T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL METALİK ALAŞIMLARIN GRAFEN TEMELLİ MALZEMELER İLE KAPLANARAK ÖZELLİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Aysel OKTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Ocak, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL METALİK ALAŞIMLARIN GRAFEN TEMELLİ MALZEMELER İLE KAPLANARAK ÖZELLİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Aysel OKTAY tarafından hazırlanan tez çalışması 20.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Esma ÖZEROL, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Burak DİKİCİ, Üye
Atatürk Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Biyomedikal Metalik Alaşımların Grafen Temelli Malzemeler ile Kaplanarak Özelliklerinin Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Aysel OKTAY

İmza

Bu çalışma, Tübitak 2210/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

Anneme ve eşime

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda engin bilgi ve tecrübelerini, zaman ve mekan gözetmeden her koşulda paylaşan, bana yol gösteren, hatalarımı gösterip daha iyi olmam için yönlendiren, destek veren, dinleyen, kendime güvenmediğim ve inanmadığım dönemlerde bile bana inanan ve güvenen, beni her zaman motive eden değerli danışman hocam Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ'a, sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hayatımın her alanında sevgilerini ve desteklerini hissettiğim, beni bugünlere getiren, hayatı öğreten, isteklerime ve hayallerime ulaşmaya çalışırken yanımda olan canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aysel OKTAY

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

TABLO LİSTESİ xi

ÖZET xii

ABSTRACT xiv

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti ... 1

1.2 Tezin Amacı ... 4

1.3 Hipotez ... 4

2 GENEL BİLGİLER 6

2.1 Biyomalzemeler ... 6

2.1.1 Metalik Biyomalzemeler ... 12

2.1.2 Titanyum ve Alaşımları ... 18

2.2 Kemiğin Yapısı ... 23

2.2.1 Kemik Hücreleri ... 26

2.3 Ortopedide İmplant Korozyonu ... 28

2.4 Ortopedide Kanser ve Enfeksiyon ... 30

2.5 Grafen Oksit ... 32

2.6 Serotonin ... 39

2.7 Elektroforetik Biriktirme (EPD) ... 42

2.7.1 EPD Parametreleri ... 44

2.8 Biyomimetik ve Yapay Vücut Sıvısı (SBF) ... 47

3 MATERYAL-METOT 50

3.1 Substrat Yüzeylerinin Hazırlanması ... 50

3.2 Modifiye Hummers Yöntemi ile Grafen Oksit Sentezi ... 50

3.3 Grafen Oksit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu ... 52

3.4 GO+Ser Süspansiyonunun Hazırlanması ... 52

3.5 Elektroforetik Biriktirme Yöntemiyle Substrat Yüzeylerinin Kaplanması 53

3.6 Elektrokimyasal Karakterizasyon (In Vitro Korozyon Testleri) ... 53

3.7 Islanabilirlik Testi (Temas Açısı Ölçümü) ... 55

3.8 Biyouyumluluk Değerlendirmesi 55
3.8.1 Hücre Canlılığı / Sitotoksisite Testi 56
3.8.2 Osteoblast Proliferasyon Hızının Belirlenmesi 56
4 BULGULAR VE TARTIŞMA **58**
4.1 Grafen Oksit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu 58
4.2 Elektrokimyasal Karakterizasyon..... 60
4.3 Islanabilirlik Analizi 63
4.4 In Vitro Sitotoksisite Analizi..... 64
4.5 Osteoblast Proliferasyon Hızı 66
5 SONUÇ VE ÖNERİLER **70**
KAYNAKÇA **72**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **88**

SİMGE LİSTESİ

^{o}C	Celcius, sıcaklık birimi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
g	Gram
g/cm^2	Gram/santimetre^2
g/cm^3	Gram/santimetre^3
GPa	Gigapaskal
K	Kelvin, sıcaklık birimi
L	Litre
M	Molar
MPa	Megapaskal
$MPa \cdot m^{1/2}$	Megapaskal·metre$^{1/2}$
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μm^2	Mikrometre^2
mg	Miligram
mg/kg	Miligram/kilogram
mEq/L	Miliekivalent/litre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
$mV \cdot s^{-1}$	Milivolt·saniye^{-1}
nm	Nanometre
cm	Santimetre
U/ml	Units per milliliter / mililitre başına birim
W/m·K	Watt/metre·Kelvin
V	Volt

KISALTMA LİSTESİ

5-HT	5-hidroksitriptamin
Al	Alüminyum
Al_2O_3	Alümina
BMP	Kemik Morfogenetik Proteini
BMU	Çok Hücreli Birim
Co	Kobalt
Cr	Krom
CV	Döngüsel Voltametri
EDS	Enerji Dağılımı Spektrometresi
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
EPD	Elektroforetik Biriktirme
Fe	Demir
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GO	Grafen Oksit
HA	Hidroksiapatit
LSV	Doğrusal Tarama Voltametrisi
MAP	Mikrotübül İlişkili Protein
Mg	Magnezyum
Mo	Molibden
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nb	Niyobyum
OCP	Açık Devre Potansiyeli
PE	Polietilen
PET	Polietilen Tereftalat
PLA	Polilaktik Asit
PLD	Darbeli Lazer Biriktirme
PMMA	Polimetil Metakrilat
PTFE	Politetrafloroetilen
PU	Poliüretan
PVC	Polivinil Klorür
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme
rGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
SBF	Yapay Vücut Sıvısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Ser	Serotonin
Ta	Tantal
Ti	Titanyum
TiO_2	Titanyum Dioksit
TKR	Total Kalça Replasmanı
TNTZ	Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr
XRD	X-Işını Difraktometresi
V	Vanadyum
Zr	Zirkonyum
ZrO_2	Zirkonya

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Malzeme türleri [39] 8
Şekil 2.2 Ortopedik cerrahi ve diş hekimliği için in vivo olarak kullanılan kemikle ilgili çeşitli implantlar [49] 13
Şekil 2.3 İnsan vücuduna implante edilen metalik malzemelerin biyolojik ortamı [53] 16
Şekil 2.4 İmplant başarısızlığının ana nedenleri [59] 17
Şekil 2.5 Kemiğin hiyerarşik yapısı [79] 24
Şekil 2.6 Kemiğin mikroskobik yapısı [79] 25
Şekil 2.7 İmplantlarda meydana gelen korozyon mekanizmaları [108] 30
Şekil 2.8 Grafen ailesi nanomalzemelerinin kimyasal yapısı [120] 33
Şekil 2.9 Üç farklı GO antibakteriyel etki mekanizmasının şematik gösterimi [25] 35
Şekil 2.10 Grafit levhalarından grafen oksit sentezi [145] 39
Şekil 2.11 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörlerinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri [149] 41
Şekil 2.12 Süspansiyonda pozitif yüklü partiküllerin negatif elektroda hareket ettiğini gösteren elektroforetik biriktirme (EPD) hücresi [162] 43
Şekil 2.13 Yüzey yükü negatif olan bir partikülün zeta potansiyeli [166] 45
Şekil 3.1 Sentezlenen grafen oksit nanopartikülleri 51
Şekil 3.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (Perkin Elmer Spectrum 400, ATR) 52
Şekil 3.3 Üç elektrotlu hücre ve potansiyostat test cihazı 55
Şekil 4.1 GO'nun XRD modeli 58
Şekil 4.2 GO'nun FTIR spektrumu 59
Şekil 4.3 GO'nun Raman spektrumu 60
Şekil 4.4 GO'nun TEM görüntüsü 60
Şekil 4.5 Hank çözeltisinde kaplanmış ve kaplanmamış TNTZ numunelerinin potansiyodinamik tarama (PDS) eğrileri 61
Şekil 4.6 Hank çözeltisinde kaplanmış ve kaplanmamış Ti6Al7Nb numunelerinin potansiyodinamik tarama (PDS) eğrileri 62
Şekil 4.7 WST-8 sitotoksisite test sonuçları 65
Şekil 4.8 Numunelerin üzerinde büyüyen hFOB 1.19 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri; GO kaplamalı Ti6Al7Nb (a), GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb (b) ve kontrol (c) 66
Şekil 4.9 Kolorimetrik WST-8 testi ile GO kaplamalı Ti6Al7Nb, GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb ve kontrol numunelerinde osteoblast proliferasyon hızının kantitatif değerlendirilmesi 67
Şekil 4.10 1 ve 3 günlük inkübasyondan sonra numunelerin üzerinde büyüyen hFOB 1.19 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri; GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb 1. gün (a), kontrol 1. gün (b), GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb 3. gün (c) ve kontrol 3. gün (d) 68
Şekil 4.11 GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb numunesi üzerinde büyüyen hFOB 1.19 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü 69

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Çevre dokularla reaksiyonlarına göre biyomalzemeler [38] 7
Tablo 2.2 Metaller, polimerler ve seramiklerin tıptaki uygulamaları [43].....9
Tablo 2.3 Yaygın metalik implant malzemeleri ve karakteristikleri [50] 14
Tablo 2.4 Titanyumun fiziksel özellikleri [62] 18
Tablo 2.5 Ti6Al7Nb'nin özellikleri [66] 20
Tablo 3.1 TNTZ'nin kimyasal bileşimi (% ağırlık).....50
Tablo 3.2 1 L SBF hazırlamak için reaktif miktarları (F2129, 2017) 53
Tablo 4.1 PDS eğrilerinden hesaplanan korozyon parametreleri.....63
Tablo 4.2 Temas açısı ölçüm sonuçları.....64
Tablo 4.3 WST-8 sitotoksisite test sonuçları.....64
Tablo 4.4 Hücrelerin doubling time değerleri 67

ÖZET

Biyomedikal Metalik Alaşımların Grafen Temelli Malzemeler ile Kaplanarak Özelliklerinin Geliştirilmesi

Aysel OKTAY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Ti6Al7Nb ve Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ) gibi titanyum alaşımları, mekanik özellikleri ve biyouyumlulukları sebebiyle ortopedik implantlar gibi birçok biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmakta ve yüzeylerinde titanyum dioksit (TiO_2) olarak bilinen kararlı bir oksit filmin varlığına bağlı olarak korozyona dirençli malzemeler olarak bilinmektedir. Ancak bu implantlar, vücut sıvısı ile temasa bağlı olarak zamanla korozyona duyarlı olabilmektedir. İmplantların korozyona uğraması, içeriğindeki toksik elementlerin salınımına sebep olup malzemenin biyouyumluluğunu olumsuz yönde etkilemektedir. Vücut içerisine salınan toksik iyonlar çevre dokuda renk değişikliğine ve implantın gevşemesiyle sonuçlanabilecek inflamatuar bir tepkiye neden olabilmektedir. Bu durum implantın ve hastanın ömrünü kısaltabilir, masraflı ve ağrılı revizyon cerrahisi ile sonuçlanabilir. Bu nedenle implantasyon sonrası korozyona bağlı iyon salınımının önlenmesi ve osteoblast proliferasyonunu arttırarak implantın kemiğe entegrasyonunun desteklenmesi hasta sağlığı ve implantın ömrü açısından büyük önem arz etmektedir. Etkili yöntemlerden birisi, yüzeyi daha kararlı ve osteoblast proliferasyonunu destekleyici malzeme/malzemeler ile kaplamaktır. Bu çalışmada

kaplama malzemeleri olarak modifiye Hummers yöntemiyle sentezlenen grafen oksit (GO) ve serotonin (Ser) kullanılmıştır. Grafen oksit (GO) elektriksel yalıtkanlık, antimikrobiyal özellikleri ve iyi biyouyumluluğu nedeniyle implant yüzeylerini kaplamak için ideal malzemelerden biridir. Serotoninin osteoblast proliferasyonunda ve farklılaşmasında rol oynadığına dair çalışmalar mevcuttur. İstenen kalınlıkta ve yüksek saflıkta bir kaplama sağlamak için elektroforetik biriktirme (EPD) yöntemi kullanılmıştır. Kaplamaların yapay vücut sıvısında (SBF) elektrokimyasal performansını araştırmak için in vitro korozyon testleri gerçekleştirilmiştir. Kaplamaların ıslatma özelliklerini değerlendirmek için statik temas açısı ölçümleri uygulanmıştır. Kaplanmış alaşımların in vitro sitotoksisitesi ve osteoblast proliferasyon hızına etkisi hFOB 1.19 osteoblast hücre hattının WST-8 testi ile kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak GO ve GO+Ser kaplamalar kaplanmamış TNTZ'nin korozyon direncinde olumsuz etkiye sebep olurken, aynı kaplamalar kaplanmamış Ti6Al7Nb'nin korozyon direncinde kayda değer bir artış göstermiştir. Alaşım yüzeylerinin GO ve Ser ile kaplanması malzemenin temas açısını düşürerek yüzeyi protein adsorpsiyonuna ve hücre tutunmasına daha elverişli hale getirmiştir. GO+Ser kaplamanın Ti6Al7Nb'nin yüzeyine osteoblast tutunmasını, hücre canlılığını ve proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Grafen oksit, serotonin, elektroforetik biriktirme, korozyon, sitotoksisite.

ABSTRACT

Improving Properties of Biomedical Metallic Alloys by Coating with Graphene-Based Materials

Aysel OKTAY

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Titanium alloys such as Ti6Al7Nb and Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ) are widely used in many biomedical fields such as orthopedic implants due to their mechanical properties and biocompatibility, and known as corrosion-resistant materials due to the presence of a stable oxide film, also called as titanium dioxide (TiO_2), on their surfaces. However, these implants may be susceptible to corrosion over time due to contact with body fluid. Corrosion of the implants causes release of toxic elements in their content content and negatively affects biocompatibility of the material. Toxic ions released into the body can cause discoloration in surrounding tissue and an inflammatory response that may result in loosening of the implant. This can shorten life of the implant and the patient, resulting in costly and painful revision surgery. Therefore, preventing corrosion-related ion release after implantation and supporting integration of the implant to the bone by increasing osteoblast proliferation are of great importance in terms of patient health and life of the implant. One of the effective methods is to cover the surface with a material/materials that are more stable and support osteoblast proliferation. In this study, graphene oxide (GO), which were synthesized by

modified Hummers method, and serotonin (Ser) were used as coating materials. Graphene oxide is one of superior materials for coating implant surfaces due to its electrical resistance by making the material surface an insulator, good biocompatibility and antimicrobial properties. There are studies showing that serotonin plays a role in osteoblast proliferation and differentiation. Electrophoretic deposition (EPD) method was used to obtain a coating of desired thickness and high purity. In vitro corrosion tests were carried out to investigate electrochemical performance of the coatings in a simulated body fluid (SBF). Static contact angle measurements were applied to evaluate wetting characteristic of the materials. In vitro cytotoxicity of and effect of the coatings on osteoblast proliferation rate were investigated qualitatively and quantitatively with WST-8 test of hFOB 1.19 osteoblast cell line. As a result, GO and GO+Ser coatings caused a negative effect on the corrosion resistance of uncoated TNTZ, while the same coatings showed a significant increase in the corrosion resistance of uncoated Ti6Al7Nb. The coating of the alloy surfaces with GO and Ser reduced the contact angle of the material, making the surface more suitable for protein adsorption and cell adhesion. It was observed that GO+Ser coating increased osteoblast adhesion, cell viability and proliferation on the surface of Ti6Al7Nb.

Keywords: Graphene oxide, serotonin, electrophoretic deposition, corrosion, cytotoxicity.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Ti6Al7Nb ve Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ) gibi titanyum alaşımları, mekanik özellikleri ve biyouyumlulukları sebebiyle ortopedik implantlar gibi birçok biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Cerrahi ve diş hekimliği alanında Ti-6Al-4V alaşımına alternatif olarak geliştirilen Ti6Al7Nb alaşımı, vanadyum (V) içermeyen bileşimi sayesinde vanadyum iyonlarının canlı dokularla olası sitotoksisitesini ve ters reaksiyon riskini ortadan kaldırır [1]. Bu alaşım, dokuda daha az biyolojik olumsuz etkiye neden olan niyobyum oksit sayesinde mükemmel mekanik parametrelere, iyi antikorozif özelliklere ve zayıf çözünürlüğe sahiptir [2]. Daha önceki çalışmalarda, anodize edilmiş Ti6Al7Nb alaşımının, insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin hücre adezyonunu, büyümesini ve farklılaşmasını geliştirdiği gösterilmiştir [3, 4].

Yeni bir β tipi titanyum alaşımı olan TNTZ alaşımı niyobyum (Nb), tantal (Ta) ve zirkonyum (Zr) gibi toksik ve alerjik olmayan içeriği nedeniyle popüler bir biyouyumlu metalik malzeme olmaya başlamıştır. Bu alaşım, mükemmel mekanik özellikler ve geliştirilmiş korozyon direnci gösterir. Düşük Young modülüne sahiptir [5, 6]. TNTZ alaşımının düşük sertliği, kemiğin yeniden şekillenmesini ve kırık kemik onarımını sağlar [7]. Ancak, TNTZ alaşımı üzerinde hücre büyümesi ile ilgili yeterli çalışma mevcut değildir.

Titanyum alaşımlarının, yüzeylerinde oluşan titanyum dioksit (TiO_2) olarak da bilinen kararlı bir oksit tabakasının varlığı nedeniyle korozyona karşı dirençli oldukları bilinmektedir. Bu termodinamik olarak kararlı oksit film, fizyolojik ortamlarda alt tabaka malzemesinin korozyonunu önleyerek, iyi bir korozyon direnci ve mükemmel biyouyumluluk sağlar [8]. Bununla birlikte, bu implantlar, implantasyondan önce uygulanan son yüzey işlemine [9], kan gibi vücut sıvısı ve vücut dokuları ile temasa [10] ve in vivo'da maruz kalma potansiyeline [11] bağlı olarak zamanla korozyona duyarlı olabilir. Bu oksit film, alt tabakanın korozyon

direncini arttırsa da yüzeyin homojen olmaması nedeniyle çukur korozyonu ve çatlak korozyonu gibi lokal korozyon türleri meydana gelir [12].

Metalik implantların korozyonu, içeriğindeki toksik elementlerin salınmasına neden olur ve malzemenin biyouyumluluğunu olumsuz etkiler [13]. Vücuda salınan toksik iyonlar, çevre dokuda inflamatuar bir yanıta neden olarak implantın renginin değişmesine ve gevşemesine neden olabilir. Bu nedenle metalik implantlarda korozyon direncinin artırılması ve toksik iyonların salınımının engellenmesi hasta sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır [14].

Malzemelerin korozyon direncini artırmak için kullanılan etkili yöntemlerden biri, yüzeyi daha stabil başka bir malzeme ile kaplamaktır. Grafen oksit (GO) elektrik direnci, iyi biyouyumluluk ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle biyomedikal implant yüzeylerini kaplamak için kullanılabilecek ideal malzemelerden biridir. GO, grafen tabakasında oksijen fonksiyonel grupların varlığında grafenin bir türevidir. Bazı çalışmalar GO'nun *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* gibi bakteriler ve konidial mantarlara karşı önemli antimikrobiyal etkileri olduğunu göstermiştir [15]. Birkaç çalışma, GO'nun Ti bazlı alaşım yüzeylerinde kaplama malzemesi olarak kullanıldığında gelişmiş korozyon direnci ve biyouyumluluk sağladığını ortaya koymuştur [16, 17]. Ti yüzeyindeki GO kaplamanın, kemik hücrelerinin büyümesini destekleyerek osteoblast hücre farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir [18]. Başka bir çalışmada, GO'nun yetişkin kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını desteklediği, protein adsorpsiyonunu arttırdığı, hücre adezyon substratı ve kondrojenik indükleyici-taşıyıcı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [19]. Grafen oksit sentezinde birçok farklı yöntem olmasına rağmen, yüksek miktarlarda hızlı üretimi nedeniyle kimyasal oksidasyon yöntemi endüstriyel ölçekte en çok tercih edilen yöntemlerden biridir [20]. Kimyasal oksidasyon yöntemleri arasında en bilineni modifiye Hummers yöntemidir. Bilinen diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, modifiye Hummers yöntemi, işlem adımları açısından daha basit ve düşük maliyetlidir ve büyük boyutlu grafen levhalar üretme avantajına sahiptir [21, 22].

İmplantasyon sonrası hastanın yaşam kalitesini etkileyen olası komplikasyonlardan biri de implanta bağlı nozokomiyal enfeksiyondur. Ortopedik

implantasyondan sonra malzeme yüzeyinde biyofilm oluşturan ve nozokomiyal enfeksiyona yol açan en yaygın patojenler *Staphylococcus aureus*, Gram pozitif, hareketsiz ve spor oluşturmayan bakterilerdir [23]. Bu tür mikroorganizmalar, ortopedik protezler, kalp kapakçıkları, üriner ve venöz kateterler gibi birçok tıbbi implant cihazına yapışarak implatın değişimiyle sonuçlanabilen enfeksiyonun gelişmesinde rol oynar. Bakteriyel adezyonu önlemek ve ortopedik implantın kemiğe entegrasyonunu desteklemek için farklı tipte malzemeler ve yüzey kaplamaları tercih edilmektedir [24]. İmplant yüzeylerinin antibakteriyel malzemelerle kaplanması, enfeksiyonu önemli ölçüde önlemede tercih edilen etkili yöntemlerden biridir. Grafen oksidin implant yüzeyinde nozokomiyal enfeksiyona sebep olan patojenlere karşı antibakteriyel özellik gösterdiğine, bu patojenlerin yüzeye yapışmasını önlediğine ve sonuç olarak implant yüzeyinde bakteriyel biyofilm oluşumunu engellediğine dair çalışmalar mevcuttur [25, 26].

Yaygın olarak bilinen kimyasallardan biri olan serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), davranışsal ve nöropsikolojik süreçleri modüle eden bir beyin nörotransmiteri olarak bilinir [27, 28, 29, 30]. Endotel hücreler, mast hücreleri, akciğer, karaciğer ve nöronlar gibi birçok farklı hücre tipinde, hücre proliferasyonu, migrasyon ve olgunlaşma aşamaları serotonin tarafından düzenlenen bir mekanizma ile gerçekleşir [28]. Yetişkin dentat girusta yapılan bir çalışma, hücre proliferasyonunun östrojen uyarımına serotoninin aracılık ettiğini göstermektedir. Serotonin ve östrojen, öğrenme ve hafıza mekanizmalarını etkiler ve bu iki mekanizma arasındaki etkileşimler, duygudurum ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynama potansiyeline sahiptir [31]. Çalışmalar, serotonin ve reseptörlerinin (özellikle 5-HT_{2B}) osteoblast alımı ve proliferasyonu yoluyla kemik metabolizması ve mekanoregülasyonunda önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur [27]. Osteoblast öncü hücrelerinin proliferasyonunun serotonin tarafından uyarılması ve desteklenmesi, kemiğin yeniden şekillenmesinde ve kırık kemik onarımında serotoninin kullanımına olanak sağlayabilir [27, 29].

Elektroforetik biriktirme (EPD), diğer imalat yöntemlerine göre avantajları nedeniyle son birkaç yıldır yeni endüstriyel uygulamalarda sıklıkla tercih edilen kaplama yöntemlerinden biridir. İstenen kalınlıkta ve yüksek saflıkta gözeneksiz, kontrol edilebilir kaplama sağlaması ve basit, düşük maliyetli, düşük riskli ve çevre

dostu olması EPD'yi diğer yöntemlere göre daha avantajlı kılmaktadır [15, 32]. EPD, sıvı bir ortamda asılı duran elektrostatik yüklü partiküllerin bir elektrik alanın etkisi altında zıt yüklü bir elektrota hareket etmesiyle, elektrot üzerinde partiküllerin birikmesine dayalı bir kaplama işlemidir [33]. Bu yöntemin hidrofobik bir kaplama sağlayarak metalleri oksidasyon ve korozyondan koruduğu ve nano yapılı kaplamaların üretimine olanak sağladığı bulunmuştur [34].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, ortopedik implant malzemesi olarak kullanılan Ti6Al7Nb ve TNTZ gibi titanyum esaslı alaşımların korozyonu sonucunda meydana gelen metal iyon salınımının azaltılması, implant yüzeyine osteoblast tutunmasının ve proliferasyonunun arttırılması için EPD yöntemi ile grafen oksit ve serotoninin metal yüzeyine kaplanması ve bu kaplamaların malzemenin fizyolojik ortamdaki korozyon özellikleri, ıslanabilirliği, hücre canlılığı ve osteoblast proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesidir. Bu çalışma ile daha etkin, gözeneksiz, hızlı, düşük maliyetli ve kontrollü bir kaplama avantajı sunan EPD yöntemi kullanılarak grafen oksit ve serotonin ile kaplanmış korozyona dirençli, osteoblast tutunmasını ve proliferasyonunu destekleyici biyomedikal alaşımların elde edilmesi amaçlanmıştır.

Mevcut veritabanlarından gerçekleştirilen literatür araştırmaları sonucunda GO ve serotoninin Ti6Al7Nb ve TNTZ alaşımları üzerine EPD yöntemi ile kaplanıp korozyon direnci, ıslanabilirlik, sitotoksisite ve osteoblast proliferasyonunun incelendiği bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle, bu çalışma ortopedik uygulamalarda ve kemik doku mühendisliğinde yeni yaklaşımlar ve değerler içermektedir.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında, ortopedik cerrahi uygulamalarda kullanılan titanyum alaşımlı implantların grafen oksit ve serotonin ile kaplanarak hasta sağlığı açısından problem teşkil eden implant korozyonu ve buna bağlı toksik iyon salınımının önlenmesi ve osteoblast üretiminin arttırılmasıyla implantın ömrünün uzatılması hedeflenmektedir. Ti6Al7Nb ve TNTZ gibi titanyum bazlı alaşımlar her ne kadar korozyona dirençli malzemeler olarak bilinse de, implante edildiklerinde

iyon bakımından zengin olan vücut sıvısı içerisinde zamanla korozyona uğramaları kaçınılmazdır. Çalışmada kaplama malzemelerinden biri olarak kullanılacak olan grafen oksidin malzeme yüzeyinde korozyon direnci oluşturduğuna, altlık malzemenin biyoyuyumluluğunu arttırdığına ve yüzeyde antibakteriyel özellikler gösterdiğine dair birçok çalışma mevcuttur. Bir diğer kaplama malzemesi serotoninin osteoblast tutunması, proliferasyonu, migrasyonu ve olgunlaşma aşamalarında rol oynadığı incelenen çalışmalar ile birlikte bilinmektedir. Bu malzemelerin titanyum alaşımlarının yüzeylerine kaplanması için istenen kalınlıkta ve yüksek saflıkta gözeneksiz, kontrol edilebilir kaplama sağlaması ve basit, düşük maliyetli, düşük riskli ve çevre dostu olması gibi avantajlarından ötürü EPD yöntemi tercih edilecektir. Önceki çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda bu çalışmanın ortopedik uygulamalarda ve özellikle kemik doku mühendisliğinde yeni yaklaşımlar ve değerler içereceği düşünülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Biyomalzemeler

Biyomalzeme mühendisliği, sonuçları insan sağlığını önemli ölçüde etkileyen, aynı zamanda ekonomi ve diğer bilimsel alanlar ile de etkileşimi olan disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Protez uzuvlar gibi biyomalzemelerin kullanımı eski zamanlara kadar uzanmaktadır; ancak son yüzyılda bilimsel buluşların sayısında hızlanan artışlar yaşanmıştır. İlk nesil biyomalzemeler inert olup yabancı cisim tepkisini minimum düzeye indirgemek için tasarlanmışlardır. Günümüzde ise hastanın kendi dokusunu yenilemeyi teşvik edebilen biyomalzemeler üretilebilmektedir. Medikal alanda polimerler, metaller, seramikler ve kompozitler olmak üzere birçok çeşitli malzeme kullanılabilmektedir.

İlk yapılan biyomalzeme tanımı şu şekildedir: “Biyomalzeme, biyolojik sistemlerle etkileşime girmesi amaçlanan, tıbbi bir cihazda kullanılan cansız bir malzemedir.” [35]. Gelişen biyomalzeme uygulamalarıyla birlikte bu tanım birçok kez revize edilmiş olup şu şekilde yenilenmiştir: "Biyomalzeme, tek başına veya karmaşık bir sistemin parçası olarak, insan veya veteriner tıbbında canlı sistemlerin bileşenleri ile etkileşimleri kontrol ederek herhangi bir teşhis veya terapötik prosedürünü yönlendirmek için kullanılan ve bir form almak üzere tasarlanmış bir maddedir” [36]. Biyomalzeme tanımının kapsamı değişiklik gösterebilir.

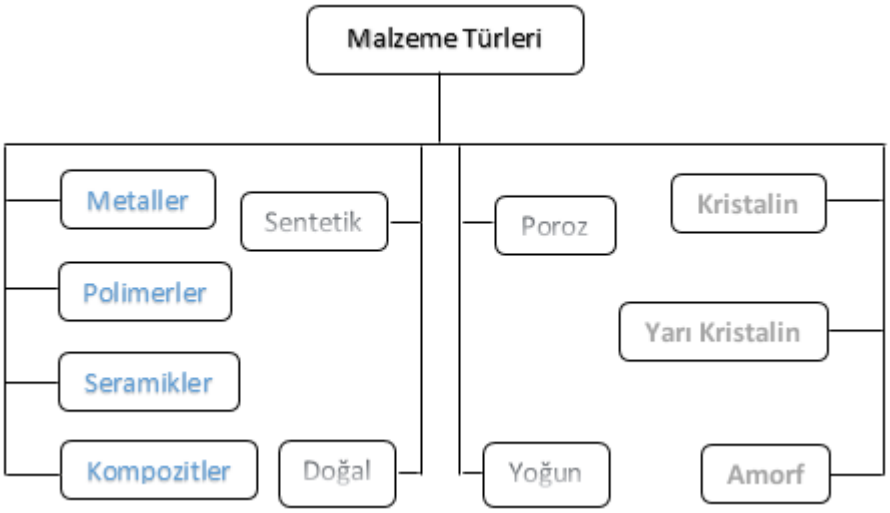
Bir malzemenin biyomalzeme olarak nitelendirilebilmesi için istenilen en önemli özelliklerden birisi biyouyumluluktur. Biyouyumluluk terimi, bir malzemenin spesifik bir uygulamada uygun konak cevabı oluşturma yeteneği olarak tanımlanır [37]. Uygun konak cevap trombojenez, mutajenez ve karsinojenez gibi komplikasyonlar olmaksızın normal bir iyileşme süreci anlamına gelmektedir. Organizmaya implante edilen bir malzeme farklı şekillerde ve derecelerde bir doku reaksiyonu oluşturur. Malzeme ve bu malzemeyle temas halinde olan doku arasında üç farklı reaksiyon gerçekleşebilir: biyoinertlik, biyoaktivite ve

biyobozunurluk (Tablo 2.1). Malzemenin implante edildiği doku ve çevresinde sitotoksisiteye sebep olması başka bir olası reaksiyondur. Malzemenin doku ve organizma tarafından reddine neden olduğundan sitotoksisite biyomalzemelerde kabul edilemez bir özelliktir.

Tablo 2.1 Çevre dokularla reaksiyonlarına göre biyomalzemeler [38]

Biomalzeme türü	Organizmanın reaksiyonu	Malzeme
Biyoinert (çeşitli derecelerde)	Malzemenin dokuyu değiştirmeden doku ile bir arada bulunması, çeşitli kalınlıklarda fibröz doku oluşumu	Tantal, titanyum, alüminyum ve zirkonyum oksitler
Biyoaktif	Malzemenin yüzeyi ile doğrudan biyokimyasal bağların oluşumu	Yüksek yoğunluklu hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat, bazı biyocamlar
Biyobozunur	Malzemenin organizmanın biyosistemi tarafından kademeli olarak bozunması, toksisite ve red olmaksızın zamanla doku ile yer değiştirme	Trikalsiyum fosfat, gözenekli hidroksiapatit, kalsiyum fosfat tuzları, bazı biyocamlar, poliüretan

Genel olarak biyomalzemeler, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi mikro ve makro yapılarına, atomik bağlarına ve kökenlerine göre sınıflandırılabilir. En yaygın biyomalzeme sınıflandırması metaller, seramikler ve polimerler şeklindedir. İki veya daha fazla biyomalzeme bir araya geldiğinde kompozit malzeme elde edilir.



