

## Titanyum Alaşımının Selenat Eklenmiş Hidroksiapatit ile Kaplanması

Bengi YILMAZ<sup>1</sup>, Zafer EVİS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Ankara.

<sup>2</sup> Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Mühendislik Bilimleri Bölümü, Ankara.

e-posta: evis@metu.edu.tr

Geliş Tarihi: 22.10.2012; Kabul Tarihi:11.11.2013

### Özet

Bir titanyum alaşımı olan Ti6Al4V, ortopedi alanında en sık kullanılan biyomalzeme olarak nitelendirilebilir. Son yıllarda, Ti6Al4V implant yüzeyleri mükemmel biyouyumluluğu ve biyoaktivitesinden yararlanabilmek amacıyla hidroksiapatit ile kaplanmaktadır. Bu çalışmada ise, biyomimetik yöntem kullanılarak hidroksiapatitin yapısına selenyum eklenmiş ve Ti6Al4V plakaların yüzeylerine kaplanmıştır. Kaplamalar, 1,5 kat yoğunluktaki yapay vücut sıvısının (SBF) normal halde ve selenat içerecek şekilde hazırlanmasından sonra plakaların her iki SBF'ye daldırılarak 37°C'de bekletilmesi ile elde edilmiştir. Hazırlanan SBF'ler her 2 günde bir yenilenmiş ve SBF içerisinde geçen 4, 7, 10, 14 ve 21. günlerde örnekler alınmıştır. Kaplamadan önce, yüzey pürüzlülüğünü arttırmak ve oksit yapı kazandırabilmek için plakalara alkali ve ısı işlem uygulanmıştır. Yapılan SEM analizlerinde, SBF'de 4. günden sonra çekirdeklenmenin oluştuğu ve 10. günde tüm yüzeyin üzeri pürüzlü küresel yapıda apatit ile kaplandığı gözlemlenmiştir.

### Anahtar kelimeler

Titanyum Alaşımı;  
Biyomimetik Kaplama;  
Hidroksiapatit; SEM.

## Selenate Doped Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy

### Abstract

Ti6Al4V, which is a titanium alloy, can be regarded as the most frequently used biomaterial in the orthopedics. In recent years, Ti6Al4V implant surfaces generally coated with hydroxyapatite in order to take advantage of its excellent biocompatibility and bioactivity properties. In this study, selenium was added into the structure of hydroxyapatite and coated on Ti6Al4V plate surfaces by using the biomimetic method. The coatings were obtained by preparing 1,5 times more concentrated simulated body fluid (1.5xSBF) in the normal composition and selenate ion added composition and immersing the plates in both of these SBFs, which were kept at 37°C. The SBFs were refreshed every 2 days and the samples were collected in the 4, 7, 10, 14 and 21 days of immersion. Before coating, the plates were alkali and heat treated to increase the roughness and gain oxide structure. In the SEM analysis, it was observed that the nucleation occurs at the 4<sup>th</sup> day of immersion and the entire surface was coated with apatite in a rough global structure after 10 days of immersion.

### Key words

Titanium Alloy;  
Biomimetic Coating;  
Hydroxyapatite; SEM.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

### 1. Giriş

Ortopedik implant malzemeleri içerisinde Ti6Al4V, mekanik özellikler açısından sert dokularla eşleşebilmesi ve korozyona karşı hayli dirençli olması sebebiyle en sık kullanılanlardan birisidir. Ancak, Ti4Al6V, kemik dokusunun implant ile entegrasyonu için aranan biyoaktivite özelliğini gösterememektedir ve bu sebeple genellikle, kemiğin doğal olarak yapısında da bulunan hidroksiapatit ile kaplanmaktadır. Doğal kemikte saf hidroksiapatitten farklı olarak F<sup>-</sup>, Mg<sup>+2</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Sr<sup>+2</sup> gibi iyonlar bulunabilmektedir (Tavares *et al.* 2010). Ayrıca, hidroksiapatitin kristal yapısına çeşitli iyonik ve

kimyasal gruplar dahil edilerek değişik özellikler kazandırılabilir.

İnsanlar için esansiyel elementlerden biri olan selenyumun birçok kanser çeşidinden koruyucu olabileceği ve yeniden oluşumunu engelleyici bir ajan olduğu bildirilmiştir (Hiraoka *et al.* 2001). Bu çalışmada, Ti6Al4V plakaların kaplanmasında kullanılacak olan hidroksiapatitin yapısına selenat iyonu ekleyerek yüzeye anti-kanser özellik kazandırmak hedeflenmiştir. Kaplama metodu olarak düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilen ve diğer metotlara (plazma spreyleme, püskürtme vb.) göre daha avantajlı olan biyomimetik yöntem seçilmiştir.

