterilizasyonu veya otoklav sterilizasyonu, kuru ısı ve etilen oksit (EtO) ile sterilizasyon, basit ve ucuz olmaları sebebiyle daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Morejón-Alonso vd. 2007). Örneğin, biyomedikal uygulamalar için, standart bir prosedüre göre, biyomalzeme 20 dk boyunca 120°C sıcaklıkta bir çelik otoklav içinde sterilize edilebilir (Santos vd. 2012). Ancak, çok yüksek derecelerde olmayan kuru ısının, hidroksiapatit kaplı Ti6Al4V plakalar için daha uygun olacağı düşünülmüş ve ön çalışmalar için plakalar 200°C'de 2 saat süre ile ısıya tabi tutulmuştur. Ancak bu işlemin, oda sıcaklığının üzerinde uygulanması sebebiyle, kaplamada mevcut fazların değişimine neden olabileceği düşünülerek XRD analizleri yapılmıştır.

Aşağıdaki grafikte, selenat eklenmiş veya normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 14 gün süreyle kaplanmış Ti6Al4V plakaların sterilizasyon işlemi önce ve sonrasında yapılan XRD analizleri verilmiştir.



Şekil 13. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısı işlem görmüş ve biyomimetik yöntemle kaplanmış Ti6Al4V plakaların XRD analizleri: (a) selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 14. Gün; (b) selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 14. gün, sterilizasyon sonrası; (c) normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 14. gün; (d) normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 14. gün, sterilizasyon sonrası.

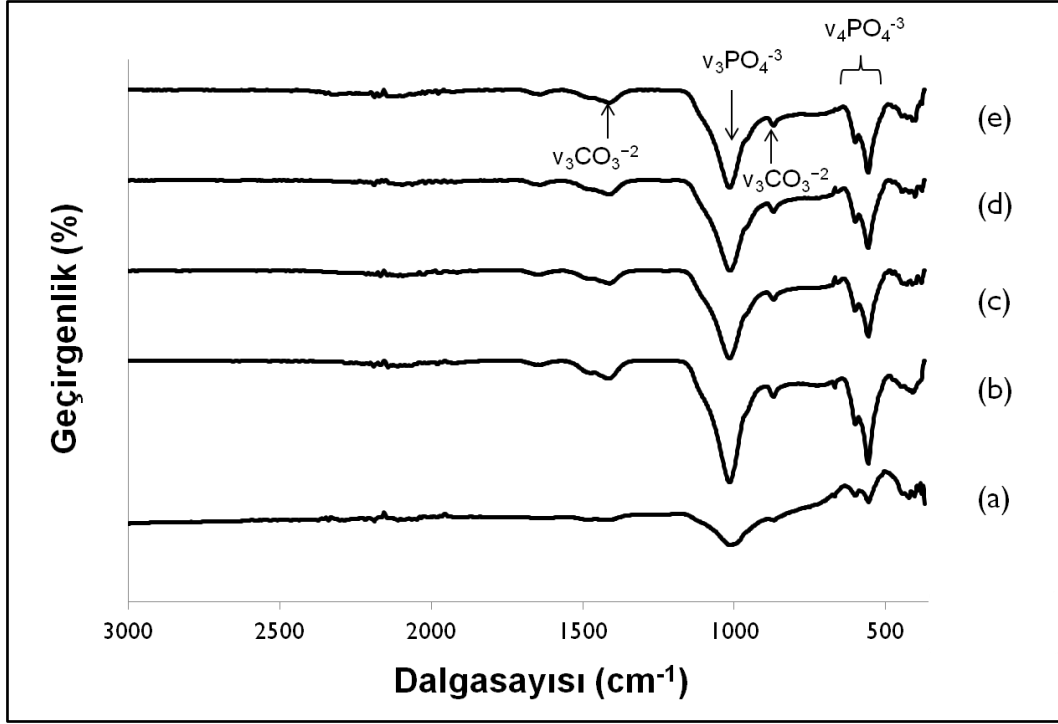
Şekil 13'de görüldüğü gibi, 2 saat süre ile 200°C ısıya tabi tutulan, selenat eklenmiş veya eklenmemiş kaplamalarda, sterilizasyon sonucunda yeni XRD pikleri, yani yeni faz oluşumlarına rastlanmamıştır. Plakalar üzerindeki kaplamalarda gözle görülebilen herhangi bir kalkma gözlemlenmemiştir.

Ayrıca, 2 saat süre ile 200°C ısıya tabi tutulan kaplamaların, sterilizasyon işlemi öncesine göre daha yüksek şiddette XRD pikleri verdiği düşünüldüğünde, kaplamanın kristallik oranının artmış olduğundan bahsedilebilir.

4.3. FTIR Sonuçları

4.3.1. Normal Kompozisyondaki 1.5xSBF ile Kaplama

Alkali ve ısı işlem gördükten sonra, normal kompozisyondaki 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 4, 7, 10, 14 ve 21 gün süreyle bekletilmiş olan Ti6Al4V plakaların üzerlerinde oluşan kaplamalara ait FTIR spektrumları Şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısıt işlem görmüş Ti6Al4V plakaların normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin FTIR analizleri: (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.

Şekil 14'ten, normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de Ti6Al4V plakaların bekletilmesiyle oluşan kalsiyum fosfat kaplamanın hidroksiapatite ait tipik FTIR spektrumu verdiği söylenebilir. Normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait FTIR pikleri Tablo 9'da listelenmiştir.

Tablo 9. Normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait FTIR pikleri.

Kaplama süresi	4. gün	7. gün	10. gün	14. gün	21. gün
FTIR Pikleri Dalgasayısı (cm ⁻¹)	556,09	557,95	557,70	557,87	557,89
	599,55	599,79	600,29	600,05	600,10
	868,37	870,82	870,34	870,99	870,07
	1012,02	1015,53	1015,57	1014,39	1015,45
	1410,36	1414,14	1412,55	1412,42	1412,65
	-	1639,18	1641,58	1641,50	1641,56

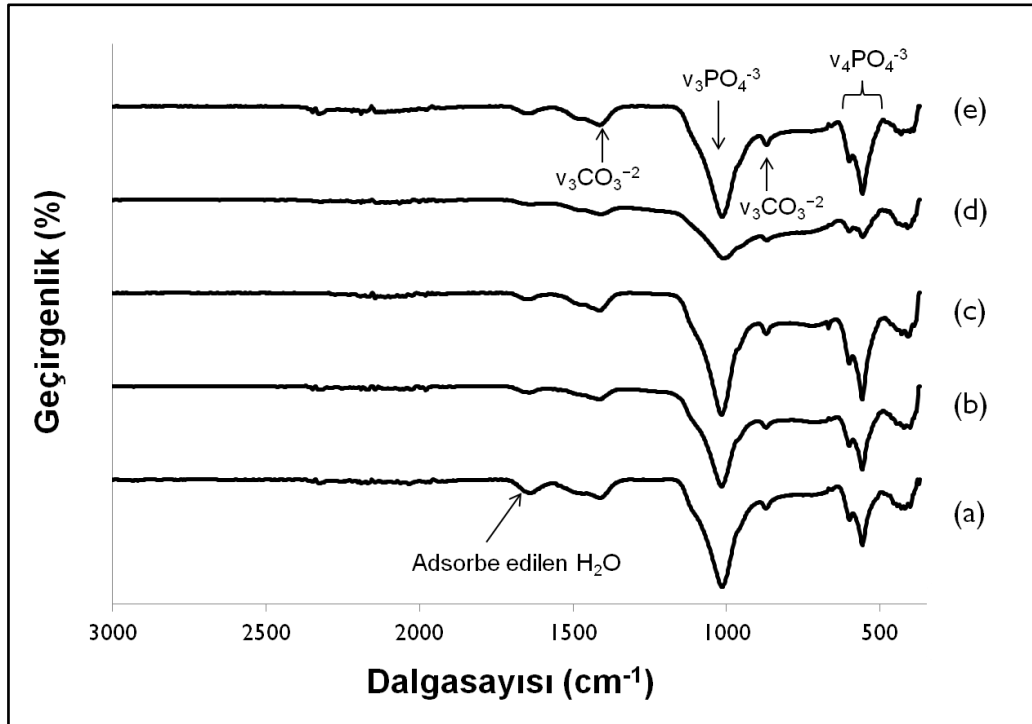
FTIR spektrumlarında, hidroksiapatit yapısındaki fosfat iyonuna (PO₄⁻³) ait olan 1015 cm⁻¹ civarındaki ν₃PO₄⁻³ gerilim modu ve en yüksek değeri ve omuz değeri sırasıyla 557 cm⁻¹ ve 600 cm⁻¹ civarlarında olan ν₄PO₄⁻³ bükülme modunun karakteristik bantları açıkça

görülmektedir. Doğal kemik ve dentin yapılarında da bulunduğu bilinen, 870 cm^{-1} ve 1412 cm^{-1} civarındaki bantlar, $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ moduna ait olup, kaplamanın içerisinde karbonat (CO_3^{2-}) iyonunun bulunduğunu göstermektedir (Silva vd., 2003). Ayrıca EDS analizlerinde de, karbon elementine rastlanmıştır. Ayrıca, 1640 cm^{-1} civarındaki zayıf bandın kaplama tarafından absorbe edilmiş olan suya (H_2O) ait olduğu düşünülmektedir (Silva vd., 2003; Suchaneka vd., 2002).

Kaplamaların FTIR spektrumları genel karakteristik açısından, birbirlerine çok benzemektedir, ancak Şekil 14(a)'da görüldüğü gibi, normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 4. günde elde edilen kaplamaya ait FTIR spektrumunda dalgasayıları aynı olmasına rağmen zayıf bantlar görülmüştür. Bunu sebebi, çekirdeklenmenin henüz başlamış olup, Ti6Al4V plaka yüzeyinin tamamen kaplanmamış olmasıdır.

4.3.2. Selenat Eklenmiş 1.5xSBF ile Kaplama

Alkali ve ısı işlem gördükten sonra, selenat eklenmiş 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 4, 7, 10, 14 ve 21 gün süreyle bekletilmiş olan Ti6Al4V plakaların üzerlerinde oluşan kaplamalara ait FTIR spektrumları Şekil 15'te verilmiştir.



Şekil 15. 400 no'lu SiC ile zımparalanmış, alkali ve ısı işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin FTIR analizleri: (a) 4. gün; (b) 7. gün; (c) 10. gün; (d) 14. gün; (e) 21. gün.

Şekil 15'ten, normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de elde edilen kaplamalarda olduğu gibi, selenat eklenmiş 1.5xSBF'de Ti6Al4V plakaların bekletilmesiyle oluşan kalsiyum fosfat kaplamanın da hidroksiapatite ait tipik FTIR spektrumu verdiği söylenebilir. Selenat eklenmiş 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait FTIR pikleri Tablo 10'da listelenmiştir.

Tablo 10. Selenat eklenmiş 1.5xSBF'de oluşan kaplamalara ait FTIR pikleri.