Şekil 2.1 Malzeme türleri [39]

Her üç tür malzeme, bunların kompozitleri ve kaplamaları biyomalzeme alanında kullanım alanı bulmaktadır. Yaygın biyomalzeme türlerinin uygulamaları Tablo 2.2'de listelenmiştir. Bu malzemelerin uygulama alanları yapısal özellikleri tarafından belirlenmektedir. Örneğin hem diş hem de kemik implantlarında metaller ve alaşımlar tercih edilirken, iyi osteoiletkenliğe sahip seramikler kemik doku mühendisliği için daha uygundur.

Genel olarak metaller biyolojik olarak parçalanamaz (Magnezyum, Mg hariç). Seramiklerin de kırılganlıkları nedeniyle yüksek gözenekli yapılara işlenmesi zordur. Bu nedenle polimerler, doku mühendisliği alanında yapı iskelesi olarak kullanım için uygun malzemelerdir [40].

Tıptaki en çeşitli malzeme sınıfı polimerlerdir. Kimyalarının değiştirilebilirliği sayesinde polimerler, fiziksel ve mekanik özelliklerde büyük çeşitlilik sunar. Çok çeşitli polimerler arasından uygun olanı polimerin mekanik mukavemeti, bozunurluğu, şeffaflığı ve geçirgenliği gibi istenilen özellikler baz alınarak seçilebilir. Polimerleri çekici biyomalzemeler yapan asıl özellik onların bozunabilirliğidir; yani çıkarılmaları veya cerrahi revizyon olmaksızın parçalanıp atılabilmeleri veya rezorbe olabilmeleri anlamına gelir [41]. Biyomalzemeler olarak kullanılan bazı doğal polimer örnekleri şunlardır: (1) emilebilir sütürler, sünger yara pansumanları, ilaç salınım mikroküre lerinde kollajen , (2) kontrollü dağıtım sistemlerinde kitosan ve türevleri, (3) oligomerik ilaç taşıyıcılarında

poli(α,L-lisin), poli (α,L-glutamik asit), poli(aspartik asit) gibi poli(amino asitler) ve (4) lubrikantlarda hyaluronik asit.

Tablo 2.2'de listelenen biyomalzemeler ve tıptaki uygulamalarına ek olarak sentetik polimerik biyomalzemelerden bazıları şunlardır: (1) poli(laktik asit), poli(glikolik asit) ve ilaç salınım sistemlerinde ve doku mühendisliğinde bunların kopolimerleri, (2) ilaç salınım sistemleri ve hücre mikroenkapsülasyonu için bir matriks olarak kullanılan poli(hidroksi bütrat), poli(ε- kaprolakton) ve kopolimerleri, poli(alkilen süksinatlar), (3) cerrahi yapıştırıcılarda poli(siyano akrilatlar), (4) film ve hidrojel olarak polifosfazenler ve (5) çeşitli biyomedikal uygulamalarda poli(etilen oksit) [42]. Polimerler bunlarla sınırlı olmayıp özel kullanımlar için farklı çeşitte ve özellikte polimerler sentezlenebilir.

Tablo 2.2 Metaller, polimerler ve seramiklerin tıptaki uygulamaları [43]

Uygulama	Biyomalzeme
İskelet sistemi	
Eklem replasmanları (kalça, diz, omuz)	Titanyum, paslanmaz çelik, polietilen (PE)
Kemik fiksasyon plaka ve vidaları	Metaller, polilaktik asit (PLA)
Kemik sementi	Polimetil metakrilat (PMMA)
Kemik defekt onarımı	Kalsiyum fosfatlar
Yapay tendon ve bağ dokusu	Politetrafloroetilen (PTFE), polietilen tereftalat (PET)
Dental implant-diş fiksasyonu	Titanyum
Kardiyovasküler sistem	
Kan damarı protezi	PET, genişletilmiş PTFE
Kalp kapakçığı	PET, karbon, metal, tırtıklı doğal doku
Kalp pili, implante edilebilir defibrillator	Titanyum, poliüretan (PU)
Stent	Paslanmaz çelik, diğer metaller, PLA
Kateter	PTFE, silikon, poliüretan

Tablo 2.2 Metaller, polimerler ve seramiklerin tıptaki uygulamaları [43] (devamı)

Organlar	
Kalp destek cihazı	Poliüretan, titanyum, paslanmaz çelik
Hemodiyaliz	Polisülfon, silikon
Kan oksijenatörü	Silikon
Nakledilen deri parçası	Kollajen, kadavra derisi, naylon, silikon
Oftalmolojik	
Kontak lensler	Akrilat/metakrilat/silikon polimerler
İntraoküler lensler	Akrilat/metakrilat polimerler
Korneal bandaj lensi	Hidrojel
Glokom drenaj	Silikon, polipropilen
Diğer	
Koklear protez	Platin, platin-iridyum, silikon
Meme implantı	Silikon
Fıtık kafesi	Silikon, polipropilen, PTFE
Dikiş iplikleri	PLA, polidioksanon, polipropilen, paslanmaz çelik
Kan torbaları	Polivinil klorür (PVC)
Kulak tüpleri (timpanostomi)	Silikon, PTFE
Rahim içi araç (RİA)	Silikon, bakır

Seramikler, ısıl işlemle üretilen inorganik, metalik olmayan katılardır. Seramiklerin yapıları üçe ayrılır: kristalli, kısmen kristalli veya amorf (örneğin cam). Biyoseramikler, seramik bazlı biyomalzemelerdir. Günümüzde biyoseramikler birçok farklı uygulamada kullanılmaktadır. Biyoseramiklerin kullanımı, ortopedide metalik implantlarla ilişkili bazı biyouyumluluk problemlerini önlemek amacıyla 1960'ların sonlarında başlamıştır. Biyoseramikler metalik implantların biyouyumluluklarını arttırmak için eklem ya da doku replasmanları ve bunların kaplamaları olarak kullanıma sahiptir. Ayrıca doku

iyileştikçe biyolojik olarak bozunabilen geçici kafesler olarak kullanılırlar. Bazıları ilaç dağıtım kanallarında kullanım için uygundur.

Canlı dokudaki reaksiyonlarına göre biyoseramikler neredeyse biyoinert, biyoaktif ve biyobozunur olarak sınıflandırılır. Neredeyse biyoinert seramikler birinci nesil biyoseramikler olup, biyoaktif ve biyobozunur seramikler ikinci nesil biyoseramiklerdir.

Birinci nesil biyoseramikler zirkonya (ZrO_2) ve alüminadır (Al_2O_3). Bunlar genellikle total kalça protezlerinin femur başı olarak kullanılırlar. Bu seramiklerin ortak özellikleri olarak biyoinert olmaları, mekanik özelliklerinin ve aşınma dirençlerinin iyi olması söylenebilir [44].

Alümina inert bir malzeme olduğu için doğrudan kemiğe bağlanmaz. Kemik ve implant arasında meydana gelen fibröz doku kemikte osteolize, ağrıya ve implantın gevşemesine neden olabilir. Ayrıca alümina seramik yapısından dolayı çok kırılgandır. Young modülü de doğal kemiğinkinden oldukça farklı olduğundan kemik replasmanı uygulamaları için uygun bir malzeme değildir. Estetik özelliklerinden dolayı diş kronları olarak kullanımı mevcuttur [45].

Zirkonya alüminaya göre daha büyük kırılma ve eğilme mukavemetine, daha iyi yorulma direncine sahip olup, daha az sürtünme ve aşınmaya maruz kalır. Zirkonyanın mekanik özellikleri nem, stres varlığında ve yüksek sıcaklığa maruz kaldığında zayıflayabilir. Bu durumdaki zirkonyanın mekanik özellikleri faz dönüşümü ve tanecik boyutunun kontrolü ile iyileştirilebilir [46].

Silika bazlı biyoaktif camlar, ikinci nesil biyoseramikler sınıfına girer. Konak dokularla arayüzey bağ kurabilen insan yapımı ilk malzemelerdir. Daha sonra Biyocam markası olarak adlandırılmışlardır. Çekme mukavemeti 42 MPa'dır, insan kortikal kemiğinin yaklaşık üçte biri kadardır. Bu nedenle daha çok periodontal dolgular gibi yükün azaltıldığı alanlarda kullanılırlar.

Kalsiyum fosfatlar 1800'lü yılların sonlarında kemik yenileyici ilaç olarak kullanılmaktaydı. 1900'lü yılların ilk çeyreğinde trikalsiyum fosfatın kemik üretimini uyardığı keşfedilene kadar olumlu bir veri mevcut değildi. Günümüzde, kalsiyum fosfatlar kemik rejenerasyonunda kullanılan kristal yapılı biyoaktif ve emilebilir seramiklerin temelini oluşturur. Kalsiyum fosfatlar bileşim ve form

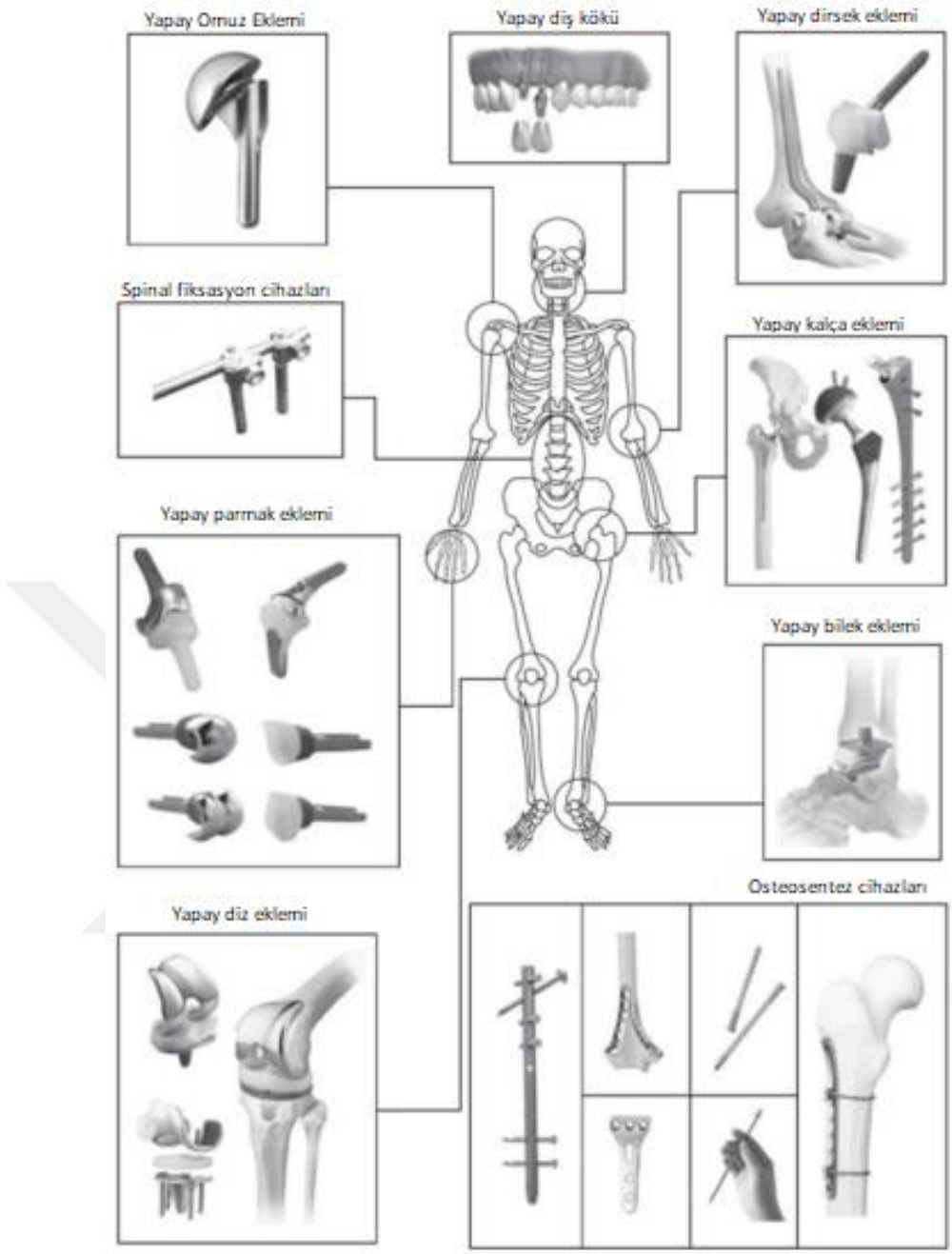
bakımından farklılık gösterir ancak hepsi biyouyumlu, osteokondüktif, toksik olmayan, antijenik olarak inaktif olup kanserojen değildir.

Sentetik hidroksiapatit (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), kemik mineralinin tam bir kimyasal ve kristalokimyasal analoğu olduğu için en çok çalışılan kalsiyum fosfattır [4]. HA'nın klinik uygulamaları, ilaç dağıtım sistemlerinden ortopedik cihazlara kadar değişebilir. Saf HA'nın mekanik özellikleri dökme malzeme olarak kullanıldığında zayıftır. Bu nedenle yük bindirilen implantlarda kullanım için uygun değildir. Küçük, yük binmeyen ve düşük gözenekli implantlar, tozlar ve kaplamalarda kullanılır [47].

2.1.1 Metalik Biyomalzemeler

Travma, hastalık veya organ fonksiyon bozukluklarının tedavisinde, yükleme söz konusu ise metalik biyomalzemelerin kullanımı ilk tercihtir [48]. Metalik biyomalzemeler genellikle ortopedik cerrahi, diş hekimliği ve kan dolaşım sistemi alanlarında tıbbi cihaz yapımında kullanılırlar. İmplant yapımında kullanılan malzemelerin yaklaşık %70'inin metalik malzemeler olduğu söylenebilir [49]. Polimerler düşük Young modülleri ve viskoelastiklikleri nedeniyle yük bindirme uygulamalarında tercih edilmez. Seramikler ise kırılgan yapıları sebebiyle yüklerin sıkıştırıcı olduğu bölgelerde kullanım için uygun değillerdir [50].

Metalik biyomalzemeler kemik doku mühendisliğinde yapay eklemler, osteosentez ve spinal fiksasyon cihazları gibi yük bindirilen parçalarda kullanılır. Dental restorasyonlar, yapay diş kökleri, protez kaideleri, ortodontik teller, protez kapaklar, elektrotlar, klipsler vb. gibi geniş bir uygulama alanına sahiptirler [51]. Şekil 2.2, metalik implant malzemelerinin tiplerini ve in vivo uygulama alanlarını göstermektedir.



Şekil 2.2 Ortopedik cerrahi ve diş hekimliği için in vivo olarak kullanılan kemikle ilgili çeşitli implantlar [49]

Fe, Cr, Co, Ni, Ti, Ta, Mo ve W gibi metaller vücut tarafından az miktarda tolere edilebilir olup implantlarda kullanıma sahiptirler [52]. Titanyum ve alaşımları, kobalt (Co) alaşımları ve paslanmaz çelik biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılan metalik biyomalzemelerdir. Bu malzemeler ile ilgili özellikler Tablo 2.3'te verilmiştir [50].

Tablo 2.3 Yaygın metalik implant malzemeleri ve karakteristikleri [50]

Malzeme	Avantaj	Dezavantaj	Birincil kullanımı
Paslanmaz çelikler	Düşük maliyet, işlenebilirlik	Yüksek Young modülü	Geçici cihazlar (plakalar, vidalar) ve kalça sapları
Co alaşımları	Aşınma direnci, korozyon direnci, yorulma mukavemeti	Yüksek Young modülü, bulunabilirlik	Dental dökümler, kalça ve diz eklemleri
Ti ve alaşımları	Biyouyumluluk, korozyon, yorulma mukavemeti, düşük Young modülü, düşük yoğunluk	Aşınma direnci, düşük kayma mukavemeti	Modüler total kalça replasmanı (TKR) (saplar), diş implantları, maksillofasiyal ve kraniyofasiyal implantlar, kalıcı cihazlar (çiviler, kalp pili kılıfları); sabitleme elemanları (vidalar, zımbalar)

Paslanmaz çelik, demir (Fe) içeriği ağırlıkça %50'den fazla olmamak kaydıyla, ağırlıkça %12-13'ün üzerinde krom (Cr) ve diğer bazı elementleri içeren demir bazlı bir alaşımdır [53]. İmplantlarda en yaygın kullanılan paslanmaz çelik östenitik paslanmaz çeliktir, özellikle 316L tipi.

Molibden (Mo), çukur korozyonuna direnci geliştirmek için orijinal paslanmaz çelik bileşimine eklenmiştir. Üretim sürecinde kullanılan vakum teknolojisi, karbon içeriğini ağırlıkça %0,08'den maksimum yaklaşık %0,03'e düşürerek korozyon direncinde bir artış sağlamıştır. Paslanmaz çelik kompozisyonuna ağırlıkça %9-15 Ni eklenerek oda sıcaklığında östenitik bir faz elde edilmiştir [50]. Öte yandan, yüksek stresli ve oksijensiz bölge gibi vücut koşullarında, 316L tipi paslanmaz çelikler bile paslanabilir [52]. Bu nedenle, korozyon sorununu çözme girişimleri Ni içermeyen östenitik paslanmaz çeliğe odaklanmaktadır. Bu çelik, östenitik yapıyı korumak için yüksek nitrojen içeriğine ve Tip 316L'ye kıyasla daha

yüksek akma dayanımına, yorulma mukavemetine, çukur korozyonuna ve çatlak korozyonuna karşı geliştirilmiş dirence sahiptir [54].

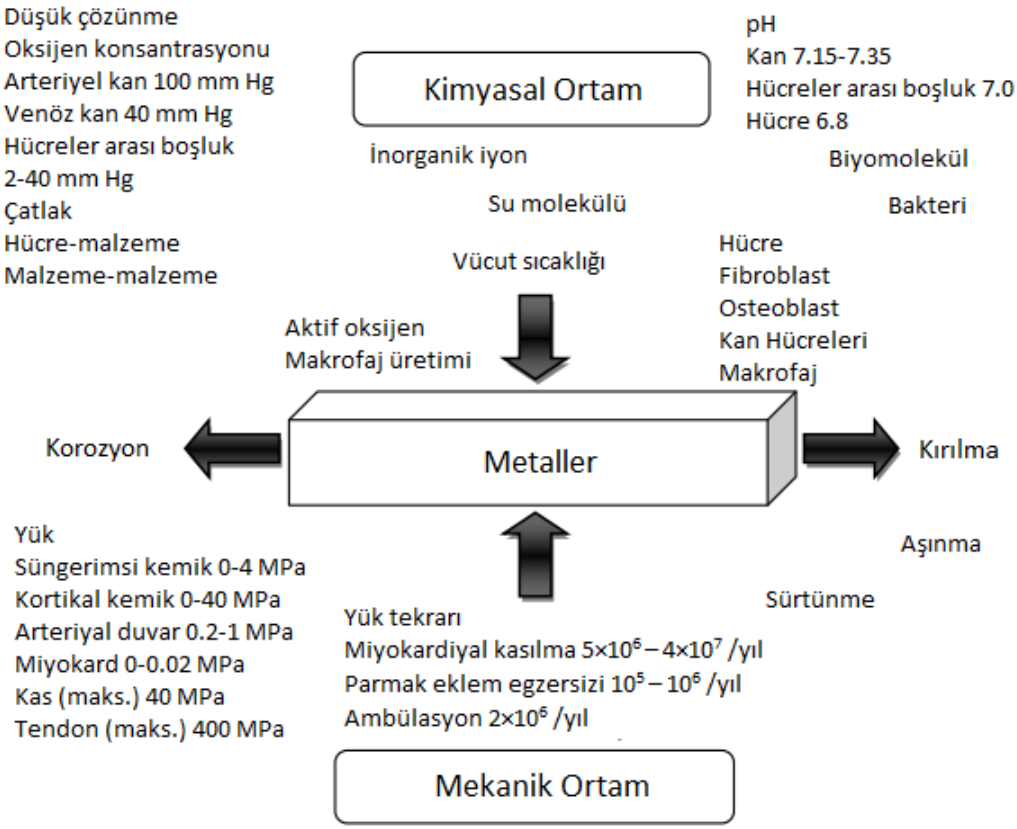
Yapay eklem uygulamalarında aşınma dirençlerinin yüksek olması sebebiyle Co-Cr alaşımları tercih edilir [48]. Bunun dışında mukavemet ve tokluk özellikleri, korozyon dirençleri yüksek olup dökülebilirlikleri iyidir. Korozyon dirençleri paslanmaz çelikten daha yüksektir. Paslanmaz çelik ve Ti alaşımlarından daha yüksek aşınma direncine sahiptirler. İşlenebilirlik özellikleri ve plastisiteleri paslanmaz çelik ve Ti alaşımlarına kıyasla daha düşüktür [53].

Co-Cr alaşımları dökülebilir CoCrMo alaşımı ve sıcak dövme ile dövülen CoNiCrMo alaşımı olmak üzere iki gruba ayrılır [52]. Korozyon dirençleri kıyaslandığında dövme alaşımınki, dökme alaşımınkinden daha düşüktür. Mekanik özelliklerinin farklılıkları vücutta kullanım alanlarında farklılıklar yaratır. Ni alerjik ve toksik olabildiğinden Ni barındırmayan Co-Cr alaşımları tercih edilmektedir. Çünkü korozyon ve aşınma durumlarında az miktarda Ni salınımı meydana gelebilir [53]. In vitro koşullarda gerçekleştirilen bir çalışmada CoCrMo nanopartiküllerinin DNA ve kromozom hasarlarına yol açabileceği sonucuna varılmıştır [55].

Magnezyum bazlı alaşımlar biyobozunur yeni bir metalik malzeme türüdür. Bu alaşımlar hafif olup yoğunlukları 1,75 g/cm^3 tür. Young modülleri insan kemiğininkine yakındır. Bu durum kemik büyümesini ve yeniden oluşumunu destekler [56]. Fizyolojik ortamda hızlı korozyon oranı sayesinde biyobozunur metalik biyomalzemeler olarak kullanılabilirler [57]. Emilebilir stentler olarak umut vaat eden malzemelerdir; bununla birlikte, Mg alaşımlarının yük taşıyan implantlar olarak kullanılması hala tartışmalıdır [56].

Ti ve alaşımları sert doku uygulamalarında yaygın olarak kullanılan metalik biyomalzemelerdir. Bir sonraki başlıkta detaylı olarak anlatılacaktır. Metalik biyomalzemeler ile ilgili ana sorun korozyon ve aşınma durumlarında yapılarındaki toksik elementlerin ana doku ve çevre dokulara salınmasıdır. Bu durum olumsuz doku reaksiyonlarına ve implantın gevşemesine yol açabilir [50].

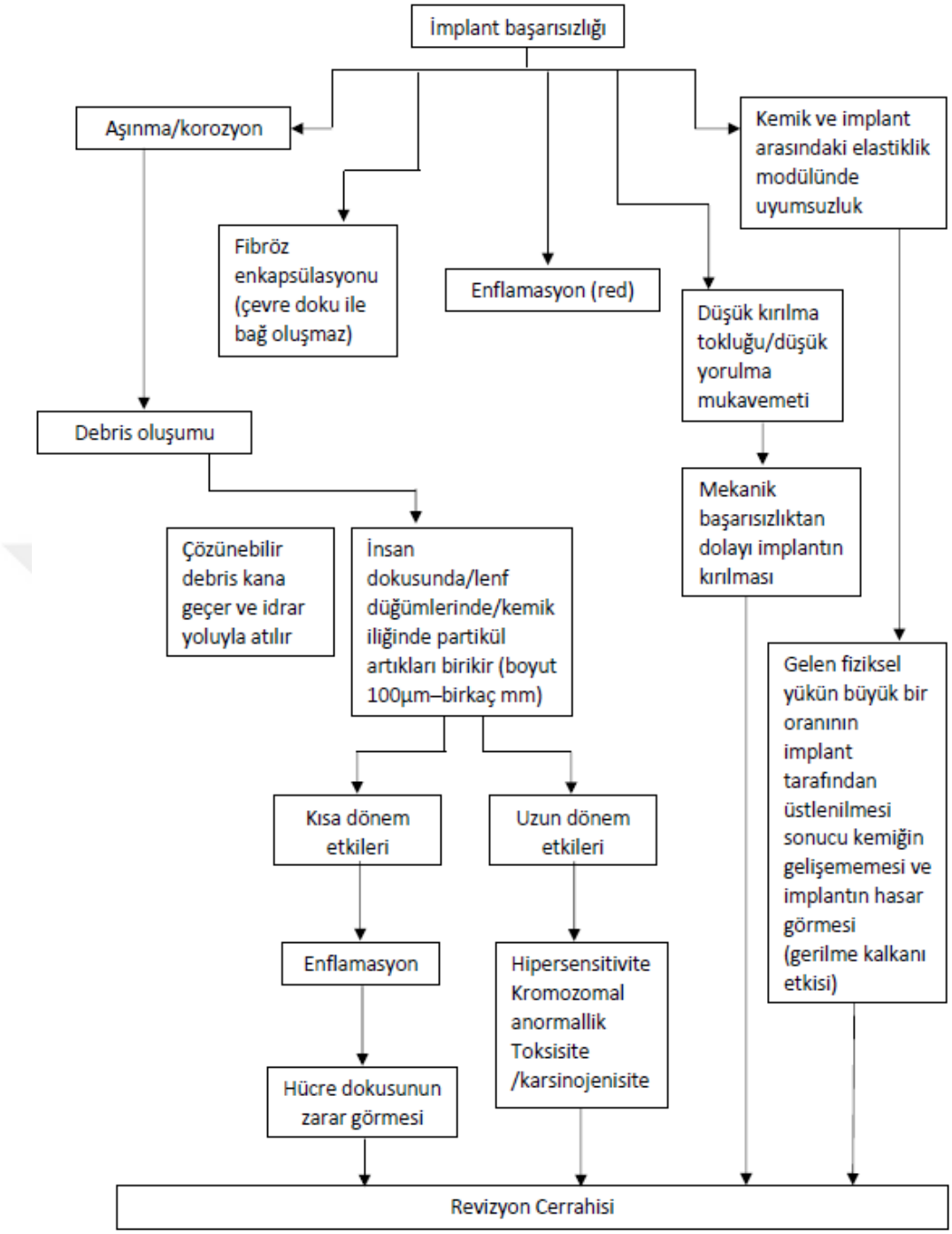
Şekil 2.3, metalik implantların biyolojik ortamda maruz kaldığı etkenlerden bahsetmektedir.



Şekil 2.3 İnsan vücuduna implante edilen metalik malzemelerin biyolojik ortamı [53]

Metalik biyomalzemeler vücuda implanta edildiğinde, serum ve hücreler arası boşluk sıvısının içeriğinde yer alan klorür iyonu korozif ve aşındırıcı bir ortam oluşturur. Kandaki ve bu boşluklardaki amino asitler, proteinler ve çözünmüş oksijen korozyon hızını arttırma eğilimindedir. Vücut sıvıları tampon özellikli olduğundan pH'ı çok değişmese de korozyon ve aşınmadan dolayı implante edilen doku ve çevresinde kritik pH değişiklikleri olabilir [53, 58].

Metalik biyomalzemeler fiziksel etkilere de maruz kalmaktadır. Seçilen implant malzemesi ve tasarımı belirtilen duruma uygun değilse, benzer şekilde implant malzemesi belirlenen alanın dışında kullanılırsa implant birçok yönden başarısız olabilir. Revizyon cerrahisi ile sonuçlanabilecek olası başarısızlık nedenleri Şekil 2.4'te verilmiştir [59].



Şekil 2.4 İmplant başarısızlığının ana nedenleri [59]

Ortopedik implantlar, vücut ağırlığı ve aktivitesi nedeniyle statik veya tekrarlayan yüklere maruz kalır [53]. Bu durum, mukavemet ve sünekliğin mükemmel bir kombinasyonunu gerektirir ve bu nedenle yük taşıma uygulamalarında metaller daha çok tercih edilir [48]. Ortopedik implant uygulamalarında tokluk, sertlik, elastikiyet, ıslanabilirlik, biyoinertlik, biyoaktivite, biyobozunurluk ve X-ray görüntüleme temel endişelerdir [53]. Total eklem replasmanı tedavisinde

sürtünme kaynaklı döküntüyü önleme amaçlı malzemenin aşınma direncinin yüksek olması beklenir. Aynı zamanda, implantasyon öncesi malzeme üzerindeki mikrobiyal yükü minimize etmek için malzeme steril edilebilir olmalıdır [48].

2.1.2 Titanyum ve Alaşımları

Titanyum geçiş elementi 1700'lü yılların sonlarında William Gregor tarafından bulunmuştur. Adını Yunan mitolojisindeki Titanlar'dan almıştır [60]. İmplant malzemesi olarak titanyum ile ilgili çalışmalar 1950'lerde Cambridge Üniversitesi'nde başlamıştır [61]. Per Ingvar Brånemark tarafından gerçekleştirilen çalışmada, tavşan kemiğine yerleştirilen titanyumun çıkarılmak istenirken kemiğe sıkıca entegre olduğu görülmüştür [37]. Bu durum osseointegrasyon olarak bilinmektedir. Sonraki çalışmalarda dental implantlar için titanyum vidalar tasarlanmıştır [37, 61]. Günümüzde ise titanyum insan vücudunun çeşitli bölgelerine çeşitli şekillerde implante edilmektedir [62]. Titanyumun fiziksel özellikleri Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4 Titanyumun fiziksel özellikleri [62]

Element Adı	Atomik Sembolü	Atom Numarası	Atom Ağırlığı	Yoğunluk (g/cm^3)	Kaynama Noktası (^oC)	Erime Noktası (^oC)
Titanyum	Ti	22	47,90	4,5	3130	1812

Düşük yoğunluklu bir element olan titanyum (çeliğin yoğunluğunun yaklaşık %60'ı), alaşımlama ve deformasyon işlemleri ile güçlendirilebilir [61]. Alüminyum (Al) ve vanadyum ilavesiyle saf titanyumun çekme mukavemeti geliştirilir [48]. Titanyum alaşımlarının Young modülü, paslanmaz çelik ve Co-Cr alaşımlarına kıyasla çok düşük olup, doğal kemiğinkine oldukça yakındır. Bu nedenle kemik fiksatörleri olarak uygun malzemelerdir [53].

Oksijen ile temas halinde, titanyum ve alaşımlarının yüzeylerinde 4 nm kalınlığında ve metal salınımına karşı koruyucu bir bariyer olan titanyum dioksit (TiO_2) tabakası oluşur [63]. Bu tabaka paslanmaz çelik ve Co-Cr alaşımlarına kıyasla, titanyum ve alaşımlarına yüksek korozyon direnci sağlar. Co-Cr alaşımları

ve titanyum ve alaşımları ile gerçekleştirilen bir çalışmada, HA kaplamalara bağlanma mukavemetinin titanyum ve alaşımlarında %33 daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır [56]. Öte yandan, burulma mukavemeti (tork) ve kırılmaya karşı burulma açısı düşüktür ve bu nedenle kemik fiksasyon telleri ve sternal teller için uygun değildir [53].

Titanyum alaşımları yaygın olarak üç faz grubunda sınıflandırılır: alfa (α), alfa-beta (α+β) ve beta (β) [64]. Bu bağlamda titanyum alaşım elementleri üç kategoriye ayrılır (1) Al, O, N, C gibi α-stabilizörler; (2) Mo, V, Nb, Ta (izomorf), Fe, W, Cr, Si, Co, Mn, H (ötektoid) gibi β-stabilizatörleri; (3) nötrler, örneğin Zr [60]. α+β faz alaşımları en yaygın kullanılan titanyum alaşımlarıdır. Bu alaşımların β hacim oranı oda sıcaklığında %5-40 aralığındadır [50]. Bunlar arasında Ti6Al4V alaşımı en yaygın biyomedikal alaşımdır ve normalde tavlanmış durumda kullanılır. α + β yapısı sayesinde daha yüksek mukavemete, daha yüksek sünekliğe ve daha yüksek düşük çevrim yorgunluğuna sahipken, β alaşımları daha yüksek kırılma tokluğuna sahiptir [59].