## 2. Materyal ve Metod

Ti6Al4V plakalar (Grade-5, ELI, ASTM B265-10) boyutları 20x20x2mm<sup>3</sup> olacak şekilde lazer kesme makinesi kullanılarak kesilmiş ve üzerinde pürüzlü bir yüzey oluşturabilmek için #400 silikon karbür (SiC) zımpara kağıdı ile zımparalanmıştır. Daha sonra, sırasıyla aseton, %70 etanol ve distile su ile ultrasonik olarak temizleme cihazında yıkanmıştır.

### 2.1. Ön-işlem

Plakalar, kaplama öncesi ön-işlem olarak alkali ve ısı işleme maruz bırakılmıştır. Ti6Al4V plakalar, 3 gün boyunca, 80°C sabit sıcaklıktaki 5M sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu içerisinde bekletilmiş ve sonrasında 1 saat süreyle yüksek dereceli fırında (Protherm PLF 140/5) 600°C ısıya maruz bırakılmıştır.

### 2.2. SBF Hazırlanması

İnsan kan plazması ve 1.5xSBF içerisindeki iyon derişimleri Tablo 1'de verilmiştir. 1.5xSBF hazırlanırken sıcaklığı 37°C±0.5°C'de sabit tutulan iyon-değişimli distile suya, Tablo 1'de verilen iyon derişimlerine uygun olarak, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.0M HCl, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve TRIS eklenmiştir. 1.5xSBF'nin kendiliğinden çökelmesini önlemek için, tampon olarak TRIS kullanılmıştır ve son pH 7.2'ye ayarlanmıştır.

Selenat (SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) iyonu eklenmiş 1.5xSBF hazırlanırken yukarıda verilen kimyasallara ek olarak sodyum selenat (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>) kullanılmıştır. Selenat iyonunun derişimi 0,15mM olacak şekilde NaSeO<sub>4</sub> eklenmiştir. Son iyon derişimleri selenat eklenmemiş 1.5xSBF ile aynıdır. Aynı şekilde, sıcaklık SBF hazırlama süreci boyunca 37°C±0.5°C'ye ve son pH 7.2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan SBF'ler kaplama işleminde bekletilmeden hemen kullanılmış ve depolanmamıştır.

### 2.3. Plakaların Kaplanması

Ti6Al4V plakalar 50ml SBF/1cm<sup>2</sup> plaka olacak şekilde plastik kaplarda SBF içersine alınmış ve sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosu içerisinde bekletilmiştir. Her iki günde bir SBF'ler yenilenmiştir. SBF içerisinde bekletilen plakalardan

4.,7.,10.,14. ve 21. günlerde örnek alınmıştır.

**Tablo 1.** İnsan kan plazması ve 1.5xSBF içerisindeki iyon derişimleri (Bigi *et al.*2005).

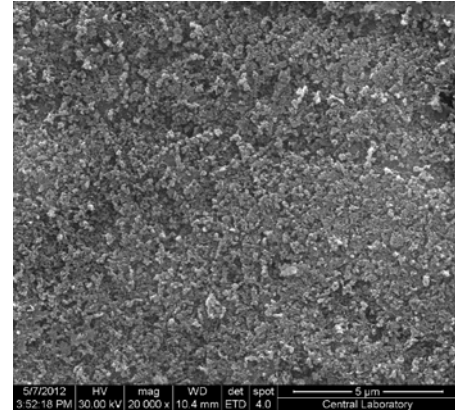
iyon	Kan [mM]	1.5xSBF [mM]
Na <sup>+</sup>	142	212,3
K <sup>+</sup>	5	7,5
Mg <sup>+2</sup>	1,5	2,3
Ca <sup>+2</sup>	2,5	3,8
Cl <sup>-</sup>	103	186,8
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1	1,5
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,75
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27	40,5

### 2.4. Yüzey ve Yapı Analizleri

Ti6Al4V plakalar üzerinde oluşan apatit kaplamanın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FE-SEM Quanta 400F) ile incelenmiştir. Kaplamanın elemental analizi ise cihaza ait enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) ünitesiyle yapılmıştır.

### 3. Bulgular

Alkali ve ısı işlemin amacı, Ti6Al4V plakalar üzerinde, apatit oluşumunu tetikleyen ve gözenekli ağ yapısında olan bir sodyum titanat katmanı elde etmektir. Alkali ve ısı işlem uygulanan plakalara ait SEM görüntüsü aşağıda verilmektedir.