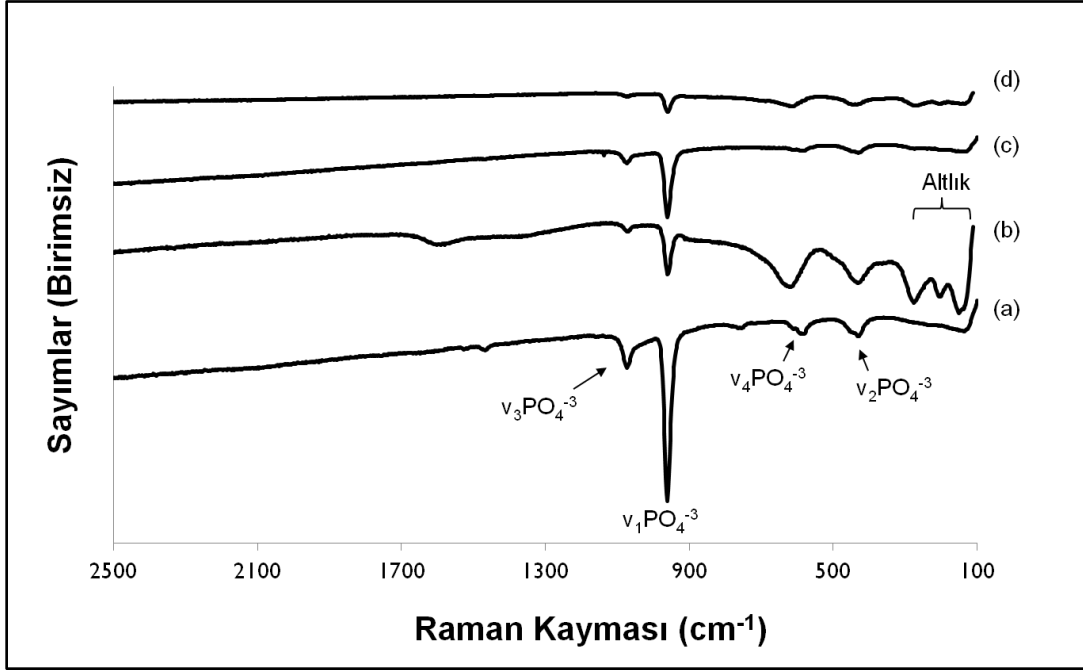
Kaplama süresi	4. gün	7. gün	10. gün	14. gün	21. gün
FTIR Pikleri Dalgasayısı (cm ⁻¹)	557,40	558,01	558,25	555,59	557,30
	599,20	600,45	600,19	599,97	599,95
	871,96	871,69	870,92	868,27	870,25
	1014,83	1016,11	1016,35	1010,52	1014,83
	1412,81	1414,63	1413,74	1409,82	1413,40
	1641,24	1642,49	1641,99	1641,01	1642,06

FTIR spektrumlarında, PO₄⁻³ iyonuna ait olan 1015 cm⁻¹ civarındaki ν₃PO₄⁻³ gerilim modu ve en yüksek değeri ve omuz değeri sırasıyla 557 cm⁻¹ ve 600 cm⁻¹ civarlarında olan ν₄PO₄⁻³ bükülme modunun karakteristik bantları ortaktır. Normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de elde edilen kaplamalarda olduğu gibi, 870 cm⁻¹ ve 1412 cm⁻¹ civarında ν₃CO₃⁻² moduna ait bantlar görülmüştür.

FTIR analizlerinde, selenyum katkılı kaplamaların spektrumlarının, hidroksiapatitten hiçbir belirgin fark göstermedikleri görülmüştür. Bu sonuç, yapılan XRD analizleri ile tutarlılık göstermiş ve kaplamaların tek fazlı olduğunu göstermiştir. Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar, bu konuda literatürde yayımlanmış çok az sayıda çalışma (Lee, 2010) ile uyumluluk içerisindedir.

4.4. Raman Spektroskopi Sonuçları

Raman spektroskopi, birçok durumda FTIR spektroskopiden daha hassas olabildiği için, burada da selenyumun hidroksiapatit yapısına girmesinin araştırılması için kullanılmıştır. Selenat eklenmiş ve normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de 7 veya 14 gün süreyle bekletilerek kaplanan Ti6Al4V plakaların Raman spektrumları Şekil 16'da verilmiştir.



Şekil 16. Selenat eklenmiş ve normal kompozisyondaki 1.5xSBF’de kaplanan Ti6Al4V plakaların Raman spektrumları: (a) selenat eklenmiş 1.5xSBF’de 14. gün; (b) selenat eklenmiş 1.5xSBF’de 7. gün S7; (c) normal kompozisyondaki 1.5xSBF’de 14. gün ve (d) normal kompozisyondaki 1.5xSBF’de 7. gün.

Fosfat grubunun (v_1) gerilim modunu işaret eden 961 cm^{-1} bandı, tüm kaplamaların ortak karakteristik bandıdır. Fosfat grubunun gözlemlenen diğer bantları: 1072 cm^{-1} (v_3 , gerilim modu) ve 429 cm^{-1} (v_2 , gerilim modu). Şekil 16 (a) ve (c)’de görülen 590 cm^{-1} bandı yine fosfat grubunun v_4 bükülme moduna aittir (Kazancı vd., 2006; Rodriguez-Valencia vd., 2013). 136 cm^{-1} , 209 cm^{-1} , 270 cm^{-1} ve 629 cm^{-1} civarlarında görülen bantlar alkali ve ısı işlem görmüş Ti6Al4V altlık plakaya aittir. Bu bantlar selenat eklenmiş 1.5xSBF’de 7. gün sonunda elde edilen kaplamada daha belirgin olarak görülmektedir. Bunun sebebi, kaplama kalınlığının 7. günde düşük olması ve yer yer boşluklar görülmesidir.

Selenit (SeO_3^{-2}) iyonunun kimyasal açıdan sülfat (SO_3^{-2}) iyonuna benzediği bilinmektedir ve selenit iyonunun simetrisi sülfat iyonuna benzer olmalıdır. Selenit iyonuna ait dört esas modu vardır: v_1 ($790\text{--}806$ ya da $760\text{--}855\text{ cm}^{-1}$) – simetrik gerilme titreşimi; v_2 ($430\text{--}461\text{ cm}^{-1}$) – bükülme titreşimi; v_3 ($714\text{--}769$ ya da $680\text{--}775\text{ cm}^{-1}$) – dejenere gerilme titreşimi; v_4 ($387\text{--}418\text{ cm}^{-1}$) – iki kat dejenere düzlem-içi bükülme titreşimi. Tüm titreşimler hem Raman hem kızılötesi aktiftir (Frost vd. 2006).

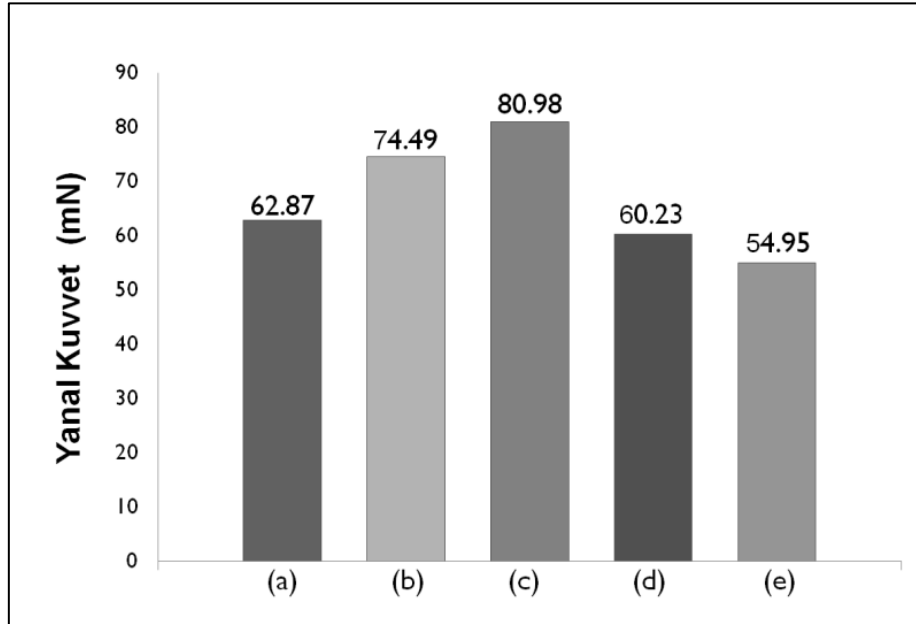
Benzer olarak, selenat (SeO_4^{-2}) ve sülfat (SO_4^{-2}) grupları da birbirlerine yapısal olarak çok benzemektedir. Selenat iyonu için Raman aktif olan normal titreşim modları ise şu şekildedir:

dejenere olmayan v_1 simetrik SeO gerilim (837 cm^{-1}), iki kat dejenere v_2 OSeO bükülme (349 cm^{-1}), üç kat dejenere v_3 asimetrik SeO gerilim (873 cm^{-1}) ve üç kat dejenere v_4 OSeO bükülme (417 cm^{-1}) (Wijnja ve Schulthess, 2000).

Selenat eklenmiş $1.5 \times \text{SBF}$ 'de 14. gün sonunda elde edilen kaplamaya ait Raman spektrumunda 764 cm^{-1} civarında zayıf bir bant görülmektedir. Bu bandın selenyuma ait iyonlardan birinden kaynaklanmakta olduğu düşünülebilir. Ancak, selenyumun hidroksiapatit içerisine girmesi istenen miktarı çok düşük olduğu için, bu bantların kesin olarak herhangi bir selenyum iyonuna atfedilmesi mümkün olmamıştır.

4.5. Çizik Testi

Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş ve normal kompozisyondaki $1.5 \times \text{SBF}$ 'de bekletilmesiyle elde edilen kaplamaların alt malzemeye yapışma özelliğinin incelenmesi için çizik (scratch) testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 17'de verilmiştir.



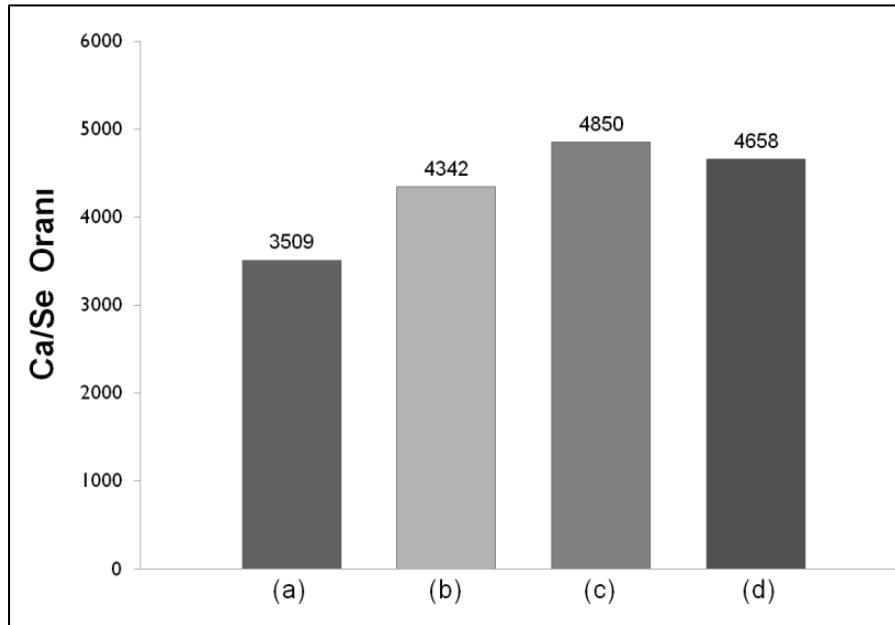
Şekil 17. Biyomimetik yöntemle kaplanmış Ti6Al4V plakaların çizik testi analizleri: (a) S10; (b) S14; (c) N10; (d) N14; (e) sterilizasyon sonrası S14.