Saf titanyum ve bunun en yaygın kullanılan alaşımı olan Ti6Al4V ELI varyantının paslanmaz çelik ve Co-Cr alaşımlarına göre biyouyumluluğu ve korozyon direnci daha yüksek olup, Young modülü daha düşüktür. Biyomedikal uygulamalarda kullanımları günden güne artmaktadır [50].

2.1.2.1 Ti6Al7Nb

Ti6Al4V alaşımı biyomedikal uygulamalarda implant malzemesi olarak en yaygın kullanılan titanyum alaşımıdır. Ancak alaşımın içeriğindeki bileşenlerin toksisitesiyle ilgili bazı problemler mevcuttur. Ti6Al4V alaşımının korozyon direnci yüksek olmasına karşın, malzemenin korozyonu veya aşınması sonucunda içeriğinde bulunan toksik vanadyum elementinin canlı dokuya salınması uzun süreli implantasyondan sonra aseptik gevşemeye yol açabilir. Ti6Al7Nb alaşımı, daha iyi korozyon direncine ek olarak, yüksek mukavemetli Ti6Al4V ile karşılaştırılabilir mekanik özelliklere sahiptir [65]. Ti6Al7Nb alaşımının özellikleri Tablo 2.5'te listelenmiştir.

Tablo 2.5 Ti6Al7Nb'nin özellikleri [66]

Özellik	Değeri
Yoğunluk	4.52 g/cm^3
Sıkıştırma mukavemeti	1086 MPa
Kırılma tokluğu	75 $MPa.m^{1/2}$
Sertlik	2900 MPa
Çekme mukavemeti	1005 MPa
Young modülü	110 GPa
Erime noktası	1860 K
Termal iletkenlik	8 W/m.K
Termal genleşme	9.8 $10^{-6}/K$
Korozyon direnci (NaCl)	0.6.10^{-4} g/cm^2

Ti6Al7Nb, Ti6Al4V alaşımındaki vanadyumun yerini almak için alaşım elementi olarak niyobyumun kullanılmasıyla geliştirilmiştir, çünkü hem vanadyum hem de niyobyum vücut merkezli kübik titanyum ile β amorftur (yani benzer faz ilişkilerine sahiptir). Böylece her ikisi de uygun β fazı stabilizatörleri olarak işlev görebilir ve sıkı paketlenmiş altıgen bir yapı olan alfa fazının oluşumunu baskılayabilir. Son çalışmalar, niyobyumun mükemmel kısa ve uzun vadeli biyouyumluluğundan bahsetmektedir. Alüminyum, uygun bir α fazı stabilizatörü olarak rolünü yerine getirmeye devam etmekte ve böylece saf titanyuma göre geliştirilmiş mekanik özellikleri korumaktadır. Ti6Al7Nb genellikle başta kalça protezi olmak üzere birçok protez ve implant parçası üretiminde, dental uygulamalarda ve bazı havacılık araçlarında kullanılmaktadır [67].

Dövme malzeme olarak ortopedik uygulama için geliştirilen Ti6Al7Nb alaşımı, diş dökümü için yeni bir alaşım olarak değerlendirilmektedir. Çıkarılan vanadyumun α + β iki fazlı yapıyı sağlayan etkisi, alaşım içeriğine niyobyum eklenerek sağlanmıştır.

Niyobyum, α + β iki fazlı yapıyı sağlamak için gerekli olan Ti-Nb ikili sistemindeki β fazını stabilize etmede vanadyuma benzer bir etki gösterir. Bu nedenle, Ti6Al7Nb alaşımında istenen mikro yapıyı sağlamak için üçlü element olarak

niyobyum kullanılmıştır. Çekme testinde Ti6Al4V alaşımıyla karşılaştırıldığında bu alaşım dökümleri, biraz daha düşük mukavemet ve yaklaşık %40 daha fazla uzama göstermiştir. Alaşımların %1 laktik aside daldırılarak salınımın kontrol edildiği bir çalışmada, Ti6Al7Nb alaşımından Ti6Al4V'ye kıyasla daha az titanyum salınmış olup, salınan titanyum miktarı saf titanyum ile yakın çıkmıştır. Ti6Al7Nb alaşımı, ticari saf titanyumdan biraz daha düşük dökülebilirlik göstermekte olup, dökümlerin güvenilirliği açısından avantajlı olan döküm gözenekliliği daha azdır [68].

Grafen oksit kaplamalar yapılarak Ti6Al7Nb alaşımının korozyon direncini artırmaya yönelik çalışma bulunmasına karşılık Ti6Al7Nb üzerine grafen oksidin elektroforetik yöntem ile kaplanarak korozyon direncinin arttırılmasına yönelik herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Rafieerad ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Ti6Al7Nb alaşımı üzerine PVD (fiziksel buhar biriktirme) magnetron püskürtme yöntemi ile grafen oksit modifiye edilmiş, anodik üçlü nanobiyoseramik kaplama yapılmış ve nano ölçekli kaplamanın mikroyapısal özellikleri, ıslanabilirlik davranışı, in vitro biyoaktivitesi incelenmiştir. İn vitro analizlerin sonucunda, yapay vücut sıvısına ilk daldırmadan sonra implant yüzeyinde kalın bir apatit tabakası oluşmuştur [69].

Başka bir çalışmada diş imlantlarında kullanılan Ti6Al7Nb alaşımı üzerinde oluşan pasif filmin herhangi bir kaplama işlemi uygulamaksızın Hank çözeltisi içerisinde elektrokimyasal empedans spektroskopisi karakterizasyonuyla korozyon özellikleri incelenmiştir. Karakterizasyon sonucunda, metal yüzeyinde iki tabakalı bir oksit film oluşmuştur. Yoğun iç tabaka yüksek korozyon direncini gösterirken, dış poroz tabakanın varlığı osseointergasyon kabiliyetini göstermektedir [70].

Bir çalışmada Ti6Al7Nb alaşımı üzerine Nb / HA / çok duvarlı karbon nanotüp hibrit altın / selenyum / altın nanopartiküller ve niyobyum oksit / HA / GO / selenyum nanopartikülleri PVD magnetron püskürtme yöntemi ile kaplanmıştır. Kaplama sonrası yapışkanlık, mikroyapı, faz, elemental özellikleri ve in vitro biyoaktivitesi incelenmiştir. Tasarlanan çok katmanlı biyofilm Ti6Al7Nb sistemlerinin, antibakteriyel ve ilaç verme potansiyeli ve uzun vadeli mekanik

tatmin ile düşük riskli kemik rejenerasyonunu kolaylaştırmaya katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır [71].

Başka bir çalışmada Ti6Al7Nb alaşımı üzerine gümüş nano partikülleri ve grafen oksitle kompozitlenmiş oksit nanotüpler PVD magnetron püskürtme yöntemi ile kaplanmıştır. Kaplama sonrası mekanik özellikler, in vitro korozyon direnci, antibakteriyel aktivite, hücre adezyonu ve proliferasyonu incelenmiştir. Sonuçlar, yüzey modifikasyonunun *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Ayrıca, AgNP/GO yüklü oksit nanotüp, kaplanmamış substratla karşılaştırıldığında hücre yapışmasını ve yayılmasını önemli ölçüde desteklemiştir. Önerilen hibrit yaklaşım, çeşitli ortopedik uygulamalar için kontrollü şekil ve biyo-işlevselliğe sahip oldukça karmaşık nano yapılar üretmek için geliştirilebilir [72].

2.1.2.2 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ)

Özellikle Ti6Al4V ELI ve Ti6Al7Nb gibi α+β tipi titanyum alaşımları biyouyumluluk, korozyon direnci ve mekanik özelliklerinin mükemmel kombinasyonu nedeniyle en popüler biyouyumlu metalik malzemeler olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, Young modülleri kortikal kemiğinkiyle karşılaştırıldığında daha büyüktür. Bu nedenle biyomedikal uygulamalar için Ti-13Nb–13Zr ve Ti–15Mo–5Zr–3Al gibi düşük Young modülüne ve daha yüksek dayanıklılığa sahip β tipi titanyum alaşımları geliştirilmiştir. Nb, Ta ve Zr gibi toksik ve alerjik olmayan elementlerden oluşan yeni bir β tipi titanyum alaşımı olan Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ), daha düşük Young modülü ve mükemmel mekanik performans elde etmek için geliştirilmiştir [73].

Niinomi ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, TNTZ alaşımının mekanik ve biyouyumluluk özellikleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, alaşımın çekme özelliklerini ve yorulma mukavemetini içeren mekanik performansı, geleneksel biyomedikal Ti6Al4V ELI'ye eşit veya daha fazladır. Young modülü, Ti6Al4V ELI'ninkinden çok daha düşüktür ve β matriks fazında α fazının veya ω fazının çökelmesiyle artar. Alaşımın kemik ile uyumluluğu mükemmeldir. Düşük sertliği, kemik kırığının iyileşmesini ve kemiğin yeniden şekillenmesini

arttırmada etkilidir. Alaşım üzerine HA biyoaktif kaplama tabakası oluşturulabilir [74].

Tanaka ve ark. tarafından yapılan çalışmada, TNTZ üzerinde oluşan yüzey oksit filminin bileşimi ve kimyasal durumu XPS ve AES analizleriyle karakterize edilmiştir. Çalışma sonucunda, TNTZ yüzeyindeki yaklaşık 3.7 nm'lik oksit filmin Ti, Nb, Ta ve Zr içerdiği sürekli bir şekilde tabaka oluşturduğu ve oldukça ince bir kompozit oksitten oluştuğu sonucuna varılmıştır. Oksit film çeşitli katyon değerleri içerdiğinden tamamen oksitlenmez, Ta oksidasyonu inhibe edilir. Bu nedenle tantal elementi oksit tabakasının altında zenginleşir. TNTZ alaşımında yüzeydeki oksit tabakanın oluşumundan asıl sorumlu element titanyumdur [75].

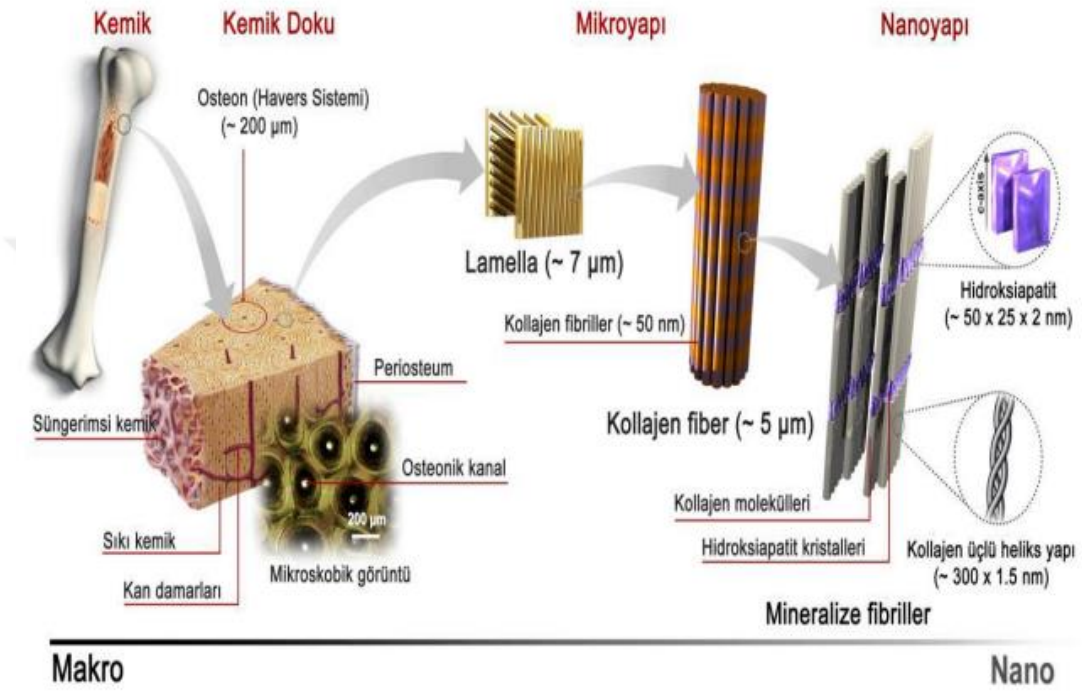
Bir çalışmada TNTZ alaşımının anti-mikrobiyal aktivite, biyolojik ve korozyon performansının değerlendirilmesi ve benzer testlerin Ti6Al4V ve Ti6Al4V2.5Cu alaşımları üzerinde yapılarak sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Malzemelerin sertliği, Young modülü, kayma modülü ve Poisson oranı da değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, TNTZ alaşımının daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Yapay vücut sıvısı çözeltisindeki üç malzeme üzerinde yapılan elektrokimyasal korozyon çalışmaları, üç alaşımın korozyon direncinin TNTZ > Ti6Al4V > Ti6Al4V2.5Cu şeklinde sıralandığını göstermiştir. Korozyon direnci ve antibakteriyel direncin birbiriyle ters orantılı olduğu tespit edilmiştir [76].

Başka bir çalışmada, TNTZ alaşımının Young modülü ve sitotokisisitesi değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda TNTZ'nin Young modülünün Ti6Al4V ELI'den daha düşük, sitotoksisitesinin ise saf titanyuma eşit olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre alaşımın biyomedikal uygulamalarda faydalı olacağı belirtilmiştir [77].

2.2 Kemiğin Yapısı

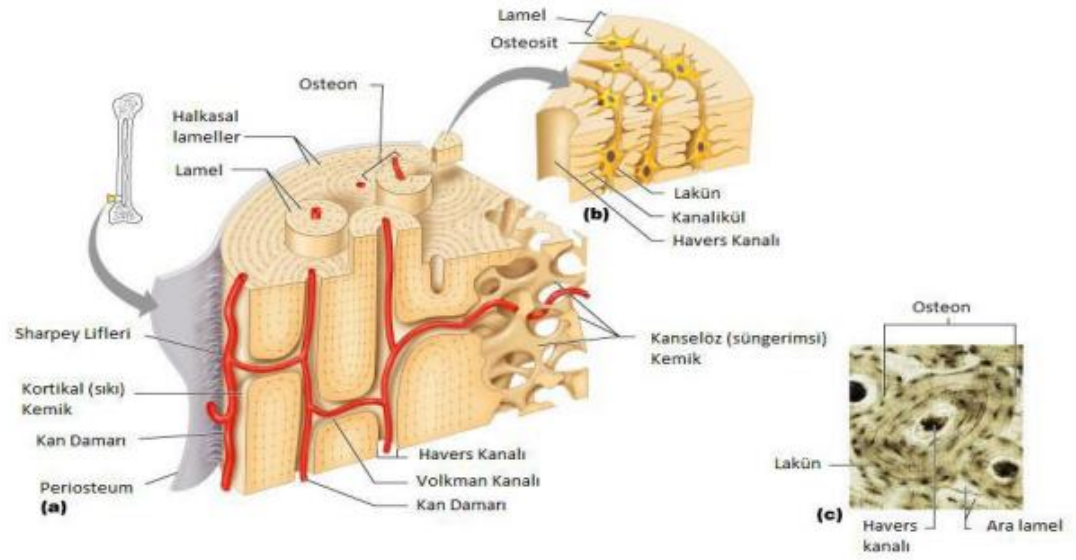
Kemik; kemik doku, kemik iliği ve bunları çevreleyen bir bağ doku olan periosteumdan oluşan damarlı ve sinirlerle donatılmış bir organdır. Kemik minerallerle çevrili bir ortamdaki canlı kemik hücrelerinden oluşur. Kemiğin mekanik özellikleri, bileşenlerinin mekanik özelliklerini ve hiyerarşik yapısındaki seviyeleri anlamaktan geçer. Bu seviyeler ve yapılar şunlardır: (1) makro yapı:

süngerimsi ve kortikal (sıkı) kemik; (2) mikro yapı (10-500 mm): Havers sistemi (osteon) ve tek trabeküller; (3) alt mikro yapı (1–10 mm): lamel; (4) nano yapı (birkaç yüz nanometreden 1 mm'ye kadar): kollajen fibrilleri ve gömülü mineral; ve (5) alt nanoyapı (birkaç yüz nanometrenin altında): mineral, kollajen ve kollajen olmayan organik proteinler gibi ana elementlerin moleküler yapısı (Şekil 2.5) [78].



Şekil 2.5 Kemiğin hiyerarşik yapısı [79]

Kemiğin kendisi, başlıca kollajen liflerini ve küçük kristaller şeklinde inorganik kemik mineralini içerir. Kemiğin mineral yapısı yaklaşık %30 organik ve %70 inorganik malzemelerden oluşur. Bu organik kısmın yaklaşık %90'ı kollajendir. Geriye kalan %10'luk kısmında ise çoğunlukla kollajen olmayan proteinler, lipitler, proteoglikanlar, osteopontin ve kemik matriks proteinleri bulunur. Kemik matriks proteinleri, kemiğe mekanik mukavemet ve doku yapışkan özelliklerini sağlar. Kemiğin inorganik kısmı olan mineral fazı hidroksiapatitten oluşur. HA'nın kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olarak bilinir. Ca^{+2} ve $(PO_4)^{-3}$ iyonları yüzey bağlanması ve elektrostatik etkileşimlerde rol oynar. HA kristalleri, üçlü kollajen sarmalların birleşerek liflerin uzun eksenlerine paralel olarak konumlanır [80]. Şekil 2.6'da kemiğin mikroskobik yapısı görselleştirilmiştir.



Şekil 2.6 Kemiğin mikroskobik yapısı [79]

Kemik; osteoblastlar, kemik astar hücreleri, osteositler ve osteoklastlar olmak üzere dört hücre tipi sergileyen mineralize bir bağ dokusundan oluşur [81, 82]. Kemik vücutta hareketin sağlanması, kalsiyum, fosfat ve kemik iliğinin vücutta depolanması, yumuşak dokuların desteklenmesi ve korunmasından sorumludur [83, 84]. Kemik inert bir organ gibi görünmesine rağmen, işleyiş bakımından dinamik bir yapıya sahiptir. Osteoklastlar tarafından sürekli olarak parçalanır. Osteoblastlar sayesinde de yeni doku oluşumu meydana gelir. Osteositlerin kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinin mekanosensörleri ve düzenleyicileri olarak çalıştığına dair kanıtlar vardır [85]. Kemik astar hücrelerinin işlevi tam olarak net değildir, ancak bu hücrelerin kemik rezorpsiyonunu kemik oluşumuna bağlamada önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [86].

Kemiğin yeniden şekillenmesi, üç aşamadan oluşan bir döngüde, eski kemiğin yeni kemikle değiştirildiği oldukça karmaşık bir süreçtir: (1) osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunun başlatılması, (2) rezorpsiyondan yeni kemik oluşumuna geçiş (veya tersinir periyot) ve (3) osteoblastlar tarafından kemik oluşumu. Kemiğin yeniden şekillenmesi süreci, temel çok hücreli birim (BMU) olarak bilinen osteoklastlar, osteoblastlar, kemik astar hücreleri ve osteositlerin döngüsel faaliyetlerinden oluşur [87, 88].

2.2.1 Kemik Hücreleri

2.2.1.1 Osteoblastlar

Osteoblastlar, toplam yerleşik kemik hücrelerinin %4-6'sını oluşturan ve büyük ölçüde kemik oluşturma işlevleriyle bilinen kemik yüzeyi boyunca yer alan küboidal hücrelerdir. Bu hücreler, bol miktarda kaba endoplazmik retikulum ve belirgin Golgi aygıtının yanı sıra çeşitli salgı kesecikleri dahil olmak üzere protein sentezleyen hücrelerin morfolojik özelliklerini gösterir. Osteoid osteoblastlar tarafından kemik matriksine salgılanır [89].

Kemik matriksinin sentezi iki adımda meydana gelir: organik matriksin birikmesi ve mineralizasyonu. İlk aşamada osteoblastlar, organik matriksi oluşturan başlıca tip I kollajen, kollajen olmayan proteinler ve proteoglikan olmak üzere kollajen proteinlerini salgılar. Sonrasında, veziküler ve fibriller olmak üzere iki fazda kemik matriksinin mineralizasyonu meydana gelir. Veziküler faz, matriks veziküller olarak adlandırılan 30 ila 200 nm arasında değişen çapa sahip kısımlar, osteoblastların apikal membran alanından proteoglikanlara ve diğer organik bileşenlere bağlandıkları yeni oluşturulmuş kemik matriksine salındığında meydana gelir. Negatif yükü nedeniyle sülfatlanmış proteoglikanlar, matriks veziküllerinde depolanan kalsiyum iyonlarını hareketsiz hale getirir. Osteoblastlar proteoglikanları parçalayan enzimleri salgılar. Parçalanan proteoglikanlardan kalsiyum iyonları salınır. Matriks vezikül zarındaki kalsiyum kanallarını geçer. Fosfatlı bileşikler, osteoblastlar tarafından salgılanan alkalin fosfataz enziminin etkisiyle bozunur. Matriks veziküllerinin içindeki fosfat iyonlarını serbest bırakır. Veziküllerdeki kalsiyum ve fosfat iyonları çekirdeklenerek hidroksiapatit kristallerini oluşturur. Fibriler faz, matriks vezikülleri içindeki kalsiyum ve fosfat iyonlarının aşırı doygunluğu bu yapıların yırtılmasına ve hidroksiapatit kristallerinin çevredeki matrikse yayılmasına yol açtığında meydana gelir [90, 91].

Osteoblastların bir kısmı kemik matriksine doğru geçer. Bu aşamada, olgun osteoblastlar apoptoza (programlı hücre ölümü) uğrayabilir ya da osteositler veya kemik astar hücreleri haline gelebilir [88, 92].

2.2.1.2 Kemik Astar Hücreleri

Kemik astar hücreleri, kemik yüzeylerini kaplayan düz şekilli osteoblastlardır. Bu hücrelerde kemik rezorpsiyonu ve oluşumunu meydana gelmez. Bu hücrelerin çekirdek yapısı ince ve düzdür. Kemik astar hücreleri kaba endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı gibi birkaç organele sahiptir [93].

Kemik astar hücrelerinin salgılama aktivitesi, kemiğin fizyolojik durumuna bağlıdır, bu sayede bu hücreler salgı aktivitelerini yeniden kazanabilir, boyutlarını artırabilir ve küboidal bir görünüm alabilir. Kemik astar hücrelerinin işlevleri tam olarak anlaşılmamıştır, ancak bu hücrelerin kemik rezorpsiyonunun meydana gelmemesi gerektiğinde osteoklastlar ve kemik matriksi arasındaki doğrudan etkileşimi önlediği gösterilmiştir [86, 94].

2.2.1.3 Osteositler

Toplam kemik hücrelerinin %90-95'ini oluşturan osteositler, en bol bulunan ve en uzun ömürlü hücreler olup, ömürleri 25 yıla kadardır. Osteositler, osteoblast farklılaşması yoluyla mezenkimal kök hücrelerinden türetilir. Bu süreç dört aşamada meydana gelir: osteoid-osteosit, preosteosit, genç osteosit ve olgun osteosit. Süreç sonunda osteoblastların alt popülasyonu osteositlere dönüşür. Birçok morfolojik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Kaba endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı gibi organellerin sayısı azalır ve protein sentezi ve salgılanmasında bir azalmaya karşılık gelen çekirdek-sitoplazma oranı artar. Osteositlerin yapısındaki birbirine bağlı ağlar, mekanik basınçları ve yükleri tespit etme kapasitesine sahip olduğundan, osteositler mekanosensör görevi görür ve böylece kemiğin günlük mekanik kuvvetlere adaptasyonuna yardımcı olur. Ayrıca kemiğin yeniden modellemesinin düzenleyicileri görevi görürler. Osteosit apoptozu, osteoklastik kemik rezorpsiyonuna kemotaktik bir sinyal olarak kabul edilir [95, 96].

2.2.1.4 Osteoklastlar

Osteoklastlar, çeşitli faktörlerin etkisi altında, hematopoietik kök hücre soyunun tek çekirdekli hücre orijinli, terminal olarak farklılaşmış çok çekirdekli hücrelerdir. Trabeküler kemikte osteoklastlar bir kemik paketini rezorbe eder ve arkasında yaklaşık 60 μm derinliğinde bir boşluk bırakır. Bu boşluk sonra yeni kemik

matriksi ile doldurulur. Başlangıçta mineralize olmayan yeni biriken matriks, mineral içeriğini artırarak mekanik sertliğini arttırır. Osteoklastlar, yaklaşık 20-40 μm/gün hızla bir tüneli rezorbe eder. Osteoblastlar daha sonra tüneli tekrar doldurur ve ortada kan damarı oluşumu için kanal bırakır [93, 97, 98].

2.3 Ortopedide İmplant Korozyonu

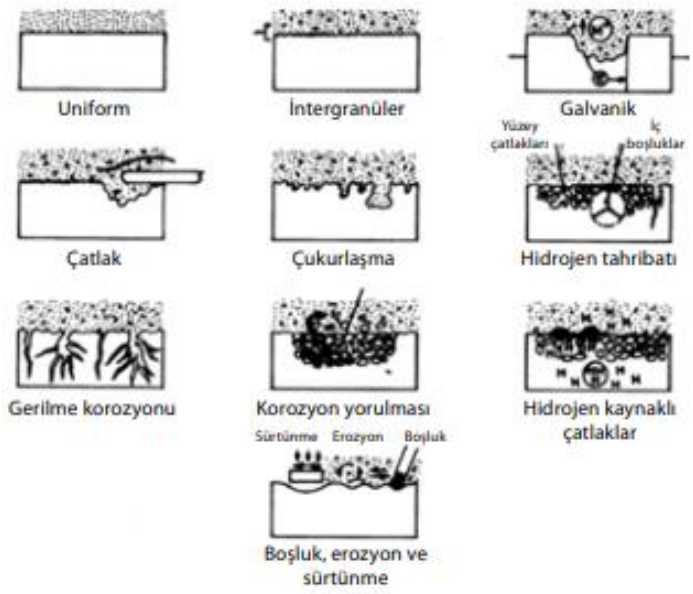
Ortopedik uygulamalar dahil endüstrilerin çoğu korozyon problemiyle karşı karşıyadır. Metalik malzemeler sıvı, gaz veya bunların kombinasyonunu içeren bir ortama maruz kaldığında korozyon kaçınılmazdır ve malzemeye zarar verir. Vücut sıvısı metalik biyomalzemeler için korozif ve aşındırıcı iyonlar içerir. Metal implantların vücut ortamından kaynaklanan korozyonu insan hayatını farklı şekillerde etkileyebilir: (1) biyouyumlu olmayan istenmeyen metal iyonları/korozyon ürünleri açığa çıkarabilir, (2) implant cihazının ömrünü kısaltabilir ve bu nedenle, masraflı ve ağrılı bir ameliyat daha gerektirebilir ve (3) nihayetinde insan ömrünü kısaltabilir. İmplantasyon işleminin başarısı ve işleyişi de metal iyonlarının salınımını etkiler. Salınan metal iyonları sadece ana dokuda değil, çevre dokularda da birikebilir, vücudun diğer kısımlarına taşınabilir [99].

Bu sebeple metalik malzemelerin korozyondan korunma yöntemleri son zamanlarda dikkat çekmektedir. Son yıllarda nanokompozit ve hidrofobik kaplamaların, organik-inorganik hibritlerin oksidasyona/korozyona karşı malzemelerin ömrünü arttırdığı ve buna bağlı olarak büyük bir tasarruf sağladığı gösterilmiştir. Korozyona dirençli kaplamalar, ağır çevre koşullarında bile malzemelerin kullanım ömrünü arttıran önemli gereksinimlerden biridir [100-103].

Son yıllarda asidik ve tuzlu ortamlarda malzeme korozyonunu önlemek için epoksi kaplama kullanılmaktadır. Fakat iyonların nüfuz etmesini sağlayan ve alaşım yüzeyinin uzun vadede hasar görmesine neden olan geniş gözenek boyutu epoksi kaplamanın dezavantajı olarak bilinir. Asidik ortamda Pd, Pt ve Ru esaslı titanyum alaşımları ile gerçekleştirilen bazı çalışmalar, bu alaşımların korozyon dirençlerinin yüksek olduğunu göstermiştir. Ancak soy metallerin maliyetleri yüksek olduğundan ticari olarak kullanım için elverişli bulunmamıştır [17]. Yapılan çalışmalarla, organik inhibitörlerle asidik ortamda uzun süreli korozyon

yavaşlatma verimi elde edilemediği sonucuna varılmıştır [104, 105]. Bu nedenle, karbon esaslı fonksiyonel malzemelerin kaplama olarak kullanılmasıyla birlikte asidik ortamdaki yüksek korozyon hızının önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Bu malzemelerin kullanılmasıyla metal yüzeyinde mükemmel adsorpsiyon elde edilebilir ve çeşitli ortamlarda korozyon önleyici bariyer olarak işlev görebilir [106].

Ti6Al7Nb ve TNTZ gibi titanyum esaslı alaşımlar iyi mekanik özellikleri, yüksek biyouyumlulukları ve güçlü korozyon direncinden dolayı biyomedikal ortopedik implantlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [67, 101, 102]. Ancak bu implantlar termal geçmiş, artık veya servis gerilmeleri, implantasyon öncesi uygulanan yüzey işlemi, implante edildiği bölge ve vücut sıvısıyla temasa bağlı olarak zamanla korozyona karşı duyarlı olabilirler. Metalik malzemelerin biyouyumluluğu ve korozyon davranışları arasında yakın bir ilişki vardır. Metalik biyomalzemelerin korozyonu sonucunda salınan metal iyonları genellikle insan sağlığına zararlıdır. Vücuda salınan toksik iyonlar, çevre dokuda inflamatuar bir yanıta neden olarak implantın renginin değişmesine ve gevşemesine neden olabilir. Alaşımın bu iyon salma davranışı ve korozyon hızı arasında yakın bir ilişki vardır [9]. Titanyum ve alaşımlarının korozyon direnci yüzeylerinde oluşan ve koruyucu bariyer görevi gören, TiO_2 olarak adlandırılan pasif bir filmin oluşumuna dayanır. Bu termodinamik olarak kararlı oksit film, fizyolojik ortamlarda altlık malzemenin korozyonunu önler, iyi bir korozyon direnci ve mükemmel biyouyumluluk sağlar. Ancak oksit filmin büyümesiyle birlikte metal iyonların salınımı da meydana gelir. İyon salınım hızı büyüme hızına eşit olduğunda, oksit filmin kalınlığı sabitlenir ve bu kalınlıkta en yüksek korozyon direncine ulaşır. Oluşan bu oksit film altlık malzemenin korozyon direncini arttırmasına rağmen, yüzeyin homojen olmamasından dolayı çukur korozyonu ve çatlak korozyonu gibi lokal korozyon türleri gerçekleşir [107]. Şekil 2.7, implantlarda görülen korozyon türlerini göstermektedir.



Şekil 2.7 İmplantlarda meydana gelen korozyon mekanizmaları [108]

2.4 Ortopedide Kanser ve Enfeksiyon

Primer kemik kanseri nadir olarak görülmesine rağmen, kanserin diğer organlardan (akciğer, meme ve prostat gibi) yayılması sonucu ortaya çıkan ikincil kanser formu en sık görülen kanser türlerinden biridir [109, 110]. Bununla birlikte, Amerika Birleşik Devletleri'nde Amerikan Kanser Derneği tarafından 2014 yılında yayınlanan istatistiklere göre, 3020 yeni primer kemik ve eklem kanseri (1680 erkek ve 1340 kadın) vakası olacağı ve 1460 kişinin bu kanserlerden yaşamlarını kaybetmesi bekleniyordu [111]. Öte yandan, geçmiş araştırmalar ABD'de her yıl 1,2 milyon yeni kanser vakasının meydana geldiğini ve yaklaşık 300000'inin sonunda bir kemik metastazı geliştirdiğini ileri sürmüştür. Bununla birlikte, otopsi çalışmaları, meme ve prostat karsinomlu hastaların %70'inin iskelet metastazı geliştirdiğini; tiroid (%40), renal (%35), bronş (%35) ve rektal (%10) karsinomlu hastalarda sayıların daha az ancak hala anlamlı olduğunu göstermiştir. [112].