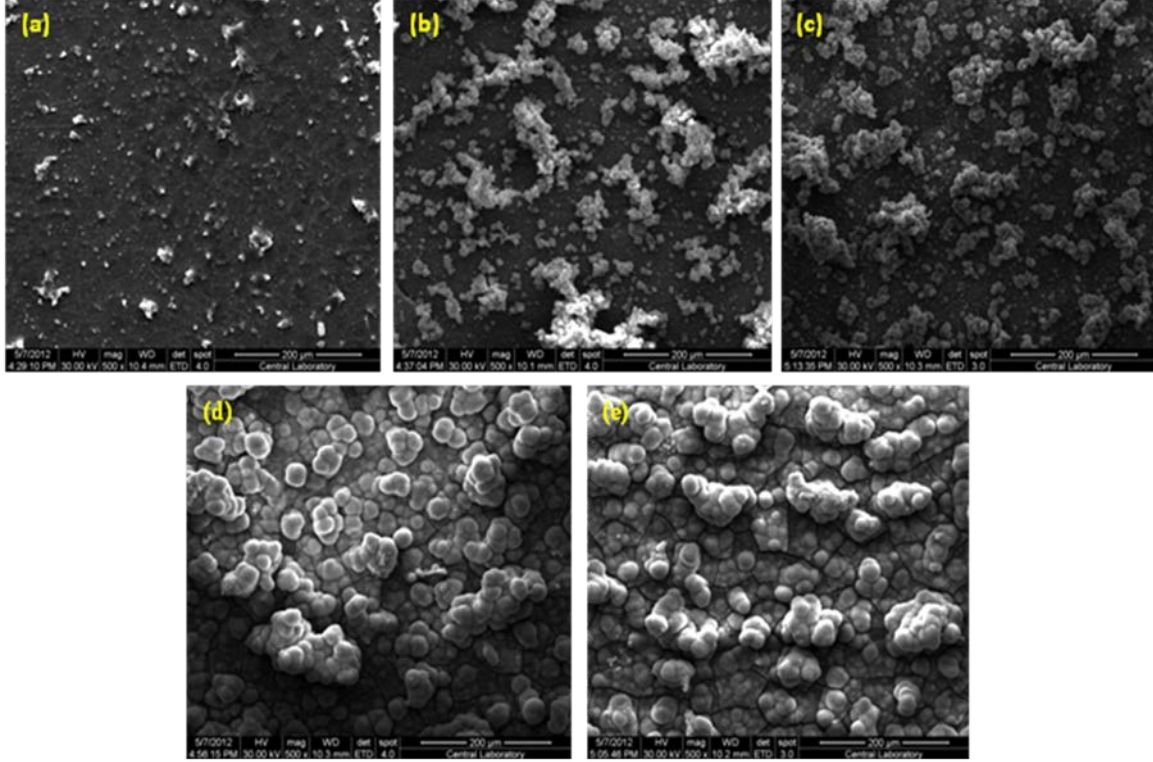
**Şekil 1.** #400 SiC zımpara ile aşındırılmış Ti6Al4V plakanın alkali ve ısı işlem sonrasındaki SEM görüntüsü (20.000x)

Zımparalanan, alkali ve ısı işlem gören Ti6Al4V plakaların 1.5xSBFde bekletilmesinden sonra elde edilen yüzeylere ait SEM görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir.

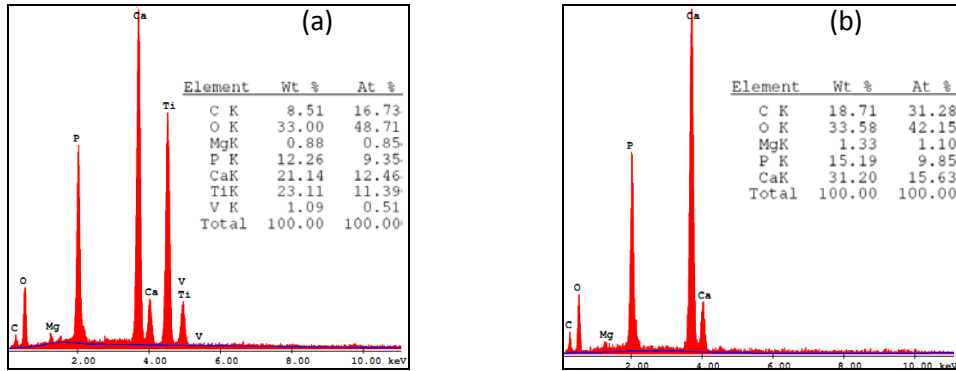
Şekil 2'deki SEM görüntülerinden 1.5xSBF'de bekleme süreleri 7.gün ve 14.gün olan örneklere ait EDS analizleri Şekil 3'de verilmiştir.