Şekil 17'de görüldüğü gibi, tüm kaplamaların kırılma anına ait kritik yanıl kuvvet (lateral force) değerleri 50 mN 'un üzerindedir. Normal kompozisyondaki $1.5 \times \text{SBF}$ 'de 10. günde elde edilen kaplama en yüksek yanıl kuvvet değerinde kırılmıştır ($80,98 \text{ mN}$). Ayrıca, selenat eklenmiş $1.5 \times \text{SBF}$ 'de 10 ve 14. günde elde edilen kaplamaların, normal kompozisyondaki $1.5 \times \text{SBF}$ 'de 10 ve 14. günde elde edilen kaplamalardan çok farklı kuvvet değerleri vermediği görülmüştür.

Kırılma anına ait kuvvet değerleri mN seviyesinde ancak beklenen değerin üzerindedir. Biyomimetik yöntemle, SBF içerisinde, öncesinde alkali ve ısıtılmış Ti6Al4V plakaların kalsiyum fosfat kaplanmasını amaçlayan bir çalışmada elde edilen kaplamaların yapışma kuvvetleri 9 mN olarak raporlanmıştır (Pasinli vd., 2010). Ayrıca, Şekil 17(e)'de verilen, selenat eklenmiş 1.5xSBF'de 14. günde elde edilen kaplamanın sterilizasyon sonrası yanal kuvvet değeri önemli ölçüde düşmemiştir ve uygulanan sterilizasyon yönteminin kaplamanın mekanik özellikleri açısından sakıncalı olmadığı görülmüştür.

4.6. ICP-MS Sonuçları

Alkali ve ısıtılmış işlem gördükten sonra, selenat eklenmiş 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 7, 10, 14 ve 21 gün süreyle bekletilmiş olan Ti6Al4V plakaların yüzeylerinden kazınan kaplamaların ICP-MS yöntemi ile belirlenen kalsiyum miktarının selenyum miktarlarına oranları Şekil 18'de verilmiştir. Selenat eklenmiş 1.5xSBF solüsyonu içerisinde 4. günde elde edilen kaplama miktarının çok az olması sebebiyle ICP-MS analizi için uygun miktarda çökelti elde edilememiştir. Ayrıca, kontrol grubu olarak, normal kompozisyondaki 1.5xSBF'de bekleme süreleri aynı olan kaplamalar için de ICP-MS yöntemi kullanılmış ve bu kaplamalarda doğal olarak selenyuma rastlanmamıştır.



Şekil 18. Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra elde edilen kaplamaların ICP-MS analizlerine göre selenyum miktarları. (a) 7. gün; (b) 10. gün; (c) 14. gün ve (d) 21. gün.

Şekil 18'de görüldüğü gibi, Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletilmesi ile elde edilen kaplamaların tamamında selenyum bulunmaktadır. Kaplama sonrası yüzey, SBF'den çıkarıldıktan sonra saf su ile yıkandığından, kaplamaya bağlanmamış çökeltiler ortamdaki uzaklaştırılmıştır ve elde edilen değerler yalnızca kaplama içerisindeki selenyum miktarlarından gelmektedir.

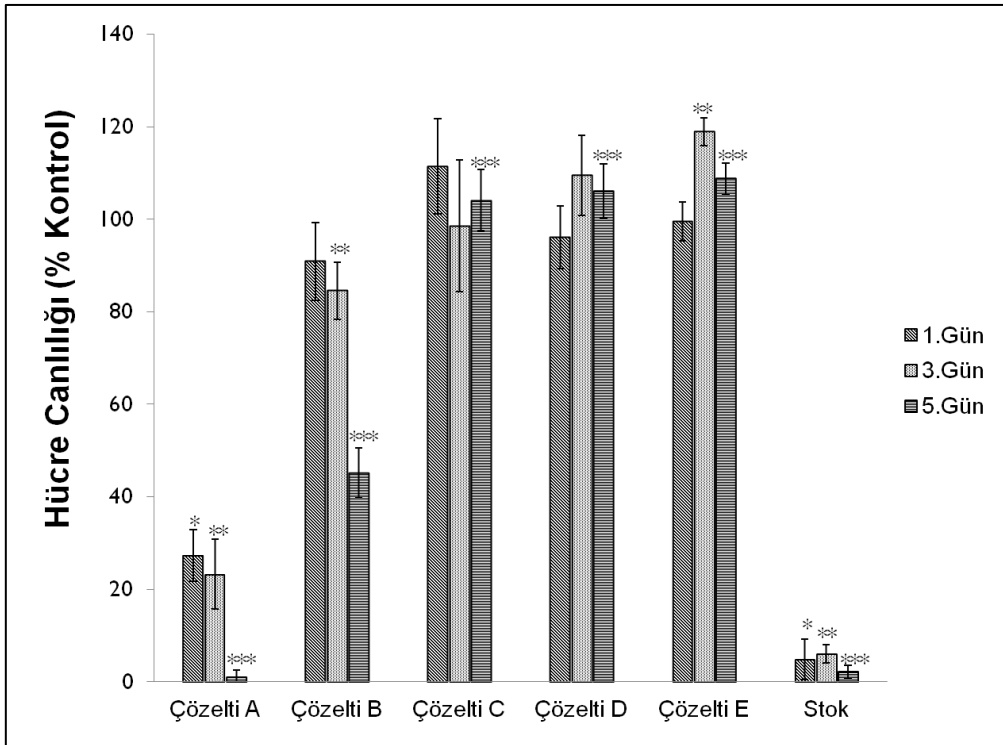
4.7. Hücre Canlılık Testleri

4.7.1. Selenyumun Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Farklı miktarlarda selenyum içeren hücre kültür ortamlarının sitotoksitesinin belirlenmesi için PrestoBlue testi yapılmıştır. Her bir kuyucuk için kontrol grubunun ortalama absorbanası alınarak hücre canlılığı yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{Her Bir Test Kuyucuğunun Absorbansı}}{\text{Kontrol Grubu Ortalama Absorbansı}} \times 100$$

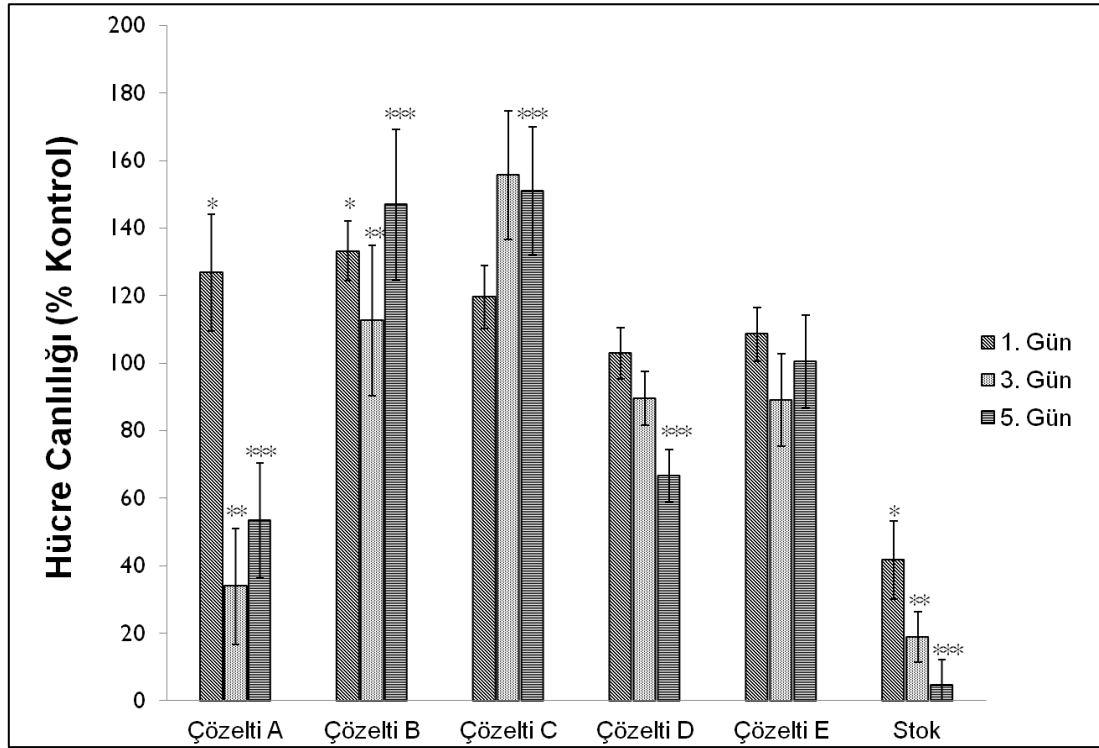
Yukarıda verilen formüle göre, her bir kuyucuk için hesaplanan yüzde canlılık değerlerinin ortalaması alınarak test grubunun yüzde canlılık değeri elde edilmiştir. Şekil 19'da hFOB 1.19 hücrelerinin farklı derişimlerde selenyum içeren ortamlarda, hücre kültür ortamına yalnızca PBS eklenen kontrol grubuna göre hücre canlılığı verilmiştir.



Şekil 19. Farklı derişimlerde selenyum içeren ortamlar için PrestoBlue testi sonuçlarına göre hFOB 1.19 hücre canlılığı (hata çubukları: standart hata) (*****) $p > 0,05$).

Şekil 19'da görüldüğü gibi, kültür ortamlarına çözelti C,D ve E eklenen sağlıklı insan kemik hücreleri genel olarak %100'ün üzerinde (kontrol grubundan daha fazla) canlılık göstermişlerdir. Çözelti A ve stok çözeltisinin ise bu hücreler üzerinde anlamlı sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir. Hücre kültür ortamının 1,1 ml'sinde 5×10^{-6} g selenyum içeren Çözelti B ile test edilmiş hücrelerde de kontrol grubuna göre anlamlı bir farkla sitotoksik etki görülmektedir.

Benzer şekilde, Saos-2 hücrelerinin farklı derişimlerde selenyum içeren ortamlarda, hücre kültür ortamına yalnızca PBS eklenen kontrol grubuna göre hücre canlılığı Şekil 20'de verilmiştir. Burada, en yüksek selenyum miktarının içeren (5×10^{-3} g Se) stok çözeltisinin Saos-2 hücreleri üzerinde anlamlı sitotoksik etkisi açıkça görülmektedir. Çözelti B ve Çözelti C'nin ise Saos-2 hücreleri üzerinde doza bağlı olarak hücre canlılığını arttırmış olduğu görülmektedir. Sitotoksik etkinin ancak selenyum miktarının Çözelti A'daki (5×10^{-5} g) derişime ulaştığında görüldüğü saptanmıştır.