Kanserli dokunun cerrahi işlemle çıkarılmasının ardından hasarlı bölgeye ortopedik cerrahi bir implantın yerleştirilmesi kemik kanseri tedavisinde kullanılan tekniklerden birisidir [113]. Ancak bu teknik cerrahi prosedürün başarısına da bağlıdır. Kanserli hücreler ortamdan tamamen

uzaklaştırılamadığında, implantın yerleştirildiği bölgede kanserli hücrelerin oluşma ihtimali vardır.

Yalnız ve ark. kanserli hastalar ile ilgili bir çalışma yürütmüştür. Bu çalışmaya geniş rezeksiyon ve sementli endoprotez uygulanan kemik tümörüne sahip 23 hasta (12'si erkek, 11'i kadın; ort. yaş 49; dağılım 14-81 yaş) dahil edilmiştir. On iki hastada (%52,2) metastatik, 11 hastada (%47,8) primer tümör bulunmuştur. 3 hastada lokal nüks görülmüştür. 7 hastada (%30,4) postoperatif komplikasyon belirtilmiştir. Takip döneminde 11 hasta tümöral nedenlere bağlı olarak kaybedilmiş olup, üç hastada uzak metastaz gelişmiş ve 9 hastanın tümörsüz olduğu rapor edilmiştir. Bu 11 hastanın 10'unun metastatik tümör grubundan ve 1 hastanın primer tümör grubundan olduğu belirtilmiştir. Ayrıca tedavi sonrası en sık görülen komplikasyonun %13 ile aynı bölgede tümör reformasyonu (lokal relaps) olduğu rapor edilmiştir [114].

Ortopedik cerrahi cihazlarında kullanılan biyomalzemelerin genelde toksik olmadığı bilinir. Ancak hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen bazı çalışmalarda bu cihazları oluşturan bazı bileşenlerin potansiyel kanserojen olduğu bulunmuştur. İnsanlar üzerinde gerçekleştirilen klinik çalışmalar ortopedik implantlara bağlı malignitenin nadir olduğunu göstermektedir. Ancak bu implantasyon sonrası meydana gelen ve iyi bilinen bir komplikasyondur [115].

Kanser gelişiminin yanı sıra, cerrahi implantasyonu takiben nozokomiyal enfeksiyon, implant çevresinde meydana gelen yaygın bir komplikasyondur. Bu enfeksiyonların üçte ikisinin nedeni *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* gibi stafilokok bakterileridir [116]. *Escherichia coli, Peptococci, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis* ve beta hemolitik *Streptococcus* gibi bakteriler implant bölgesini ve çevresini enfekte edebilen diğer patojenlerdir. Genellikle patojenik olmayan, kommensal, insan derisi saprofiti olarak düşünülen *S. epidermidis*, biyomalzeme ile ilgili enfeksiyonlarda ciddi bir patojen olarak bilinir ve vasküler protezlerin, beyin cerrahisi şantlarının ve ortopedik implantların enfeksiyonlarının önde gelen nedenidir [117].

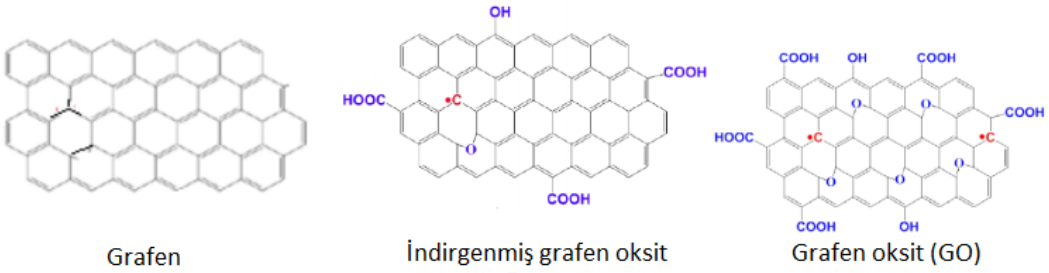
Son yıllardaki teknolojik gelişmeler, moleküler düzeyde biyoloji ve malzeme bilimindeki ilerlemeler ile birlikte daha iyi sonuçlar elde etmek için ortopedik

implantlara birtakım özellikler eklemek mümkün hale gelmiştir. Buna bağlı olarak, biyomalzemelerin enfeksiyonunu önlemek için iki farklı malzeme tercih edilir: (1) antibakteriyel ve (2) antiadeziv. Antibiyotikler (örneğin, rifampisin ve minosiklin), gümüş iyonları, klorheksidin ve gümüş sülfadiazin içeren antibakteriyel kaplamalar önerilmiştir. Bununla birlikte, adeziv bakterilerin tam ve uzun süreli eradikasyonunu sağlayan tek bir antibakteriyel malzemenin geliştirilmediği bilinmektedir [118].

2.5 Grafen Oksit

2004 yılında keşfedilen grafen dünya çapında büyük ilgi görmüştür. İki boyutlu ve sp^2 hibritleşmesine sahip olan grafen, termal ve kimyasal kararlılık, mekanik mukavemet ve iyon difüzyonuna engel olması gibi olağanüstü karakteristik özellikleri grafenin metaller üzerinde korozyon direnci yüksek ve koruyucu bir kaplama olması için güçlü bir aday yapmaktadır [119]. Buna karşılık, grafenin doğrudan metal yüzeyler üzerinde sabit kalması zordur, ayrıca grafen sulu ya da susuz çözücülerde zayıf dağılabilirliğe sahiptir. Bu dezavantajlar, grafenin korozyon önleyici bir kaplama olarak kullanılmasında zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle birçok araştırmacı grafeni farklı polimerler ile kompozit oluşturarak korozyon önleyici kaplama olarak kullanmıştır. Fakat grafen tabakalarının kimyasal olarak soy olması polimer matriksleri ile her türlü etkileşimi önlemekte ve kompozitlerde genişletilmiş dolgu-dolgu maddesi birikmesine neden olmaktadır. Diğer yandan GO, bazal düzleminde hidroksil ve epoksil fonksiyonel gruplar ile hem sp^2 hem de sp^3 hibridize karbonlara ve kenarlarda karbonil ve karboksil gruplarına sahip altıgen bir karbon ağından oluşur. Oksijen taşıyan fonksiyonel gruplar GO'i hidrofilik ve bunun sonucunda suda ve polimerlerde iyi dağılabilir yapar. Dolayısıyla, GO-polimer kompozit malzemelerin işlenebilir hale getirilmesi grafen ile karşılaştırıldığında nispeten daha kolaydır. Grafitin GO'ya oksidasyonu sırasında, sp^2 hibritleştirilmiş karbon yapısı kırılır ve π-π konjugasyonunu bozarak grafitin komşu tabakaları arasındaki uzaklık 0.335 nm'den 0.68 nm'ye artar. Artan uzaklıktan dolayı tabakalar arasındaki etkileşim azalır ve böylece GO'nun sulu ortamda tek katmanlı GO tabakalarına dökülmesi kolaylaşır [103]. Sp^2 konfigürasyonunun bozulması GO'e aynı zamanda elektriksel yalıtkanlık sağlar ve korozyona dirençli bir yapı verir.

Elektrolitler grafen oksidin katmanlı yapısından nüfuz edemezler [120]. Grafen, indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve grafen oksidi içeren grafen ailesi nanomalzemelerinin kimyasal yapısı Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Grafen ailesi nanomalzemelerinin kimyasal yapısı [120]

GO biyogörüntüleme [121], biyosensör [121, 122], ilaç salınımı [123, 124] ve iskele [125] gibi biyomedikal uygulamalarda kayda değer sonuçlar göstermiştir. GO'nun antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı birkaç çalışmanın sonucunda, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* gibi bakterilere ve fungal conidia'ya karşı güçlü antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu bulunmuştur [15]. GO'nun sahip olduğu bu özellik sayesinde, antimikrobiyal özellikli yeni biyomedikal implantlar geliştirilebilir.

Biyomedikal malzemeler üzerine grafen oksit kaplamasıyla ilgili literatürde birçok farklı çalışma mevcuttur. Asgar ve ark. 2019 yılında yaptıkları çalışmada, Ti6Al4V alaşımını Hummers yöntemi ile sentezlenen grafen oksit ile elektroforetik biriktirme yöntemini kullanarak kaplamışlardır. Grafen oksit sentezlendiğini doğrulamak için XRD (X-Işını Difraktometresi), FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ve Raman spektroskopisi gerçekleştirmişlerdir. Korozyon davranışını incelemek için Açık Devre Potansiyeli (OCP), Döngüsel Voltametri (CV), Doğrusal Tarama Voltametrisi (LSV) ve Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) teknikleri kullanılmıştır. Ti6Al4V alaşımı fonksiyonel grafen oksit ile kaplandıktan sonra, açık devre potansiyelinde pozitif bir değişim ve polarizasyon direncinde artış görülmüştür [16].

Başka bir çalışmada katalizör, ilaç salınımı ve sensörlerde kullanılan karbonil demir nanopartikülleri üzerine grafen oksit kaplama yapılmış, döngüsel voltametri sonucu herhangi bir oksidasyon piki görülmemiştir. Demir yapıları üzerinde

grafen oksit kaplanmasıyla mükemmel bir pasiflik ve korozyon direnci elde edilmiştir [126].

Ho ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada çelik üzerine grafen oksidi elektroforetik biriktirme yöntemiyle kaplayıp korozyona karşı olan etkisini incelemişlerdir. İki boyutlu yapısından dolayı grafen oksidin mükemmel bir bariyer özelliği gösterdiğini ve çeliğin korozyon direncini önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir [127].

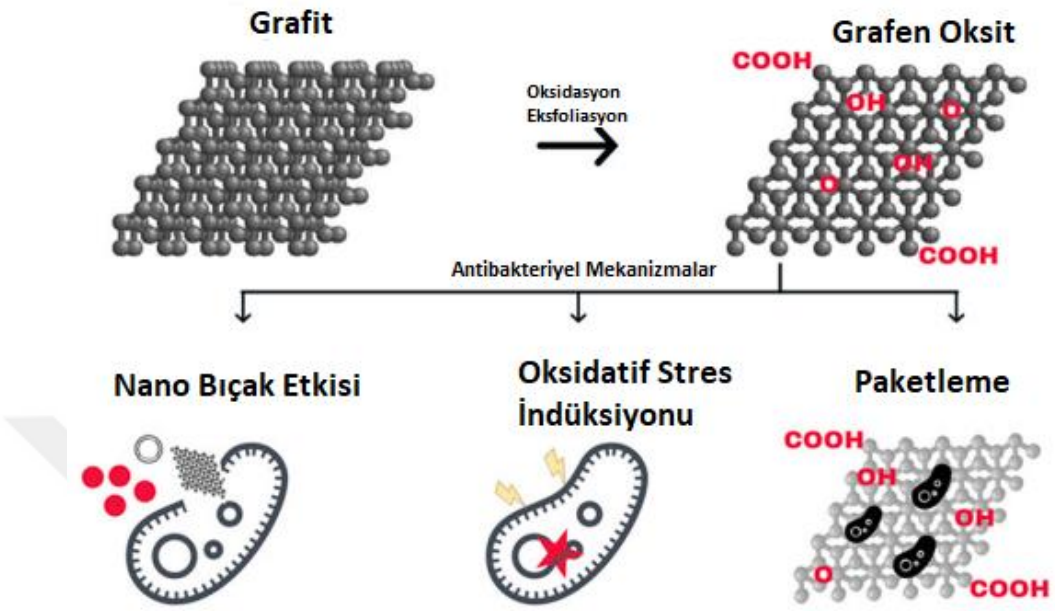
Rehman ve ark. 2018 yılında yayınladıkları çalışmada çeliğin üzerine elektroforetik biriktirme yöntemiyle grafen oksit kaplama yaparak çeliğin korozyon direncindeki değişimini empedans ve doğrusal tarama voltametri yöntemleri ile incelemişlerdir. Malzeme yüzeyinin grafen oksit ile kaplanmasının korozyon direncini arttığı sonucuna varılmıştır [128].

Birkaç çalışma, GO'nun Ti bazlı alaşım yüzeylerinde kaplama malzemesi olarak kullanıldığında gelişmiş korozyon direnci ve biyouyumluluk sağladığını ortaya koymuştur [16, 17]. Ti yüzeyindeki GO kaplamanın, kemik hücrelerinin büyümesini destekleyerek osteoblast hücre farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir [18]. Başka bir çalışmada, GO'nun yetişkin kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını desteklediği, protein adsorpsiyonunu arttırdığı, hücre adezyon substratı ve kondrojenik indükleyici-taşıyıcı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [19].

GO'nun antimikrobiyal aktivitesi geniş çaplı çalışmalarla incelenmiştir. Çalışmaların çoğu çözeltideki GO aktivitesine odaklanırken, birkaçı GO'nun katı fazda kaplama malzemesi olarak aktivitesi üzerinde durmaktadır [129, 130]. GO, antimikrobiyal etkisini üç farklı mekanizma ile gösterebilmektedir (Şekil 2.9) [131].

1. GO tabakalarının keskin kenarları, sırasıyla hücre zarını kesip hücre içi sitoplazmik bileşenlerin sızması ve mikroorganizmanın ölümü ile sonuçlanan fiziksel müdahaleyi gerçekleştirebilir, bu mekanizmaya nano bıçak etkisi denir [132].
2. GO oksidatif stresi indükleyebilir, bu fenomene bakteriler tarafından grafen tabakalarının kimyasal olarak indirgenmesi neden olur [133].

3. GO mikroorganizmaları, besin bulamamaları için paketleyerek çevreden izole edebilir, çoğalmayı durdurabilir; bu mekanizma, GO kaplamalı yüzeylerden ziyade esas olarak çözelti aşamasında gözlenmiştir [134].



Şekil 2.9 Üç farklı GO antibakteriyel etki mekanizmasının şematik gösterimi [25]

GO yüzeyleri kaplamak, yapışma ve biyofilm önleyici aktivite elde etmek için tek başına veya diğer maddelerle kombinasyon halinde kullanılabilir. GO bazlı kaplama hazırlamak için spin kaplama ve elektroeğirme, vakumlu filtrasyon, akımsız kaplama, faz ters çevirme, elektroforetik biriktirme, hidrojel birleştirme/çapraz bağlama, ıslak kimyasal indirgeme, çözücü buharlaştırma ve çözelti dökümü gibi farklı yöntemler kullanılmıştır [135].

Biyomalzeme yüzeylerinin GO ile kaplanması ile ilgili çalışmalar 2010 yılında başlamıştır. Hu ve arkadaşları, vakumlu filtrasyon yoluyla GO ve rGO kağıdı oluşturmuş ve bunu *E. coli*'ye karşı test etmiştir. Lusiferaz bazlı ATP tahlili yoluyla GO nano tabakalarının mevcudiyetinde *E. coli*'nin metabolik aktivitelerini ve canlılığını ölçmüşlerdir. Toplanan verilere göre, rGO kağıdı bakterilere karşı daha az etkiliyken, GO kağıdı ile etkileşimden sonra (85 μg/ml GO kullanılarak 2 saatlik inkübasyondan sonra neredeyse %85 canlılık kaybı) metabolik aktivite ve bakteri canlılığı önemli oranda azalmıştır. Biyouyumluluk deneyleri, 20 g/mL'deki GO nano tabakalarının 2 saatlik inkübasyondan sonra A549 hücrelerine sitotoksisite göstermemiş olup, 24 saat sonra hücre canlılığında hafif bir düşüş görülmüştür.

Daha yüksek konsantrasyonda (85 g/mL) GO nano tabakaları, 24 saat içinde artan bir sitotoksisite (%50) göstermiştir [136].

Başka bir çalışmada, GO ve rGO elektroforetik biriktirme yöntemi ile paslanmaz çelik üzerine kaplanmıştır. Membran bozulması mekanizması ile GO'nun aktivitesini gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Ancak çalışma sonucunda rGO'nun aktivitesi daha yüksek çıkmıştır. Bunun sebebinin rGO'nun hücre zarına doğrudan hasar veren daha keskin ve yüklü köşelere sahip olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Yazarlar, dış zara sahip Gram-negatif *E. coli*'nin, rGO'nun yol açtığı zar hasarına Gram-pozitif *S. aureus*'tan daha dirençli olduğunu belirtmektedir [137].

Başka bir çalışma, paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde elektroforetik biriktirme ile oluşturulan Go ve rGO yüzeylerine odaklanmaktadır. Bu durumda da bir membran bozulması mekanizması belirtilmiştir, ancak rGO'nun GO'dan daha aktif olduğu görülmüştür. rGO'nun daha iyi antibakteriyel aktivitesi, daha keskin ve yüklü kenarları tarafından desteklenmiş ve bunun sonucunda doğrudan temastan kaynaklanan büyük bir bakteri hücre zarı hasarı oluşmuştur. Yazarlar, bir dış zar ile karakterize edilen Gram-negatif *E. coli*'nin, rGO'nun neden olduğu zar bozulmasına Gram-pozitif *S. aureus*'tan daha dirençli olduğunu iddia etmektedir [137].

Perrault ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, GO'nun farklı antimikrobiyal mekanizmalarını incelemek için hem süspansiyon hem de kaplamalı yüzeyler kullanılmıştır. Nano tabakanın boyutunun aktivite üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, GO kaplı yüzeyler daha küçük tabaka boyutlarında daha fazla antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. Özellikle 0.10 ve 0.01 μm^2 boyutları test edildiğinde, bakteriyel hücre oksidasyonu mekanizması yoluyla sırasıyla %50 ve %30 hücre canlılığı elde edilmiştir. Yazar tarafından, ana bakteriyel etkinin tabaka boyutu azaldıkça artan glutatyon (GSH) oksidasyon yüzdesinin ölçülmesiyle görülen bakteriyel hücre oksidasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Süspansiyonda, daha büyük GO tabakaları kullanılarak daha yüksek antimikrobiyal aktivite elde edilmiştir: özellikle, 0,65 μm^2 tabaka boyutu kullanıldığında canlı bakteri sayısı %0,5'tir [138].

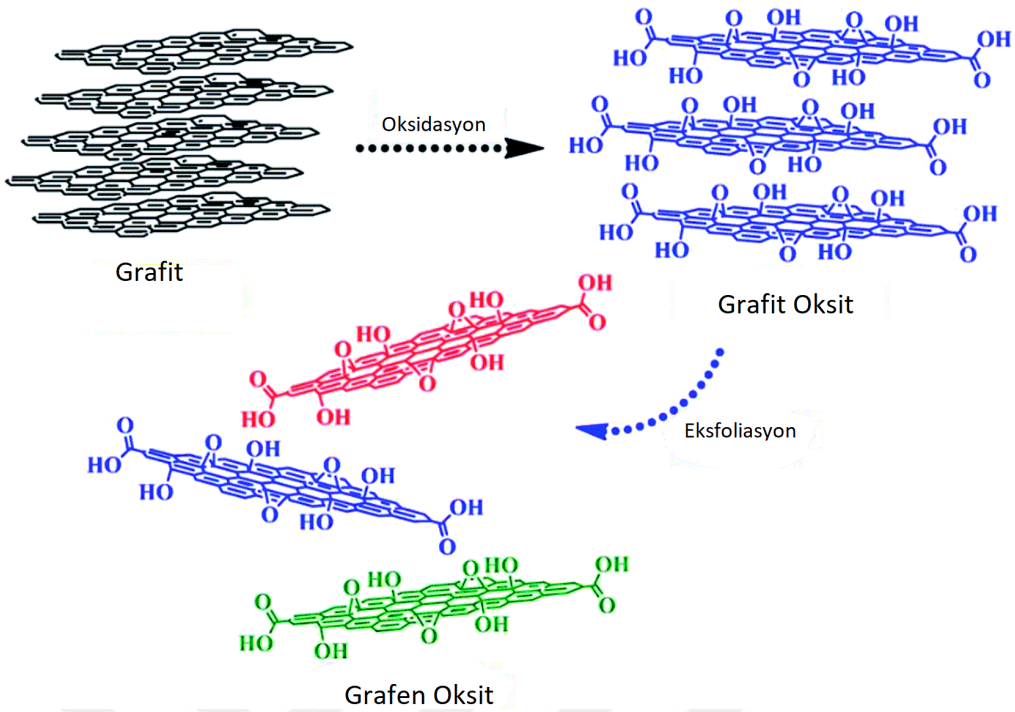
Bir çalışmada, GO-Ag nanohibritlerin Gram negatif bakteriler *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*, Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* mayasına karşı antimikrobiyal özelliklerinin konsantrasyona ve zamana bağlı olduğu bulunmuştur. *C. albicans* ve *S. aureus*, GO-Ag nanohibritlere karşı en yüksek duyarlılığı göstermiştir. Bu nanohibritlerin, farklı alanlardaki uygulamalarda antimikrobiyal aktiviteye sahip malzemeler geliştirmek için polimer nanokompozitlerde nanodolgu malzemeleri olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [139].

Son yıllardaki çalışmalar ile grafen oksidin anti-biyofilm aktivitesi keşfedilmiştir. Bir çalışmada, GO'nun başlıca yara patojenlerine (*P. aeruginosa, S. aureus ve C. Albicans*) karşı anti-biyofilm aktivitesini araştırılmıştır. GO'nun inhibisyon biyofilm oluşumundaki etkisi ve olgun biyofilme müdahale etme kabiliyeti analiz edilmiştir. İnhibisyonun değerlendirilmesi için, mikroorganizmalar 96 kuyulu düz tabanlı plakada 50 mg/L GO ile 24 saat temas ettirilmiştir. Biyofilm kütlesindeki en büyük azalma *S.aureus*'ta görülmüştür. Olgun biyofilmin 50 mg/L GO'ya maruz bırakılmasından sonra biyokütlenin azaldığı ve hücrelerin biyofilmden ayrıldığı sonucuna varılmıştır. Başka bir çalışmada GO, membranı çevreleyen ince bir GO tabakası oluşturarak, basit bir elektrospreyleme yöntemiyle polikarbonat üretan membran üzerinde biriktirilmiştir. Gram pozitif *S. aureus* ve Gram negatif *Pseudomonas aeruginos*a'nın polikarbonat üretan ve membranı çevreleyen GO yüzeylerine yapışması ölçülmüş, sırasıyla %85,5 ve %63,5'luk bir azalma saptanmıştır [140].

İmplantın etrafındaki bakteriyel enfeksiyon ve buna bağlı biyofilm oluşumu, implantın başarısız olmasına neden olan ve implantın çıkarılması için yeni bir cerrahi operasyon gerektiren etkenlerden biridir. GO'nun bu çalışmaların gösterdiği potansiyel antibakteriyel ve anti-biyofilm özelliği, bu malzemenin ortopedik kullanımının ameliyat sonrası başarı açısından çok iyi bir seçim olduğunu kanıtlamaktadır.

Grafen üretiminde mekanik eksfoliasyon [141], epitaksiyal büyüme [142], grafen oksit yapısal restorasyonu ve küçük organik moleküllerden tabandan sentezini içeren çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu çeşitli yöntemler arasında yüksek

miktarlarda ve hızlı üretime olanak sağlaması nedeniyle en çok tercih edilen yöntem kimyasal oksidasyon yöntemidir. Grafen üretmek için kullanılan kimyasal yöntemlerin neredeyse tamamı aynı işlem sırasına sahiptir. İlk olarak, grafen tabakaları arasındaki uzaklık, grafen tabakalarının yüzeylerinde hidroksil grupları ve kenarlarda karboksil grupları oluşturularak arttırılır. İkinci aşama olarak, oksijen fonksiyonel grupları yoluyla grafen tabakaları arasındaki boşluğun arttırılmasıyla, indirgeme işlemi sırasında grafen tabakalarının birbirinden daha kolay ayrılması sağlanır. Başarılı bir oksidasyon işlemi sonucunda O/C oranının yüksek olması beklenir ve indirgeme işleminden sonra bu O/C oranı önemli ölçüde azalır. Kimyasal oksidasyon yöntemleri içerisinde en çok bilinen yöntem modifiye Hummers yöntemidir. Hummers yöntemi 1958 yılında daha güvenli, hızlı ve verimli bir şekilde grafit oksit üretmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Yöntem geliştirilmeden önce, grafitin oksidasyonu işlemi sülfürik asit ve nirtik asit gibi kuvvetli asitlerle yapılmaktaydı. Ancak bu kuvetli asitlerin tehlikeli olması nedeniyle farklı bir yöntemin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Staudenmaier-Hoffman-Hamdi yönteminde, potasyum klorat kullanımıyla grafen oksit sentezi gerçekleştirilmiştir [143]. Fakat bu yöntemin klasik Hummers yöntemine göre daha fazla tehlikeye sahip olduğu görülmüştür. William S. Hummers ve Richard E. Offeman, yukarıdaki yöntemlere alternatif olarak kendi yöntemlerini oluşturmuşlardır. Yaklaşımları, konsantre bir asit çözeltisine ilave edilen grafitin sodyum nitrat, potasyum permanganat gibi kuvvetli oksitleyici ajanlar ile oksitlenmesini sağlamaktır. Geliştirmiş oldukları bu yöntemle birlikte Staudenmaier-Offeman yönteminde bulunan 98°C'nin üzerine çıkma zorunluluğu ve bundan kaynaklı patlama riski ortadan kaldırılmıştır [144]. Şekil 2.10, grafit levhalarından grafen oksit sentezini göstermektedir.



Şekil 2.10 Grafit levhalarından grafen oksit sentezi [145]

2.6 Serotonin

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), sinirsel aktiviteyi ve nöropsikolojik süreçleri modüle eden bir nörotransmiterdir. Serotonin reseptörlerini hedef alan ilaçların psikiyatri ve nörolojide sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, çoğu serotonin merkezi sinir sisteminin dışında bulunur ve neredeyse 15 serotonin reseptörünün tamamı beyin içinde olduğu kadar dışında da eksprese edilir [146].

Serotonin bir aminoasit olan triptofandan sentezlenir. Triptofan bir indol halkası ve bir karboksil-amid yan zincirini içerir. Bununla birlikte indol halkası hem bir benzen halkasından hem de merkezi bir nitrojene sahip ikincil bir pentan halkasından oluşması bakımından benzersizdir. İndol halkası ve dolayısıyla triptofanın kendisi ışığı absorbe edebilir. Bitkilerde bulunan triptofan bazı reseptör proteinleri üretir. Bu proteinler ışığı kullanarak önemli biyolojik moleküllerin üretiminde rol alır [147]. Klorofil, içeriğindeki triptofandan dolayı ışığı yakalayabilir. Bunun sonucunda ATP, indirgenmiş kofaktörler (NADH) ve oksijen üretilir. Triptofan başka bir amino asit ile yer değiştirirse tüm bu süreç bloke edilir [148]. Ayrıca bitkilerde triptofan, indol-asetik asit yapmak için amid grubunu

çıkararak tropik faktör oksine dönüştürür. Oksin, hücre şeklindeki değişiklikleri uyarır ve bitkiler için hareket sağlar. Bitkilerin yapraklarının güneşe dönük olmasını sağlar. Böylece triptofan, ışık enerjisini yakalayıp emilimi maksimum düzeye çıkarmak için bitkinin konumlandırılmasında işlev görür [149].

Uzun yıllardır yapılan çalışmalarla, serotoninin morfoloji üzerindeki etkileri yaygın olarak bilinmektedir. 50 yıldan fazladır, serotoninin kan damarlarını daralttığı ve iskelet kasında, trombositlerde, endotel hücreler ve fibroblastlarda şekil değişikliklerini indüklediği kabul edilmiştir. Serotonin; büyük ölçüde serotonin üretebilen, salabilen ve yeniden alabilen mast hücrelerinden meydana gelir. Salınan serotonin daha sonra kemotaktik olarak hareket edebilir, vasküler geçirgenliği artırabilir, vazodilatasyona ve düz kas spazmına neden olabilir [149].

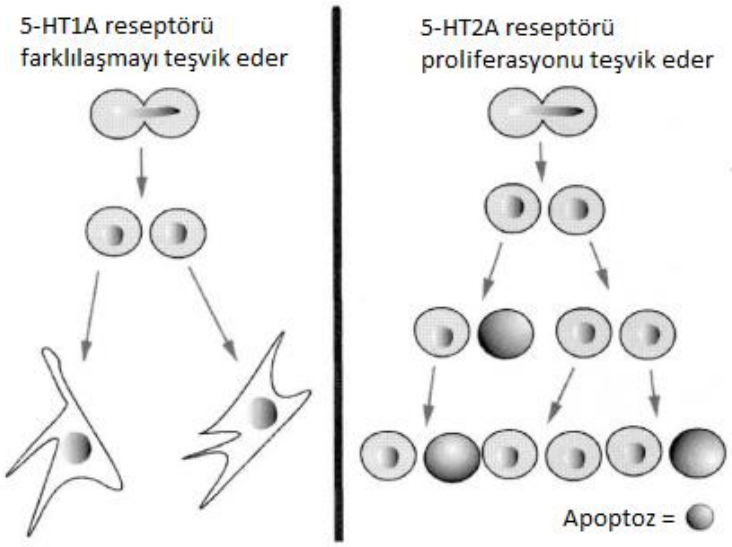
Morfoloji üzerindeki etkilerine ek olarak, serotoninin hücre proliferasyonunda da önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Kültürlenmiş sıçan pulmoner arter düz kas hücrelerinde, serotonin DNA sentezini indükler ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB'nin mitojenik etkisini güçlendirir [150].

Yetişkin dentat girusta yapılan bir çalışma, hücre proliferasyonunun östrojen uyarımına serotoninin aracılık ettiğini göstermektedir. Serotonin ve östrojen, öğrenme ve hafıza mekanizmalarını etkiler ve bu iki mekanizma arasındaki etkileşimler, duygudurum ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynama potansiyeline sahiptir [151].

Serotoninin hücre morfolojisini değiştirmede ve proliferasyonunu uyarmada kullandığı mekanizma, doğrudan hücre iskeletini hedef alabilir. Hücre iskeletini oluşturan ana bileşen olan mikrotübüller, hücrelere şeklini verir. Mikrotübüller, uzun tübülin polimerlerinden oluşur [152]. 1975'te Tan ve Lagnado serotonin ve ilgili indol alkaloidlerinin beyin mikrotübüler proteinleri üzerindeki etkilerini bulmuşlardır [153]. Sonraki çalışmalarda, serotoninin endotel hücreleri tarafından alındığı ve stres liflerine bağlandığı keşfedilmiştir [154]. Bu sırada serotonin aktin polimerizasyonunu indükler ve hücre iskeletindeki değişikliklere sebep olur. Serotonin mikrotübüllerin ve mikrofilamentlerin düzenlenmesinde ve korunmasında doğrudan bir etkiye sahiptir. Serotonin tarafından gerçekleştirilen hücre iskeleti stabilitesindeki değişikliklere kısmen mikrotübül ilişkili proteinler

(MAP'lar) eşlik eder. MAP'lar, tübülin polimerlerine bağlanarak ve depolimerizasyonlarını inhibe ederek hücre iskeletini stabilize eder. Farklılaşmamış insan nöroblastom hücrelerinde yapılan bir çalışmada, yüksek konsantrasyonlu serotonin (50 μM) MAP'lardan biri olan sitoplazmik tau proteininin azalmasına sebep olurken, düşük konsantrasyonlu serotonin ise (50 nM) bu proteinin artması yönünde bir etki göstermektedir. Bu entegre olaylar, çoklu reseptörlerin aksiyonuyla gerçekleşmektedir [155].