Şekil 4'te ise #400 SiC zımparalanmış, alkali ve ısıtılmış işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenat iyonu eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerine ait SEM görüntüleri verilmektedir. Bu örneklerle ait EDS analiz sonuçlarında çok düşük

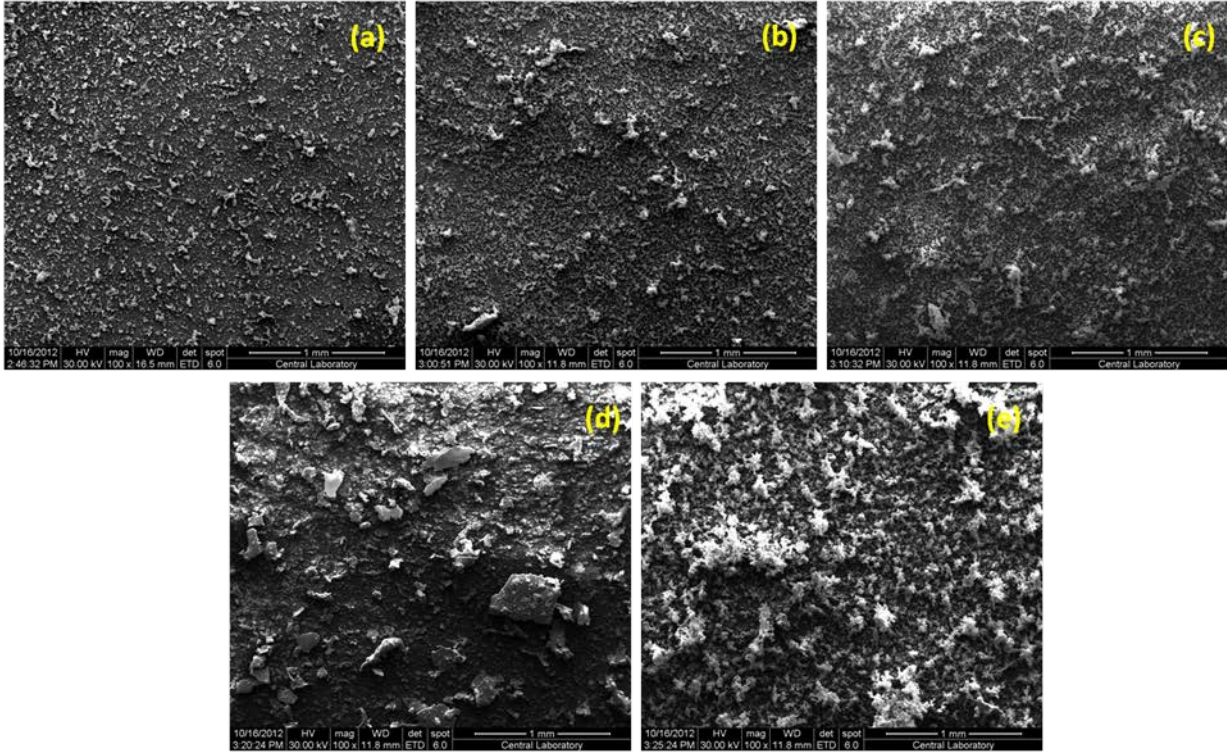
derişimde olduğu için selenyum (Se) pikleri alınamamış, normal kompozisyondaki 1.5xSBF içerisinde bekletilen plakalarınki ile benzer bir şekilde kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) pikleri elde edilmiştir. EDS analiz sonuçları burada gösterilmemiştir.



Şekil 2. #400 SiC zımparalanmış, alkali ve ısıtılmış işlem görmüş Ti6Al4V plakaların 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin SEM görüntüleri (500x) (a)4.gün (b) 7.gün (c)10.gün (d)14.gün (e) 21.gün.



Şekil 3. #400 SiC zımparalanmış, alkali ve ısıtılmış işlem görmüş Ti6Al4V plakaların 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin EDS analizleri (a)7.gün (b)14.gün.