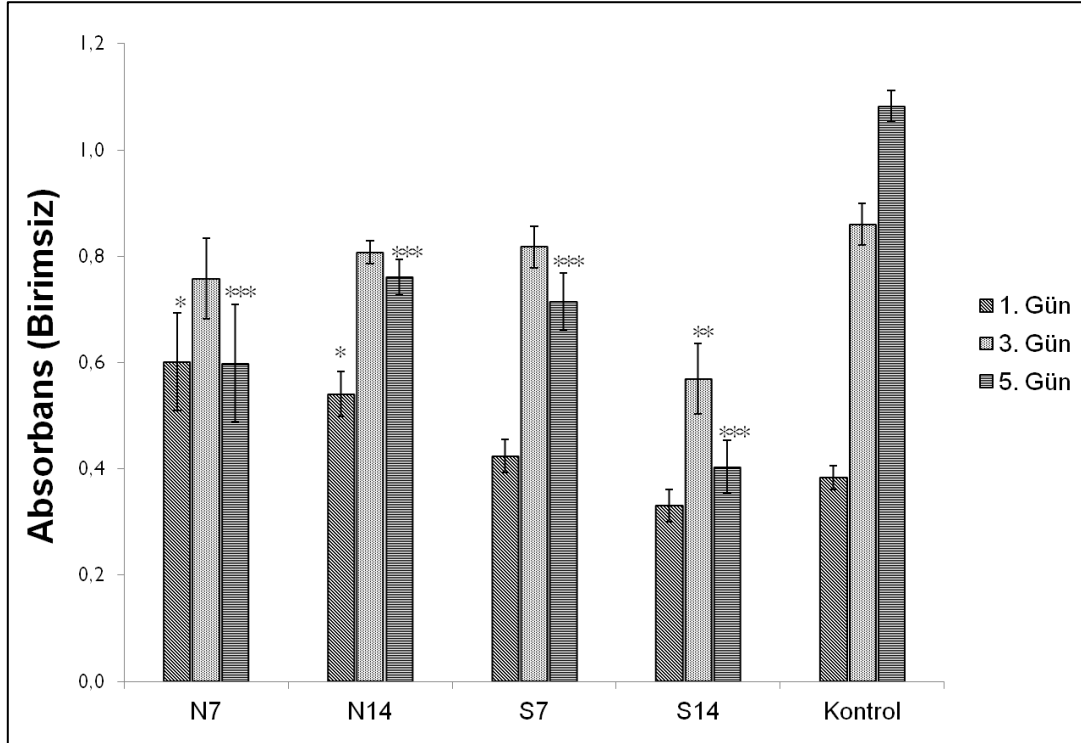
Şekil 20. Farklı derişimlerde selenyum içeren ortamlar için PrestoBlue testi sonuçlarına göre Saos-2 hücre canlılığı (hata çubukları: standart hata) (***,***) $p > 0,05$).

Tekrar hatırlatmak gerekirse, selenyumun hidroksiapatit yapısına eklenmesinin asıl amacının (hFOB 1.19 hücre hattı ile temsil edilen) sağlıklı insan kemik hücrelerinde hücre canlılığının (kontrol grubu ile temsil edilen) normalden fazla olması veya normalden düşük olmaması iken (Saos-2 hücre hattı ile temsil edilen) kanserli insan kemik hücrelerinin hücre canlılığının

ise normalden az olmasıdır. Şekil 19 ve 20, birlikte değerlendirildiğinde, Çözelti D ve Çözelti E eklenen hFOB 1.19 hücrelerinde canlılık artarken, Saos-2 hücrelerinde göre azalma olmuştur. Ancak, bunların arasından 5×10^{-8} g Se içeren Çözelti D'nin Saos-2 hücreleri için kontrol grubundan anlamlı derecede düşük canlılık ile sonuçlandığı görülmektedir. Selenyumun bu derişimi, ICP-MS yöntemi ile selenat eklenmiş 1.5xSBF'de bekletilerek elde edilen kaplamalarda belirlenen ve dolayısıyla hücre canlılığı üzerindeki etkisi test edilmek istenen miktardır. Bu sonuçlara göre, kanserli hücrelerin çoğalması baskılanırken, salgı hücrelerin canlılığında artış görülebilmesi açısından optimum selenyum derişimin Çözelti D'de elde edilmiştir.

4.7.2. Selenat Eklenmiş ve Normal 1.5xSBF'de Bekletilerek Kaplanan Plakaların Hücre Canlılık Testi

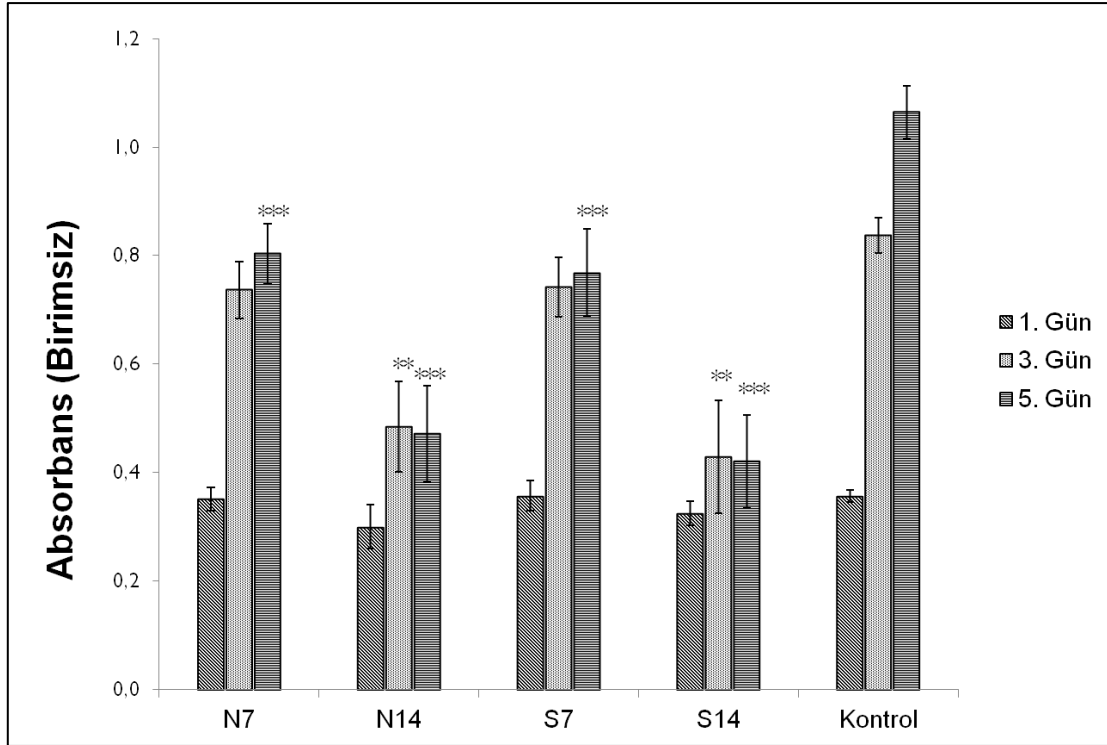
Selenat eklenmiş ve normal 1.5xSBF'de bekletilerek kaplanan plakalar üzerine eklenen hFOB 1.19 hücrelerinin PrestoBlue canlılık test sonuçları, hücre kültür ortamlarının absorbands değerleri cinsinden Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 21. Selenat eklenmiş ve normal 1.5xSBF'de bekletilerek kaplanan plakaların PrestoBlue testine göre hFOB 1.19 hücre canlılığına etkisi (hata çubukları: standart hata) (*, **, ***p>0,05).

Şekil 21’de görüldüğü gibi, hücre büyütme kabında kontrol grubu hücrelerinin absorbansı zamanla artarken, genel olarak plakalar üzerine ekilmiş hücrelerin absorbansı kontrol grubuna göre daha düşüktür.

Benzer olarak, Şekil 22’de, selenat eklenmiş ve normal 1.5×SBF’de bekletilerek kaplanan plakalar üzerine ekilen Saos-2 hücrelerinin PrestoBlue canlılık test sonuçları, hücre kültür ortamlarının absorbans değerleri cinsinden görülmektedir. Bu hücreler için de, hFOB 1.19 hücrelerinde olduğu gibi, kontrol grubu absorbansı zamanla artarken, genel olarak plakalar üzerine ekilen hücrelerin absorbansının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri, canlı hücrelerin PrestoBlue aktif bileşenini indirgeyebilme özelliklerinin bir sonucu olduğu için hücre canlılığının da direkt olarak göstergesidir.



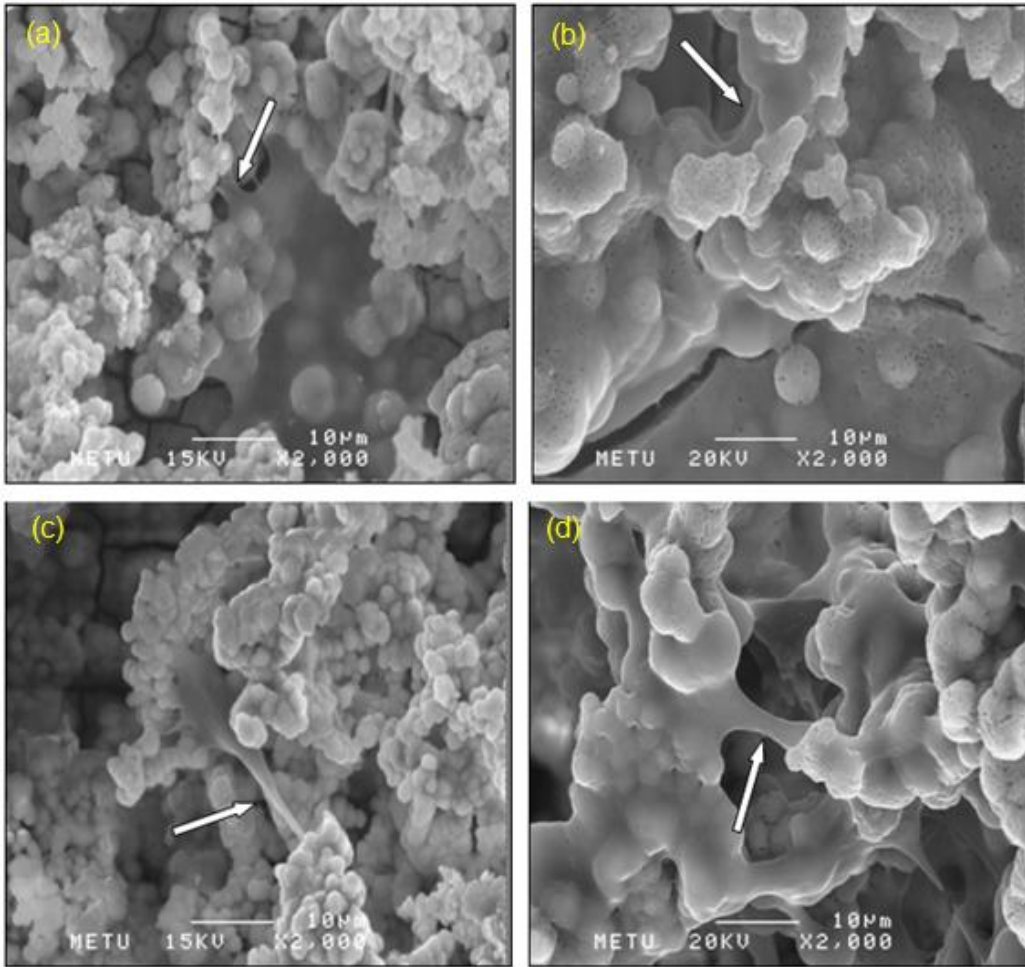
Şekil 22. Selenat eklenmiş ve normal 1.5×SBF’de bekletilerek kaplanan plakaların PrestoBlue testine göre Saos-2 hücre canlılığına etkisi (hata çubukları: standart hata) (*, **, ***p>0,05).

Özellikle Saos-2 hücreleri için daha net olarak görülen, normal veya selenat eklenmiş 1.5×SBF’de 14. günde elde edilen kaplamalarda hücre canlılığının, 7. günde elde edilen kaplamalara göre daha düşük olması, bu durumun yalnızca hidroksiapatitin yapısında selenyumun varlığı ile değil, kaplama kalınlığı ile de ilgili olabileceğini akla getirmektedir. Selenat eklenmiş veya eklenmemiş 1.5×SBF’de 14. günde elde edilen kaplamalarda, yığın

halindeki apatit tepeciklerinden zamanla dökülmeler ve dolayısıyla yüzeye tutunmuş canlı hücre sayısında azalma olabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan, kontrol grubunun ekilmiş olduğu hücre kültürü plastikleri (TCP), hücrelerin büyümesi için ideal ortam olmak üzere tasarlanmış olduklarından, kontrol grubu ile test edilen plakalar üzerindeki hücrelerin canlılığında görülen fark beklenmedik bir sonuç değildir.

