

Biyomimetik Bir Yaklaşım ile β -TCP/Kitosan için EPD Kaplama

Yasemin TABAK^{1*} 

Öz

Bu çalışmada, biyomalzeme uygulamalarında kullanılmak üzere, elektroforetik kaplama yöntemi (EPD) ile fonksiyonel derecelendirilmiş Si_3N_4 esaslı seramik altlık üzerine kaplama denemeleri yapılmıştır. Kaplama çözeltisi trikalsiyum fosfat (TCP), jelatin, kitosan, asetik asit ve su ile hazırlanmıştır. Çözeltinin hazırlanması Süspansiyon-1 ve Süspansiyon-2'nin hazırlanması şeklinde iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kitosan ve asetik asit 5 saat boyunca karıştırılmıştır. Buna paralel olarak TCP ve su 4 saat boyunca karıştırılmış, TCP ve su karışımına jelatin ilave edildikten sonra 1 saat daha karıştırılmıştır. Hazırlanan bu iki karışım birleştirilerek Süspansiyon 1 oluşturulmuştur. Ardından Süspansiyon 1 karışımı 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Süspansiyon 2'nin hazırlanması için ise TCP, jelatin ve su karışımı 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Güç kaynağının katot (-) kutbuna bağlanmış olan Si_3N_4 malzeme ve anot kutbuna (+) bağlanmış olan paslanmaz çelik malzeme, birbirlerine paralel duracak şekilde kaplama çözeltisi içerisine daldırılmıştır. Sonrasında güç kaynağından 30 V voltaj uygulanarak kaplama uygulaması yapılmıştır. Kaplama esnasında çözeltilerin karıştırılmasına devam edilmiş olup; 3 farklı denemede hazırlanan kaplama uygulamalarında elektrotlar arası mesafe 0,5 cm, uygulama süresi sırasıyla 1 dk, 2dk ve 3dk olarak denenmiştir. Kaplanan numunelerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan mikroyapı analizlerinde uygulama esnasındaki parametrelerin kaplama kalınlıklarına etkisi incelenmiştir. X-ışını difraksiyonu (XRD) ile kaplanmış ve kaplanmamış numuneler karşılaştırılmıştır. Yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde 21 gün bekletilen kaplanmış numunelerin SEM ve XRD analiz sonuçları irdelendiğinde biyouyumlu kaplamaların geliştirildiği görülmüştür. Kaplamalı numunelere yüzey pürüzlüğü, temas açısı ve FTIR analizleri yapılarak kaplamanın etkileri incelenmiştir. Yapılan analizler sonucu en iyi kaplama EPD-4 koduna sahip numune olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Elektroforetik kaplama, Silisyum nitrid, TCP, Kitosan.

EPD Coating for β -TCP/ Chitosan Using a Biomimetic Approach

Abstract

In this study coating trials are carried out on a functionally graded Si_3N_4 based ceramic substrate by electrophoretic deposition (EPD) method, for biomaterial applications. Coating solution is prepared in two stages, as Suspension 1 and Suspension 2, using tricalcium phosphate (TCP), gelatine, chitosan, acetic acid, and water. Initially chitosan and acetic acid are mixed for 5 hours, and TCP and water are mixed for 4 hours. The latter is mixed for 1 more hour after addition of gelatine. Suspension 1 is formed by combining these two mixtures which is then mixed for 2 hours. On the other hand, Suspension 2 is prepared by mixing TCP, gelatine and water for 2 hours. The Si_3N_4 material is connected the negative terminal of the power supply as cathode and stainless steel material is connected to the positive terminal as anode. They are submerged into the coating solution as positioned parallel to each other. Coating process is carried out by applying 30 V potential between the electrodes that are kept 0,5 cm apart. Solution is continuously stirred during the process and three coating trials are carried out for 1, 2 and, 3 min. duration times. Coated samples are examined by scanning electron microscope (SEM) to investigate the effect of coating parameters on the coating thicknesses. X-ray diffraction (XRD) studies are performed to compare the coated and uncoated samples. Coated samples are kept in simulated body fluid (SBF) for 21 days and their SEM and XRD data revealed the achievement of biocompatible coatings. The effects of the coating were investigated by making surface roughness, contact angle and FTIR analyzes on the coated samples. As a result of the analyses made, it was seen that the sample with the best coating EPD-4 code.

Keywords: Electrophoretic deposition, Silicon nitride, TCP, Chitosan.

¹TÜBİTAK Marmara Research Center, The Vice Presidency of Materials Technologies, Kocaeli, Türkiye, yasemin.tabak@tubitak.gov.tr

¹<https://orcid.org/0000-0002-4912-8828>

1. Giriş

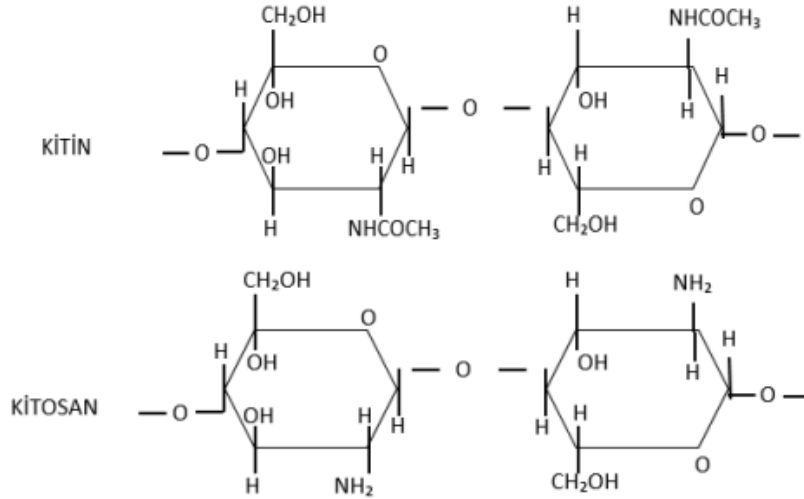
Biyomimetik, doğal biyolojik sistemlerin yapısını ve işlevini taklit edebilen pratik malzeme ve sistemler tasarlamak için doğadan ilham alınan bilim alanıdır (Sarıkaya ve ark, 2003). Doğadaki modelleri inceleyerek var olan bu eşsiz tasarımlardan esinlenerek insanlığın problemlerine çözümler bulmaya çalışan bir bilim dalı (biyomimetik) olarak ortaya çıkmaktadır. Grekçede (Yunanca) bios (hayat) ve mimemisis (taklit) olarak nitelenmektedir. Biyomimetik bir dünyada, güneşi ve basit bileşikleri kullanan hayvanlar ve bitkilerin yaptığı gibi, toprakta tamamen çözünebilir lifleri, seramikleri, plastikleri ve kimyasal maddeleri kullanarak üretim yaparız. Doğa her durumda, modeller sağlayacaktır; yapraklardan kopyalanan güneş pilleri, örümcek ağı tarzında örülmüş çelik lifler, sedeften yararlanılarak oluşturulmuş kırılmaz seramikler, çayırdaki yetişen uzun otlardan esinlenen uzun ömürlü tahıllar, hücreler gibi sinyal veren bilgisayarlar üretilmiştir. Biyomimetikler doğal dünyada neyin işlediğini ve daha da önemlisi neyin varlığını devam ettirdiğini keşfetmemizi sağlamamıza yaramaktadır (Benyus, 2022).