**Şekil 4.** #400 SiC zımparalanmış, alkali ve ısıl işlem görmüş Ti6Al4V plakaların selenyum eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra yüzeylerinin SEM görüntüleri (100x) (a)4.gün (b) 7.gün (c)10.gün (d)14.gün (e) 21.gün.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Isıl işlem, titanat tabakanın kararlılığını artırmak için uygulanmıştır. Şekil 1'de verilen SEM görüntüsünden, alkali ve ısıl işlem sonrasında plaka yüzeylerin mikro gözenekli ve gevşek bir yapı kazandığı anlaşılabilir. Isıl işlem sırasında, 600°C'den yüksek sıcaklıklara çıkılırsa, daha kararlı bir yüzey elde edileceği ancak sodyum salımı az olduğundan daha az TiOH grubu oluşacağı (Kim *et al.* 1997) düşünülerek yüksek sıcaklıklar tercih edilmemiştir.

Şekil 2'de de görüldüğü gibi, 4.günde çekirdeklenmenin olduğu ve 7.günde ise kalsiyum fosfat kristallerinin büyümekte olduğundan bahsedilebilir. Yüzeydeki kalsiyum fosfat birikimi küçük tanecikler şeklinde başlayıp, kümelenme haline dönüşmüştür. 14.günde kaplamanın kürecikler halini aldığı ve küreciklerin 21.günde daha büyümüş olduğu sonucuna varılabilir. 14.günde alınan EDS spektrumunda, tüm yüzeyin kaplanmış olduğu görülebilmektedir. Substrat plakaya ait titanyum (Ti), alüminyum (Al) ve vanadyum (V) pikleri görülmemekte, kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) pikleri alınmaktadır.

Şekil 4'te verilen ve Ti6Al4V plakaların selenyum eklenmiş 1.5xSBF'de bekletildikten sonra elde edilen yüzeylerine ait olan SEM görüntülerinden, selenat iyonunun eklenmesiyle oluşan kalsiyum fosfat yapının morfolojisinin oldukça farklı olduğu söylenebilir. Ortamda selenat iyonu yokken çökelmiş olan kalsiyum fosfat kaplamaya ait tanecikli yapı korunmuş ancak boyutları ve şekilleri değişmiştir.

Selenyum içeren SBF'den apatit çökmesi sırasında, selenatın fosfat grubu ile yer değiştirmesi öngörülmektedir. P-O bağ mesafesi  $\langle P-O \rangle \approx 1,53-1,65 \text{ \AA}$  ve Se-O bağ mesafesi  $\langle Se-O \rangle \approx 1,65 \pm 0,01 \text{ \AA}$  olmak üzere selenatın fosfat grubundan daha büyük boyutta olduğu bilinmektedir. Ayrıca, fosfatın ( $PO_4^{3-}$ ) ve selenatın ( $SeO_4^{2-}$ ) değerlikleri farklıdır (Lee, 2010). Bu sebeple, hidroksiapatit kafesinde, fosfat grupları yerine selenat gelmesinden dolayı kalsiyum atomlarının biraz daha yüksek mesafelere itilmesiyle lokal çarpılmaların meydana gelmesi muhtemeldir. Bu durum morfolojiyi de değiştirebilir.

Bu alışma, selenyumun hidroksiapatit kaplama yapısına eklenmesi konusunda bir ilktir. Selenat iyonu eklenerek oluşturulan biyomimetik kaplamanın yapısal analizlerinin değişik yöntemler kullanılarak ve in vitro uygulamalardaki karakteristiklerinin belirlenmesi için takip eden çalışmalar yapılması gerekmektedir.

#### **Teřekkür**

Bu alışma TÜBİTAK tarafından 111M262 no’lu proje ile desteklenmektedir.

#### **Kaynaklar**

- Bigi, A., Boanini, E., Bracci B., Facchini A., Panzavolta, S., Segatti, F., and Sturba L., 2005. Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method. *Biomaterials*, **26**, 4085–4089.
- Hiraoka K., Komiya S., Hamada T., Zenmyo M. and Inoue A., 2001. Osteosarcoma cell apoptosis induced by selenium. *Journal of Orthopedic Research*, **19**, 809–814.
- Kim, H.-M., Miyaji, F., and Kokubo, T., 1997. Effect of heat treatment on apatite forming ability of ti metal induced by alkali treatment. *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **8**, 341–347.
- Lee, Y.J., 2010. Spectroscopic investigation of arsenate and selenate incorporation into hydroxylapatite, *Current Applied Physics*, **10**, 158–163.
- Tavares, D.S., Resende C.X., Quitan M.P., Granjeiro J.M. and Soares G.A., 2010. Influence of strontium doping on cytocompatibility of hydroxyapatite: comparison of three in vitro assays. The 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, Rio Grande Sul, Brezilya.