4.8. Saos-2 Hücrelerin Kaplanan Plakalar Üzerinde SEM ile Görüntülenmesi

Saos-2 hücrelerinin, 7 veya 14 gün süre ile normal kompozisyondaki ve selenat eklenmiş 1.5×SBF'de kaplanan Ti6Al4V plakalar üzerinde yapışma ve üremelerini tespit edebilmek için SEM görüntüleri alınmıştır. Plakalar üzerinde 7 gün boyunca inkübe edilen hücrelerin SEM görüntüleri Şekil 23'de verilmiştir.

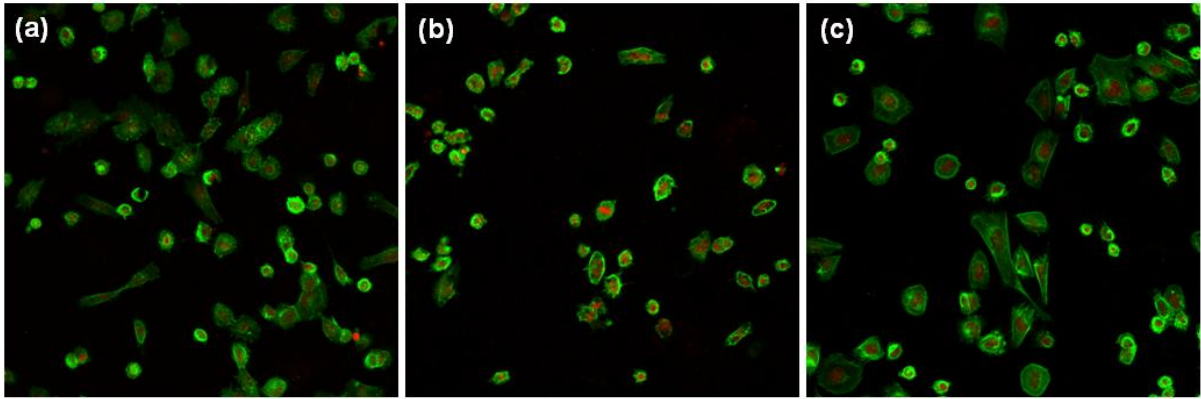


Şekil 23. Saos-2 hücrelerinin, farklı plakalar üzerine ekilerek 7 gün inkübasyonundan sonra alınan SEM görüntüleri (2000×): (a) N7; (b) S7; (c) N14; (d) S14 (oklar hücrelere ait uzantıları göstermektedir).

Şekil 23'de görüldüğü gibi, hücreler, küresel hidroksiapatit yapıları üzerine yüzey topografyasını takip ederek tutunmuştur. Hücrelere ait psödopodlar hidroksiapatit tepelikleri arasındaki uzantılar olarak görülmektedir. Ancak, saf haldeki hidroksiapatit veya selenyum eklenmiş hidroksiapatit ile kaplanmış plakalarda hücre tutunması açısından önemli bir farka rastlanmamıştır.

4.9. Saos-2 Hücrelerin Kaplanan Plakalar Üzerinde Konfokal Mikroskop ile Görüntülenmesi

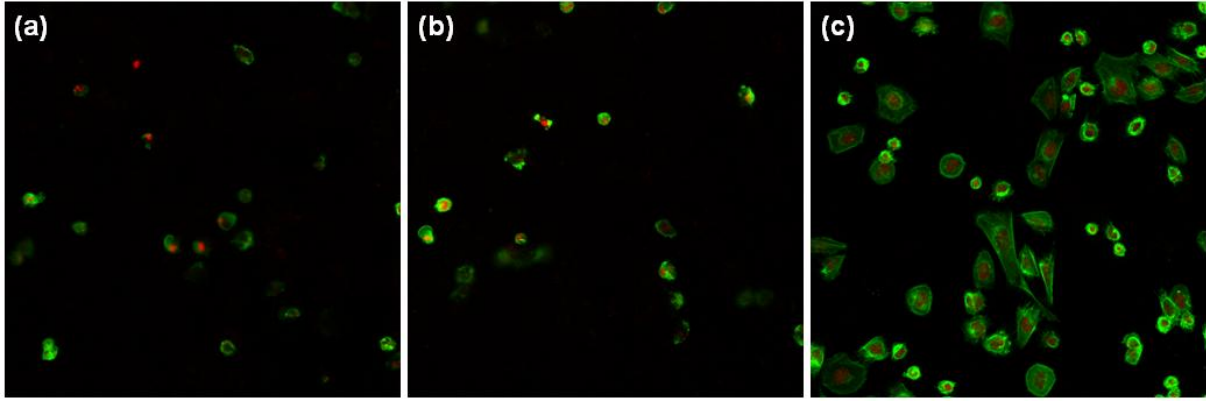
Normal kompozisyonda ve selenat eklenmiş $1.5 \times \text{SBF}$ 'de 7 gün bekletilerek oluşan kaplamalara ekilen Saos-2 hücrelerinin çekirdek ve aktin yapılarının FITC ve PI ile işaretlenmesiyle elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 24'te verilmiştir.



Şekil 24. Farklı altlıklar üzerine FITC ve PI ile işaretlenerek ekilmiş, hücrelerin 1 gün inkübasyon sonrası konfokal mikroskop görüntüleri: (a) N7; (b) S7; (c) Lamel.

Şekil 24'te görüldüğü gibi, PI ile boyanan hücre çekirdekleri kırmızı floresan verirken, FITC ile boyanan aktin filamanları yeşil renkte ışımaktadır. Hücreler her üç yüzeyde de tutunmuş ve bölünme örnekleri göstermektedir. Bilindiği gibi, lamel camları genellikle hücre kültür çalışmalarında negatif kontrol olarak kullanılan ve hücrelerin üzerinde tutunabileceği uygun bir ortamdır. Lamel üzerine ekilmiş olan hücreler ile normal kompozisyonda veya selenat eklenmiş $1.5 \times \text{SBF}$ 'de 7 gün bekletilen Ti6Al4V plakalar üzerine ekilen hücreler arasında sayısal olarak belirgin fark bulunmamaktadır.

Normal kompozisyonda ve selenat eklenmiş $1.5 \times \text{SBF}$ 'de 14 gün bekletilerek oluşan kaplamalara ekilen Saos-2 hücrelerinin çekirdek ve aktin yapılarının işaretlenmesiyle elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 25'te verilmiştir.



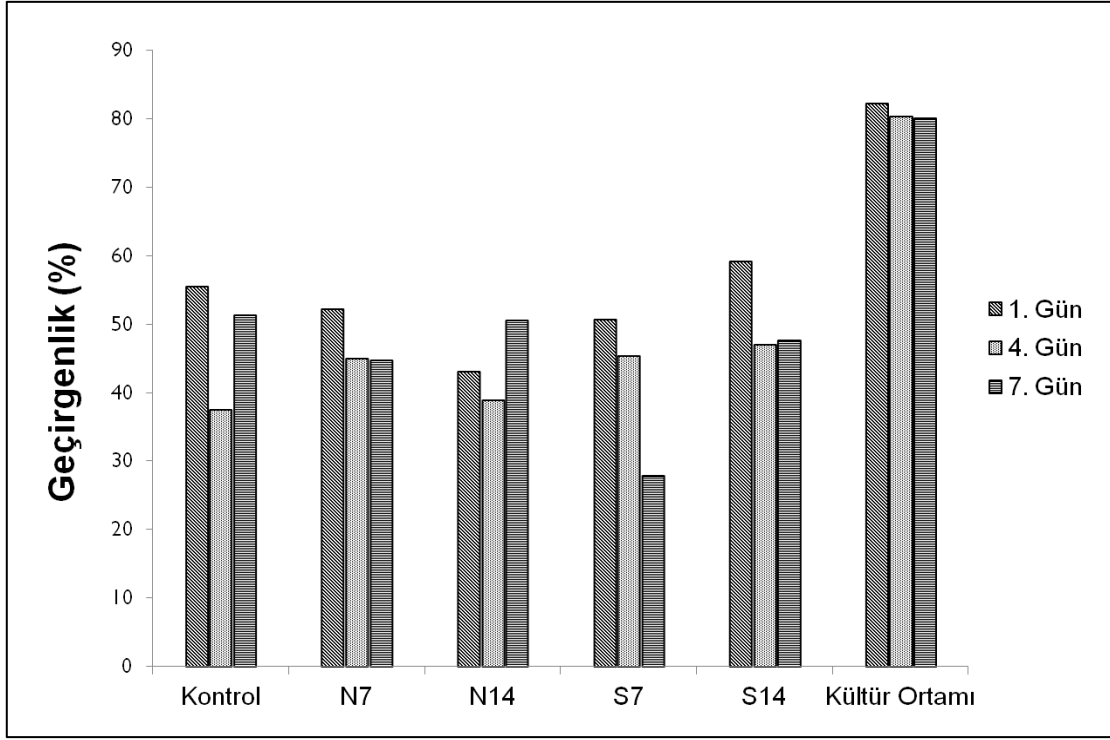
Şekil 25. Farklı altlıklar üzerine FITC ve PI ile işaretlenerek ekilmiş, hücrelerin 1 gün inkübasyon sonrası konfokal mikroskop görüntüleri: (a) N14; (b) S14; (c) Lamel.

Şekil 25'den de görülebildiği gibi, normal kompozisyonda ve selenat eklenmiş 1.5×SBF'de 7 gün bekletilerek elde edilen plakalar üzerine ekilen hücrelerden farklı olarak, 14. günde elde edilen kaplamalar üzerine ekilen hücreler kontrol gurubundan belirgin şekilde sayıca azdır. Yapılan PrestoBlue testi sonucunda (bkz. Şekil 22) da benzer etki görülmüştür. Selenyumlu veya saf haldeki hidroksiapatit ile 14 gün süreyle biyomimetik yöntemle kaplanan plakalardan her ikisinde de hücre sayısında azalma görüldüğünden, bu azalışın, toksik etki sebebi ile değil kaplama kalınlığı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Kaplama kalınlığının artması ile, hücre kültür ortamında kaplamalardan lokal dökülmelerin hücre kaybına sebep olması olasıdır.

4.10. Bakteri Tutulumu ve Üremesi

S. epidermidis, insanlarda derinin normal flora üyelerinden biridir. Herhangi bir implantın vücuda yerleştirilmesinde implant biyomalzemesine tutunarak biyofilm oluşturması ile primer bakteriyemilerin en sık karşılaşılan etkenlerindendir (Rupp ve Fey, 2010). Bu çalışmada, Ti6Al4V plakaların selenat eklenmiş 1.5×SBF'de bekletilmesiyle elde edilen anti-kanser amaçlı kaplamaların, bir yandan da *S. epidermidis*'in bu plakalara tutulumu yönünden incelenmesi hedeflenmiştir. Selenyumun anti-bakteriyel bir malzeme olarak mevcut potansiyelinin, üretilen kaplamalara da aynı özelliği kazandırması ön görülmüştür.

Bakteri ekilmiş plakaların ve lamelin (kontrol) bulunduğu ortamdan alınan örneklerin, kültür ortamının kendisi ile beraber spektrofotometre analizinden elde edilen geçirgenlik grafiği Şekil 26'da verilmiştir.