Sentetikten doğal polimerlere kadar birçok biyolojik olarak parçalanabilen plastik kaynağı vardır. Sentetik polimerler yenilenemeyen petrol kaynaklarından elde edilirken, polisakkaritler ve proteinler gibi doğal polimerler yıllık olarak yenilenebilir kaynaklardan büyük miktarlarda elde edilebilir (Zullo ve ark, 2009). Biyopolimerlerin yenilenebilir, ayrışabilir olmaları, doğada bol miktarda bulunmaları ve düşük maliyetle elde edilmeleri en büyük avantajlarıdır. Sentetik plastiklerin çevresel etkisini en aza indirebilecek biyopolimerlerin kullanımına artan bir ilgi var (Barbin ve ark, 2015). Son yıllarda çevre kirliliği ve küresel ısınmadan dolayı, petrokimyasal polimerlerden farklı olarak çevreye minimum zararı bulunan çevre dostu biyopolimerler üzerinde çalışılmakta ve bu konu geliştirilmektedir. Biyobozunur polimerlerin (biyopolimer) büyük miktarı organizmaların büyüme döngüleri sırasında kimyasal veya biyolojik olarak sentezlenmektedir.

Polisakkaritler arasında, selülozdan (yeryüzünde en çok bulunan biyopolimer) sonra, kitosan, geniş kapsamlı çevresel uygulamalar için tercih edilen ikinci biyopolimerdir (Abbasi ve ark, 2023). Kitosan da biyobozunur bir biyopolimer olup toksik olmaması, biyoyumlu olması ve doğal olarak elde edilebilmesi sebebi ile endüstriyel ve akademik alanlardaki birçok çalışma alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (Cankaya, 2016).

Kitosan, doğada en çok bulunan ikinci polisakkarit olan kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilmektedir. Kitin doğada, böcekler ve örümcekler gibi omurgasızların dış iskeletinde, fungi ve bazı alglerin ise hücre duvarlarında bulunmaktadır. Kitin, tekrarlayan N-asetil-D-glukozamin alt birimlerin bağı ile bağlanmasından oluşmuş bir homopolimerdir. Kitosan ise, N-glukozamin ve Nasetil glukozamin birimlerinin glikozidik bağları ile bir araya gelmesinden oluşan lineer bir polisakkarittir. Kitosan biyobozunurluk ve biyoyumluluk özelliklerine sahiptir. Bununla birlikte

antibakteriyel, antifungal ve yara iyileştirici gibi özelliklere de sahiptir. Kitosanın bozunma ürünleri toksik, antijenik ve kanserojenik değildir. Kitosan kemiğin hücre dışı matrisinin yapısında yer alan glikozamino glikanlara benzemektedir. Bu sebeple in-vitro ortamlardaki kemik doku mühendisliği uygulamalarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Tunçay, 2013; Sunal 2015; Güven 2006) Şekil 1’de Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 1.Kitinin ve Kitosanın kimyasal yapısı. (Kurtuluş 2020)

Trikalsiyum fosfat (TCP) ise, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ kimyasal formülüne sahip olup; fizyolojik ortamda çözünebilen ve implantasyon sırasında kemik ile değiştirilebilen biyolojik olarak bozunabilir bir biyoseramiktir. TCP'nin en yaygın olanları α ve β polifromlarıdır. TCP'nin Ca/P atomik oranı 1,50'dir (Gür 2018). B-trikalsiyum fosfat (β -TCP), en çok kullanılan ve güçlü sentetik kemik aşısı ikamesidir. Bu sadece osteokondüktif değil, aynı zamanda osteoindüktiftir (Bohner 2020). B-trikalsiyum fosfat (β -TCP, β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), kemik rejenerasyonu için en çekici biyomalzemelerden biridir ve β -TCP makrogözenekli yapı iskeleleri, hem hücre çoğalması hem de mekanik destek için çok umut vericidir (Somer, 2023). Jelatin ise, kolajen proteinlerinin hidrolitik ayrılması ile üretilen bir polipeptittir. Peptit bağları ile bir araya gelmiş 19 amino asitten oluşmaktadır. Trikalسيوم fosfat (TCP) seramikleri gözenekli ve emilebilen malzemelerden biridir. TCP in vivo olarak çözülebilen ve bifazik seramiklerde olduğu gibi biyorezorpsiyonu kolaylaştırabilen, biyolojik olarak emilebilir bir Ca-P'dir (Rey ve ark, 2017).

Doğal bir polimer olan jelatin, derinin, kemiklerin ve bağ dokusunun ana bileşeni olan bir protein olan doğal kolajenin kontrollü asit veya alkalın hidrolizi ile elde edilir (Jätariu ve ark, 2011). Jelatin, doğası bozulmuş kolajen olarak kabul edilir. Jelatin, denatüre olması nedeniyle nispeten düşük antijeniteye sahiptir ve kollajenden çok daha ucuzdur (Lien ve ark,2008). Son zamanlarda,

kombine jelatin ve kitosan malzemeleri, ilaç taşıyıcıları ve ilaç salımı gibi biyomedikal uygulamalarda ve doku mühendisliği yapı iskelelerinde büyük ilgi görmüştür (Wang ve ark, 2015).

Bu çalışmada kitosan, β -TCP ve sığır jelatini elektroforetik biriktirme tekniği yöntemi ile silisyum nitrür esaslı altık malzeme üzerine kaplanması üzerine çalışılmıştır. Elektroforetik biriktirme tekniği ilk olarak 1808 yılında Rus bilim adamı Ruess tarafından sudaki kil parçacıklarının elektrik alan etkisiyle meydana gelen hareketini gözlemlemesiyle keşfedilmiştir. EPD tekniğinin ilk pratik kullanımı ise ABD' de 1933 yılında bir platin katot üzerine toria parçacıklarının biriktirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. 1980 li yıllarda ise EPD seramik alanında kullanılmaya başlamıştır (Bahçepınar, 2020). Elektroforetik biriktirme (EPD) esasen iki aşamalı bir süreçtir. İlk adımda, bir sıvı içinde asılı duran parçacıklar, süspansiyona bir elektrik alanı uygulayarak (elektroforez) bir elektrota doğru hareket etmeye zorlanır. İkinci adımda, parçacıklar elektrotlardan birinde toplanır ve üzerinde tutarlı bir tortu oluşturur. İşlemin yalnızca bir toz kompaktı verdiğine dikkat edilmelidir ve bu nedenle elektroforetik çökeltmeyi bir yoğunlaştırma adımı takip etmelidir. Bu kaplama için tamamen yoğun bir malzeme elde etmek için sinterleme veya kütleme gibi aşama gerekebilmektedir (Van der Biest, 1999). Literatürde EPD kaplama üzerine birçok çalışma olmasına rağmen Si_3N_4 altık üzerine EPD kaplanmasına yönelik az sayıda yayın mevcuttur. Si_3N_4 altık üzerine TCP-Kitosan EPD kaplanmasına yönelik ise çalışma bulunmamaktadır (Boccaccini ve ark., 2010, Esmaili ve ark., 2023, Uchiskoshi ve ark., 2000, Lessing ve ark., 2000, Varlık 2021, Simchi ve ark., 2009, Heise ve ark., 2019, Yamashita ve ark., 2002, Pishbin ve ark., 2014). Dolayısı ile biyoaktivitesi olan Si_3N_4 altık üzerine β -TCP/kitosanın EPD yöntemi ile kaplanması yenilikçi bir çalışmadır. EPD kaplamanın kolay uygulanabilirliği ve Si_3N_4 altık üzerine kaplamanın tutunabilirliği hücre büyümesi için elverişli ortam yaratacağından çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. Materyal ve Metot

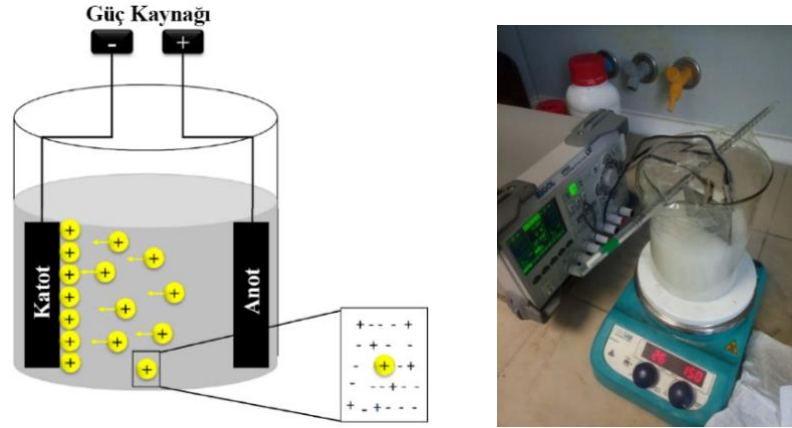
2.1. Materyal

Deneysel çalışmalar kapsamında başlıca kullanılan hammaddeler kitosan (Alfa Aesar™ Chitosan, 85% deacetylated), β -TCP ($\geq\beta$ phase phase basis %98 Sigma-Aldrich), hücre kültürüne uygun özellikteki sığır jelatini (Sigma-Aldrich/TypeB BioReagent) ve asetik asettir.