Beyinde serotonin, en az 14 farklı protein içeren yedi reseptör ailesi ile etkileşime sahiptir. Bunlardan iki reseptör, çeşitli hücresel ve davranışsal süreçlerde karşıt işlevlere sahip olan 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörleridir. 5-HT1A reseptörünün aracılık ettiği aksiyonlar hücre içi stabilizasyonu sağlar, hücre farklılaşmasının ve proliferasyonunun durmasıyla sonuçlanır. 5-HT1A reseptörünü içeren ilaçların klinik olarak beyin aktivitesini azaltıcı etkisi mevcuttur. Bu ilaçlar anksiyolitik olarak çalışır. 5-HT2A reseptörünün aracılık ettiği aksiyonlar, hücre içi stabilizasyonu bozar. Hücre proliferasyonu, sinaptogenez ve apoptoza sebep olur. 5-HT2A reseptör ilaçları klinik olarak halüsinasyonlar üretir. 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörleri ile hücre iskeleti arasındaki dinamik etkileşimler, beyin bozukluklarının etiyolojisine ilişkin önemli bilgiler ve tedavileri için yeni stratejiler sağlayabilir [149]. 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörlerinin osteoblast hücrelerinin proliferasyonundaki etkileri Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



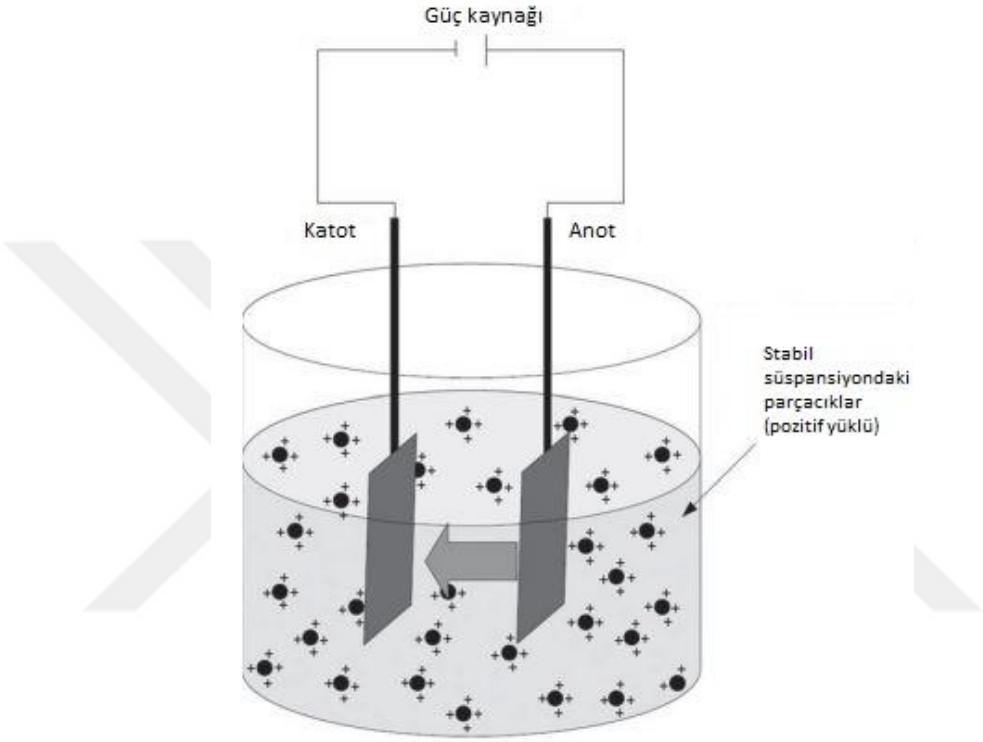
Şekil 2.11 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörlerinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri [149]

5-HT reseptörleri olan 5-HT2A, 5-HT2B ve 5-HT2C, serotonin reseptörlerinin bir alt ailesine aittir. Bunların amino asit ve mRNA dizileri, insan ve birçok diğer tür için mevcuttur. 5-HT2 reseptörlerinin sinir, kas ve endotel dokuları üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar ile osteositler, osteoblastlar ve periosteal fibroblastlarda 5-HT2B reseptörü mRNA'sının eksprese edildiği keşfedilmiştir. Bazı farmakolojik çalışmalar, 5-HT2B reseptörünün işgalinin periost fibroblastlarının proliferasyonunu indüklediği sonucuna varmıştır. Tavukta 5-HT2B reseptör mRNA'sının en yüksek ekspresyonunu gösteren osteositler ve daha az ölçüde ekspresyon gösteren osteoblastlar, kemiğin mekanik kullanımına adaptasyonunda rol oynayan mekanosensör hücreler olarak kabul edilir. Nitrik oksit, osteositlerin ve osteoblastların mekanik uyarımı sonucu salınan bir sinyal molekülüdür. Tercihen 5-HT2 reseptörlerine bağlanan serotonin analoğu α-metil-5-HT, mekanik olarak uyarılan fare osteoblastları aracılığıyla nitrik oksit salınımını azaltmıştır. Bu sonuçlar, serotoninin kemik metabolizmasında ve mekanoregülasyonunda yer aldığına dair kanıt oluşturmaktadır. Osteoblast öncü hücrelerinin proliferasyonunun serotonin tarafından uyarılması ve desteklenmesi, kemiğin yeniden şekillenmesinde ve kırık kemik onarımında serotoninin kullanımına olanak sağlayabilir [156].

2.7 Elektroforetik Biriktirme (EPD)

EPD fonksiyonel olarak derecelendirilmiş malzemelerin [157], hibrit kompozit malzemelerin [158, 159], lamine edilmiş nanoseramiklerin [160], fonksiyonel ve nanoyapılı filmler ve kaplamaların [161] üretimi için umut vaat eden yeni bir yöntemdir. Son birkaç yıldır yeni endüstriyel uygulamalarda diğer fabrikasyon yöntemlerine kıyasla sahip olduğu avantajlardan dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Gözeneksiz, istenilen kalınlıkta ve yüksek saflıkta kaplama olanağı sağlaması, hızlı, basit, düşük maliyetli, az riskli ve çevre dostu olması, mikroyapı, stokiyometri, makroskopik ve mikroskopik boyutlar ve özellikleri üzerinde kontrol edilebilir olması EPD'yi diğer yöntemlere göre avantajlı kılmaktadır [32, 33]. EPD, temelde ilk adımda sıvı bir ortamda asılı kalan elektrostatik yüklü partiküllerin elektrik alanın etkisi altında zıt yüklü bir elektroda göç etmesi ve ikinci adımda yüklü partiküllerin elektrot üzerine birikmesi sonucunda nispeten yoğun, homojen paketlenmiş/bağlanmış bir tabakanın oluşturulduğu iki adımlı bir kaplama

işlemidir (Şekil 2.12). Bu yöntemde, nano desteğin hacim fraksiyonunu arttırmak mümkündür. Yöntem, elektriksel olarak iletken herhangi bir yüzey üzerinde mikronlardan nanometre ölçeğine kadar geniş bir dizide malzeme uygulamak için uygundur [103]. Hidrofobik bir kaplama sağlayarak metalleri oksidasyon ve korozyondan koruması ve nano yapılı filmlerin ve kaplamaların üretimi olanağı sağlaması da EPD'ye olan ilgiyi arttırmaktadır.



Şekil 2.12 Süspansiyonda pozitif yüklü partiküllerin negatif elektroda hareket ettiğini gösteren elektroforetik biriktirme (EPD) hücresi [162]

GO'nun kolloidal süspansiyonlarından metalik substratlar üzerinde elektroforetik birikimi uygun bir prosedür olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni, GO'da bazal düzlem fonksiyonel grupların varlığının, kolloidal süspansiyon yapmak için polar çözücüler içinde homojen dağılım oluşumuna yardımcı olabilmesi ve bundan dolayı grafen oksitin iletken altlık malzemeler üzerine biriktirilebilmesidir [163]. EPD'nin metal yüzeyinde korozyona dirençli grafen oksit kaplamalar üretmek için etkili yöntemlerden birisi olduğu bilinmektedir. Bir çalışmada, GO nano levhalar EPD yöntemi kullanılarak iki boyutlu (2D) çelik (Fe) plakalar ve üç boyutlu (3D) demir çubukların yüzeyine kaplanmıştır. Kaplanmış GO nano levhaların lateral boyutunun artmasıyla birlikte, Fe plaka yüzeyinde daha pürüzsüz ve daha kalın

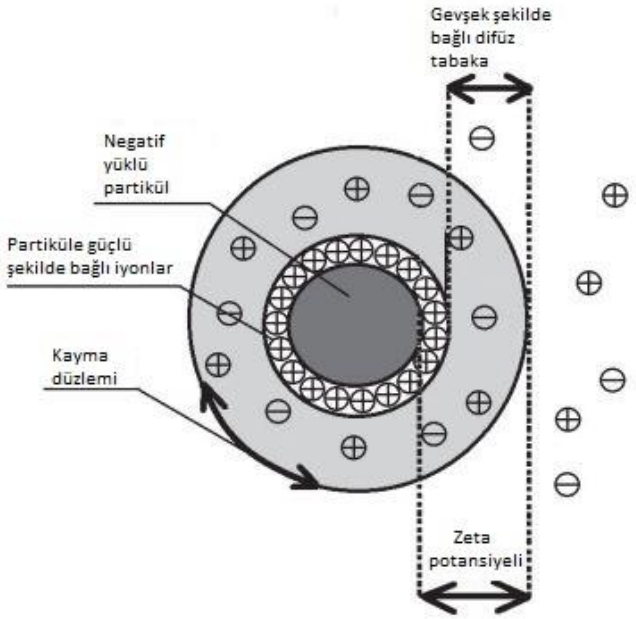
bir kaplama tabakası oluştuğu sonucuna varılmıştır. Bu da malzemenin korozyon direncini arttırmıştır. GO'lar EPD ekipmanı kullanılarak metal yüzeylerine başarıyla kaplanmıştır [164].

Başka bir çalışmada, biyolojik olarak parçalanabilen AZ31B magnezyum alaşımı üzerine EPD ile GO kaplanmıştır. Voltaj ve zaman gibi EPD parametreleri, tek tip GO kaplamaları elde etmek için optimize edilmiştir. Ringer çözeltisinde gerçekleştirilen çalışmada GO kaplamaların, kaplamasız Mg alaşımına kıyasla korozyon direncini 16 kat arttırdığı sonucuna varılmıştır [165].

2.7.1 EPD Parametreleri

2.7.1.1 Sıvı Ortamın Tipi ve Kolloidal Süspansiyonun Özellikleri

Elektroforetik biriktirme işleminin temel parametrelerinden biri, kullanılan elektrolitin türü, bunun zeta potansiyeli ve pH değeri gibi özellikleridir. Yöntemin etkinliği öncelikle kolloidal süspansiyonun özelliklerine bağlıdır. Zeta potansiyeli, yüklü partikülün içinde bulunduğu sıvı ile etkileşimiyle ilgilidir. Sıvı bir ortamdaki partiküllerin yükü hakkında bilgi verir. Şekil 2.13, yüzey yükü negatif olan bir partikülün Zeta potansiyelini göstermektedir. Zeta potansiyeli, EPD işlemi sırasında kullanılan süspansiyonun çok önemli bir özelliği olan süspansiyon stabilitesi ile yakından ilgilidir. Varsayımlara göre, sıvı tabakada iki kısım ayırt edilebilir. Birincisi, Stern tabakası olarak adlandırılan ve partikülün işaretine zıt yüklü sıvı iyonların yapıştığı yüzeye en yakın bölgedir. Bu bölge hareketsiz olarak kabul edilir ve absorbe edilmiş iyonları içerebilir. Dış bölgede bu etkileşimler çok daha zayıftır. Bu kısma difüz katman denir. Elektriksel kuvvetlerin ve rastgele termal hareketin etkisiyle iyonların difüzyonu mümkündür. Bu varsayım, her iyonun etrafında oluşan bir elektrik çift katman kavramını ortaya koymaktadır. Çözeltinin potansiyeli sıfıra eşit olarak tanımlanırsa, zeta potansiyeli olan bir elektro kinetik potansiyel, kayma düzlemindeki potansiyel olur [166].



Şekil 2.13 Yüzey yükü negatif olan bir partikülün zeta potansiyeli [166]

Biriktirilecek partikülleri içeren süspansiyon, partiküllerin çözelti içinde gerekli dağılımını sağlayan zeta potansiyelini sağlamalıdır. Düşük düzeyde dispersiyon, kaplamanın zayıf yapışması ve düzensiz morfoloji ile sonuçlanan aglomeraların oluşumuna yol açar. Zeta potansiyel değerleri tipik olarak -100 mV ila +100 mV arasındadır. Süspansiyon, zeta potansiyeli -30 mV'den düşük veya +30 mV'den büyük olduğunda yüksek derecede stabiliteye sahiptir. Zeta potansiyel eğrisi, pH'ın bir fonksiyonu olarak sunulabilir [167].

2.7.1.2 Elektriksel Parametreler

Elektroforetik biriktirme, yalnızca elektrolit süspansiyonuna bir elektrik alanı uygulandığında meydana gelir. Biriktirme, bir elektrotun kaplanacak substrat olduğu bir elektrokimyasal hücrede gerçekleşir. Alanın iyonun elektrik yükünü etkilediği kuvvet, elektrotlara uygulanan voltajla orantılı olan elektrik alan gücüyle doğru orantılıdır. Uygulanan voltaj U, elektrik alan gücü I ve elektrolitin ortaya çıkan elektrik direnci R arasındaki ilişki, Ohm kanunu ile tanımlanır [168].

Daha fazla elektrik alanı uygulandığında kaplama daha hızlı biriktirilmesine rağmen, filmin kalitesi düşebilir. Orta düzeyde uygulanan elektrik alanında daha düzgün filmler biriktirilebilirken, nispeten yüksek elektrik alanları uygulanırsa film kalitesi bozulur. Elektrot üzerinde malzemenin kaplanması kinetik bir

fenomendir. Bu nedenle partiküllerin elektrot üzerinde birikme hızı kaplamanın yoğunluk davranışlarını etkiler. Elektrik alanın arttırılması süspansiyonda türbülans oluşumuna sebebiyet verebilir. Kaplama, ortamdaki türbülansın sebep olduğu akıntılardan dolayı bozulabilir. Ayrıca yüksek voltaj değerlerinde partiküllerin hareketi o kadar hızlı olabilir ki, beklenen kıvamda bir kaplama oluşmaz [168].

2.7.1.3 Biriktirme Süresi

Elektroforetik biriktirme işleminin temel parametresi biriktirme süresidir. Genel olarak, artan işlem süresi ile biriken kaplama kalınlığı artar, ancak daha da önemlisi, mekanik özellikleri de aynı anda azalır. Elektroforetik biriktirme işleminin süresi, elektriksel parametrelere ek olarak, üretilen yapıların morfolojisini ve mekanik özelliklerini etkileyen temel değişkendir [169].

Daha uzun bir işlem süresi ile daha fazla aglomera ve küçük çatlaklar içeren daha az homojen bir kaplama elde edilir. Birikmiş kaplamanın kalınlığının ve kütlesinin, yalnızca biriktirmenin ilk zamanında arttığı ve biriktirme hızının, biriktirme süresinin doğrusal bir fonksiyonu olduğu açıkça ifade edilebilir. Ancak daha uzun süre boyunca, biriktirme hızı düşer ve çok uzun biriktirme süresinde bir platoya ulaşır [169].

2.7.1.4 Partikül Boyutu ve Şekli

Elektroforetik biriktirme ile biriktirilecek partiküllerin boyutu, özellikle partiküllerin işlem sırasında süspansiyonda kalacak kadar ince olması gerektiğinden çok önemlidir. Elektroforez işlemini gerçekleştirmek için kullanılan toz tanelerinin boyutu ve şekli, elektrolit içindeki partiküllerin hareketliliğini doğrudan etkiler, aynı zamanda biriken kaplamanın kalınlığını ve süspansiyonun zeta potansiyelini de etkiler [170].

Nanometrik tozların kullanımı, en yüksek homojenliğe sahip kaplamanın elde edilmesini sağlayarak, çatlak ve istenmeyen por riskini en aza indirir. Nanotozlar kullanılarak elde edilen kaplamanın pürüzlülüğü daha düşüktür. En çok tercih edilen toz parçacık şekli küreseldir. Böyle bir tozdan biriktirilen kaplama, en yüksek yoğunluğu ve homojenliği, ayrıca en yüksek sertliği ve alt tabakaya yapışmayı gösterir [170].

2.8 Biyomimetik ve Yapay Vücut Sıvısı (SBF)

Genel olarak biyomimetik, doğada var olan yöntem ve sistemlerin teknoloji ve mühendisliğe uygulanmasıdır. Özellikle kemik dokusu mühendisliğinde dikkat çeken alanlardan birisi olarak bilinmektedir [171].

Biyomimetik yöntem, metalik biyomalzemelerden üretilen implantların insan vücut koşullarını taklit etmek amacıyla fizyolojik sıcaklık ve pH'ta SBF'ye daldırılmasına dayanmaktadır. Dört ana avantajı vardır: (1) düşük sıcaklıkta bir işlem olması nedeniyle ısıya duyarlı herhangi bir alt tabakaya (polimerler dahil) uygulanabilir; (2) yüksek biyoaktiviteye ve iyi emilim özelliklerine sahip kemik benzeri apatit kristalleri oluşturulabilir; (3) gözenekli veya karmaşık implant geometrileri üzerinde bile biriktirilebilir ve (4) kemik büyümesini uyarıcı faktörleri içerebilir [172].

Biyomimetik apatit kaplama yoluyla, esas olarak insan kan plazmasının inorganik bileşimini, pH'ını ve sıcaklığını taklit eden SBF'ye implantları daldırarak kemik mineralizasyon süreci taklit edilir [173]. SBF, insan kan plazmasının sadece inorganik kısmını içermekte olup, protein, glikoz, vitamin, hormon vb. organik kısımları içermemektedir.

Kokubo tarafından SBF kalsifiye edici çözelti için önerilen ilk formülasyondan bu yana, birkaç farklı bileşim önerilmiştir [174]. Kokubo ve diğerleri tarafından kullanılan orijinal SBF'nin insan kan plazmasında bulunan SO_4^{-2} iyonlarından yoksun olduğu söylenebilir. Bu bileşim daha sonra c-SBF olarak düzenlenmiş ve birçok araştırmacı tarafından 'SBF' adıyla kullanılmıştır. Bununla birlikte, düzeltilmiş c-SBF, insan kan plazması ile karşılaştırıldığında hala Cl^- iyonu açısından zengin ve HCO^{-3} iyonu açısından zayıftır [175]. Oyane ve arkadaşları bu farkı düzeltmeye çalışmıştır. İyon konsantrasyonları kan plazmasınınkine eşit olan r-SBF ve i-SBF çözeltileri hazırlanmıştır. İyon konsantrasyonu kan plazmasınınkine eşit ancak HCO^{-3} iyon konsantrasyonu kan plazmasınınkinden farklı olan m-SBF çözeltisi geliştirilmiştir [170]. R-SBF ve i-SBF'nin, bu SBF'lerden apatit ve kalsiti çökeltmedeki güçlü eğilimlerinden dolayı uzun vadeli stabilitelerinin iyi olmadığı bilinmektedir [173,176].

2004 yılında Takadama ve ark., HCO^{-3} iyon konsantrasyonunu c-SBF'ninkine eşit bırakarak, yalnızca Cl^{-} iyon konsantrasyonunu insan kan plazması düzeyine indirdikleri yeni geliştirilmiş bir SBF'yi (n-SBF) önermişlerdir [177]. Bu geliştirilmiş SBF, stabilitesi ve sentetik malzemeler üzerinde apatit oluşumunun tekrarlanabilirliği açısından yuvarlak robin testi yoluyla c-SBF ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, c-SBF'nin uzun vadeli stabilite ve apatit oluşumunun tekrarlanabilirliği açısından n-SBF'den farklı olmadığı sonucuna varılmıştır [175, 177].

Daha önceki başlıklarda belirtildiği gibi, titanyum ve titanyum bazlı alaşımların yüzeylerinde oluşan pasif ince bir TiO_2 tabakası sayesinde genellikle kimyasal olarak kararlı oldukları bilinmektedir [178]. Kim ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, TiO_2 tabakasının bile sodyum titanat hidrojel tabakası oluşumu sürecinde sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile reaksiyona girebileceği bulunmuştur [179]. Çalışmada Ti ve Ti alaşımları, biyoaktiviteyi geliştirmek için alkali işleme ve ardından ısıl işleme tabi tutulmuştur.

Titanyum ve alaşımları alkali çözeltiye içerisindeyken, yüzeylerinde alkali iyonları barındıran hidratlı bir titanyum oksit hidrojel tabakası oluşur [180]. Hidrojel tabakası ısıl işlem ile kurutulur. Kararlı bir alkali titanat tabakası oluşturma sürecinde yoğunlaştırılır [179]. Metal ve alaşımları, 60°C sıcaklıkta 24 saat boyunca 5 M NaOH çözeltisine daldırıldığında, yüzeyinde sodyum titanat hidrojel tabakası oluşturulabilir [181]. NaOH çözeltisi ve ısıl işleme maruz kalmış metal SBF'ye daldırıldığında, iyon değişimiyle SBF içerisindeki H_3O^{-} iyonları Na^{+} iyonlarını serbest bırakır. Sonuç olarak metal yüzeyinde Ti–OH grupları oluşur [180]. Bu gruplar, kalsiyum titanat oluşturmak için SBF içerisindeki Ca^{+2} iyonlarıyla bir araya gelir. Oluşan kalsiyum titanat SBF içerisindeki fosfat iyonlarıyla bir araya gelerek CaP'yi oluşturur. Bunda, fonksiyonel grupların SBF içerisindeki iyonlar ile elektrostatik olarak etkileşiminin etken olduğu söylenebilir. Oluşan Ti-OH grupları negatif yüklü olup sıvıdaki pozitif yüklü Ca^{+2} iyonlarıyla elektrostatik etkileşim sonucu bir araya gelir ve kalsiyum titanat oluşur. Bu iyonlar yüzeyde birikmeye başladıkça, yüzey pozitif yüklenir. Bunun sonucunda pozitif yükle yüklenmiş yüzey negatif yüklü fosfat iyonları ile bir araya gelerek CaP oluşturulur [182]. Apatit çekirdekleri oluştuktan sonra, çevredeki sıvıdan

kalsiyum ve fosfat iyonlarını alarak kendiliğinden büyürler. Apatit oluşumunun devam edebilmesi için kalsiyum ve fosfat iyonlarının ortamda bulunması gereklidir. Bu nedenle işlem sırasında SBF ikmali sağlanmalıdır [183].

3
MATERYAL-METOT

3.1 Substrat Yüzeylerinin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan TNTZ alaşım malzemesi, 25 mm çapında ve 50 mm uzunluğunda sıcak dövme çubuktur. Kimyasal bileşimi Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 TNTZ'nin kimyasal bileşimi (% ağırlık)

Nb	Ta	Zr	C	N	O	H	Fe	Ti
28,6	12,3	4,75	0,02	0,01	0,09	0,04	0,22	bal.

Metal yüzeylerin yapısı, kaplamanın özelliklerini doğrudan etkiler. Bu nedenle kaplanacak her metalin yüzeyinin aynı işlemle hazırlanması önemlidir. Tel erezyon yöntemiyle 15 x 10 x 2 mm plakalar halinde kesilen Ti6Al7Nb ve TNTZ alaşımları, optimum kaplama için düzgün bir pürüzlülük elde etmek adına sırasıyla #400, #600, #800, #1000 ve #1200 tanecikli SiC (silisyum karbür) zımpara kağıtları ile polisajlanarak ön işleme tabi tutulmuştur. Son olarak yüzeyler 0,5 ve 1 μm elmas cila pastası ile parlatılıp, distile su ve etanol ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Parlatılmış numunelerin oksidasyonunu önlemek için kurutma işlemi bir vakumlu desikatörde gerçekleştirilmiştir. Kaplama işleminden önce numuneler 40˚C'de 15 dakika ultrasonik banyoda (ISOLAB, 621.05.001, Almanya) temizlenmiştir. Daha sonra 3 kez distile su ile yıkanıp kurutulmuştur.

3.2 Modifiye Hummers Yöntemi ile Grafen Oksit Sentezi

Modifiye Hummers yöntemine göre grafen oksit sentezinde, bir buz banyosunda 9:1 oranında konsantre edilen H_2SO_4 (MERCK, 7664-93-9, Almanya) /H_3PO_4 (%85) (MERCK, 7664-38-2, Almanya) karışımına (360:40 ml) öncelikle 3.0 g grafit (Graphene Supermarket, mesh size 300) yavaş yavaş ilave edilmiştir. Daha sonra grafitin tamamının asitle reaksiyona girmesi için soğuk ortamda manyetik

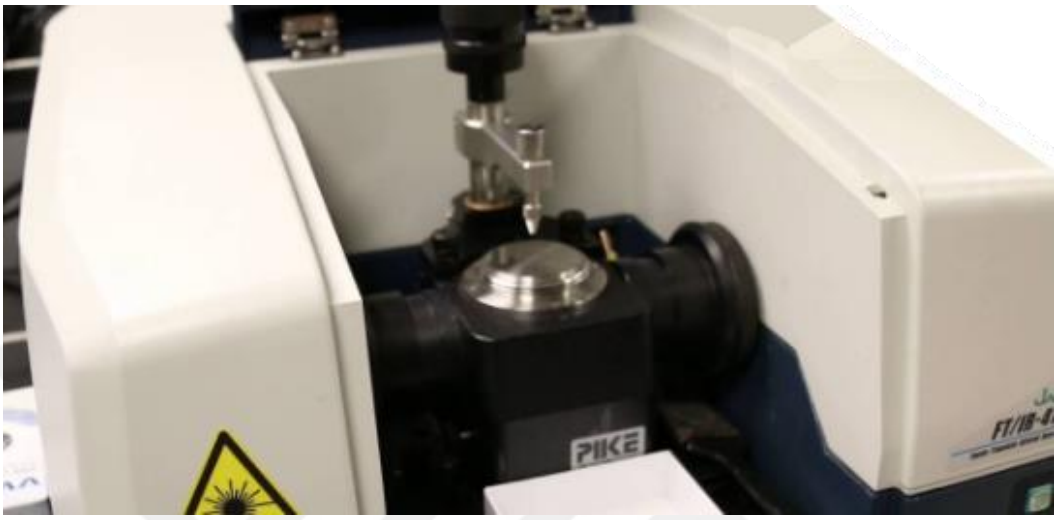
karıştırıcıda (HEIDOLPH, MR 3000, Almanya) yarım saat karıştırılmıştır. Banyo sıcaklığının 10°C'yi geçmemesi için 18,0 g $KMnO_4$ (ISOLAB, 7722-64-7, Almanya) yavaş yavaş ilave edilmiştir. Bu aşamada banyo sıcaklığının 10°C'yi geçmemesi kritiktir. $KMnO_4$ güçlü bir oksitleyici ajandır. Ani ekzotermik reaksiyonlar meydana getirebilir. $KMnO_4$ eklendikten sonra çözelti soğuk ortamda manyetik karıştırıcı kullanılarak yarım saat boyunca karıştırma işlemine tabi tutulmuştur. Yarım saat sonra çözelti, reaksiyonun gerçekleşmesi için 50°C'ye ısıtılmıştır. Isıtılan çözelti, sabit sıcaklıkta 12 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra karışım oda sıcaklığına soğutulmuş ve 400 ml buz ve 3 ml H_2O_2 (%20'lik çözelti) (KIMPA, 7722-84-1, Türkiye) çözeltisi eklenmiştir. Karışım 3000 rpm'de 45 dakika boyunca santrifüjlenip (NÜVE, NF 800, TÜRKİYE) süpernatant dökülmüştür. Peletlerin yıkanması için santrifüj tüpleri 400 ml'e kadar saf su ile doldurulmuş ve 5000 rpm'de 45 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Daha sonra sırayla HCl (ISOLAB, 7647-01-0, Almanya) ile 3 kez, saf etanol (ISOLAB, 64-17-5, Almanya) ile 3 kez 5000 rpm'de 45'er dakika santrifüj yapılmıştır. Elde edilen GO (Şekil 3.1), 80°C'ye ayarlanmış etüvde (ELECTRO-MAG, M 420 P, Türkiye) gece boyunca vakum altında kurutulmuştur.



Şekil 3.1 Sentezlenen grafen oksit nanopartikülleri

3.3 Grafen Oksit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

GO nanopartiküllerinin bileşimini araştırmak için 900-3700 cm^{-1} aralığında Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (Perkin Elmer Spectrum 400, ATR) kullanılarak kimyasal karakterizasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (Perkin Elmer Spectrum 400, ATR)

GO nanopartiküllerinin morfolojisi, 200 kV'luk bir hızlandırıcı voltajında transmisyon elektron mikroskobu (TEM, JEOL 1220, JEM) kullanılarak gözlemlenmiştir.

Kristal yapısı Cu Kα radyasyonlarına (λ=1.54060 Å, 45 kV ve 40 mA) sahip tarama hızı 1°/dakikada 3° 49 ile 20° arası olan XRD (X-ray Diffraction; X' Pert PRO PANalytical equipment) ile karakterize edilmiştir.

Sentezlenen GO'nun moleküler yapısı ile ilgili bilgi edinmek için Raman Spektroskopisi gerçekleştirilmiştir. Raman ölçümleri, Renishaw InVia sistemi ile, 10 μW lazer gücüne sahip bir lazerin 532 nm hattı ile, 1 μm çapında bir noktadaki 50x objektif ile numune üzerinde merkezlenmiştir. Sinyal, 10 x 10 μm^2'lik bir alandan toplanmıştır.

3.4 GO+Ser Süspansiyonunun Hazırlanması

GO+Ser katkılı kaplama süspansiyonunu hazırlamak için, 2 mg GO 20 ml deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Bu karışımı homojen olarak elde etmek için ultrasonik banyo kullanılmıştır. Bu sayede nanopartiküller solüsyon içerisinde

dağıtılmıştır. GO karışımına 0,002 mg serotonin (Sigma-Aldrich Chemicals) eklenerek önce vorteks çalkalayıcıda 10 dakika karıştırıldıktan sonra ultrasonik banyoda 10 dakika çalkalanmıştır. Bu işlem sırasıyla bir kez daha tekrarlanmıştır. Sonuç olarak GO+Ser kaplama süspansiyonu hazırlanmıştır.

Kaplama malzemelerinin etkinliğini karşılaştırmak için GO öncü çözeltisi hazırlanmıştır.

3.5 Elektroforetik Biriktirme Yöntemiyle Substrat Yüzeylerinin Kaplanması

Kaplama işlemi, 2 elektrotlu sistemden oluşan bir elektrokimyasal hücrede DC Güç Kaynağı (UNI-T UTP3315TFL, ÇİN) kullanılarak EPD yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu (anot) kaplanacak substratlardır. Karşıt elektrot (katot) çalışma elektrodunun yüzey alanından daha büyük bir yüzey alanına sahip saf titanyum bir plakadır. Elektrotlar hazırlanan kaplama çözeltisinin bulunduğu hücrenin içine 1 cm arayla paralel olarak, alaşımların 10 mm'lik kısımları çözelti içerisinde kalacak şekilde daldırılmıştır. Kaplama, 3 dakikalık biriktirme süresinde 10 V'luk sabit bir voltajda gerçekleştirilmiştir. Kaplanmış substratlar çatlamayı ve oksidasyonu önlemek için desikatörde kurutulmuş ve ardından 20 dakika boyunca UV sterilizasyonuna maruz bırakılmıştır.