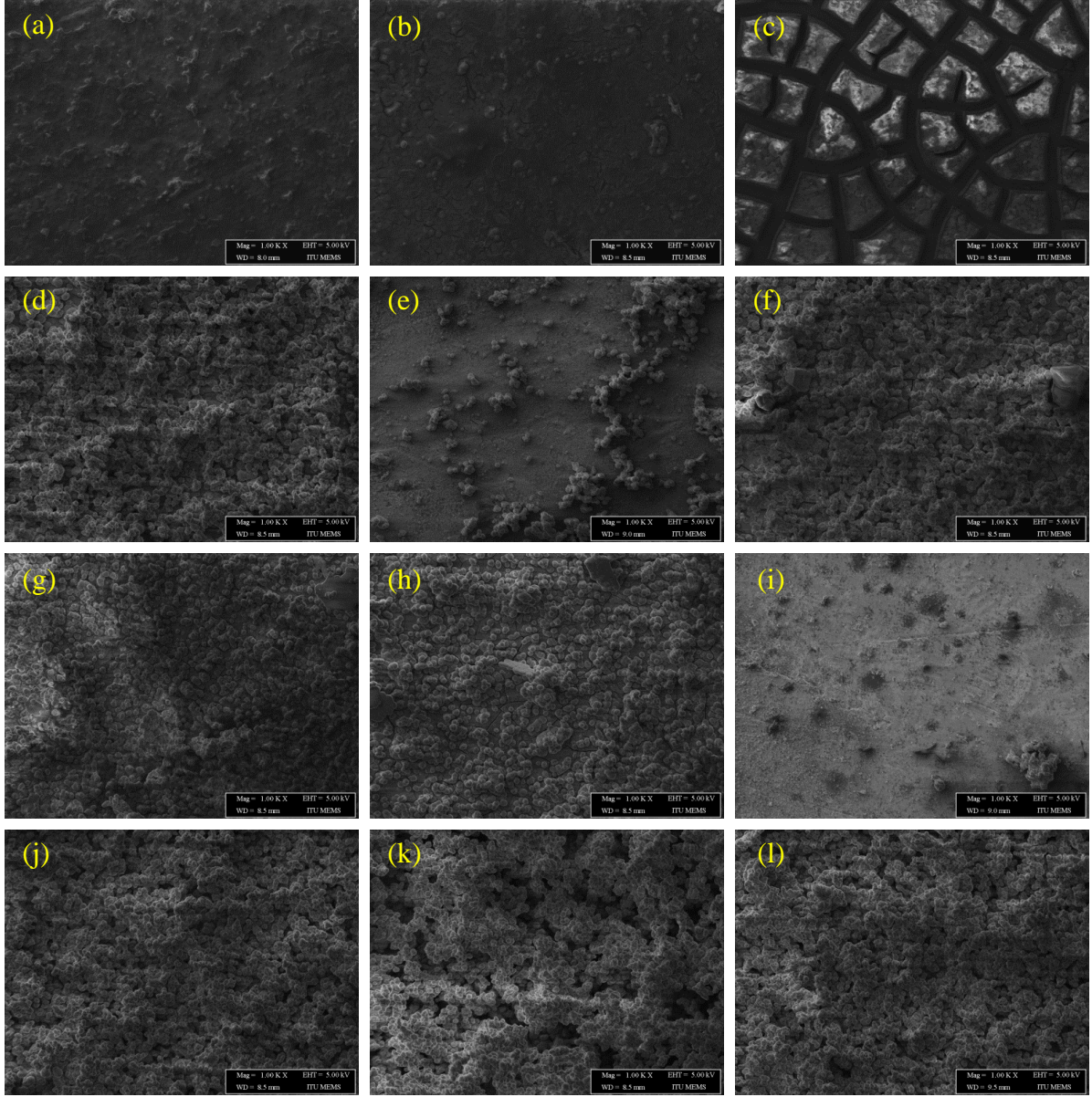
Şekil 26. Bakteri ekilen plaka (N7, N14, S7, S14) ve kontrol gruplarının bulunduğu ortamlardan 1, 4 ve 7 gün inkübasyon sonrası alınan örneklere ait ışık geçirgenlikleri.

Spektrofotometrik ölçümlerde, ışığın geçirgenlik yüzdesi ölçüm yapılan ortamdaki partikül sayısı ile ters orantılı olduğundan, örneklerin içinde bulunduğu ortamdaki bakteri sayısı arttıkça, ölçülen yüzde geçirgenlik değerinin azalması gerekmektedir. Şekil 26'da görüldüğü üzere, bakteri içermeyen kültür ortamı diğer gruplardan daha yüksek geçirgenlik değerine sahiptir.

Benzer olarak, geçirgenlik yüzdesi arttıkça, ortamdaki bakteri sayısının azaldığı ve tutulumun daha çok örnek üzerinde olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple, yüzde geçirgenlik değeri azaldıkça da örnek üzerinde bakteri sayısının azaldığı söylenebilir.

1, 4 ve 7 günlük bakteri kültür süresi değerlendirildiğinde selenyumlu kaplamalar üzerinde (S7 ve S14) başlangıca göre bakteri sayısında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, 7 günlük inkübasyon sonunda, S7 olarak isimlendirilen, selenat eklenmiş 1.5×SBF'de 7. günde elde edilen kaplama üzerindeki bakteri sayısının en az olduğu görülmüştür. Bu bulgu, örneklerden alınan SEM görüntüleri ile uyum içerisindedir.

Üzerlerine *S. epidermidis* bakterisi ekilmiş plakaların 1, 4 ve 7 gün inkübasyon sonrası SEM görüntüleri Şekil 27'de verilmiştir.



Şekil 27. *S. epidermidis* bakterisi ekilmiş plakaların 1, 4 ve 7 gün inkübasyon sonrası SEM görüntüleri: (a) N7, 1. gün; (b) N7, 4.gün; (c) N7, 7.gün; (d) N14, 1.gün; (e) N14, 4.gün; (f) N14, 7.gün ; (g) S7, 1.gün; (h) S7, 4.gün; (i) S7, 7.gün; (j) S14, 1.gün;(k) S14, 4.gün; (l) S14, 7.gün (Büyütme:1000×).

Şekil 27'den de görüldüğü gibi, *S. epidermidis* bakterisi üzüm salkımı şeklinde yuvarlak formda bulunmaktadır. Şekil 27(i)'de verilen, S7 plakasının 7 gün süreyle bakteri inkübasyonu sonrası elde edilen görüntüsünde, 1. ve 4. günlere göre bakteri sayısında gözle görülür bir azalma olduğu söylenebilir. Ancak, S14 plakası için, spektrofotometrik analizde ilk güne göre bakteri sayısında azalış görünse de, SEM görüntülerinde bu durum net olarak gözlemlenememiştir.

Selenyum içeren farklı bileşiklerin, *S. aureus* bakterisinin çoğalması üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, konsantrasyona bağlı olarak bu bileşiklerin bakteri üzerinde toksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Xi vd., 2002). Aynı şekilde, Tran vd. (2010c) tarafından gerçekleştirilen ve elemental selenyumun titanyum plakalar üzerinde nano tepelikler oluşturacak şekilde kaplanmasını hedefleyen bir çalışmada, bu kaplamanın aynı aileden *S. epidermidis* bakterisi üzerinde anti-bakteriyel etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Ancak, ilginç olarak söz konusu bu çalışmada da, daha yüksek oranda selenyum içeren kaplamanın, düşük oranda selenyum içeren kaplamaya göre anti-bakteriyel etkisinin daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, kaplamalara ait göz önünde bulundurulması gereken diğer özellikleri akla getirmektedir. Bunlara örnek olarak, yüzey morfolojisi ve engebeliliği verilebilir. Daha yüksek oranda selenyum içeren S14'ün, S7'ye göre daha fazla bakteri tutulumuna sahip olmasının, artan kaplama engebeliliği ile hücre tutulumunun artmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

5. SONUÇ

Bu projede, hidroksiapatiti yapısına potansiyel bir anti-kanser ve anti-bakteriyel ajan olan selenyum ekleyerek fonksiyonelleştirmek ve ortopedik alanda sıklıkla kullanılan bir titanyum alaşımı olan Ti6Al4V yüzeyine kaplamak amaçlanmıştır. Bu çalışma, hidroksiapatitin yapısına biyomimetik yöntem ile selenyum eklenmesi açısından literatürde bir ilktir.

Selenat eklenen ve normal kompozisyonda hazırlanan 1.5×SBF'de Ti6Al4V plakaların bekletilmesi ile elde edilen kaplamaların SEM görüntülerinden, çözelti içerisinde geçen 4. günde yer yer apatit çekirdeklenmesinin başlamış olduğu görülmüştür. Plakaların, çözeltide bekleme süresi arttıkça çekirdeklerin üzerine apatit çökmesinin devam etmiş ve sonuçta küçük yarım kürecikler halinde apatit yığınları oluşmuştur. Apatit yığılması arttıkça, selenat eklenen 1.5×SBF'den elde edilen kaplamaların, normal kompozisyondaki 1.5×SBF'den elde edilen kaplamalara göre daha tekdüze ve düzgün formda tepecikler oluşturduğu söylenebilir. EDS analizlerinden, her iki kaplama türü için de Ca/P molar oranının çözeltide bekleme süresi ile arttığı görülmektedir.

Yapılan XRD analizleri sonucunda, kaplamalara ait XRD paternleri ICDD kart no 1-1008 standart hidroksiapatit ile karşılaştırılmış; selenyum içeren kaplamaların, normal kompozisyondaki 1.5×SBF'den elde edilen kaplamalarda olduğu gibi, standart hidroksiapatit XRD pikleri verdiği saptanmıştır. Her iki çeşit kaplama da sinterlenme işlemine tabi tutulmamış dolayısı ile hayli amorf yapıdadır.

FTIR spektrumlarında, kaplamaya selenyum eklenmesi açısından önemli bir farka rastlanmamış, her iki tür kaplamanın da hidroksiapatite ait tipik FTIR spektrumuna sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, XRD sonuçları ile birlikte düşünüldüğünde kaplamaların yalnızca hidroksiapatit fazı içerdiği söylenebilir. Diğer yandan, FTIR analizini tamamlayıcı bir metot sayılabilecek olan Raman spektrometresi ile yapılan çalışmalar sonucunda, yapısına selenyum eklenen kaplamada ekstra zayıf bir bant görülmüştür. Selenat eklenmiş 1.5×SBF'de bekletilme süreleri 4 ile 21 gün arasında değişen kaplamaların tamamında ICP-MS yöntemiyle selenyum tespit edilmiştir. Ca/Se oranı 3500 ila 5000 arasında değişmektedir. Ayrıca, nano-çizik testi sonuçlarına göre, kaplamaların kritik yanıl kuvvetlerinin 60-80 mN arasında farklı değerler aldığı görülmüştür.

Sağlıklı insan kemik hücreleri (osteoblast, hFOB 1.19) ve insan kanserli kemik hücreleri (osteosarkom, Saos-2) ile yapılan hücre canlılık testleri sonucunda, farklı selenyum derişimlerinde hazırlanan çözeltilerden; Çözelti D'nin (5×10^{-8} g Se/1.1ml hücre kültür ortamı)

optimum selenyum derişimini sağladığı gösterilmiştir. Ancak saf veya selenyum içeren kaplamalar üzerine doğrudan ekilen iki farklı hücre tipi için de canlılığın, hücre kültür plastiği üzerine ekilen kontrol grubundan düşük olduğu tespit edilmiştir.

İnsan florasının bir üyesi ancak implant çevresi enfeksiyonlarının temel etkenlerinden biri olan *S. epidermidis* bakterisi ile yapılan spektrofotometre ve SEM ile görüntüleme çalışmaları sonucunda, bu bakterinin üremesinin selenat eklenmiş 1.5×SBF'de 7. günde elde edilen kaplama üzerinde zamanla baskılanabildiği net olarak ortaya koyulmuştur. Ancak, selenat eklenmiş 1.5×SBF'de 14. günde elde edilen kaplama bakteri üremesi açısından bu denli etkili olamamıştır.