2.2. Metot

Bu çalışmada, elektroforetik kaplama yöntemi (EPD) ile biyomalzeme uygulamalarında kullanılmak üzere fonksiyonel derecelendirilmiş Si_3N_4 esaslı seramik altlık üzerine kaplama

uygulanması denenmiştir. Kaplama çözeltisi TCP, jelatin, kitosan, asetik asit ve su ile hazırlanmıştır. Çözeltinin hazırlanması süspansiyon-1 ve süspansiyon-2'nin hazırlanması şeklinde iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kitosan ve asetik asit 5 saat boyunca karıştırılmıştır. Buna paralel olarak TCP ve su 4 saat boyunca karıştırılmış, TCP ve su karışımına jelatin ilave edildikten sonra 1 saat daha karıştırılmıştır. Hazırlanan bu iki karışım birleştirilerek Süspansiyon 1 oluşturulmuştur. Ardından Süspansiyon 1 karışımı 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Süspansiyon 2'nin hazırlanması için ise TCP, jelatin ve su karışımı 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Güç kaynağının katot (-) kutbuna bağlanmış olan Si_3N_4 malzeme ve anot kutbuna (+) bağlanmış olan çelik malzeme, birbirlerine paralel duracak şekilde kaplama çözeltisi içerisine daldırılmıştır. Sonrasında güç kaynağından 30 V voltaj uygulanarak kaplama uygulaması yapılmıştır. Kaplama esnasında çözeltilerin karıştırılmasına devam edilmiş olup; 3 farklı denemede hazırlanan kaplama uygulamalarında diyetler arası mesafe 0,5 cm, uygulama süresi sırasıyla 1 dk, 2dk ve 3dk olarak denenmiştir. Kaplanan numunelerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan mikroyapı analizlerinde uygulama esnasındaki parametrelerin kaplama kalınlıklarına etkisi incelenmiştir. Şekil 2'de TCP-Kitosan EPD kaplamanın gösterimi verilmiştir.



Şekil 2. TCP-Kitosan EPD kaplama gösterimi.

Süspansiyon 1'de 100 ml 'lik bir beher içerisinde reçetedeki miktarda kitosan ve asetik asit, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 300 rpm hızda 5 saat karıştırılmış olup; 250 ml 'lik bir beher içerisinde reçetedeki miktarda TCP ve Su, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 300 rpm hızda 1 saat karıştırılmıştır. Sonrasında bu karışıma reçetedeki miktarda jelatin ilave edilmiş ve 4 saat daha aynı şekilde karıştırılmıştır. İki ayrı beherde hazırlanan karışımlar 500 ml 'lik tek bir beherde birleştirilmiş, bu şekilde oluşturulan Süspansiyon 1, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 300 rpm hızda 2 saat karıştırılmıştır. Tablo 1'de Süspansiyon 1'e ait reçete verilmiştir.

Tablo 1. Süspansiyon 1.

| Malzeme | Miktar |
|-------------|----------|
| Jelatin | 0,032 gr |
| Kitosan | 1,563 gr |
| TCP | 2,344 gr |
| Asetik Asit | 17,25 ml |
| Su | 250 ml |

Daha sonra süspansiyon 2 hazırlanmış olup 250 ml 'lik bir beher içerisinde reçetede ki miktarda TcP, Jelatin ve Su, önce manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 300 rpm hızda 2 saat karıştırılmıştır. Süspansiyon 2'ye ait reçete Tablo 2'de verilmiştir. Daha önce hazırlanmış olan Süspansiyon 1 ve Süspansiyon 2, 500 ml'lik tek bir beher içerisinde birleştirildi. Bu çözelti tüm numuneler için 19 saat süreyle oda sıcaklığında 300 rpm hızda manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılmıştır.

Tablo 2. Süspansiyon 2.

| Malzeme | Miktar |
|---------|--------|
| Jelatin | 2,5 gr |
| TCP | 2,5 gr |
| Su | 250 ml |

Kaplama malzemesi olarak kullanılan silisyum nitürür esaslı seramik parça UBE marka biyo grade nitelikte α -Si₃N₄ tozu kullanılarak elde edilmiştir. XRD analiz sonucunda α fazının yoğunlukta olduğu görülmekte olup; XRF analizinde ise ağırlıkça %39,938 N elementi, ağırlıkça %60,062 Si elementi varlığından bahsedilmektedir. Optimum koşullarda fonksiyonel derecelendirilmiş olarak üretilen silisyum nitürür esaslı altlığın biyoaktif kaplamasının yapılabilmesi için sinterleme işlemi yapılan numunenin kaplama öncesinde yüzey pürüzlülüğünün artırılarak adezyon kuvvetinin üzerindeki olumlu etkisi için Merck marka Ortofosforik Asit (H₃PO₄) (%85) kullanılmıştır. Numuneler ortofosforik asit içerisine atılmış ve 180°C kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. 1 saat kaynatılan ortofosforik asitle dağlama yapılan yüzeyler uygun sıcaklıkta destile su ile iyice durulanmış, daha sonra fırında 24 saat 200°C'de 1°C/dk hızda kurutulmuştur. Ardından asit uzaklaştırılmıştır.

Dağlama işlemi; ters akış soğutma yöntemiyle kurulan düzenekte gerçekleştirilmiştir. Ters Akış Soğutmalı Cihaz, sıvı konsantrasyonunun sabit tutulmasını sağlayan ısıtılmış bir sıvı sisteminden gaz buharlaşmasının suyla soğutulmasını sağlayan bir düzendir. Isı ölçerli manyetik karıştırıcı tablası, kristalizasyon kabı, cam balon, kondenser, ayaklıkları tutucu, plastik hortum ve oyuncak balon kullanılarak sistem kurulmuştur. Isıtılan sıvı cam balona konur ve kondenser ile birleştirilmiş ve tutucuyla sabitlenmiştir. Kristalizasyon kabına silikon yağı, gliserin, sıvı parafin gibi bir sıvı dökülerek belli bir seviyeye kadar doldurulmuştur. Cam balonun ağzı bir tıpa ile kapatılmıştır. Şekil 3'de ters akış soğutmalı dağlama düzeneği ve kurutma işlemi gösterilmektedir.



Şekil 3. Kaplama öncesi numunelerin dağlanma ve kuruma aşaması.