3.6 Elektrokimyasal Karakterizasyon (In Vitro Korozyon Testleri)

GO+Ser katkılı substratların yapay vücut sıvısında (SBF) elektrokimyasal korozyon performansını araştırmak için üç elektrotlu hücrede in vitro korozyon testleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kaplanmış ve kaplanmamış substratlara potansiyodinamik polarizasyon (PDS) testleri uygulanmıştır. SBF olarak HBSS (Hanks dengeli tuz çözeltisi) kullanılmıştır. 1 L SBF'nin hazırlanması için reaktifler Tablo 3.2'de verilmiştir.

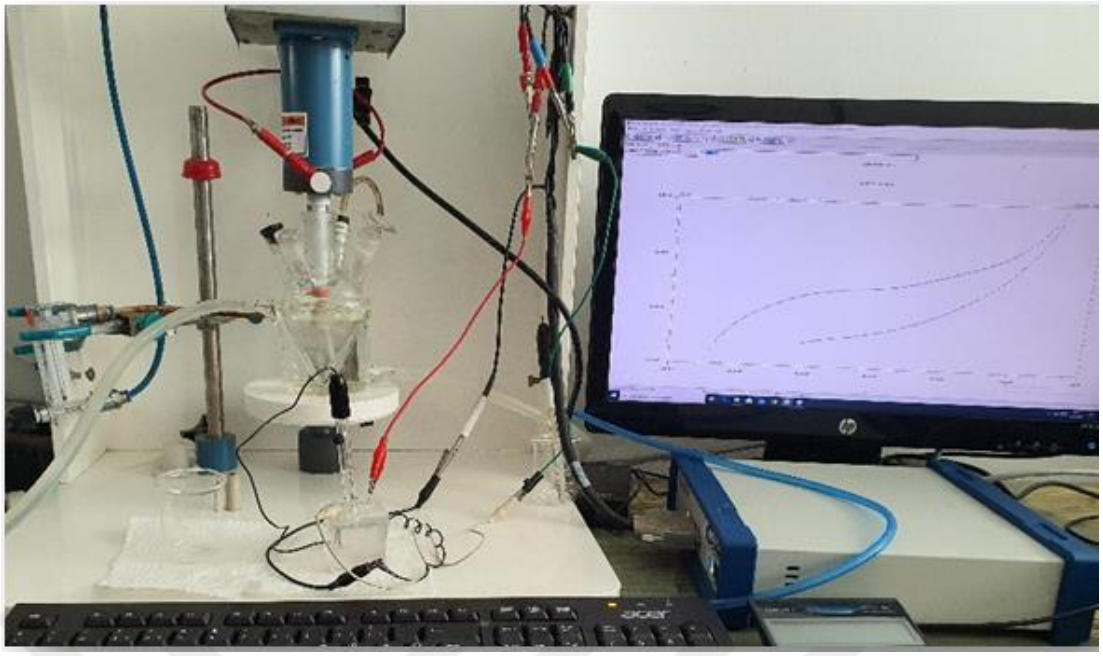
Tablo 3.2 1 L SBF hazırlamak için reaktif miktarları (F2129, 2017)

No	Reaktif	Miktar
1	NaCl	8 g

Tablo 3.2 1 L SBF hazırlamak için reaktif miktarları (F2129, 2017) (devamı)

2	KCl	400 mg
3	$CaCl_2$	140 mg
4	$MgSO_4$-$7H_2O$	100 mg
5	$MgCl_2$-$6H_2O$	100 mg
6	Na_2HPO_4-$2H_2O$	60 mg
7	KH_2PO_4	60 mg
8	D-Glikoz (Dekstroz)	1 g
9	$NaHCO_3$	350 mg

Elektrolitin pH'ı testten önce yaklaşık 7,3 (± 0,02) olarak ölçülmüştür. Sıcaklığı, testler boyunca insan vücudu koşullarını taklit etmek için 36,5 (± 0,5) °C'de tutulmuştur. Akım ve potansiyel (I - E) değerlerini ölçmek için bir galvanostat/potansiyostat test cihazı (Gamry, PCI14/750, ABD) kullanılmıştır. Şekil 3.3'te, kullanılan üç eletrotlu hücre ve potansiyostat görülmektedir. Referans ve karşıt elektrotlar olarak sırasıyla Ag/AgCl ve Pt teli kullanılmıştır. PDS taramasına başlamadan önce, numunelerin açık devre potansiyeli (E_{ocp}) kararlı hale ulaşana kadar elektrolit içinde bekletilmiştir. Dengeye ulaştıktan sonra, -0,3 V'deki potansiyelden E_{ocp} değerine karşı dinamik olarak 1 $mV \cdot s^{-1}$ tarama hızı ile polarizasyon başlatılmış ve anodik potansiyel 2,0 V üzerindeki potansiyele ulaştığında durdurulmuştur. Test numunelerinin teste maruz kalan alanı yaklaşık 0,25 cm^2 olup, testlerden sonra tüm veriler yüzey alanı baz alınarak normalleştirilmiştir. Her bir numune 3 kere test edilmiştir. Sonuçlar, aynı koşullar altında kaplanmamış substratların sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.3 Üç elektrotlu hücre ve potansiyostat test cihazı

3.7 Islanabilirlik Testi (Temas Açısı Ölçümü)

Malzemelerin ıslanabilirliği, DSA 25 (Kruss GmbH, Hamburg, Almanya) gonyometresi kullanılarak statik temas açısı yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada ultra saf su (Polwater DL-100 deionizer, Labopol-Polwater, Krakow, Polonya) kullanılmıştır. Her malzeme türü gözlemlenen ıslanma davranışının tekrarlanabilirliğini sağlamak için üç kez test edilmiştir. Sonuçların ortalaması nihai sonuç olarak kabul edilmiştir.

3.8 Biyouyumluluk Değerlendirmesi

Biyouyumluluk değerlendirmesi için gerekli olan testler, kaplanmamış Ti6Al7Nb alaşımının korozyon direncinde artışa sebep olan GO ve GO+Ser kaplamalı Ti6AlNb numuneleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. GO ve GO+Ser kaplamalar, kaplanmamış TNTZ alaşımının korozyon direnci üzerinde olumsuz etkiye neden olduğu için kaplanmamış TNTZ, GO kaplamalı TNTZ ve GO+Ser kaplamalı TNTZ numuneleri biyouyumluluk değerlendirmesine dahil edilmemiştir. Kaplanmış ve kaplanmamış Ti6Al7Nb numunelerinin biyouyumluluğu, ATCC'den (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu) elde edilen normal insan fetal osteoblast hücre hattı (hFOB 1.19) kullanılarak in vitro koşullarda değerlendirilmiştir. HFOB 1.19 hücreleri, %10 FBS (PAA Laboratories), 300 μg/ml G418, 100 U/ml penisilin, 100

μg/ml streptomisin (Sigma-Aldrich Chemicals) ile desteklenmiş fenol kırmızısı içermeyen DMEM/Ham F12 ortamının (Sigma-Aldrich Chemicals) 1:1 karışımı içinde kültürlenmiştir ve %5 CO_2 ve %95 havadan oluşan nemli bir atmosferde 34°C'de muhafaza edilmiştir.

3.8.1 Hücre Canlılığı / Sitotoksisite Testi

GO kaplamalı ve GO+Ser kaplamalı alaşımların kantitatif sitotoksisitesini değerlendirmek için hFOB 1.19 hücreleri, 1,5 x 10^4 hücre/disk konsantrasyonunda 100 μl tam büyüme ortamı içinde 96 kuyulu plakaya yerleştirilen substratlar üzerine doğrudan ekilmiştir. Hücre kültürü deneylerine başlamadan önce, susbtrat yüzeyleri etilen oksit ile sterilize edilmiştir. Glass coverslip üzerinde kültürlenen hücreler kontrol görevi görmüştür. 34°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra hücre canlılığı, Hücre Sayım kiti-8 (Sigma-Aldrich Chemicals) kullanılarak WST-8 kolorimetrik test ile değerlendirilmiştir. Test, üretici protokolüne göre yapılmıştır. Test 3 kez çalıştırılıp, sonuçların ortalaması nihai sonuç olarak kabul edilmiştir. WST-8 testi ile mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi ölçülerek hücrenin metabolik aktivitesi değerlendirilir. Hücre canlılığı testinin sonuçları, kontrol hücreleri ile elde edilen OD değerlerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

WST-8 testi turuncu suda çözünür formazan boya ürettiğinden ve hücreler için toksik olmadığından, substratlar PBS tamponu ile nazikçe durulanmış ve malzemeler üzerinde kültürlenen hFOB 1.19 hücreleri Canlı/Ölü Hücre İkili Boyama Kiti (Sigma-Aldrich Chemicals) kullanılarak üretici protokolüne göre boyanmıştır. Daha sonra substratların sitotoksisitesi konfokal bir mikroskop (FV1000 ile donatılmış Olympus Fluoview) altında gözlem yoluyla kalitatif olarak incelenmiştir. Kit, yalnızca canlı hücreleri boyayan güçlü yeşil floresan sağlayan kalsein-AM boyası ve ölü hücrelerin çekirdeklerini boyayan kırmızı floresan veren propidyum iyodür (PI) boyası içerir.

3.8.2 Osteoblast Proliferasyon Hızının Belirlenmesi

GO kaplamalı ve GO+Ser kaplamalı alaşımların hücre çoğalma hızı, WST-8 testi kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Hücre kültürü deneylerine başlamadan önce, susbtrat yüzeyleri etilen oksit ile sterilize edilmiştir. HFOB 1.19

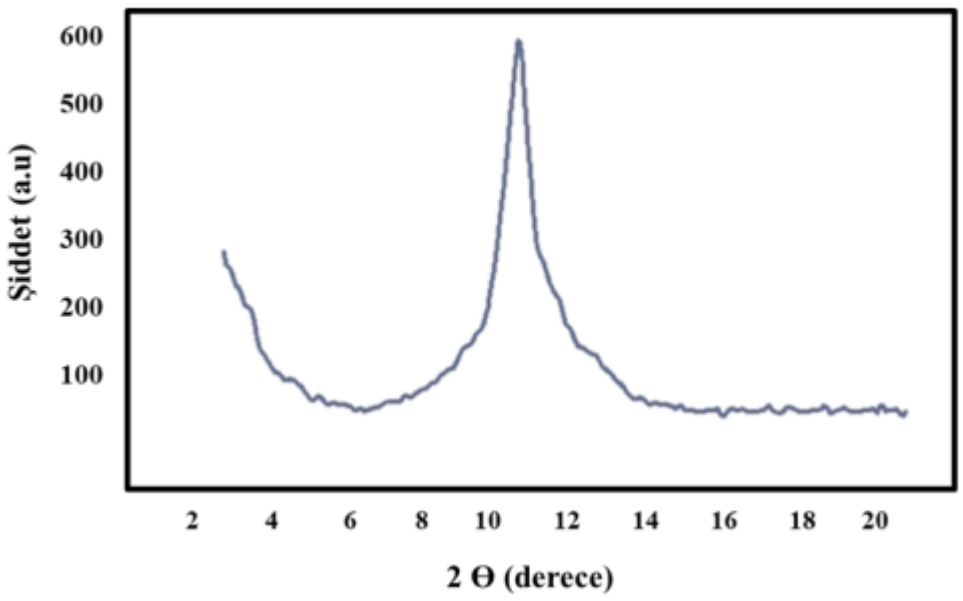
hücreleri, 3 x 10^3 hücre/disk konsantrasyonunda (çok düşük inokülasyon hücre yoğunluğu) 100 μl tam büyüme ortamı içinde 96 kuyulu plakaya yerleştirilen substratlar üzerine doğrudan ekilmiştir ve 34°C'de 3 gün kültüre alınmıştır. Glass coverslip üzerinde kültürlenen hücreler kontrol görevi görmüştür. Hücre ekiminden 1 ve 3 gün sonra substrat yüzeylerindeki toplam hücre sayısını belirlemek için WST-8 testi yapılmıştır. Osteoblast hücre sayısı, hFOB 1.19 normal insan fetal osteoblast hücrelerinin bilinen konsantrasyonu uygulanarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinin absorbans değeri kullanılarak belirlenmiştir. Test 3 kez çalıştırılıp, sonuçların ortalaması nihai sonuç olarak kabul edilmiştir.

WST-8 testi hücreler için toksik olmadığından, 3 günlük kültürden sonra substrat yüzeylerinde büyüyen hFOB 1.19 hücreleri, bazı modifikasyonlarla birlikte daha önce tarif edilen prosedüre göre osteoblast hücre iskeleti ve çekirdekleri çift floresan boyaması kullanılarak görselleştirilmiştir. Hücreler 10 dakika %3,7 formaldehit solüsyonunda sabitlenmiştir, %0,2 TritonX-100 (Sigma-Aldrich Chemicals) ile 15 dakika geçirgenleştirilmiş ve fallotoksin konjugatı (AlexaFluor635) kullanılarak 20 dakika boyanmıştır. Çekirdek boyama işlemi, 0,5 μg/ml DAPI boyası (Sigma-Aldrich Chemicals) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyde uygulanan AlexaFluor635 phalloidin boyası (Invitrogen), hücre iskeleti filamentlerinin kırmızı floresanını sağlayan F-aktin'i seçici olarak boyarken, DAPI mavi floresan ile hücre çekirdeklerini boyar. Boyanan osteoblast hücreleri konfokal mikroskop altında incelenmiştir.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Grafen Oksit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

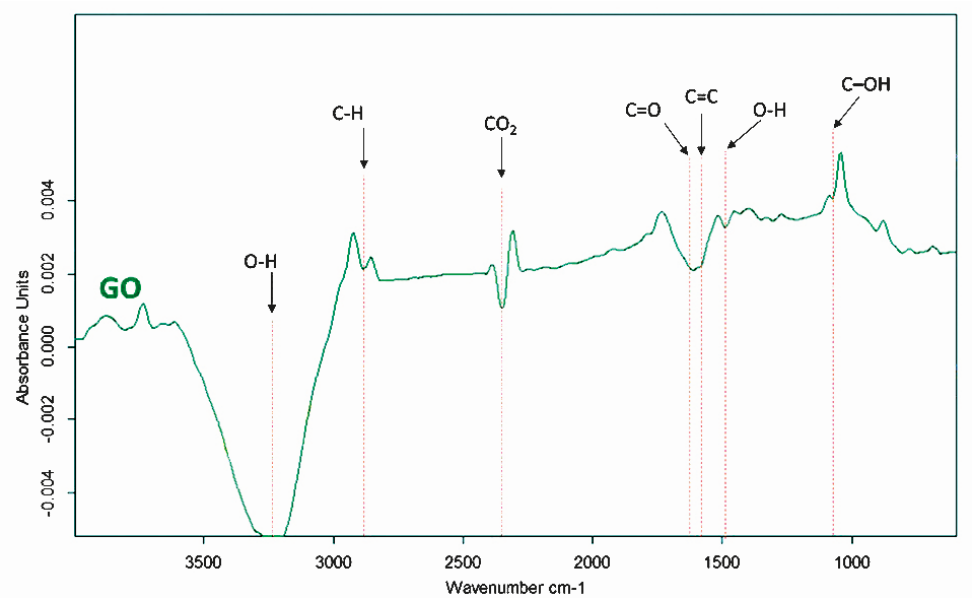
Sentezlenen GO'nun XRD analizi, malzemenin tabakaları arası değişikliği ve kristal özelliklerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. XRD spektroskopisindeki karakteristik pikler, grafit için 2θ=26,4636° ve GO için 2θ=10,5524° değerlerinde görülmektedir. Şekil 4.1'de grafitin yapısında var olan 26,4636° pikinin oksidasyon sonrasında GO'da görülmemesi, bunun yerine 10,5524° pikinin görülmesi literatürdeki sonuçlarla uyuşmakta ve GO yapısının düzgün olarak elde edildiğini göstermektedir [184].



Şekil 4.1 GO'nun XRD modeli

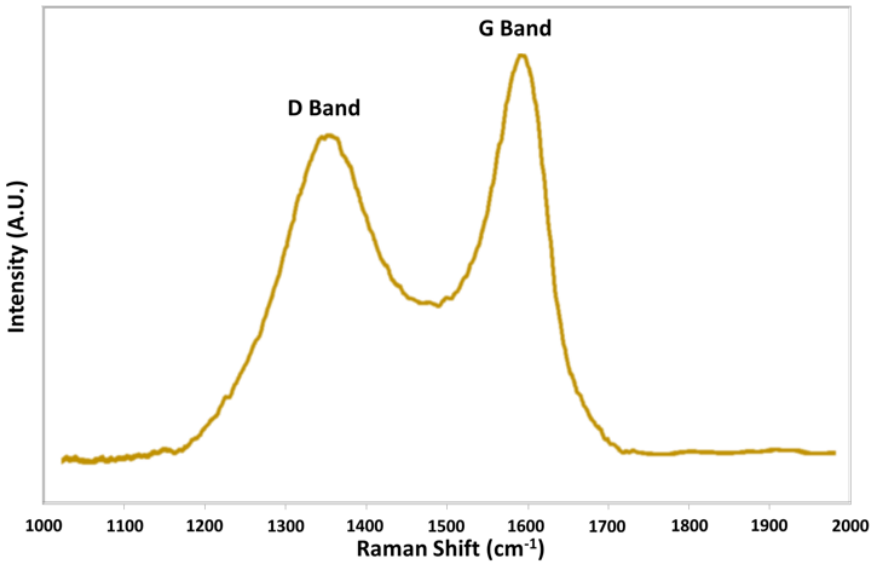
GO'nun FTIR spektrumu Şekil 4.2'de gösterilmektedir. GO üzerine adsorbe olan su moleküllerinin OH gruplarının gerilme ve bükülme titreşimine karşılık gelen yüksek frekans alanında 3000 - 3500 cm^{-1} arasında geniş bir pik oluşmuştur. Bu pik, GO'nun güçlü bir hidrofilik yapıya sahip olduğunu göstermektedir. 2920 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1}'deki absorpsiyon pikleri, CH_2'nin simetrik ve simetrik olmayan

gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Karboksil C=O grubu için karakteristik pikler 1730 cm^{-1}'de bulunmaktadır. Aromatik C=C grubuna ait pik 1630 cm^{-1}'de görülmektedir. 1200 cm^{-1}'deki absorpsiyon pikleri, karboksilik asidin C-O bağının gerilme titreşimini göstermektedir [185]. Bu, grafen oksidin yapısındaki oksijen içeren grupların varlığını ve grafitin oksitlendiğini göstermektedir. Polar gruplar, özellikle yüzey hidroksil grupları, grafit ve su molekülleri arasında hidrojen bağlarının oluşmasına neden olur. Bu durum grafen oksidin hidrofilik yapısını daha iyi açıklamaktadır.



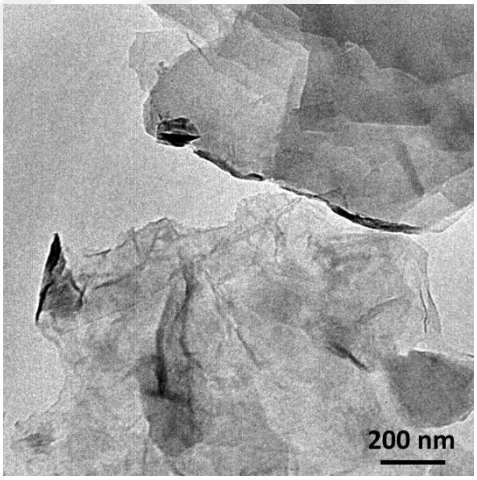
Şekil 4.2 GO'nun FTIR spektrumu

GO'nun Raman spektrumu Şekil 4.3'te sunulmaktadır. Grafit sentezleyerek elde edilen GO'nun yapısındaki değişimi gösteren Raman spektroskopisindeki G (sp^2) bandı düzenli/aromatik yapıları ifade ederken, D (sp^3) bandı oksidasyon sonucu oluşan aromatik düzensizlikleri, amorf yapıları ve alifatik yapıları gösterir. GO'nun G-bandı ve D-bandı sırasıyla 1660 cm^{-1} ve 1380 cm^{-1}'de görülmektedir. G-bandı, grafit malzemelerdeki C-C bağının gerilmesinden kaynaklanır ve tüm sp^2 karbon sistemlerinde mevcuttur. D-bandı, GO bazal düzleminde hidroksil ve epoksi gruplarının bağlanmasıyla oluşan yapısal kusurlardan kaynaklanır [186].



Şekil 4.3 GO'nun Raman spektrumu

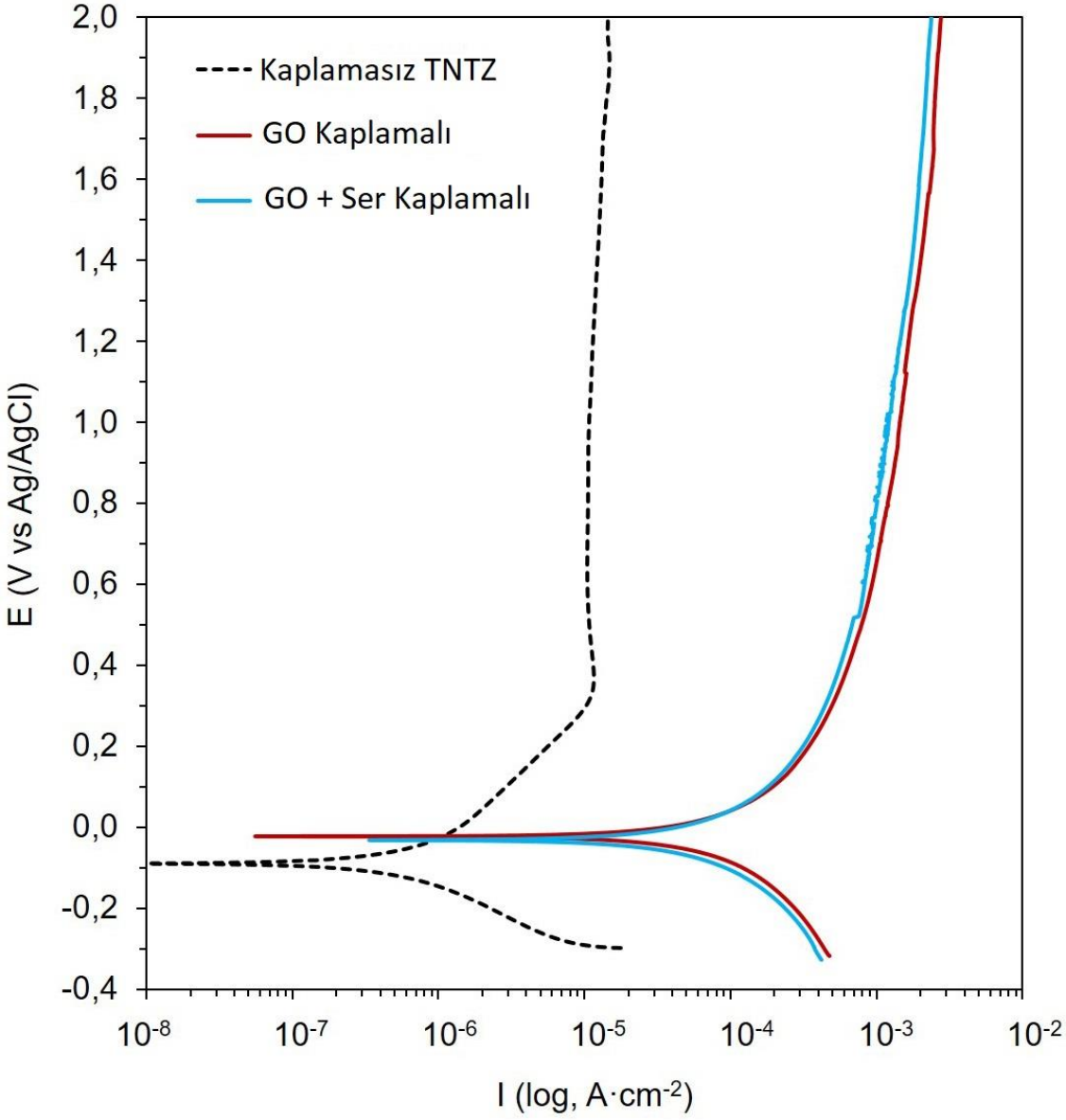
Şekil 4.4'te gösterildiği gibi, sentezlenen GO tabakaları elektron ışıması altında neredeyse şeffaftır, bu da GO tabakalarının oldukça ince olduğunu göstermektedir.



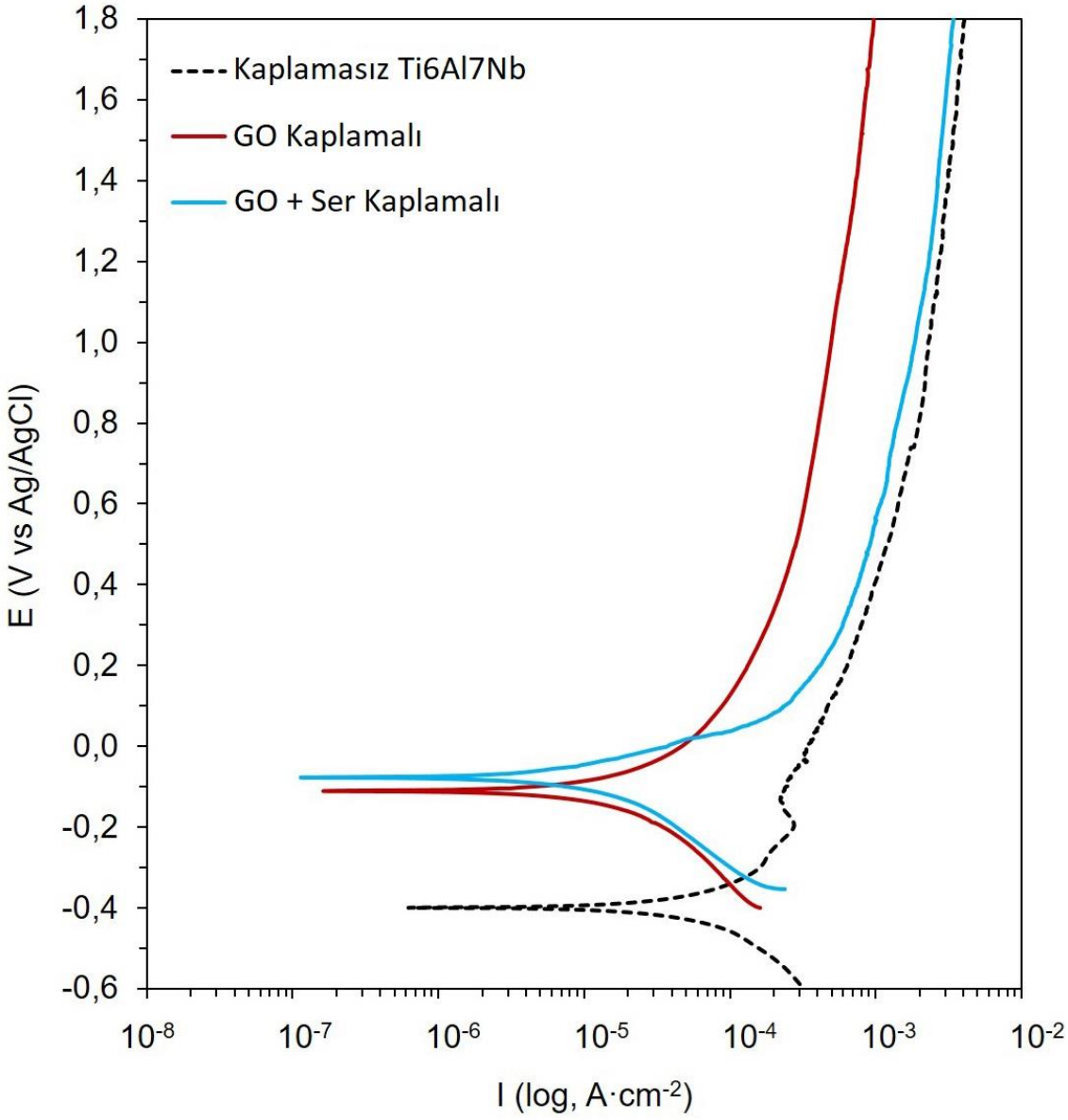
Şekil 4.4 GO'nun TEM görüntüsü

4.2 Elektrokimyasal Karakterizasyon

TNTZ ve Ti6Al7Nb alaşımlarının kaplamalı ve kaplamasız numunelerinin PDS eğrileri sırasıyla Şekil 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5 Hank çözeltisinde kaplanmış ve kaplanmamış TNTZ numunelerinin potansiyodinamik tarama (PDS) eğrileri



Şekil 4.6 Hank çözeltisinde kaplanmış ve kaplanmamış Ti6Al7Nb numunelerinin potansiyodinamik tarama (PDS) eğrileri

PDS eğrilerinden hesaplanan korozyon potansiyeli (E_{corr}), korozyon akım yoğunluğu (I_{corr}), polarizasyon direnci (R_p) ve korozyon hızı değerleri Tablo 4.1'de toplanmıştır.

Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Tablo 4.1 karşılaştırıldığında, en düşük korozyon hızı kaplamasız TNTZ numunesinde gözlenirken, in vitro korozyona en dayanıklı kaplama Ti6Al7Nb alaşımı üzerine GO+Ser kaplama olmuştur. Ayrıca, GO ve GO+Ser kaplamalı yüzeylerin her iki substrat üzerindeki PDS eğrileri birbirine oldukça benzer olarak gözlemlenmiştir. Bu kaplamaların korozyon hızı ve I_{corr} değerleri de birbirine oldukça yakındır.

Bu nedenle hem GO hem de GO+Ser kaplamaların kaplanmamış TNTZ alaşımının korozyon direnci üzerinde olumsuz etkiye sebep olduğu, Ti6Al7Nb alaşımları üzerindeki her iki kaplamanın ise kaplanmamış muadillerine göre korozyon direncinde kayda değer bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Öyle ki GO+Ser kaplamanın I_{corr} değeri, sadece GO kaplamaya ve kaplamasız Ti6Al7Nb alaşımına göre sırasıyla yaklaşık 2 ve 4 kat artmıştır.

Tablo 4.1 PDS eğrilerinden hesaplanan korozyon parametreleri

Substrat	Numune	E_{corr} (mV)	I_{corr} (× 10^{-6}, A·cm^{-2})	Korozyon Hızı (mpy)	R_p (ohms·cm^2)
TNTZ	Kaplanmamış TNTZ	-89	0,8	0,243	58197
	GO kaplamalı	-22	83,0	25,39	635
	GO+Ser kaplamalı	-30	78,0	24,08	752
Ti6Al7Nb	Kaplanmamış Ti6Al7Nb	-399	91,3	30,82	585
	GO kaplamalı	-110	42,0	14,18	2489
	GO+Ser kaplamalı	-77	22,2	7,501	2660

4.3 Islanabilirlik Analizi

Malzeme yüzeyinin ıslanabilirliği, adezyon yani yapışma ile ilişkilendirilmektedir, Islanabilirlik özelliği temas açısı ile açıklanabilen bir kavramdır. Bir katının ıslanabilme miktarı genellikle katı ile sıvı arasındaki temas açısı ile belirlenmektedir. Sıvı küresinin katı yüzeye değdiği noktadan bir teğet çizilirse, bu teğetin yüzey ile yaptığı açı “temas açısı” olarak adlandırılır. Açı ne kadar büyükse, ıslanabilirlik o kadar azdır. Bir biyomalzeme yüzeyi biyolojik dokularla temas etmeye başladığında ilk önce su molekülleri bu yüzeye ulaşır. Bu nedenle biyomalzeme yüzeyinin ıslanabilirliği başlangıçta proteinlerin yüzeye adsorpsiyonunda ve hücrelerin yüzeye yapışmasında kritik parametrelerden

birisidir. Hücre yapışmasının genellikle hidrofilik yüzeylerde daha yüksek olduğu bilinmektedir [187]. Bu bilgiler doğrultusunda statik temas açısı ölçümü sonucunda elde edilen Tablo 4.2'deki sonuçlar incelendiğinde, Ti6Al7Nb ve TNTZ alaşımlarının kaplamasız numunelerinde yüzey temas açısının en yüksek olduğu, dolayısıyla ıslanabilirliğin en düşük olduğu görülmektedir. Alaşım yüzeylerinin GO ve Ser ile kaplanması, kaplanmamış numunelere kıyasla malzemenin temas açısını düşürmüştür. GO'nun hidrofilik yapısından dolayı, malzemenin yüzeyini daha hidrofilik yaparak protein adsorpsiyonuna ve hücre yapışmasına daha uygun hale getirdiği düşünülmektedir.