Bu çalışmada, hidroksiapatit yapısına giren selenyumun artırılabilirliğini test etmek amacıyla, selenat eklenmiş 1.5×SBF üretiminde kullanılan selenat iyonu derişimi 100 kat artırılarak 100×Se 1.5×SBF üretilmiştir. Ancak, yapılan birbirinden bağımsız deney tekrarlamalarında, Ti6Al4V plakaların bu çözeltide 14 gün boyunca bekletilmesine rağmen çekirdeklenmenin başlamadığı ve hiç apatit çökmesinin olmadığı görülmüştür.

Bu çalışma, yapay vücut sıvısı formülasyonuna farklı bir iyon ekleyerek, metalik bir implant yüzeyi üzerinde yapısına iyon eklenmiş hidroksiapatit çökmesinin sağlandığı ilk çalışmadır. İlerideki çalışmalarda, elde edilen kaplamaların, içerdeği selenyum oranları değiştirilerek sağlıklı insan kemik hücrelerinin çoğalmasında ve kanserli kemik hücrelerinin üremesinin engellenmesinde bir optimizasyon sürecine gidilebilir. Bu süreçte, kaplamalara selenyum eklenmesi ile kazandırılan anti-bakteriyel özellik de göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

- Ak Azem, F., Çakır, A. 2008. "316L Paslanmaz Çelik Altlıkların Üzerine Sol-Jel Tekniği İle Amonyak Takviyeli Çözelti Kullanarak Hidroksiapatit (HAp) Kaplanması", Türkiye Seramik Dergisi, 26, 136–143.
- American Cancer Society. "Cancer Facts & Figures 2013". <http://www.cancer.org/research/cancerfactsfigures/cancerfactsfigures/cancer-facts-figures-2013>. Son erişim tarihi: 21 Ocak 2014.
- An, Y., Draughn, R. 2000. Mechanical testing of bone and the bone-implant interface. Boca Raton: CRC Press.
- Atlas, R. M. 1993. Handbook of Microbiological Media (3rd Edition). Editor: Parks, L. C., ABD: CRC Press Inc. p:492.
- Bao, Q., Chen, C., Wang, D., Ji, Q., Lei, T. 2005. "Pulsed Laser Deposition and Its Current Research Status in Preparing Hydroxyapatite Thin Films", Applied Surface Science, 252, 5, 1538–1544.
- Başpınar, S. M., Küçük, M., Taktak, Ş., Ergün, Y., Demir, Y. 2009. "Titanyum İmplant Yüzeylerinin Kaplanması için Doğrudan Direnç Isıtma Cihaz Tasarımı ve İşlem Parametrelerinin İncelenmesi", 5. Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumu (IATS'09), Karabük, Türkiye.
- Besu, N. 2007. Silver Doped Hydroxyapatite Coating on Titanium Surfaces and Its Effect on Early Bone Response and Osseointegration, (M.Sc. Thesis), The University of Tennessee Health Science Center, ABD.
- Bigi, A., Boanini, E., Bracci, B., Facchini, A., Panzavolta, S., Segatti, F., Sturba, L. 2005. "Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium:a new fast biomimetic method", Biomaterials, 26, 4085–4089.
- Bigi, A., Boanini, E., Panzavolta, S., Roveri, N. 2000. "Biomimetic Growth of Hydroxyapatite on Gelatin Films Doped with Sodium Polyacrylate", Biomacromolecules, 1, 752–756.
- Cecen, E., Bolaman, Z. 2010. "İkincil Kanserler", Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi, 20, 3, 190-200.
- Chakraborty, J., Daneu, N., Recnik, A., Chakraborty, M., Dasgupta, S., Ghosh, J., Sengupta, S., Mazumdar, S., Sinha, M. K., Basu, D. 2011. "Stepwise Formation of Crystalline Apatite in the Biomimetic Coating of Surgical Grade SS 316L Substrate: A TEM Analysis", Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42, 4, 682–687.
- Chowdhry, M., Cockshott, S., Jeys, L. 2009. "Secondary Malignant Tumours of Bone", Surgery, 27, 2, 86–89.

- Combs, G.F. 2001. "Review Article: Selenium in Global Food System", *British Journal of Nutrition*, 85, 517–547.
- Conde, J. C., Paz, M. D., Serra, J., González P. 2013. "Numerical and Experimental Study of the Ti6Al4V Macrostructure Obtained by Nd:YAG Laser", *Applied Physics B*, DOI 10.1007/s00340-013-5584-1
- Cui, X., Kim, H. M., Kawashita, M., Wang, L., Xiong, T., Kokubo, T., Nakamura, T. 2010. "Apatite Formation on Anodized Ti6Al4V Alloy in Simulated Body Fluid", *Metals and Materials International*, 16, 3, 407–412.
- Frost, R. L., Weier, M. L., Reddy, B., Cejka, J. 2006. "A Raman Spectroscopic Study of the Uranyl Selenite Mineral Haynesite", *Journal of Raman Spectroscopy*, 37, 816–821.
- Graci, C., Maccauro, G., Muratori, F., Spinelli, M. S., Rosa, M. A., Fabbriani, C. 2010. "Infection Following Bone Tumor Resection and Reconstruction with Tumoral Prostheses: A Literature Review", *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 23, 4, 1005–1013.
- Gupta, R., Kumar, A. 2008. "Bioactive Materials for Biomedical Applications Using Sol–Gel Technology", *Biomedical Materials*, 3, 034005.
- Habibovic, P., Barre`re F., van Blitterswijk, C.A., de Groot, K., Layrolle, P. 2002. "Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants", *Journal of the American Ceramic Society*, 85, 3, 517–22.
- Hiraoka, K., Komiya, S., Hamada, T., Zenmyo, M., Inoue, A. 2001. "Osteosarcoma Cell Apoptosis Induced By Selenium", *Journal of Orthopedic Research*, 19, 809–814.
- Jiang, X-R., Macey M. G., Lin, H-X., Newland, A. C. 1992. "The Antileukaemic Effects and The Mechanism of Sodium Selenite", *Leukemia Research*, 16, 347–352.
- Jones, F.H. 2001. "Teeth and Bones: Applications of Surface Science to Dental Materials and Related Biomaterials" *Surface Science Reports*, 42, 3–5, 75–205.
- Kazancı, M., Fratzl, P., Klaushofer, K., Paschalis, E. P. 2006. "Complementary Information on In Vitro Conversion of Amorphous (Precursor) Calcium Phosphate to Hydroxyapatite from Raman Microspectroscopy and Wide-Angle X-Ray Scattering". *Calcified Tissue International*, 79, 5, 354–359.
- Keel, S. B., Jaffe, K. A., Nielsen, G. P., Rosenberg, A. E. 2001. "Orthopaedic Implant-Related Sarcoma: a Study of Twelve Cases", *Modern Pathology*, 14, 10, 969–977.
- Kim, H. M., Miyaji, F., Kokubo, T. 1997. "Effect of Heat Treatment on Apatite Forming Ability of Ti Metal Induced by Alkali Treatment", *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8, 341–347.

- Kim, H. M., Miyaji, F., Kokubo, T., Nakamura, T. 1996. "Preparation of Bioactive Ti and Its Alloy via Simple Chemical Surface Treatment", *Journal of Biomedical Materials Research*, 32, 409–417.
- Kirkpatrick, C. J., Alves, A., Köhler, H., Kriegsmann, J., Bittinger, F., Otto M., Williams, D. F., Eloy, R. 2000. "Biomaterial-Induced Sarcoma: A Novel Model to Study Preneoplastic Change", *American Journal of Pathology*, 156, 4, 1455–1467.
- Kokubo, T., Miyaji, F., Kim, H. M. 1996. "Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals", *Journal of American Ceramic Society*, 4, 1127–1129.
- Kokubo, T., Takadama, H. 2006. "How Useful is SBF in Predicting In Vivo Bone Bioactivity?", *Biomaterials*, 27, 15, 2907–2915.
- Lanfear, J., Fleming, J., Wu, L., Webster, G., Harrison, P. R. 1994. "The Selenium Metabolite-Selenodiglutathioie-Induces P53 and Apoptosis: Relevance to the Chemopreventive Effects of Selenium", *Carcinogenesis*, 15, 1387–1392.
- Lee, Y. J. 2010. "Spectroscopic Investigation of Arsenate and Selenate Incorporation into Hydroxylapatite", *Current Applied Physics*, 10, 158–163.
- Letavayova, L., Vlckova, V., Brozmanov, J. 2006. "Selenium: from Cancer Prevention to DNA Damage", *Toxicology*, 227, 1–14.
- Li, Y., Li, Q., Zhu, S., Luo, E., Li, J., Feng, G., Liao, Y., Hu, J. 2010. "The Effect of Strontium-Substituted Hydroxyapatite Coating on Implant Fixation in Ovariectomized Rats", *Biomaterials*, 31, 9006–9014.
- Life Technologies Corporation. 2014a. "Invitrogen Manuals, Propidium Iodide Nucleic Acid Stain", <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp01304.pdf> Son erişim tarihi: 21 Ocak 2014.
- Life Technologies Corporation. 2014b. "Invitrogen PrestoBlue Cell Viability Reagent Frequently Asked Questions", <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf> Son erişim tarihi: 21 Ocak 2014.
- Liu, X., Chu, P. K., Ding C. 2004. "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications", *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 47, 3–4, 49–121.
- McDowell, L. R. 2003. *Minerals in Animal and Human Nutrition (2nd Edition)*, Hollanda: Elsevier. p:404.
- Miao, S., Weng, W., Cheng, K., Du, P., Shen, G., Han, G., Zhang, S. 2005. "Sol–Gel Preparation of Zn-Doped Fluoridated Hydroxyapatite Films", *Surface & Coatings Technology*, 198, 223–226.

- Morejón-Alonso, L., Carrodegua, R. G., García-Menocal, J. A. D., Pérez, J. A. A., Manent, M. S. 2007. "Effect of Sterilization on the Properties of CDHA-OCP- β -TCP Biomaterial", *Materials Research*, 10, 15–20.
- Moriarty, T. F., Schlegel, U., Perren, S., Richards, R. G. 2010. "Infection in Fracture Fixation: Can We Influence Infection Rates Through Implant Design?", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 1031–1035.
- Mróz, W., Bombalska, A., Burdyńska, S., Jedyński, M., Prokopiuk, A., Budner, B., Ślósarczyk, A., Zima, A., Menaszek, E., Ścisłowska-Czarnecka, A., Niedzielski, K. 2010. "Structural Studies of Magnesium Doped Hydroxyapatite Coatings After Osteoblast Culture", *Journal of Molecular Structure*, 977, 145–152.
- Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. 2008. "Selenium in Food and the Human Body: A Review", *Science of the Total Environment*, 400, 115–141.
- Nouri, A., Hodgson, P. D., Wen, C. 2010. *Biomimetic Porous Titanium Scaffolds for Orthopedic and Dental Applications in Biomimetics Learning From Nature*, Editor: Mukherjee, A., Online: InTech. p:415–448.
- Oyane, A., Onuma, K., Ito, A., Kim, H. M., Kokubo, T., Nakamura, T. 2003. "Formation and Growth of Clusters in Conventional and New Kinds of Simulated Body Fluids", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 64, 2, 339–348.
- Park, S. S., Lee, H. J., Oh, I. H., Lee, B. T. 2005. "Effects of Ag-Doping on Microstructure and Mechanical Properties of Hydroxyapatite Films", *Key Engineering Materials*, 277-279, 113–118.
- Pasinli, A., Yüksel, M., Çelik, E., Şener, S., Taş, A. C. 2010. "A New Approach in Biomimetic Synthesis of Calcium Phosphate Coatings Using Lactic Acid–Na Lactate Buffered Body Fluid Solution", *Acta Biomaterialia*, 6, 2282–2288.
- Perla, V., Webster, T. J. 2005. "Better Osteoblast Adhesion on Nanoparticulate Selenium-A Promising Orthopedic Implant Material", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 75A, 356–364.
- Renaudin, G., Laquerrière, P., Filinchuk, Y., Jallot, E., Nedelec, J. M. 2008. "Structural Characterization of Sol–Gel Derived Sr-Substituted Calcium Phosphates with Anti-Osteoporotic and Anti-Inflammatory Properties", *Journal of Materials Chemistry*, 18, 3593–3600.
- Rodríguez-Valencia, C., Lopez-Alvarez, M., Cochon-Cores, B., Pereiro, I., Serra, J., Gonzalez, P. 2013. "Novel Selenium-Doped Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Applications", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A, 3, 853–861.