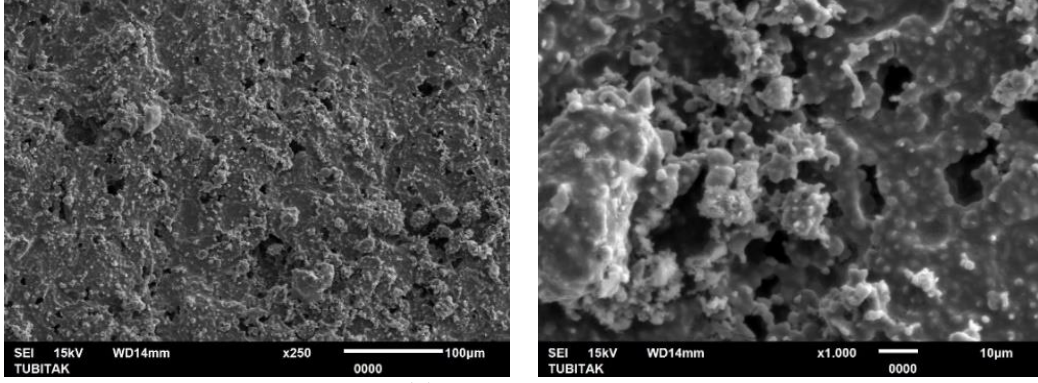
Kurutulan ve asit uzaklaştırılan numuneleri EPD yöntemiyle kaplanmak β -TCP, kitosan ve jelatin kaplaması için reçetedeki Süspansiyon 1 ve 2 ayrı beherlerde hazırlanarak birleştirilmiştir ve EPD karışımı hazırlanmıştır. Jelasyon oluşumu için 19 saat manyetik karıştırılmıştır. Reçete insan kemiğini taklit edecek şekilde ağırlıkça % 65 inorganik, % 35 organik bileşimler olacak şekilde geliştirilmiştir. β -TCP, HAP'a (Hidroksiapatit) göre 10 kat daha biyobozunabilir özelliktedir. Kitosan ise doğal polimer olup β -TCP ile biyoyumluluğu arttırmaktadır. Jelatin ise bir protein olup film oluşturma özelliğine sahiptir (Fang ve ark., 2019; Puvaneswary ve ark., 2016; Gómez-Estaca ve ark., 2011; Maji ve ark., 2018)

Tablo 3. 1.5X Hızlandırılmış SBF (Yapay Vücut Sıvısı) Reçetesi (Jalota ve ark., 2008)

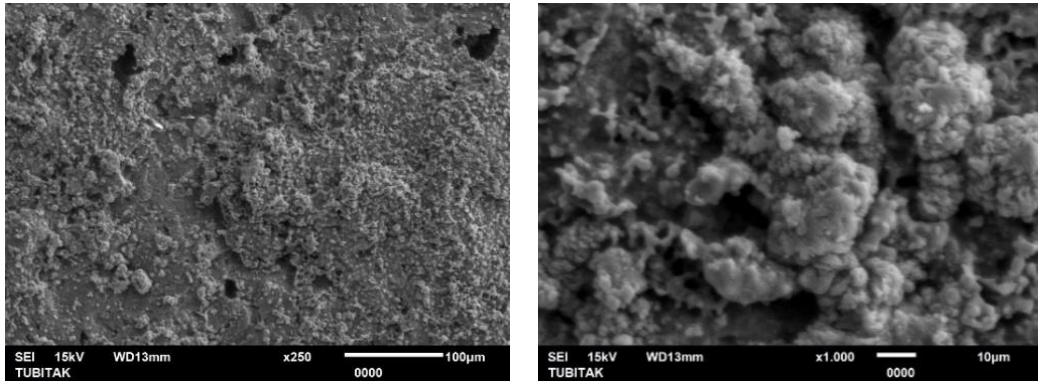
| Sıra | Malzeme | Miktar |
|------|--------------------------------------|-----------|
| 1 | NaCl | 9,8184 gr |
| 2 | NaHCO ₃ | 3,4023 gr |
| 3 | KCl | 0,5591 gr |
| 4 | Na ₂ HPO ₄ | 0,2129 gr |
| 5 | MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,4574 gr |
| 6 | 1 M HCl | 15 ml |
| 7 | CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,5513 gr |
| 8 | Na ₂ SO ₄ | 0,1065 gr |
| 9 | TRIS | 9,0855 gr |
| 10 | 1 M HCl | 50 ml |

3. Bulgular ve Tartışma

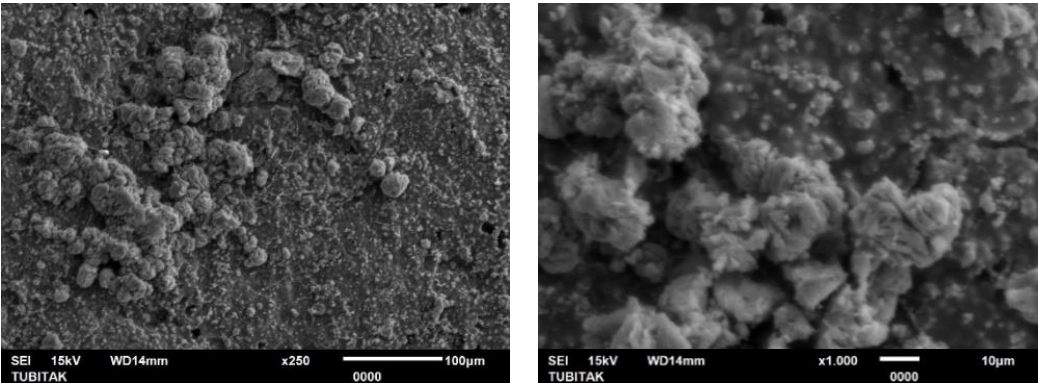
EPD ile Si_3N_4 esaslı altlık üzerine yapılan β -TCP/kitosan 4 farklı kaplama denemesi yapılmıştır. Şekil 4'te (a) EPD-1, (b) EPD-2 ve (c) EPD-3 kaplamalarına ait SEM görüntüleri, Şekil 5'te EPD-4 nolu kaplamaya ait SEM görüntüleri verilmiştir.



(a) EPD-1 20V 1 dk

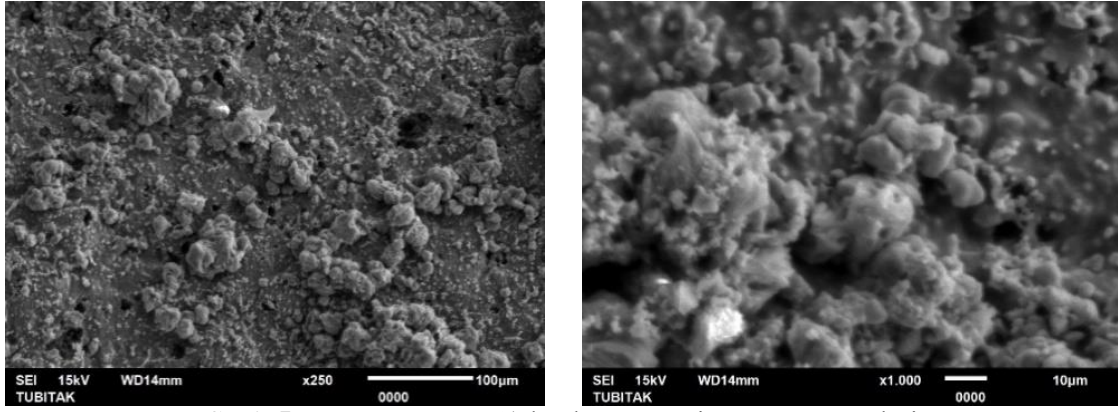


(b) EPD-2 30V 1 dk



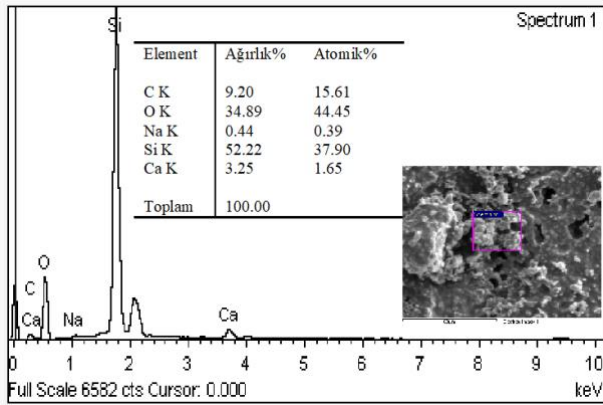
(c) EPD-3 30V 2 dk

Şekil 4. (a) EPD-1, (b) EPD-2 ve (c) EPD-3 kaplamalarına ait SEM görüntüleri

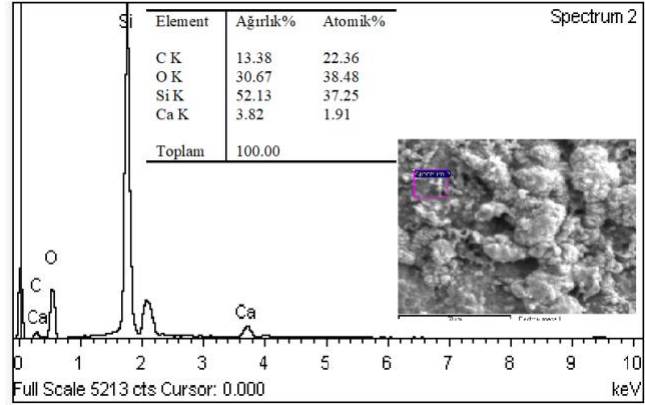


Şekil 5. EPD-4 (30V 3 dk) kaplamasına ait SEM görüntüleri

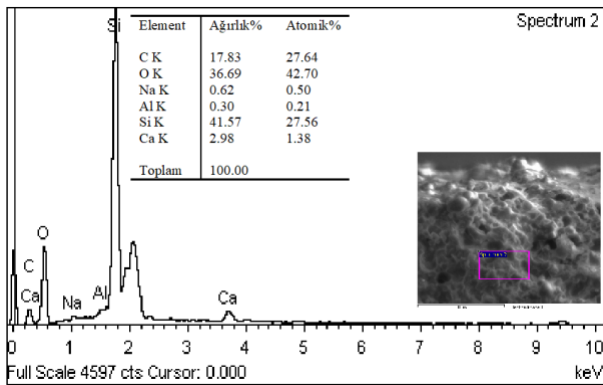
Elde edilen kaplamalar kendi aralarında kıyaslandıklarında EPD-4 kodu ile verilen 30V ile 3dk ile kaplanan β -TCP/kitosan esaslı EPD kaplamasının literatürdeki β -TCP-Kitosan oluşumuna ait görüntüler ile benzeşmekte olduğu görülmüştür. Dolayısıyla kaplamanın başarılı şekilde elde edildiği söylenebilir (Mina ve ark., 2015; Mahjoup ve ark 2014). Şekil 6'da ise kaplama numunelerine ait EDS sonuçları verilmiştir. EDS sonuçları genel olarak benzerlik göstermiş olsa da noktasal olarak analiz alındığı için lokal bölgelere göre miktarca yüzdelerde farklılıklar mevcuttur.



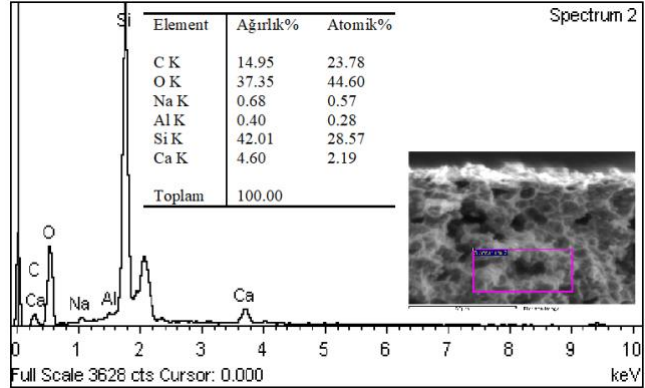
(a) EPD-2 20V 1 dk



(b) EPD-2 30V 1 dk



(c) EPD-3 30V 2 dk

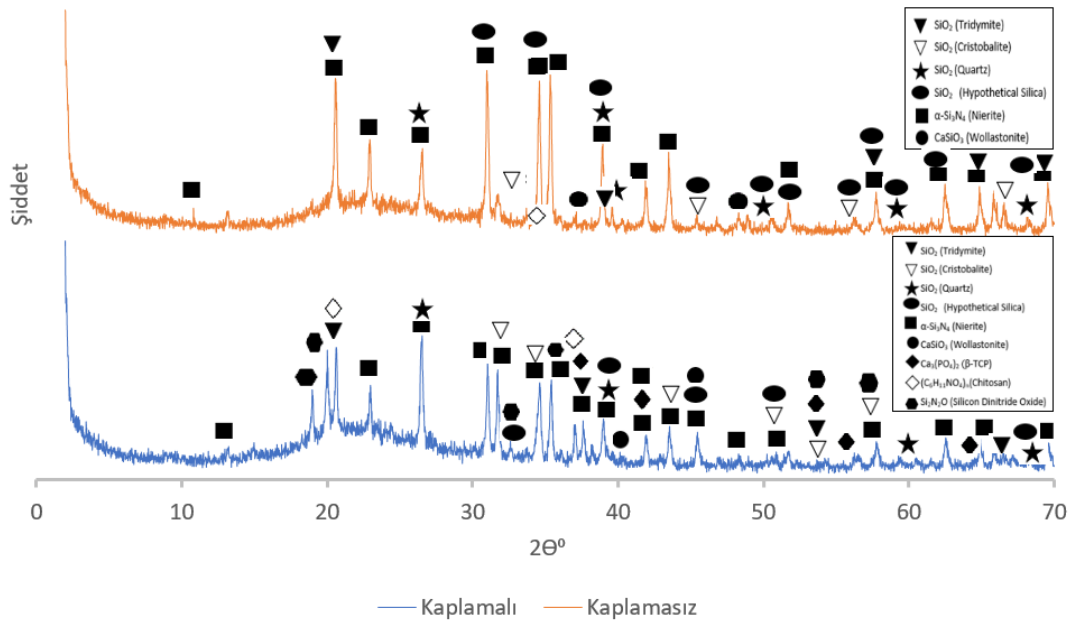


(d) EPD-3 30V 3 dk

Şekil 6. (a) EPD-1, (b) EPD-2 ve (c) EPD-3 (d) EPD-4 nolu kaplamalarına ait EDS sonuçları

Elde edilen EPD-4 nolu kaplamanın biyolojik olarak aktivitesini test etmek için insan kan plazmasını taklit eden iyon oranlarına sahip su bazlı çözelti olan SBF (Yapay Vücut Sıvısı); 1.5X şeklinde Tablo 3’te verilen reçeteye göre üretilmiştir. ile 21 gün boyunca hızlandırılmış yapay vücut sıvısı içinde tutulmuştur. Öncesinde ve sonrasında XRD testi yapılmıştır.

SBF sıvıları, biyoaktif yüzeyler üzerinde apatit mineralini oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bu çalışmada, S. Jolata ve arkadaşları tarafından geliştirilen “1.5X Tas-SBF” olarak adlandırılan “hızlandırılmış” SBF hazırlanmıştır (Jalota ve ark., 2008). Hızlandırılmış SBF sıvısının hazırlanmasında Sodyum Klorit (NaCl), Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃), Potasyum Klorit (KCl), Dipotasyum Hidrojen Fosfat (Na₂HPO₄), Magnezyum Klorit Hekzahidrat (MgCl₂.6H₂O), Kalsiyum Klorür Dihidrat (CaCl₂.2H₂O) (Ekstra Saf), Sodyum Sülfat (Na₂SO₄) (Susuz), TRIS (Hidroksimetil Aminometan), Hidroklorik Asit (HCl) ve destile su kullanılmıştır. SBF çözeltisi hazırlanırken ortam sıcaklığı 36-37 °C civarında tutulmuş ve pH kontrolü de gerçekleştirilmiştir. 1 lt SBF sıvısı hazırlamak için öncelikle 700 ml saf su 36 °C’ye ısıtılır ardından gerekli kimyasallar sırasıyla suya eklenerek ortam sıcaklığı ve pH kontrolüyle çözelti üzerine su eklenerek 1 lt’ye tamamlanır. Son olarak hazırlanan SBF sıvısının pH değeri 7.4’tür ve insan vücudunun pH değerine yakındır.

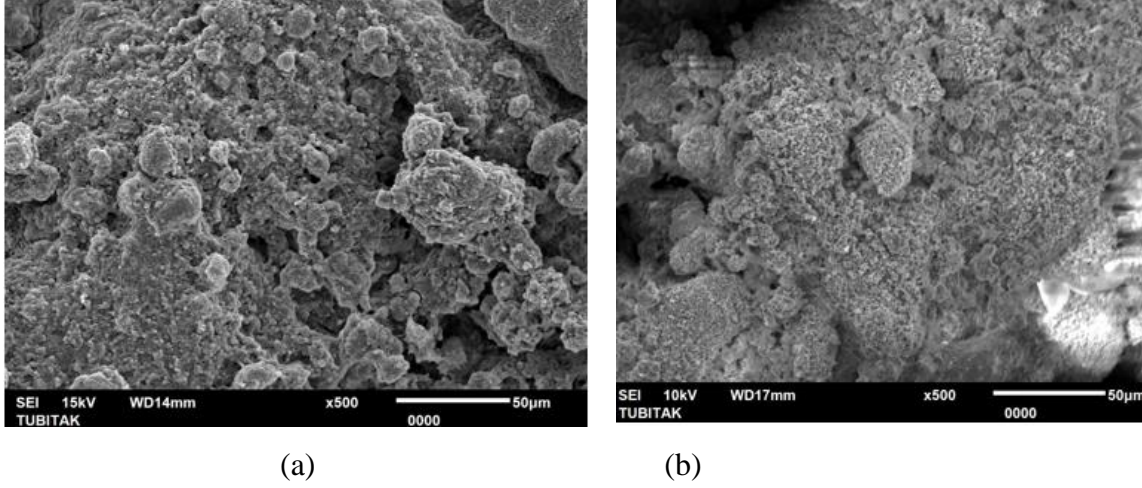


Şekil 7. SBF (Yapay Vücut Sıvısı) İçinde 21 Gün Bekletilmiş Kaplamalı (EPD-4) ve Kaplamasız Numuneye Ait XRD Analiz Grafiği

Kaplama sonrası numuneye XRD, 21 gün SBF’de bekleyen kaplamalı ve kaplamasız şahit numuneye numuneye XRD yapılmış olup XRD grafiği Şekil 7’de verilmiştir. SBF’de bekletilmiş kaplanmış ve kaplanmamış numunelerin XRD analizlerinin tümünde Tridimit, Kristobalit, Quartz,

Hypothetical Silica, Nierite ve Wollastonite gözlenmiş olup; kaplanmış ve SBF’de bekletilmiş numunelerde ise ekstra faz olarak β -TCP, Chitosan ve Silisyum Dinitrit Oksit ($\text{Si}_2\text{N}_2\text{O}$) gözlenmiştir.

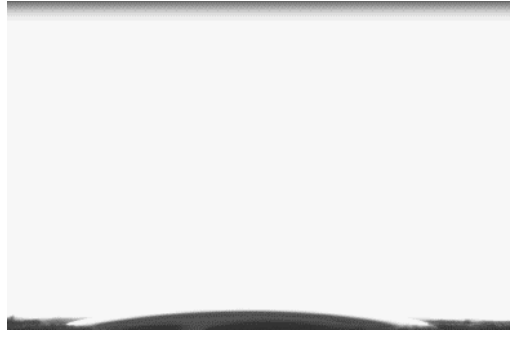
Şekil 8’da SBF’de 21 gün bekletilmiş EPD-4 kodlu kaplanmış (a) ve kaplanmamış (b) numunelere ait SEM görüntüleri görülmekte olup kaplanmış numunenin hücre büyümeye daha elverişli bir yapı oluşturduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 8. SBF (Yapay Vücut Sıvısı) İçinde 21 Gün Bekletilmiş (a) Kaplanmış/EPD-4 (b) Kaplanmamış Numuneye Ait Farklı Büyütmelerde SEM Görüntüleri 500x

Ayrıca, yapı iskelelerinin hidrofiliği temas açısı yöntemi ile ölçülmüştür. Pürüzlü yüzeylerin ıslanabilirliği, hem kimyasal bileşim hem de katı yüzeyin geometrik yapısı ile kontrol edilebilecek önemli bir özelliktir. Bir sıvı damlası pürüzlü bir yüzeye temas ettiğinde, damlacık ya yayılır ya da bırakıldığı gibi kalır, her iki durumda da sıvı ile yüzey arasında bir açı oluşmaktadır. Temas açısı ölçümleri pürüzlü yüzeyin ıslanabilirliğini karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Demir, 2019). Temas açısı ölçümleri Kruss DSA100 cihazı ile ölçülmüştür. En iyi ıslatma açısını veren numune de EPD-4 kodlu numune olup ortalama değer $50,92 \pm 0,1$ olup literatür ile uyum göstermektedir (Siddiqui M.A, 2014).

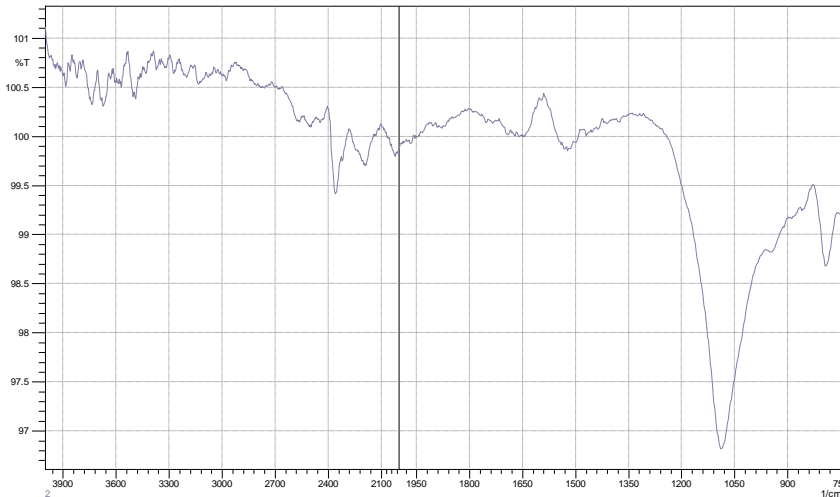
EPD-4 kodlu numuneye ait örnek ölçüm görüntüsü Şekil 9’da verilmiş olup hidrofilik karakter göstermektedir (Yuan ve Lee, 2013). Yüzeydeki damla temas açısı cihazının kamerası ile kaydedilmiştir ve kaydedilen görüntü kullanılarak yapı iskelelerinin temas açıları belirlenmiştir. Her bir iskele yüzeyi üzerinde 6 noktada analiz yapılmış ve sonuçta ortaya çıkan temas açısı görüntüleri ortalama değer olarak sunulmuştur. Kitosan-jelatin polimerik karışımlar için ise çapraz bağlama ve jelatin miktarı artışı ile hidrofilik davranışın arttığı, temas açılarının küçüldüğü görülmüştür (Hasırcı ve ark; 2010).



Şekil 9. EPD-4 nolu numunenin temas açısı ölçümü

Yüzey pürüzlüğünün ölçülebilmesi amacı ile DEKTAM 6M Stylus Profiler cihazında ölçüm yapılmıştır. Her bir numune için 6'şar ölçüm yapılmış olup en iyi yüzey pürüzlülüğü değeri EPD-4 kodlu numunede elde edilmiştir. EPD-4 kodlu numune için ortalama Ra değeri $5,8 \pm 0,1$ olarak ölçülmüştür. Yüzey pürüzlülüğü değerleri birbirleri ile uyumlu olup yüzey pürüzlülüğünün ıslatma açısı üzerine etkisi önemsiz seviyededir. Elde edilen yüzey pürüzlülük değeri doku uyumu için elverişlidir. Yüzey alanını artırması nedeni ile doku tutunmasına yardımcı olmaktadır (Qingfeng Z., ve ark., 2008).

FTIR analizi Shimadzu marka cihazda $750-4000 \text{ cm}^{-1}$ bant aralığında gerçekleştirilmiştir. Şekil 10'da EPD-4'e ait FTIR grafiği verilmiş olup; daha literatürde önce β -TCP/kitosan ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$) üzerine yapılmış olan analiz sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Caicedo J.C. ve ark., 2020). Elde edilen FTIR sonuçları kaplamanın hücre tutunmasına olanak sağlayacak nitelikte olduğunu desteklemektedir (Zan Q. ve ark. 2007).



Şekil 10. EPD-4 kodlu kaplama numunesine ait FTIR grafiği

4. Sonuçlar ve Öneriler

Elde edilen kaplamalar kendi aralarında kıyaslandıklarında EPD-4 kodu ile verilen 30V ile 3dk ile kaplanan β -TCP/kitosan esaslı EPD kaplamanın literatürdeki β -TCP-Kitosan oluşumuna ait görüntüler ile benzeşmekte olduğu görülmüştür.

SBF’de bekletilmiş kaplanmış ve kaplanmamış numunelerin XRD analizlerinin tümünde Tridimit, Kristobalit, Quartz, Hypothetical Silica, Nierite ve Wollastonite gözlenmiş olup; kaplanmış ve SBF’de bekletilmiş numunelerde ise ekstra faz olarak β -TCP, Chitosan ve Silisyum Dinitrit Oksit ($\text{Si}_2\text{N}_2\text{O}$) gözlenmiştir.

Yapı iskelelerinin hidrofiliği temas açısı yöntemi ile ölçülmüştür. Her bir iskele yüzeyi üzerinde 6 noktada analiz yapılmış ve sonuçta ortaya çıkan temas açısı görüntüleri ortalama değer olarak sunulmuştur. En iyi ıslatma açısını veren numune de EPD-4 kodlu numune olup ortalama değer $50,92 \pm 0,1$ olup literatür ile uyum göstermekte olup hidrofilik karakter göstermektedir. Kitosan-jelatin polimerik karışımlarda çapraz bağlama ve jelatin miktarı artışı ile hidrofilik davranışın arttığı, temas açılarının küçüldüğü görülmüştür.

Yüzey pürüzlülüğünün ölçülebilmesi amacı her bir numune için 6’şar ölçüm yapılmış olup en iyi yüzey pürüzlülüğü değeri EPD-4 kodlu numunede elde edilmiştir. EPD-4 kodlu numune için ortalama Ra değeri $5,8 \pm 0,1$ olarak ölçülmüştür. Yüzey pürüzlülüğü değerleri birbirleri ile uyumlu olup yüzey pürüzlülüğünün ıslatma açısı üzerine etkisi önemsiz seviyededir. Elde edilen yüzey pürüzlülük değeri doku uyumu için elverişlidir. Yüzey alanını arttırması nedeni ile doku tutunmasına yardımcı olmaktadır.

EPD-4’e ait FTIR grafiği verilmiş olup; daha literatürde önce β -TCP/kitosan (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$) üzerine yapılmış olan analiz sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Elde edilen FTIR sonuçları kaplamanın hücre tutunmasına olanak sağlayacak nitelikte olduğunu desteklemektedir.

Literatürde EPD kaplama üzerine birçok çalışma olmasına rağmen Si_3N_4 altık üzerine EPD kaplanmasına yönelik az sayıda yayın mevcuttur. Si_3N_4 altık üzerine TCP-Kitosan EPD kaplanmasına yönelik ise çalışma bulunmamaktadır. Dolayısı ile biyoaktivitesi olan Si_3N_4 altık üzerine β -TCP/kitosanın EPD yöntemi ile kaplanması yenilikçi bir çalışmadır. EPD kaplamanın kolay uygulanabilirliği ve Si_3N_4 altık üzerine kaplamanın tutunabilirliği hücre büyümesi için elverişli ortam yaratacağından çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın gelecek aşamalarında ise MTT ve LDH testleri gibi biyolojik testlerin yapılarak biyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi, Micro CT ve sıvı porozimetre analizlerinin yapılmasıyla birlikte gözeneklilik bakımından fonksiyonel derecelendirilmiş geçişin analizinin yapılması

öngörülmektedir. Ayrıca antibakteriyel özelliklerin belirlenmesi amacı ile ISO 22916 standardına göre testlerin yapılması planlanmaktadır.

Teşekkür

TÜBİTAK MAM- Slovakya Bilimler Akademisi (SAS) ile uluslararası ikili iş birliği projesi olan "120N266" kodlu projeye teşekkürlerimi sunarım.

Yazarların Katkısı

Bu çalışmada diğer yazarların katkısı bulunmamaktadır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Bu çalışmada işbirliği yapılan kişi ve şirketler arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

Kaynaklar

- Bohner, M. Santoni, B.L.G. Döbelin N., (2020). β -tricalciumphosphatefor bone substitution: Synthesisandproperties, *ActaBiomaterialia*, 113(1), 23-41<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.022>
- Somers N, Jean, F, Lasgorceix, M, Preux. N, Delmotte C , Boilet L , Petit, F, Leriche. A, (2023),Fabrication of doped β -tricalciumphosphatebioceramicsby Direct Ink Writing for bone repair applications, *Journal of the European Ceramic Society*, 43 (2), 629-638
- Kurtuluş, G. Vardar F., (2020), Kitosanın Özellikleri, Uygulama Alanları, Bitki Sistemlerine Etkileri, *Int. J. Adv. Eng. PureSci.*, 32(3): 258-269 DOI: 10.7240/jeps.635430
- Fang C.-H., Lin Y.-W., Sun J.-S., Lin F.-H., (2019), "The chitosan/tri-calcium phosphate biocomposite bone cement promotes better osteo-integration: an in vitro and in vivo study", *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 14(162).
- Puvaneswary S., Talebian S., Raghavendran H. B., Murali M. R., Mehrali M., Afifi A. M., Kasim N. H. B. A., Kamarul T., (2015), "Fabrication and in vitro biological activity of TCP-Chitosan-Fucoidancomposite for bone tissue engineering", *Carbohydrate Polymers*, 134, 799-807.
- Gómez-Estaca J., Gómez-Guillén M.C., Fernández-Martín F., Montero P., (2011), "Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the propertiesof compound gelatinechitosan films", *Food Hydrocolloids*, 25, 1461-1469.
- Maji K., DasguptaS., PramanikK., BissoyiA., (2018), "Preparation and characterization of gelatin-chitosan-nano β -TCP basedscaffold for orthopaedic application", *Materials Science & Engineering C*, 86, 83-94.
- Mahjoub H., Sarosi C., Orasan C, Saplontai P. A., SEM characterisation of a tricalcium phosphate – chitosan,-PMMA cement, (2014) *Key Engineering Materials* 1662-9795, 614, 47-51

doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.614.47

- Mina A., Castano A., CaiCedo J.C., Caicedo H.H., Aguilar Y., (2015), Determination of physical properties for β -TCP + chitosan biomaterial obtained on metallic 316L substrates, *Materials Chemistry and Physics* 160 296e307, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.04.041>
- Jalota, S., Bhaduri S.B., Tas A.C., (2008), "Using a synthetic body fluid (SBF) solution of 27 mm HCO₃ to make bone substitutes more osteointegrative", *Mater. Sci. Eng. C*, 28, 129–140.
- Benyus, J.M., (2022). *Biyomimikri, İhamımı Doğadan Alan İnovasyon*. İstanbul, Vizyon Basımevi.
- Bahçepınar A. İ., (2020), EPD Yöntemi ile HA Kaplama İşleminde Kumlamının Kaplamanın Yüzey Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.
- Tunçay Ö.E., (2013), *Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Dokum Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Sunal E., (2015), *Development of Chitosan/Nanohydroxyapatite/Pcl Barrier Membranes for Periodontal Regeneration*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Güven S., (2006), *Integrated Biomimetic Scaffolds for Soft Tissue Engineering*, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- Gür V., (2018), *Farklı Sıcaklıklarda Üretilen Kobalt Katkılı Hidroksiapatitlerin Kristal Yapı ve Morfolojilerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Van der Biest O.O., Vandepierre L.J., *Electrophoretic Deposition of Materials Annu. Rev. Mater. Sci.* 1999. 29, 327–52
- Çankaya N., Sökmen Ö., *Kitosan-Kil Biyonanokompozitleri*, *Politeknik Dergisi*, (2016). 19(3), 283-295.
- Sarikaya M., Tamerle, C., Jen A.Y., Schulten K., Baneyx F., *Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. Nature Materials*, (2003), 2, 577–585 <https://doi.org/10.1038/nmat964>
- Zullo R., Iannace S., *The effects of different starch sources and plasticizers on film blowing of thermoplastic starch: Correlation among process, elongational properties and macromolecular structure*, *Carbohydrate Polymers*, (2009), 77(2), 376-383, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861709000307>
- Abbasi A., Khatoon F., Ikram S., *A review on remediation of dye adulterated system by ecologically innocuous "biopolymers/natural gums-based composites"*, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2023), 231, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813023001162>
- Barbin, D. F., Valous, N. A., Dias, A. P., Camisa, J., Hirooka, E. Y., Yamashita, F., *VIS–NIR spectroscopy as a process analytical technology for compositional characterization of film biopolymers and correlation with their mechanical properties*, *Materials Science and Engineering: C*, (2015), 56, 274–279. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493115301648>
- Rey C., Combes C., Drouet C., Grossin D., Bertrand G., Soulié J., *1.11 Bioactive Calcium Phosphate Compounds: Physical Chemistry*, *Comprehensive Biomaterials II*, (2017), 1, 244-290 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128035818101717>
- Jătariu (Cadinoiu) A.N., Popa M., Curteanu S., Peptu C.A., *Covalent and ionic co-cross-linking—An original way to prepare chitosan–gelatin hydrogels for biomedical applications*, *Journal of Biomedical Materials Research Part of A*, (2011), 98A(3), 342-350. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33122>
- Lien S.M., Li W.T., Huang T.J., *Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method*, *Materials Science and Engineering: C*, (2008), 28(1), 36-43, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493106003912>
- Wang Y., Guo X., Pan R., Han D., Chen T., Geng Z., Xiong Y., Chen Y., *Electrodeposition of chitosan/gelatin/nanosilver: A new method for constructing biopolymer/nanoparticle composite films with conductivity and antibacterial activity*, *Materials Science and Engineering: C*, (2015), 53, 222-228.
- Demir M., (2019), *Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonuna Yönelik PCL/Kitosan İçeren Formülasyonların Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
- Yuan, Y., & Lee, T. R. (2013). *Contact angle and wetting properties*. In *Surface science techniques*, 3-34. Springer Berlin Heidelberg.
- Siddiqui N., (2014), *Development of Chitosan Based Composite Matrices for Bone Tissue Engineering*, PhD Thesis, Biotechnology And Medical Engineering, National Institute Of Technology Rourkela, India.
- Hasırcı N., Işıklı C., Küçükürhan A., *Kitosan (2010), Jelatin Yapıların Doku Mühendisliği Amaçlı 2-D ve 3-D Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Biyouyumluluk Özelliklerinin İncelenmesi*, Proje Raporu

- Qingfeng Z., Wang C., Dong L., Cheng P., Tian J., (2008), Effect of surface roughness of chitosan-based microspheres on cell adhesion, *Applied Surface Science* 255(2):401–403, DOI: 10.1016/j.apsusc.2008.06.074
- Caicedo J.C., Caicedo H.H., Ramirez-Malule H., (2020), Structural and chemical study of β -Tricalcium phosphate-chitosan coatings, *Materials Chemistry and Physics*, 240, 122251.
- Zan Q., Wang C., Dong L., Liu R., Tian J., (2007), Preparation and Characterization of Biodegradable β -TCP-based Composite Microspheres as Bone Tissue Engineering Scaffolds, *Key Engineering Materials*, 1662-9795, 336-338, 1646-1649 doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.336-338.1646
- Boccaccini A. R., Keim S., Ma R., Li Y. and Zhitomirsky I., (2010), Electrophoretic deposition of biomaterials, *J. R. Soc. Interface* 7, S581–S613, doi:10.1098/rsif.2010.0156.focus.
- Esmaili, Mohammad Mahdi and Hassanzadeh Nemat, Nahid and Joupari, Morteza Daliri (2023), Surface Modification of Ti6Al4V Alloy with Si3N4/Nd Coating: Study of Microstructure, Hardness and Corrosion Behavior, doi.org/10.2139/ssrn.4354242
- Uchiskoshi T., Fukada Y., Suziki T., Nicholson P.S., (2000), Fabrication of Silicon Nitride Ceramics by EPD, *Journal of Japan Society of Powder and Powder Metallurgy*, 47, 9.
- Lessing P. A., Erickson A. W., Kuerth D. C., (2000), Electrophoretic deposition [EPD] applied to reaction joining of silicon carbide and silicon nitride ceramics, *Journal of Materials Science* 35, 2913 – 2925.
- Varlık Ö., TiB₂-Kitosan Kompozitlerin EPD Yöntemi ile Kaplanması Araştırılması (2021), Yüksek Lisans Tezi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı, Eskişehir Eskişehir Teknik Üniversitesi.
- Simchi A., Pishbin F., Boccaccini A.R., Electrophoretic deposition of chitosan, (2009), *Materials Letters*, 63,26, 2253-2256.
- Heise S., Forster C., Heer S., Qi H., Zhou J., Virtanen S., Lu T., Boccaccini A.R., (2019), Electrophoretic deposition of gelatine nanoparticle/chitosan coatings, *Electrochimica Acta*, 307, 318-325.
- Yamashita K., Yonehara E., Ding X., Nagai M, Umegaki T., Matsuda M., (2002), Electrophoretic coating of multilayered apatite composite on alumina ceramics, *Journal of Biomedical Materials Research*,
- Pishbin F., Mourin V., Flor S., Kreppel S., Salih V., Ryan M.R., Boccaccini A.R., (2014), Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Bioactive Glass/ Chitosan Composite Coatings for Orthopaedic Implants, [dx.doi.org/10.1021/am5014166](https://doi.org/10.1021/am5014166), *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6, 8796–8806.