Tablo 4.2 Temas açısı ölçüm sonuçları

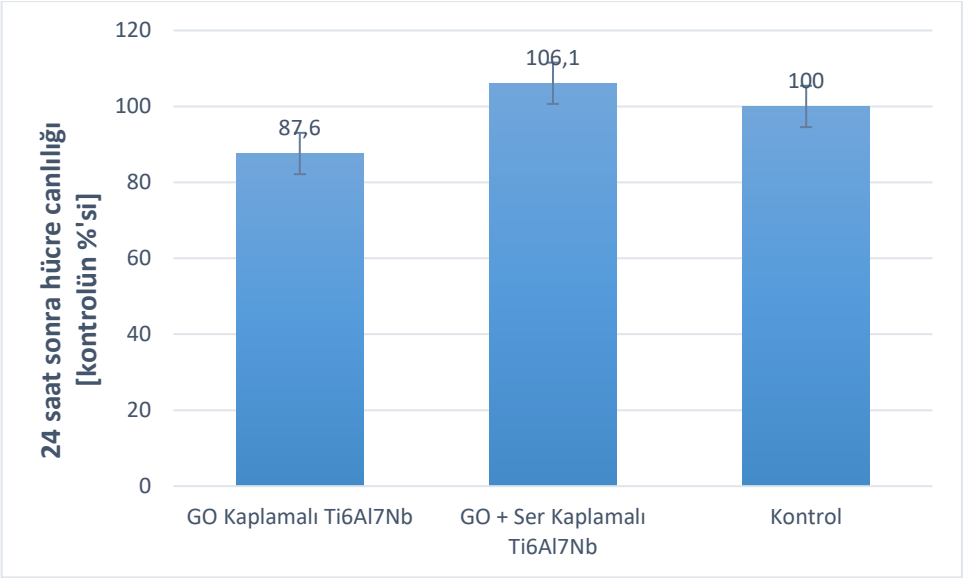
Numune	Temas Açısı [°]
Kaplanmamış TNTZ	99,4 ± 5,7
GO kaplamalı TNTZ	80,4 ± 2,4
GO+Ser kaplamalı TNTZ	81,1 ± 1,6
Kaplanmamış Ti6Al7Nb	103,4 ± 2,9
GO kaplamalı Ti6Al7Nb	100,5 ± 1,1
GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb	91,1 ± 2,7

4.4 In Vitro Sitotoksisite Analizi

WST-8 sitotoksisite sonuçları, kontrol hücreleri ile elde edilen OD değerlerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.3 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.3 WST-8 sitotoksisite test sonuçları

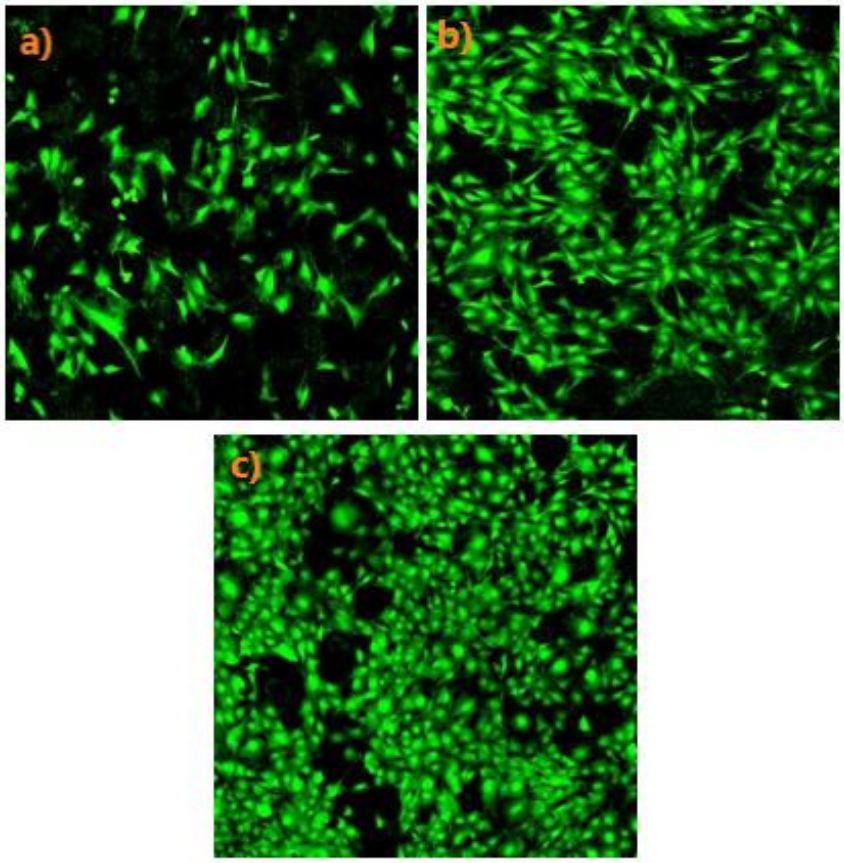
	GO Kaplamalı Ti6Al7Nb	GO + Ser Kaplamalı Ti6Al7Nb	Kontrol
24 saat sonra canlılık [kontrolün %'si]	87,6 ± 3,7	106,1 ± 12,5	100 ± 7,1



Şekil 4.7 WST-8 sitotoksisite test sonuçları

24 saatlik inkübasyondan sonra hücre canlılığı, konfokal mikroskop ile Şekil 4.8'de görselleştirilmiştir. Canlı/ölü hücre ikili boyamadan sonra konfokal mikroskop sonuçları, tüm numunelerin yüzeylerinde canlı yeşil floresan osteoblast hücrelerinin kümelerini göstermiştir. Yüzeylerde sadece canlı hücreleri temsil eden yeşil floresan hücrelerin gözlemlenip, ölü hücreleri temsil eden kırmızı floresan hücrelerin görülmemesi numunelerin sitotoksik olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, kontrol numunesi hariç tüm yüzeylerde büyüyen hFOB 1.19 hücreleri tipik uzatılmış küresel bir şekle sahiptir. Bu durum, hFOB 1.19 hücrelerinin 1 günlük inkübasyondan sonra sadece GO ve GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb yüzeylerine tutunduğunu göstermektedir. Kontrol numunesinde ise hücreler daha küresel yapıya sahiptir. Yüzeye tam tutunma olmamıştır. Bu durumda GO içeren kaplamalarda, GO'nun hidrofilik yapısından dolayı yüzeye tutunmayı arttırıcı performans gösterdiği düşünmektedir. Bütün numunelere tutunan hücreler normal morfolojiye sahiptir ve iyi yayılmıştır. Yüzeylerin osteoblast yapışması ve büyümesi için elverişli olduğu görülmektedir. GO kaplamalı Ti6Al7Nb yüzeyinde hücre tutunması GO+Ser kaplamalı yüzeye kıyasla daha az olup, buna bağlı olarak Tablo 4.3 ve Şekil 4.7'de de görüldüğü üzere 24 saat sonra ölçülen hücre canlılık seviyesi de daha azdır. GO+Ser kaplamalı yüzeyde hücreler substrat yüzeyine iyi tutunmuş ve çoğalmıştır, hücre canlılığı kontroldekinden daha fazladır. Kaplamaya GO katkısının, GO'nun hidrofilik

yapısından dolayı hücre tutunmasını arttırdığı düşünülmektedir. Ancak serotoninin de içerdiği hidroksil ve primer amin azot grubundan dolayı sahip olduğu hidrofilik yapının, kaplama süspansiyonu içerisindeki serotonin konsantrasyonu çok düşük olduğu için az bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

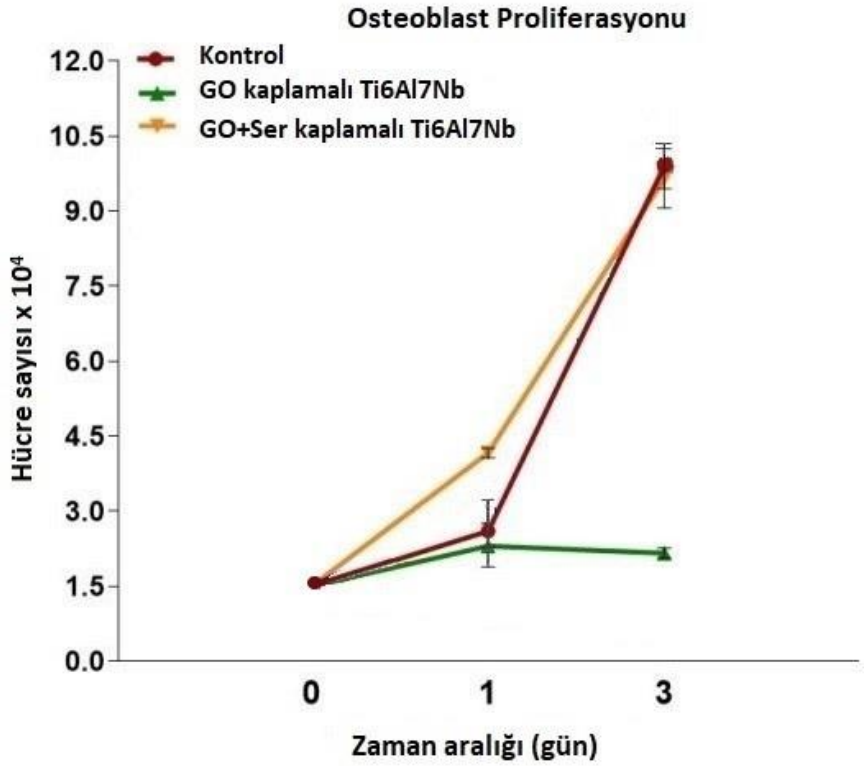


Şekil 4.8 Numunelerin üzerinde büyüyen hFOB 1.19 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri; GO kaplamalı Ti6Al7Nb (a), GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb (b) ve kontrol (c)

4.5 Osteoblast Proliferasyon Hızı

Hücre proliferasyonu, 1 ve 3 günlük inkübasyondan sonra WST-8 testi kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.9 incelendiğinde, WST-8 testi in vitro deney sırasında GO kaplamalı Ti6Al7Nb hariç tüm numuneler (GO+Ser kaplamalı ve kontrol) üzerindeki osteoblast sayısının zamanla arttığını ortaya koymaktadır. Hücrelerin tamamı canlılığını sürdürmüş, biyolojik fonksiyonlarını korumuş ve başarılı bir şekilde çoğalmıştır. GO kaplamalı yüzeyde 1 günlük inkübasyondan sonra hücre sayısında diğer numunelerden daha az bir

artış gözlemlenmiş olup, 3 günlük inkübasyondan sonra osteoblast proliferasyonunun yavaşlamasıyla hücre sayısı zamanla sabitleşmeye başlamıştır.



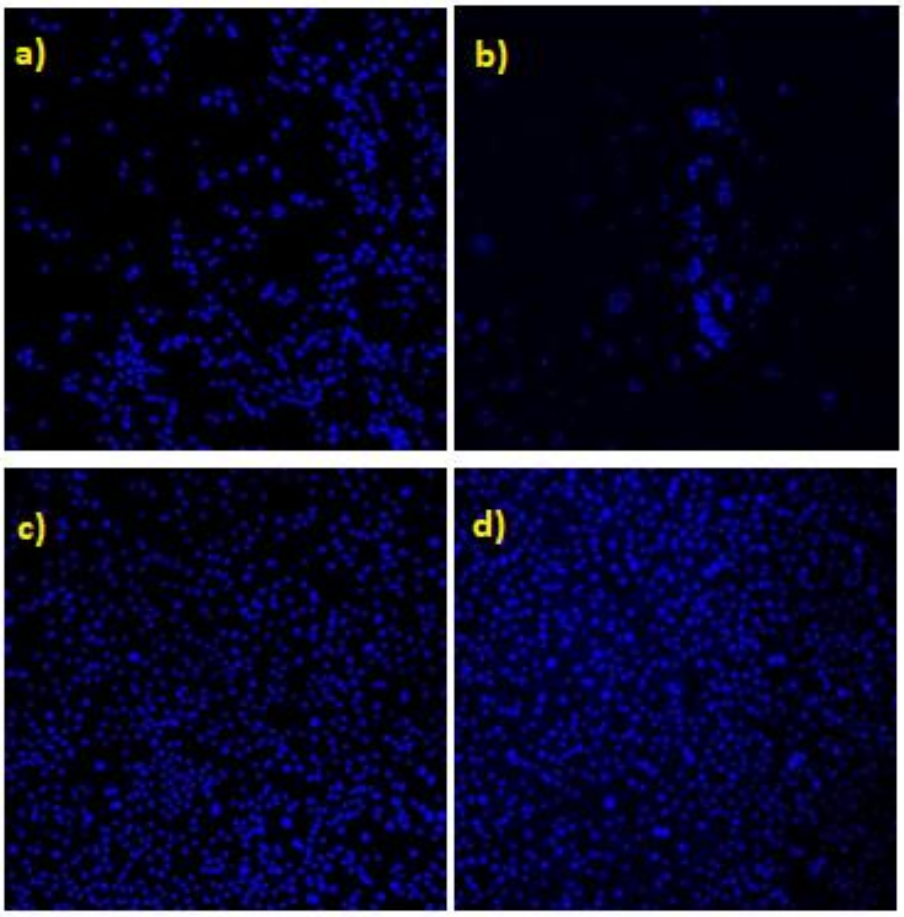
Şekil 4.9 Kolorimetrik WST-8 testi ile GO kaplamalı Ti6Al7Nb, GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb ve kontrol numunelerinde osteoblast proliferasyon hızının kantitatif değerlendirilmesi

Tablo 4.4, numuneler üzerinde büyüyen hücrelerin doubling time değerlerini göstermektedir. GO + Ser kaplamalı Ti6Al7Nb yüzeyinde hFOB 1.19 hücrelerinin doubling time değeri, GO kaplamalı yüzeye kıyasla yaklaşık 6 kat azalmıştır. Bu da hücrelerin GO + Ser kaplamalı yüzeyde yaklaşık 6 kat daha hızlı çoğaldığını göstermektedir. Burada serotoninin osteoblast proliferasyon hızını arttırıcı yönde performans gösterdiği düşünülmektedir.

Tablo 4.4 Hücrelerin doubling time değerleri

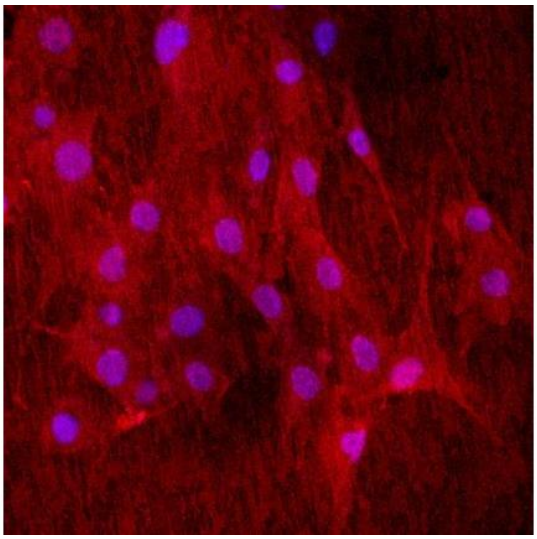
	GO Kaplamalı Ti6Al7Nb	GO + Ser Kaplamalı Ti6Al7Nb	Kontrol
Doubling time (saat)	184.4	31.9	25.8

Şekil 4.10'da 1 ve 3 günlük inkübasyondan sonra GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb ve kontrol numuneleri üzerinde büyüyen hFOB 1.19 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri görülmektedir.



Şekil 4.10 1 ve 3 günlük inkübasyondan sonra numunelerin üzerinde büyüyen hFOB 1.19 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri; GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb 1. gün (a), kontrol 1. gün (b), GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb 3. gün (c) ve kontrol 3. gün (d)

Şekil 4.11'de AlexaFluor635 palloidin (kırmızı floresan) GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb numunesi üzerinde büyüyen hFOB 1.19 hücrelerinin hücre iskeleti filamentlerinden F-aktini, DAPI (mavi floresan) ise hücre çekirdeklerini göstermektedir.



Şekil 4.11 GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb numunesi üzerinde büyüyen hFOB 1.19 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ortopedik cerrahi uygulamalarda implant olarak kullanım amacıyla elektroforetik biriktirme tekniği kullanılarak GO ve serotonin ile kaplanmış Ti6Al7Nb ve TNTZ alaşımları geliştirilmiştir. GO nanopartiküllerinin XRD, FT-IR, Raman analizleri ve TEM görüntüsü sonuçlarına bakıldığında Modifiye Hummers yöntemiyle başarıyla sentezlendiği görülmüştür. Ti6Al7Nb ve TNTZ alaşım yüzeylerinin biyouyumluluğunu ve korozyon özelliklerini arttırmak için yüzeyler GO ve serotonin ile kaplanmıştır. Kaplanmış ve kaplanmamış numuneler in vitro korozyon direnci, ıslanabilirlik, sitotoksisite ve osteoblast proliferasyon hızı bakımından ayrıntılı olarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Statik temas açısı ölçümü ile gerçekleştirilen ıslanabilirlik analizinde her iki alaşım yüzeylerinin GO ve Ser ile kaplanması, kaplanmamış numunelere kıyasla malzemenin temas açısını düşürmüş olup, GO'nun hidrofilik yapısından dolayı yüzeyi daha hidrofilik yaparak protein adsorpsiyonuna ve hücre yapışmasına daha elverişli hale getirmiştir. Yapay vücut sıvısının taklidi olan Hanks dengeli tuz çözeltisinde gerçekleştirilen in vitro korozyon testleri sonucunda, GO ve GO+Ser kaplamanın TNTZ alaşımının korozyon direnci üzerinde olumsuz bir etkiye neden olduğu bulunmuştur. Bu nedenle TNTZ ve bunun kaplanmış numuneleri biyouyumluluk çalışmalarına dahil edilmemiştir. GO ve GO+Ser kaplamanın Ti6Al7Nb alaşımının korozyon hızını sırasıyla 2 kat ve 4 kat azalttığı bulunmuştur. GO'nun Ti6Al7Nb yüzeyinde yalıtkan ve stabil bir tabaka oluşturarak koruyucu görev gördüğü, korozyon hızını azaltıp, orantılı olarak direnci arttırdığı düşünülmektedir. Kaplama süspansiyonunda bulunan GO miktarının arttırılması sonucu malzeme yüzeyinde biriken kaplamaların kalınlıkları daha fazla olsaydı GO'nun malzeme yüzeyinin korozyon hızı ve direnci üzerine katkısı daha belirgin şekilde görülebilirdi. In vitro sitotoksisite sonuçları, kaplanmamış Ti6Al7Nb ve kaplamalı numunelerin (GO ve GO+Ser) sitotoksik olmadığını göstermiştir. GO+Ser kaplamalı yüzeyde hücre tutunması, sadece GO kaplamalı yüzeye kıyasla daha iyi olup, buna bağlı 1 günlük inkübasyon sonrası

hücre canlılığı da daha yüksektir. Bütün numunelerdeki hücreler normal morfolojiye sahiptir. 3 günlük inkübasyon sonrası GO+Ser kaplamalı numunenin doubling time değerinin sadece GO kaplamalı numuneye kıyasla yaklaşık 6 kat azalmasıyla, serotoninin osteoblast proliferasyon hızı üzerindeki indükleyici etkisini gösterdiği düşünülmektedir.

GO+Ser kaplamalı Ti6Al7Nb alaşımının, GO ve serotoninden gelen korozyon direncini, osteoblast tutunmasını ve proliferasyonunu arttırıcı özellikleriyle ortopedik cerrahi uygulamalarda umut verici bir implant malzemesi olacağına inanılmaktadır.

- Kaplama işlemi için gerekli olan süspansiyon çözeltisindeki GO ve serotoninin miktarları değiştirilerek Ti6Al7Nb ve TNTZ alaşımı üzerindeki in vitro korozyon direnci ve biyouyumluluk özellikleri araştırılabilir.
- EPD yöntemi ile kaplamanın önemli parametrelerinden olan kaplama süresi ve voltajı değiştirilip çeşitli kombinasyonlarda kaplamalar yapılarak kaplama tabakasının kalınlığının korozyon direnci üzerindeki etkisi araştırılabilir.
- In vitro testler her ne kadar gerçek vücut koşulları taklit edilerek gerçekleştirilen ön çalışmalar olsalar da sonuçlar bazen in vivo sonuçlar ile uyum sağlamayabilir. Bu nedenle çalışmanın gerçek vücut koşullarındaki etkisini daha iyi araştırabilmek için hayvan deneyleri ile in vivo çalışma yapılabilir.
- Kaplama tabakasının içerisine malzemenin biyouyumluluğunu ve korozyon direncini destekleyici farklı katkılar ilave edilerek etkinliği araştırılabilir.

KAYNAKÇA

[1] L. Bolzoni, N. H. Babu, E. Ruiz-Navas, ve E. Gordo, “Comparison of Microstructure and Properties of Ti-6Al-7Nb Alloy Processed by Different Powder Metallurgy Routes,” Key Engineering Materials, cilt 551, s. 161–179, 2013.

[2] P. Szymczyk, G. Ziółkowski, A. Junka, ve E. Chlebus, “Application of Ti6Al7Nb Alloy for the Manufacture of Biomechanical Functional Structures (BFS) for Custom-Made Bone Implants,” Materials, cilt 11, no. 6, s. 971, 2018.

[3] H.-H. Huang, C.-P. Wu, Y.-S. Sun, W.-E. Yang, ve T.-H. Lee, “Surface nanotopography of an anodized Ti–6Al–7Nb alloy enhances cell growth,” Journal of Alloys and Compounds, cilt 615, 2014.

[4] Y.-S. Sun, J.-F. Liu, C.-P. Wu, ve H.-H. Huang, “Nanoporous surface topography enhances bone cell differentiation on Ti–6Al–7Nb alloy in bone implant applications,” Journal of Alloys and Compounds, cilt 643, 2015.

[5] T. Akahori, M. Niinomi, H. Fukui, M. Ogawa, ve H. Toda, “Improvement in fatigue characteristics of newly developed beta type titanium alloy for biomedical applications by thermo-mechanical treatments,” Materials Science and Engineering: C, cilt 25, no. 3, s. 248–254, 2005.

[6] D. Kuroda, M. Niinomi, M. Morinaga, Y. Kato, ve T. Yashiro, “Design and mechanical properties of new β type titanium alloys for implant materials,” Materials Science and Engineering: A, cilt 243, no. 1-2, s. 244–249, 1998.

[7] M. Niinomi, T. Hattori, K. Morikawa, T. Kasuga, A. Suzuki, H. Fukui, ve S. Niwa, “Development of Low Rigidity β-type Titanium Alloy for Biomedical Applications,” Materials Transactions, cilt 43, no. 12, s. 2970–2977, 2002.

[8] V. S. D. Viteri ve E. Fuentes, “Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials,” Tribology - Fundamentals and Advancements, 2013.

[9] R. A. Corbett, "Laboratory corrosion testing of medical implants," Proceedings of Materials and Processes for Medical Devices Conference, ASM International, Materials Park, OH, s. 166-171, 2004.

[10] R. Asri, W. Harun, M. Samykano, N. Lah, S. Ghani, F. Tarlochan, ve M. Raza, “Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review,” Materials Science and Engineering: C, cilt 77, s. 1261–1274, 2017.

[11] R. A. Corbett ve S. N. Rosenbloom, ”An Assessment of ASTM F 2129 Test Results Comparing Nitinol to Other Implant Alloys,” In SMST 2006: Proceedings of the International Conference on Shape Memory and

Superelastic Technologies, 2006.

[12] J. Pan, C. Leygraf, D. Thierry, ve A. M. Ektessabi, “Corrosion resistance for biomaterial applications of TiO2 films deposited on titanium and stainless steel by ion-beam-assisted sputtering,” Journal of Biomedical Materials Research, cilt 35, no. 3, s. 309–318, 1997.

[13] K. Nielsen, “Corrosion of metallic implants,” British Corrosion Journal, cilt 22, no. 4, s. 272–278, 1987.

[14] G. Manivasagam, D. Dhinasekaran, ve A. Rajamanickam, “Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review,” Recent Patents on Corrosion Science, cilt 2, no. 1, s. 40–54, 2010.

[15] C. Zhao, S. Pandit, Y. Fu, I. Mijakovic, A. Jesorka, ve J. Liu, “Graphene oxide based coatings on nitinol for biomedical implant applications: effectively promote mammalian cell growth but kill bacteria,” RSC Advances, cilt 6, no. 44, s. 38124–38134, 2016.

[16] H. Asgar, K. Deen, Z. U. Rahman, U. H. Shah, M. A. Raza, ve W. Haider, “Functionalized graphene oxide coating on Ti6Al4V alloy for improved biocompatibility and corrosion resistance,” Materials Science and Engineering: C, cilt 94, s. 920–928, 2019.

[17] N. Palaniappan, I. S. Cole, F. Caballero-Briones, S. Manickam, C. Lal, ve J. Sathiskumar, “Neodymium-decorated graphene oxide as a corrosion barrier layer on Ti6Al4V alloy in acidic medium,” RSC Advances, cilt 9, no. 15, s. 8537–8545, 2019.

[18] K. Rho, C. Park, K. Alam, D. Kim, M.-K. Ji, H.-P. Lim, ve H. Cho, “Biological Effects of Plasma-Based Graphene Oxide Deposition on Titanium,” Journal of Nanomaterials, cilt 2019, s. 1–7, 2019.

[19] H. H. Yoon, S. H. Bhang, T. Kim, T. Yu, T. Hyeon, ve B.-S. Kim, “Dual Roles of Graphene Oxide in Chondrogenic Differentiation of Adult Stem Cells: Cell-Adhesion Substrate and Growth Factor-Delivery Carrier,” Advanced Functional Materials, cilt 24, no. 41, s. 6455–6464, 2014.

[20] D. He, Z. Peng, W. Gong, Y. Luo, P. Zhao, ve L. Kong, “Mechanism of a green graphene oxide reduction with reusable potassium carbonate,” RSC Advances, cilt 5, no. 16, s. 11966–11972, 2015.

[21] E. Sujiono, Zurnansyah, D. Zabrian, M. Dahlan, B. Amin, Samnur, ve J. Agus, “Graphene oxide based coconut shell waste: synthesis by modified Hummers method and characterization,” Heliyon, cilt 6, no. 8, 2020.

[22] A. Nekahi, P. Marashi, ve D. Haghshenas, “Transparent conductive thin film of ultra large reduced graphene oxide monolayers,” Applied Surface Science, cilt 295, s. 59–65, 2014.

[23] J. Holinka, M. Pilz, B. Kubista, E. Presterl, ve R. Windhager, “Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth,” The Bone & Joint Journal, cilt 95-B, no. 5, s. 678–682, 2013.

[24] Q. Wang ve T. J. Webster, “Nanostructured selenium for preventing biofilm formation on polycarbonate medical devices,” Journal of Biomedical Materials Research Part A, cilt 100A, no. 12, s. 3205–3210, 2012.

[25] M. Cacaci, C. Martini, C. Guarino, R. Torelli, F. Bugli, ve M. Sanguinetti, “Graphene Oxide Coatings as Tools to Prevent Microbial Biofilm Formation on Medical Device,” Advances in Experimental Medicine and Biology Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health, s. 21–35, 2019.

[26] N. C. Hashim, “Graphene Oxide-Modified Hydroxyapatite Nanocomposites In Biomedical Applications: A Review,” Ceramics - Silikaty, s. 426–448, 2019.

[27] I. Westbroek, A. V. D. Plas, K. E. D. Rooij, J. Klein-Nulend, ve P. J. Nijweide, “Expression of Serotonin Receptors in Bone,” Journal of Biological Chemistry, cilt 276, no. 31, s. 28961–28968, 2001.

[28] E. C. Azmitia, “Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis,” Brain Research Bulletin, cilt 56, no. 5, s. 413–424, 2001.

[29] T. Dhenain, F. Côté, ve T. Coman, “Serotonin and orthodontic tooth movement,” Biochimie, cilt 161, s. 73–79, 2019.

[30] M. Berger, J. A. Gray, ve B. L. Roth, “The Expanded Biology of Serotonin,” Annual Review of Medicine, cilt 60, no. 1, s. 355–366, 2009.

[31] M. Banasr, M. Hery, J. M. Brezun, ve A. Daszuta, “Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus,” European Journal of Neuroscience, cilt 14, no. 9, s. 1417–1424, 2001.

[32] A. R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, ve I. Zhitomirsky, “Electrophoretic deposition of biomaterials,” Journal of The Royal Society Interface, cilt 7, no. 5, 2010.

[33] A. R. Boccaccini, J. A. Roether, B. J. C. Thomas, M. S. P. Shaffer, E. Chavez, E. Stoll, ve E. J. Minay, “The Electrophoretic Deposition of Inorganic Nanoscaled Materials-A Review-,” Journal of the Ceramic Society of Japan, cilt 114, no. 1325, s. 1–14, 2006.

[34] S. Dey, B. Singh, ve L. Besra, “Graphene Coating on Copper by Electrophoretic Deposition for Corrosion Prevention,” Coatings, cilt 7, no. 12, s. 214, 2017.

[35] D. F. Williams, “Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials,“ Elsevier Science Ltd., Chester, England, cilt 4, 1987.

[36] D. F. Williams, “On the nature of biomaterials,” Biomaterials, cilt 30, no. 30, s. 5897–5909, 2009.

[37] B. D. Ratner, “Introduction: Biology and Medicine – Key Concepts in the Use of Biomaterials in Surgery and Medical Devices,” Biomaterials Science, s. 393–394, 2013.

[38] V. A. Dubok, “Bioceramics—Yesterday, Today, Tomorrow,” Powder Metallurgy and Metal Ceramics, cilt 39, no. 7-8, s. 381-394, 2000.

[39] S. Bose ve A. Bandhyopadhya, Characterization of Biomaterials. Amsterdam: Elsevier, 2013.

[40] X. Liu, J. M. Holzwarth, ve P. X. Ma, “Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering,” Macromolecular Bioscience, cilt 12, no. 7, s. 911–919, 2012.

[41] B. D. Ulery, L. S. Nair, ve C. T. Laurencin, “Biomedical applications of biodegradable polymers,” Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, cilt 49, no. 12, s. 832-864, 2011.

[42] N. Angelova ve D. Hunkeler, “Rationalizing the design of polymeric biomaterials,” Trends in Biotechnology, cilt 17, no. 10, s. 409–421, 1999.

[43] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. I. Schoen, ve J. E. Lemons, “Biomaterials science: an introduction to materials in medicine,” Canada, s. 27, 2013.

[44] A. T. Güner ve C. Meran, “Biomaterials Used in Orthopedic Implants,” Pamukkale University Journal of Engineering Sciences, cilt 26, no. 1, s. 54–67, 2020.

[45] A. W. Batchelor ve M. Chandrasekaran, “Service Characteristics of Biomedical Materials and Implants,” Series on Biomaterials & Bioengineering, 2004.

[46] F. Mahyudin, L. Widhiyanto, ve H. Hermawan, “Biomaterials in Orthopaedics,” Advanced Structured Materials Biomaterials and Medical Devices, s. 161–181, 2016.

[47] D. Shi ve X. Wen, “Bioactive Ceramics: Structure, Synthesis, and Mechanical Properties,” Introduction to Biomaterials, s. 13–28, 2005.

[48] H. Hermawan, “Biodegradable Metals for Cardiovascular Applications,” Biodegradable Metals SpringerBriefs in Materials, s. 23–37, 2012.

[49] M. Niinomi, “Metals for biomedical devices,” 2010.

[50] J. González-Carrasco, “Metals as bone repair materials,” Bone Repair Biomaterials, s. 154–193, 2009.

[51] T. Nakano, “Mechanical properties of metallic biomaterials,” Metals for Biomedical Devices, pp. 71–98, 2010.

[52] “Bone and Biomaterials,” An Introduction to Biomaterials, s. 529–548, 2011.

[53] T. Hanawa, “Overview of metals and applications,” Metals for Biomedical Devices, s. 3–29, 2019.

[54] N. Hallab, R. Urban, ve J. Jacobs, “Corrosion and Biocompatibility of Orthopedic Implants,” Biomaterials in Orthopedics, 2003.

[55] G. Bhabra, A. Sood, B. Fisher, L. Cartwright, M. Saunders, W. H. Evans, A. Surprenant, G. Lopez-Castejon, S. Mann, S. A. Davis, L. A. Hails, E. Ingham, P. Verkade, J. Lane, K. Heesom, R. Newson, ve C. P. Case, “Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier,” Nature Nanotechnology, cilt 4, no. 12, s. 876–883, 2009.

[56] “- Sol–Gel Derived Hydroxyapatite Coatings on Metallic Implants: Characterization, In Vitro and In Vivo Analysis,” Biological and Biomedical Coatings Handbook, s. 16–59, 2016.

[57] X.-N. Gu ve Y.-F. Zheng, “A review on magnesium alloys as biodegradable materials,” Frontiers of Materials Science in China, cilt 4, no. 2, s. 111–115, 2010.

[58] A. Galeotti, R. Uomo, G. Spagnuolo, S. Paduano, R. Cimino, R. Valletta, ve V. D’Antò, “Effect of pH on in vitro biocompatibility of orthodontic miniscrew implants,” Progress in Orthodontics, cilt 14, no. 1, 2013.

[59] M. Geetha, A. Singh, R. Asokamani, ve A. Gogia, “Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review,” Progress in Materials Science, cilt 54, no. 3, s. 397–425, 2009.

[60] X. Liu, P. Chu, ve C. Ding, “Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications,” Materials Science and Engineering: R: Reports, cilt 47, no. 3-4, s. 49–121, 2004.

[61] S. Lampman, “Titanium and Its Alloys for Biomedical Implants,” Materials for Medical Devices, s. 223–236, 2012.

[62] O. Addison, A. J. Davenport, R. J. Newport, S. Kalra, M. Monir, J. F. W. Mosselmans, D. Proops, ve R. A. Martin, “Do ‘passive’ medical titanium surfaces deteriorate in service in the absence of wear?,” Journal of The Royal Society Interface, cilt 9, no. 76, s. 3161–3164, 2012

[63] J. R. P. Jorge, V. A. Barão, J. A. Delben, L. P. Faverani, T. P. Queiroz, ve W.

G. Assunção, “Titanium in Dentistry: Historical Development, State of the Art and Future Perspectives,” The Journal of Indian Prosthodontic Society, cilt 13, no. 2, s. 71–77, 2012.

[64] N. R. Patel, ve P. P. Gohil, “A Review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance,” International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering, cilt 2, no. 4, s. 91-101, 2012.

[65] S. Tamilselvi, V. Raman, ve N. Rajendran, “Corrosion behaviour of Ti–6Al–7Nb and Ti–6Al–4V ELI alloys in the simulated body fluid solution by electrochemical impedance spectroscopy,” Electrochimica Acta, cilt 52, no. 3, s. 839–846, 2006.

[66] M. Manov, “Investigation of Morphology of Ti-6Al-7Nb after sulphuric anodizing,” Journal of Maritime & Transportation Science, cilt 53, no. 1, s. 85–91, 2017.

[67] M. A. Khan, Williams R. L., ve Williams D. F., "The corrosion behaviour of Ti–6Al–4V, Ti–6Al–7Nb and Ti–13Nb–13Zr in protein solutions," Biomaterials, cilt 20, no. 7, s. 631-637, 1999.

[68] D. Iijima, “Wear properties of Ti and Ti–6Al–7Nb castings for dental prostheses,” Biomaterials, cilt 24, no. 8, s. 1519–1524, 2003.

[69] A. Rafieerad, A. Bushroa, B. Nasiri-Tabrizi, J. Vadivelu, F. Yusof, ve S. Baradaran, “Graphene Oxide Modified Anodic Ternary Nanobioceramics on Ti6Al7Nb Alloy for Orthopedic and Dental Applications,” Procedia Engineering, cilt 184, s. 409–417, 2017.

[70] I. C. Lavos-Valereto, S. Wolynec, I. Ramires, A. C. Guastaldi, ve I. Costa, “Electrochemical impedance spectroscopy characterization of passive film formed on implant Ti–6Al–7Nb alloy in Hank’s solution,” Journal of Materials Science: Materials in Medicine, cilt 15, no. 1, s. 55–59, 2004.

[71] A. Rafieerad, A. Bushroa, A. Amiri, V. Gopinath, M. Sookhakian, S. Baradaran, M. Rafieerad, S. Saber-Samandari, ve J. Vadivelu, “Large-scale hybrid silver nanowall-reduced graphene oxide biofilm: A novel morphology by facile electrochemical deposition,” Surface and Coatings Technology, cilt 347, s. 297–303, 2018.

[72] A. Rafieerad, A. Bushroa, B. Nasiri-Tabrizi, S. Baradaran, A. Amiri, S. Saber-Samandari, S. Khanahmadi, E. Zeimaran, W. Basirun, K. Kalaiselvam, K. Vellasamy, ve J. Vadivelu, “Simultaneous enhanced antibacterial and osteoblast cytocompatibility performance of Ti6Al7Nb implant by nano-silver/graphene oxide decorated mixed oxide nanotube composite,” Surface and Coatings Technology, cilt 360, s. 181–195, 2019.

[73] T. Akahori, M. Niinomi, H. Fukui, M. Ogawa, ve H. Toda, “Improvement in fatigue characteristics of newly developed beta type titanium alloy for biomedical applications by thermo-mechanical treatments,” Materials

Science and Engineering: C, cilt 25, no. 3, s. 248–254, 2005.

[74] M. Niinomi, T. Hattori, K. Morikawa, T. Kasuga, A. Suzuki, H. Fukui, ve S. Niwa, “Development of Low Rigidity β-type Titanium Alloy for Biomedical Applications,” Materials Transactions, cilt 43, no. 12, s. 2970–2977, 2002.

[75] Y. Tanaka, M. Nakai, T. Akahori, M. Niinomi, Y. Tsutsumi, H. Doi, ve T. Hanawa, “Characterization of air-formed surface oxide film on Ti–29Nb–13Ta–4.6Zr alloy surface using XPS and AES,” Corrosion Science, cilt 50, no. 8, s. 2111–2116, 2008.

[76] G. S. Kumar, S. Chinara, S. Das, C. Tiwari, Prakash, ve G. N. Rao, “Studies on Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy for use as a prospective biomaterial,” Materials Today: Proceedings, cilt 15, s. 11–20, 2019.

[77] M. Niinomi, “Fatigue performance and cyto-toxicity of low rigidity titanium alloy, Ti–29Nb–13Ta–4.6Zr,” Biomaterials, cilt 24, no. 16, s. 2673–2683, 2003.

[78] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, ve P. Zioupos, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” Medical Engineering & Physics, cilt 20, no. 2, s. 92–102, 1998.

[79] U. Topaloğlu, M. A. Ketani, ve B. Güney Saruhan, "Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri," Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt 10, no. 1, s. 62-71, 2017.

[80] M. Ansari, “Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies,” Progress in Biomaterials, cilt 8, no. 4, s. 223–237, 2019.

[81] J. A. Buckwalter, M. J. Glimcher, R. R. Cooper, ve R. Recker, “Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization,” Instructional Course Lectures, cilt 45, s. 371–386, 1996.

[82] P. A. Downey ve M. I. Siegel, “Bone biology and the clinical implications for osteoporosis,” Physical Therapy, cilt 86, no. 1, s. 77–91, 2006.

[83] A. G. Robling, A. B. Castillo, ve C. H. Turner, “Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling,” Annual Review of Biomedical Engineering, cilt 8, s. 455–498, 2006.

[84] H. K. Datta, W. F. Ng, J. A. Walker, S. P. Tuck, ve S. S. Varanasi, “The cell biology of bone metabolism,” Journal of Clinical Pathology, cilt 61, no. 5, s. 577–587, 2008.

[85] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology,” Clinical Journal of the American Society of Nephrology, cilt 3, no. 3, s. 131–139, 2008.

[86] V. Everts, J. M. Delaissie, ve W. Korper, “The bone lining ´cell: its role in cleaning Howship’s lacunae and initiating bone formation,” Journal of Bone

and Mineral Research, cilt 17, no. 1, s. 77–90, 2002.

[87] N. A. Sims ve J. H. Gooi, “Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption,” Seminars in Cell and Developmental Biology, cilt 19, no. 5, s. 444–451, 2008.

[88] H. M. Frost, “Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling,” Calcified Tissue Research, cilt 3, no. 1, s. 211–237, 1969.

[89] M. Capulli, R. Paone, ve N. Rucci, “Osteoblast and osteocyte: games without frontiers,” Archives of Biochemistry and Biophysics, cilt 561, s. 3–12, 2014.

[90] M. Fakhry, E. Hamade, B. Badran, R. Buchet, ve D. Magne, “Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts,” World Journal of Stem Cells, cilt 5, no. 4, s. 136–148, 2013.

[91] Y. Yoshiko, G. A. Candeliere, N. Maeda, ve J. E. Aubin, “Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization,” Molecular and Cellular Biology, cilt 27, no. 12, s. 4465–4474, 2007.

[92] A. M. Parfitt, “Bone-forming cells in clinical conditions,” in Bone, cilt 1: The Osteoblast and Osteocyte, s. 351–429, 1990.

[93] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, ve P. S. Cerri, “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells,” BioMed Research International, cilt 2015, s. 1–17, 2015.

[94] H. J. Donahue, K. J. McLeod ve C. T. Rubin, “Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function,” Journal of Bone and Mineral Research, cilt 10, no. 6, s. 881–889, 1995.

[95] T. A. Franz-Odendaal, B. K. Hall, ve P. E. Witten, “Buried alive: how osteoblasts become osteocytes,” Developmental Dynamics, cilt 235, no. 1, s. 176–190, 2006.

[96] M. B. Schaffler, W.-Y. Cheung, R. Majeska, ve O. Kennedy, “Osteocytes: master orchestrators of bone,” Calcified Tissue International, cilt 94, no. 1, s. 5–24, 2014.

[97] B. F. Boyce, D. E. Hughes, K. R. Wright, L. Xing, ve A. Dai, “Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases,” Laboratory Investigation, cilt 79, no. 2, s. 83–94, 1999.

[98] K. Kim, S. H. Lee, J. H. Kim, Y. Choi, ve N. Kim, “NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of osteoclast fusion and increased bone formation,” Nature Medicine, cilt 12, no. 12, s. 1403–1409, 2006.

[99] R. Singh ve N. B. Dahotre, “Corrosion degradation and prevention by surface

modification of biometallic materials," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, cilt 18, no. 5, s. 725–751, 2006.

[100] Q. Wang ve Y. Zheng, "The electrochemical behavior and surface analysis of Ti50Ni47.2Co2.8 alloy for orthodontic use," Dental Materials, cilt 24, no. 9, s. 1207–1211, 2008.

[101] J. Hieda, M. Niinomi, M. Nakai, K. Cho, T. Mohri, ve T. Hanawa, "Adhesive strength of medical polymer on anodic oxide nanostructures fabricated on biomedical β-type titanium alloy," Materials Science and Engineering: C, cilt 36, s. 244–251, 2014.

[102] E. Kobayashi, T. J. Wang, H. Doi, T. Yoneyama, ve H. Hamanaka, "Mechanical properties and corrosion resistance of Ti–6Al–7Nb alloy dental castings," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, cilt 9, no. 10, s. 567-574, 1998.

[103] B. P. Singh, B. K. Jena, S. Bhattacharjee, ve L. Besra, "Development of oxidation and corrosion resistance hydrophobic graphene oxide-polymer composite coating on copper," Surface and Coatings Technology, cilt 232, s. 475–481, 2013.

[104] C. Brossia ve G. Cragnolino, "Effect of palladium on the corrosion behavior of titanium," Corrosion Science, cilt 46, no. 7, s. 1693–1711, 2004.

[105] U. Eduok ve J. Szpunar, "Ultrasound-assisted synthesis of zinc molybdate nanocrystals and molybdate-doped epoxy/PDMS nanocomposite coatings for Mg alloy protection," Ultrasonics Sonochemistry, cilt 44, s. 288–298, 2018.

[106] N. Kirkland, T. Schiller, N. Medhekar, ve N. Birbilis, "Exploring graphene as a corrosion protection barrier," Corrosion Science, cilt 56, s. 1–4, 2012.

[107] J. Pan, C. Leygraf, D. Thierry, ve A. M. Ektessabi, "Corrosion resistance for biomaterial applications of TiO2 films deposited on titanium and stainless steel by ion-beam-assisted sputtering," Journal of Biomedical Materials Research, cilt 35, no. 3, s. 309–318, 1997.

[108] C. Pekşen, ve D. Aydın, "İmplant dayanımı," Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi, cilt 10, no. 2, s. 122-128, 2011.

[109] P. A. Tran, L. Sarin, R. H. Hurt, ve T. J. Webster, "Titanium surfaces with adherent selenium nanoclusters as a novel anticancer orthopedic material," Journal of Biomedical Materials Research Part A, cilt 9999A, 2009.

[110] E. Cecen, ve Z. Bolaman, "İkincil kanserler," Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi, cilt 20, no. 3, s. 190-200, 2010.

[111] "Cancer Facts & Figures 2014," Atlanta: Amerikan Kanser Topluluğu, 2014, http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webc

ontent/acspc-042151.pdf

[112] M. Chowdhry, S. Cockshott, ve L. Jeys, “Secondary malignant tumours of bone,” Surgery (Oxford), cilt 27, no. 2, s. 86–89, 2009.

[113] P. A. Tran, E. Taylor, L. Sarin, R. H. Hurt, ve T. J. Webster, “Novel Anti-Cancer, Anti-Bacterial Coatings for Biomaterial Applications: Selenium Nanoclusters,” MRS Proceedings, cilt 1209, 2009.

[114] E. Yalniz, M. Çiftdemir, ve S. Memişoğlu, “Tümör rezeksiyon protezi uygulanan kemik tümörlü olgularda fonksiyonel sonuçlar,” Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica, cilt 42, no. 4, s. 238-245, 2008.

[115] S. B. Keel, K. A. Jaffe, G. P. Nielsen, ve A. E. Rosenberg, “Orthopaedic Implant-Related Sarcoma: A Study of Twelve Cases,” Modern Pathology, cilt 14, no. 10, s. 969–977, 2001.

[116] D. Teterycz, T. Ferry, D. Lew, R. Stern, M. Assal, P. Hoffmeyer, L. Bernard, ve I. Uçkay, “Outcome of orthopedic implant infections due to different staphylococci,” International Journal of Infectious Diseases, cilt 14, no. 10, 2010.

[117] A. Gristina, “Biomaterial-Centered Infection,” Clinical Orthopaedics & Related Research, cilt 427, s. 4-12, 2004.

[118] B. Montdargent ve D. Letourneur, “Toward New Biomaterials,” Infection Control & Hospital Epidemiology, cilt 21, no. 6, s. 404–410, 2000.

[119] D. Rokaya, V. Srimaneepong, J. Qin, K. Siraleartmukul, ve V. Siriwongrungson, “Graphene Oxide/Silver Nanoparticle Coating Produced by Electrophoretic Deposition Improved the Mechanical and Tribological Properties of NiTi Alloy for Biomedical Applications,” Journal of Nanoscience and Nanotechnology, cilt 19, no. 7, s. 3804–3810, 2019.

[120] R. Podila, T. Moore, F. Alexis, ve A. Rao, "Graphene coatings for biomedical implants," Journal of visualized experiments: JoVE, cilt 73, 2013.

[121] D. Du, Y. Yang, ve Y. Lin, “Graphene-based materials for biosensing and bioimaging,” MRS Bulletin, cilt 37, no. 12, s. 1290–1296, 2012.

[122] C. Nan-Fu, T. Huang, H. Lai, ve K. Liu, “Graphene oxide-based SPR biosensor chip for immunoassay applications,” Nanoscale Research Letters, cilt 9, no. 1, s. 1-7, 2014.

[123] R. Justin ve B. Chen, “Characterisation and drug release performance of biodegradable chitosan–graphene oxide nanocomposites,” Carbohydrate Polymers, cilt 103, s. 70–80, 2014.

[124] K. Kostarelos ve K. S. Novoselov, “Exploring the Interface of Graphene and Biology,” Science, cilt 344, no. 6181, s. 261–263, 2014.

[125] S. H. Ku ve C. B. Park, “Myoblast differentiation on graphene oxide,” Biomaterials, cilt 34, no. 8, s. 2017–2023, 2013.

[126] A. Yadav, R. Kumar, H. K. Choudhary, ve B. Sahoo, “Graphene-oxide coating for corrosion protection of iron particles in saline water,” Carbon, cilt 140, s. 477–487, 2018.

[127] C.-Y. Ho, S.-M. Huang, S.-T. Lee, ve Y.-J. Chang, “Evaluation of synthesized graphene oxide as corrosion protection film coating on steel substrate by electrophoretic deposition,” Applied Surface Science, cilt 477, s. 226–231, 2019.

[128] Z. U. Rehman, M. A. Raza, F. A. Ghauri, R. Kanwal, A. Ahmad, ve A. Inam, “Graphene Oxide Coatings Deposited on Steel Substrate Using Electrophoretic Deposition and Electrochemical Evaluation of Coatings in Saline Media,” Key Engineering Materials, cilt 778, s. 111–117, 2018.

[129] X. Zou, L. Zhang, Z. Wang, ve Y. Luo, “Mechanisms of the Antimicrobial Activities of Graphene Materials,” ChemInform, cilt 47, no. 22, 2016.

[130] M. Yousefi, M. Dadashpour, M. Hejazi, M. Hasanzadeh, B. Behnam, M. D. L. Guardia, N. Shadjou, ve A. Mokhtarzadeh, “Anti-bacterial activity of graphene oxide as a new weapon nanomaterial to combat multidrug-resistance bacteria,” Materials Science and Engineering: C, cilt 74, s. 568–581, 2017.

[131] J. D. Mangadlao, C. M. Santos, M. J. L. Felipe, A. C. C. D. Leon, D. F. Rodrigues, ve R. C. Advincula, “On the antibacterial mechanism of graphene oxide (GO) Langmuir–Blodgett films,” Chemical Communications, cilt 51, no. 14, s. 2886–2889, 2015.

[132] V. T. H. Pham, V. K. Truong, M. D. J. Quinn, S. M. Notley, Y. Guo, V. A. Baulin, M. A. Kobaisi, R. J. Crawford, ve E. P. Ivanova, “Graphene Induces Formation of Pores That Kill Spherical and Rod-Shaped Bacteria,” ACS Nano, cilt 9, no. 8, s. 8458–8467, 2015.

[133] S. Gurunathan, J. W. Han, A. A. Daye, V. Eppakayala, ve J.-H. Kim, “Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa,” International Journal of Nanomedicine, s. 5901, 2012.

[134] V. Palmieri, F. Bugli, M. C. Lauriola, M. Cacaci, R. Torelli, G. Ciasca, C. Conti, M. Sanguinetti, M. Papi, ve M. D. Spirito, “Bacteria Meet Graphene: Modulation of Graphene Oxide Nanosheet Interaction with Human Pathogens for Effective Antimicrobial Therapy,” ACS Biomaterials Science & Engineering, cilt 3, no. 4, s. 619–627, 2017.

[135] L. Duan, Y. Wang, Y. Zhang, ve J. Liu, “Graphene immobilized enzyme/polyethersulfone mixed matrix membrane: Enhanced antibacterial, permeable and mechanical properties,” Applied Surface Science, cilt 355, s.

436–445, 2015.

[136] W. Hu, C. Peng, W. Luo, M. Lv, X. Li, D. Li, Q. Huang, ve C. Fan, “Graphene-Based Antibacterial Paper,” ACS Nano, cilt 4, no. 7, s. 4317–4323, 2010.

[137] O. Akhavan ve E. Ghaderi, “Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria,” ACS Nano, cilt 4, no. 10, s. 5731–5736, 2010.

[138] F. Perreault, A. F. D. Faria, S. Nejati, ve M. Elimelech, “Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters,” ACS Nano, cilt 9, no. 7, s. 7226–7236, 2015.

[139] M. Cobos, I. De-La-Pinta, G. Quindós, M. J. Fernández, ve M. D. Fernández, “Graphene Oxide–Silver Nanoparticle Nanohybrids: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Properties,” Nanomaterials, cilt 10, no. 2, s. 376, 2020.

[140] S. Thampi, A. M. Nandkumar, V. Muthuvijayan, ve R. Parameswaran, “Differential Adhesive and Bioactive Properties of the Polymeric Surface Coated with Graphene Oxide Thin Film,” ACS Applied Materials & Interfaces, cilt 9, no. 5, s. 4498–4508, 2017.

[141] A. Reina, X. Jia, J. Ho, D. Nezich, H. Son, V. Bulovic, M. S. Dresselhaus, ve J. Kong, "Large Area, Few-Layer Graphene Films on Arbitrary Substrates by Chemical Vapor Deposition", Nano Letters, cilt 9, no. 1, s. 30-35, 2009.

[142] H. Chen, W. Zhu, ve Z. Zhang, “Contrasting Behavior of Carbon Nucleation in the Initial Stages of Graphene Epitaxial Growth on Stepped Metal Surfaces,” Physical Review Letters, cilt 104, no. 18, 2010.

[143] K. Ojha, O. Anjaneyulu, ve A. K. Ganguli, "Graphene-based hybrid materials: synthetic approaches and properties," Current Science, s. 397-418, 2014.

[144] W. S. Hummers ve R. E. Offeman, “Preparation of Graphitic Oxide,” Journal of the American Chemical Society, cilt 80, no. 6, s. 1339–1339, 1958.

[145] W. Yu, L. Sisi, Y. Haiyan, ve L. Jie, “Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: a review,” RSC Advances, cilt 10, no. 26, s. 15328–15345, 2020.

[146] M. Berger, J. A. Gray, ve B. L. Roth, “The Expanded Biology of Serotonin,” Annual Review of Medicine, cilt 60, no. 1, s. 355–366, 2009.

[147] L.-G. Josefsson ve L. Rask, “Cloning of a Putative G-Protein-Coupled Receptor from Arabidopsis thaliana,” European Journal of Biochemistry, cilt 249, no. 2, s. 415–420, 1997.

[148] T. Mogi, T. Marti, ve H. G. Khorana, “Structure-function studies on bacteriorhodopsin. IX. Substitutions of tryptophan residues affect protein-retinal interactions in bacteriorhodopsin,” J. Biol. Chem, cilt 264, s. 14197–

14201, 1989.

[149] E. C. Azmitia, “Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis,” Brain Research Bulletin, cilt 56, no. 5, s. 413–424, 2001.

[150] S. Eddahibi, V. Fabre, C. Boni, M. P. Martres, B. Raffestin, M. Hamon, ve S. Adnot, “Induction of Serotonin Transporter by Hypoxia in Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cells,” Circulation Research, cilt 84, no. 3, s. 329–336, 1999.

[151] C. Clarke, K. Clarke, J. Muneyyirci, E. Azmitia, ve P. M. Whitaker-Azmitia, “Prenatal cocaine delays astroglial maturation: immunodensitometry shows increased markers of immaturity (vimentin and GAP-43) and decreased proliferation and production of the growth factor S-100,” Developmental Brain Research, cilt 91, no. 2, s. 268–273, 1996.

[152] T. Mitchison ve M. Kirschner, “Dynamic instability of microtubule growth,” Nature, cilt 312, no. 5991, s. 237–242, 1984.

[153] L. P. Tan ve J. R. Lagnado, “Effects of Indole Alkaloids and Related Compounds on the Properties of Brain Microtubular Protein,” Biochemical Society Transactions, cilt 3, no. 1, s. 121–124, 1975.

[154] J. Alexander, H. Hechtman, ve D. Shepro, “Serotonin induced actin polymerization and association with cytoskeletal elements in cultured bovine aortic endothelium,” Biochemical and Biophysical Research Communications, cilt 143, no. 1, s. 152–158, 1987.

[155] N. J. John, G. M. Lew, L. Goya, ve P. S. Timiras, “Effects of Serotonin on Tyrosine Hydroxylase and Tau Protein in a Human Neuroblastoma Cell Line,” Plasticity and Regeneration of the Nervous System Advances in Experimental Medicine and Biology, s. 69–80, 1991.

[156] I. Westbroek, A. V. D. Plas, K. E. D. Rooij, J. Klein-Nulend, ve P. J. Nijweide, “Expression of Serotonin Receptors in Bone,” Journal of Biological Chemistry, cilt 276, no. 31, s. 28961–28968, 2001.

[157] P. Sarkar, S. Datta, ve P. S. Nicholson, “Functionally graded ceramic/ceramic and metal/ceramic composites by electrophoretic deposition,” Composites Part B: Engineering, cilt 28, no. 1-2, s. 49–56, 1997.

[158] S.-B. Lee, O. Choi, W. Lee, J.-W. Yi, B.-S. Kim, J.-H. Byun, M.-K. Yoon, H. Fong, E. T. Thostenson, ve T.-W. Chou, “Processing and characterization of multi-scale hybrid composites reinforced with nanoscale carbon reinforcements and carbon fibers,” Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, cilt 42, no. 4, s. 337–344, 2011.

[159] I. Zhitomirsky, “Electrophoretic hydroxyapatite coatings and fibers,”

Materials Letters, cilt 42, no. 4, s. 262–271, 2000.

[160] L. Vandeperre, ve O. Van der Biest, “Composite SiC-graphite interlayers for crack deflection in ceramic laminates,” In Proc. Ceramic-Ceramic Composites IV, 4th International Conference on Ceramic Composites, s. 23-25, 1997.

[161] C. Kaya, F. Kaya, B. Su, B. Thomas, ve A. Boccaccini, “Structural and functional thick ceramic coatings by electrophoretic deposition,” Surface and Coatings Technology, cilt 191, no. 2-3, s. 303–310, 2005.

[162] M. Mehdipour, A. Afshar, R. S. Moakhar, ve M. Mohebali, “Colloidal and Electrophoretic Behavior of Chitosan-Bioactive Glass Coating on Stainless Steel 316L,” Journal of Colloid Science and Biotechnology, cilt 2, no. 4, s. 302–308, 2013.

[163] L. Besra, ve M. Liu, “A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD),” Progress in materials science, cilt 52, no. 1, s. 1-61, 2007.

[164] S. Ryu, Y. J. Kwon, Y. Kim, ve J. U. Lee, “Corrosion protection coating of three-dimensional metal structure by electrophoretic deposition of graphene oxide,” Materials Chemistry and Physics, cilt 250, s. 123039, 2020.

[165] M. F. Maqsood, M. A. Raza, F. A. Ghauri, Z. U. Rehman, ve M. T. Ilyas, “Corrosion study of graphene oxide coatings on AZ31B magnesium alloy,” Journal of Coatings Technology and Research, cilt 17, no. 5, s. 1321–1329, 2020.

[166] T. Tadros, “Zeta potential in colloid science. Principles and application,” Colloids and Surfaces, cilt 5, no. 1, s. 79–80, 1982.

[167] A. Kumar, ve C. K. Dixit, “Methods for characterization of nanoparticles ,” Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids, s. 44–58, 2017.

[168] P. Mondragón-Cortez ve G. Vargas-Gutiérrez, “Electrophoretic deposition of hydroxyapatite submicron particles at high voltages,” Materials Letters, cilt 58, no. 7-8, s. 1336–1339, 2004.

[169] A. Abdeltawab, M. Shoeib, ve S. Mohamed, “Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coatings on titanium from dimethylformamide suspensions,” Surface and Coatings Technology, cilt 206, no. 1, s. 43–50, 2011.

[170] A. Laska, “Parameters Of The Electrophoretic Deposition Process And Its Influence On The Morphology Of Hydroxyapatite Coatings. Review,” Inżynieria Materiałowa, cilt 1, no. 1, s. 20–25, 2020.

[171] I. O. Smith ve P. X. Ma, “Biomimetic Scaffolds in Tissue Engineering,” Tissue Engineering, s. 31–39, 2010.

[172] P. Habibovic, F. Barrère, C. A. Blitterswijk, K. Groot, ve P. Layrolle, “Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants,” Journal of the American Ceramic Society, cilt 85, no. 3, s. 517–522, 2004.

[173] C. Zhao, H. Fan, ve X. Zhang, “Advances in Biomimetic Apatite Coating on Metal Implants,” Advances in Biomimetics, 2011.

[174] A. Bigi, E. Boanini, B. Bracci, A. Facchini, S. Panzavolta, F. Segatti, ve L. Sturba, “Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method,” Biomaterials, cilt 26, no. 19, s. 4085–4089, 2005.

[175] T. Kokubo ve H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” Biomaterials, cilt 27, no. 15, s. 2907–2915, 2006.

[176] A. Oyane, K. Onuma, A. Ito, H.-M. Kim, T. Kokubo, ve T. Nakamura, “Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids,” Journal of Biomedical Materials Research, cilt 64A, no. 2, s. 339–348, 2003.

[177] H. Takadama, M. Hashimoto, M. Mizuno, ve T. Kokubo, “Round-Robin Test Of Sbf For In Vitro Measurement Of Apatite-Forming Ability Of Synthetic Materials,” Phosphorus Research Bulletin, cilt 17, s. 119–125, 2004.

[178] T. Kokubo, H. Kim, ve M. Kawashita, “14.1 Ceramics for Biomedical Applications,” Handbook of Advanced Ceramics, s. 385–416, 2003.

[179] H.-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, ve T. Nakamura, “Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment,” Journal of Biomedical Materials Research, cilt 32, no. 3, s. 409–417, 1996.

[180] T. Kokubo, F. Miyaji, H.-M. Kim, ve T. Nakamura, “Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals,” Journal of the American Ceramic Society, cilt 79, no. 4, s. 1127–1129, 1996.

[181] T. Kokubo, “Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment,” Acta Materialia, cilt 46, no. 7, s. 2519–2527, 1998.

[182] T. Kokubo, H.-M. Kim, ve M. Kawashita, “Novel bioactive materials with different mechanical properties,” Biomaterials, cilt 24, no. 13, s. 2161–2175, 2003.

[183] M. Wei, M. Uchida, H.-M. Kim, T. Kokubo, ve T. Nakamura, “Apatite-forming ability of CaO-containing titania,” Biomaterials, cilt 23, no. 1, s. 167–172, 2002.

[184] V. Loryuenyong, K. Totepvimarn, P. Eimburanapravat, W. Boonchompoo, ve A. Buasri, “Preparation and Characterization of Reduced Graphene Oxide

Sheets via Water-Based Exfoliation and Reduction Methods," Advances in Materials Science and Engineering, cilt 2013, s. 1–5, 2013.

[185] T. Rattana, S. Chaiyakun, N.Witit-anun, N. Nuntawong, P. Chindaudom, S. Oaew, C. Kedkeaw, ve P. Limsuwan, "Preparation and characterization of graphene oxide nanosheets", Procedia Engineering, cilt 32, s. 759-764, 2012.

[186] S. S. Nanda, D. K. Yi, ve K. Kim, "Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Raman spectroscopy," Scientific Reports, cilt 6, no. 1, 2016.

[187] K. L. Menzies ve L. Jones, "The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials," Optometry and Vision Science, cilt 87, no. 6, s. 387–399, 2010.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. A. Baz, H. Yılmazer, C. B. Üstündağ, “Biyomedikal Metalik Alaşımların Grafen Temelli Malzemeler ile Kaplanarak Özelliklerinin Geliştirilmesi,” 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), s. 708, 2020.