- Rupp, M. E., Fey, P. D. 2010. "Staphylococcus Epidermidis and Other Coagulase-Negative Staphylococci", Principles and Practice of Infectious Diseases (7th edition). Editor: Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. ABD: Churchill Livingstone Elsevier.
- Santos, C., Gomes, P. S., Duarte, J. A., Franke, R. P., Almeida, M. M., Costa, M. E. V., Fernandes M.H. 2012. "Relevance of the Sterilization-Induced Effects on the Properties of Different Hydroxyapatite Nanoparticles and Assessment of the Osteoblastic Cell Response", Journal of Royal Society Interface, 9, 77, 3397-3410.
- Silva, C. C., Pinheiro, A. G., Miranda, M. A. R., Góes, J. C., Sombra, A. S. B. 2003. "Structural Properties of Hydroxyapatite Obtained by Mechanochemical Synthesis", Solid State Sciences, 5, 553–558.
- Suchaneka, W. L., Shuk, P., Byrappa, K., Riman, R. E., TenHuisen, K. S., Janas, V. F. 2002. "Mechanochemical–Hydrothermal Synthesis of Carbonated Apatite Powders at Room Temperature", Biomaterials, 23, 699–710.
- Takadama, H., Hashimoto, M., Mizuno, M., Kokubo, T. 2004. "Round-Robin Test of SBF for In-Vitro Measurement of Apatite-Forming Ability of Synthetic Materials", Phosphorus Research Bulletin, 17, 119–125.
- Taş, A. C., 2000. "Synthesis of Biomimetic Ca-Hydroxyapatite Powders at 37°C in Synthetic Body Fluids", Biomaterials, 21, 14, 1429–1438.
- Tavares, D. S., Resende, C. X., Quitan, M. P., Granjeiro, J. M., Soares, G. A. 2010. "Influence of Strontium Doping on Cytocompatibility of Hydroxyapatite: Comparison of Three In Vitro Assays", The 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, Rio Grande Sul, Brazil.
- Teterycz, D., Ferry, T., Lew, D., Stern, R., Assal, M., Hoffmeyer, P., Bernard, L., Uçkay, I. 2010. "Outcome of Orthopedic Implant Infections due to Different Staphylococci", International Journal of Infectious Diseases, 14, 913–918.
- Tran, P. A., Webster, T. J. 2008. "Enhanced Osteoblast Adhesion on Nanostructured Selenium Compacts for Anti-Cancer Orthopedic Applications", International Journal of Nanomedicine, 3, 391–396.
- Tran, P. A., Sarin, L., Hurt, R. H., Webster, T. J. 2009. "Opportunities For Nanotechnology Enabled Bioactive Bone Implants", Journal of Materials Chemistry, 19, 2653–2659.
- Tran, P. A., Sarin, L., Hurt, R. H., Webster, T. J. 2010a. "Differential Effects of Nanoselenium Doping on Healthy and Cancerous Osteoblasts in Coculture on Titanium", International Journal of Nanomedicine, 5, 351–358.

- Tran, P. A., Sarin, L., Hurt, R. H., Webster, T. J. 2010b. "Titanium Surfaces with Adherent Selenium Nanoclusters as a Novel Anticancer Orthopedic Material", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93, 4, 1417–1428.
- Tran, P. A., Taylor, E., Sarin, L., Hurt, R. H., Webster, T. J. 2010c. "Novel Anti-Cancer, Anti-Bacterial Coatings for Biomaterial Applications: Selenium Nanoclusters", *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 1209, 1209-YY08-04.
- Visuri, T., Pulkkinen, P., Paavolainen, P. 2006. "Malignant Tumors at the Site of Total Hip Prosthesis, Analytic Review of 46 Cases", *Journal of Arthroplasty*, 21, 3, 311–323.
- Wang, D., Chen, C., He, T., Lei, T. 2008. "Hydroxyapatite Coating on Ti6Al4V Alloy by a Sol-Gel Method", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 2281–2286.
- Wei, M., Kim, H. M., Kokubo, T., Evans, J. H. 2002. "Optimising the Bioactivity of Alkaline-Treated Titanium Alloy", *Materials Science and Engineering:C*, 20, 125–134.
- Wijnja, H., Schulthess, C. P. 2000. "Vibrational Spectroscopy Study of Selenate and Sulfate Adsorption Mechanisms on Fe and Al (Hydr)Oxide Surfaces", *Journal of Colloidal Interface Sciences*, 229, 286–297.
- Wu, Z., Feng, B., Weng, J., Qu, S., Wang, J., Lu, X. 2008. "Biomimetic Apatite Coatings on Titanium Coprecipitated With Cephadrine and *Salviae Miltorrhizae*", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84B, 486–492.
- Xi, L., Yi, L., Jun, W., Huigang, L., Songsheng, Q. 2002. "Microcalorimetric Study of *Staphylococcus Aureus* Growth Affected by Selenium Compounds", *Thermochimica Acta*, 387, 1, 57–61.
- Yalnız, E., Çiftdemir, M., Memişoğlu, S. 2008. "Tümör Rezeksiyon Protezi Uygulanan Kemik Tümörlü Olgularda Fonksiyonel Sonuçlar", *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, 42, 4, 238–245.
- Yang, J., Huang, K., Qin, S., Wu, X., Zhao, Z., Chen, F. 2009. "Antibacterial Action of Selenium-Enriched Probiotics against Pathogenic *Escherichia Coli*", *Digestive Diseases and Sciences*, 54, 2, 246–254.
- Yang, L. 2010. *Calcium Phosphate Coatings For Bone Regeneration*, (PhD Thesis), University of Twente, Enschede, Hollanda.
- Yang, Y., Kim, K. H., Ong, J. L. 2005. "A Review on Calcium Phosphate Coating Produced Using a Sputtering Process-An Alternative to Plasma Spraying", *Biomaterials*, 26, 3, 327–337.
- You, C., Oh, S., Kim, S. 2001. "Influences of Heating Condition and Substrate-Surface Roughness on the Characteristics of Sol-Gel-Derived Hydroxyapatite Coatings", *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 21, 49–54.

- Zhao, C. Y., Fan, H. S., Zhang, X. D. 2011. "Advances In Biomimetic Apatite Coating On Metal Implants", *Advances In Biomimetics*, Editor: George, A., Online: InTech.
- Zhao, L., Chu, P.K., Zhang. Y., Wu. Z. 2009. "Antibacterial coatings on titanium implants", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91, 1, 470–480.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ZAFER EVİS
Proje No:	111M262
Proje Başlığı:	Selenyum Eklenmiş Hidroksiapatit İle Biyomimetik Metot Kullanılarak Kaplanan, Anti-Kanser Ve Anti-Bakteriyel Amaçlı Ti6Al4v Ortopedik İmplant Üretimi, Mekanik, Yapısal Ve Biyolojik Açılardan İncelenmesi
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	NEZAHAT GÜRLER
Danışmanlar:	SREEPARNA BANERJEE, AYŞEN TEZCANER
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. MÜHENDİSLİK BİLİMLERİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/12/2011 - 01/12/2013
Onaylanan Bütçe:	179665.0
Harcanan Bütçe:	147175.15
Öz:	<p>Sert dokuların işlevlerini yerine getirmek üzere vücuda yerleştirilen implantların çevresinde kanser oluşumu ve enfeksiyonun önlenmesi için implant yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada, selenyumun etkili bir antioksidan, potansiyel bir anti-kanser ve anti-bakteriyel ajan olma özelliklerini, hidroksiapatitin yüksek biyoyumluluk ve biyoaktivitesi ile birleştirmek amacıyla, biyomimetik yöntem ile yapısına selenyum eklenmiş hidroksiapatit Ti6Al4V plakalar üzerine kaplanmıştır.</p> <p>Bu projede, normal kompozisyondaki 1.5×SBF (1,5 kat yoğun yapay vücut sıvısı) ile, içerisine selenat (SeO₄-2) iyonu eklenmiş 1.5×SBF üretilmiş ve plakalar, bu çözeltilerde bekletilerek saf halde veya yapısına selenyum eklenmiş hidroksiapatitle kaplanmıştır. Elde edilen kaplamaların yüzey ve mikro yapıları SEM, EDS, XRD, ICP-MS, FTIR ve Raman spektroskopisi ile incelenmiştir. SEM görüntülerinden, her iki çözeltide kaplanan yüzeylerde 4. günde çekirdeklenmenin başlamış olduğu, çözeltide bekleme süresi arttıkça çekirdeklerin etrafında çökmenin devam ettiği ve oluşan kalsiyum fosfat yapının küçük yarım kürecikler halinde büyüdüğü görülmüştür. Selenyum içeren kaplamaların, normal kompozisyondaki 1.5×SBF'den elde edilen kaplamalarda olduğu gibi, standart hidroksiapatit XRD pikleri verdiği saptanmıştır. FTIR spektrumlarında önemli bir farka rastlanmamış, ancak Raman spektrumlarında, yapısına selenyum eklenen kaplamada ekstra zayıf bir bant görülmüştür. Ayrıca, selenat eklenmiş 1.5×SBF'de bekletilme süreleri 4 ile 21 gün arasında değişen kaplamaların tamamında ICP-MS yöntemiyle selenyum tespit edilmiştir. Çizik testi sonuçlarına göre, kaplamaların kritik yanıl kuvvetlerinin 60-80 mN arasında farklı değerler aldığı görülmüştür.</p> <p>Ayrıca, sağlıklı insan kemik hücreleri (hFOB 1.19) ve osteosarkom hücreleri (Saos-2) ile hücre canlılık testleri yapılmıştır. Saos-2 hücrelerinin çoğalması baskılanırken, hFOB 1.19 hücre canlılığında artış görülmesi açısından, 1ml hücre kültür ortamına 5×10⁻⁸g selenyum içeren 100µl çözelti eklemenin optimum selenyum derişimini sağladığı gösterilmiştir. Ancak saf veya selenyum içeren kaplamalar üzerine doğrudan ekilen iki farklı hücre tipi için de canlılığın, hücre kültür plastiği üzerine ekilen kontrol grubundan düşük olduğu tespit edilmiştir. Kaplamaların anti-bakteriyel özelliklerini araştırmak için S. epidermidis bakterisinin implant yüzeyi üzerindeki tutunma ve çoğalma davranışı tespit edilmiştir. Selenat eklenmiş 1.5×SBF'de 7. günde elde edilen kaplama üzerinde bakteri sayısının zamanla azaldığı gözlemlenmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Hidroksiapatit, Selenyum, Ti6Al4V, SBF, Biyomimetik Kaplama, Antikanser, Antibakteriyel
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır