

# MİKRO ARK OKSİDASYON İŞLEMİ UYGULANMIŞ Ti6Al4V ALAŞIMLARININ *İN-VİVO* BİYOUYUMLULUK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ\*

Mert GÜNYÜZ\*\*

*İstanbul Teknik Üniversitesi,  
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü,  
Maslak -İstanbul  
e-mail: gunyuz@itu.edu.tr*

Faysal UĞURLU, Onur ÇAVUŞ

*Marmara Üniversitesi,  
Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş Çene  
Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı  
Nişantaşı-İstanbul*

Murat BAYDOĞAN

*İstanbul Teknik Üniversitesi,  
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü,  
Maslak İstanbul*

Cem ŞENER

*Marmara Üniversitesi,  
Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş Çene Hastalıkları ve  
Cerrahisi Anabilim Dalı, Nişantaşı-İstanbul*

Hüseyin ÇİMENOĞLU

*İstanbul Teknik Üniversitesi, Metalurji ve Malzeme  
Mühendisliği Bölümü, Maslak -İstanbul*

## ÖZET

Bu çalışmada, Ti6Al4V alaşımına mikro ark oksidasyon işlemi uygulanarak, işlem sonrasında yüzeyin morfolojik ve yapısal özellikleri ile in vitro ve in-vivo biyouyumluluk özellikleri incelenmiştir. Mikro ark oksidasyon işlemi, bazik esaslı bir çözelti içerisinde ve farklı voltaj değerleri esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Mikro ark oksidasyon işlemi sonunda malzeme yüzeyinde poröz, içerisinde kalsiyum ve fosforca zengin partiküllerin bulunduğu anataz ve rutil formunda TiO<sub>2</sub> tabakası elde edilmiştir. Mikro ark oksidasyon uygulanmış numunelerin in vitro biyouyumluluk özellikleri, numuneler yapay vücut sıvısı içerisinde 30 gün tutularak belirlenmiştir. Yapay vücut sıvısı yüzeyinde en yüksek oranda apatit oluşumu gözlenen numunelere in vivo biyouyumluluk deneyleri uygulanarak yüzeyde kemik dokusunun gelişmesi incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ti6Al4V, mikro ark oksidasyon, biyouyumluluk

## Investigation of in-vivo Biocompatibility Properties of Ti6Al4V Alloys Subjected to Micro Arc Oxidation Process

### ABSTRACT

In this study, surface properties and biocompatibilities of Ti6Al4V alloys were examined after the micro arc oxidation processes, which were carried out in an alkaline solution by applying different voltage values. Micro arc oxidation process provided precipitation of Ca and P rich particulates within the oxide layer composed of rutile and anatase modifications of TiO<sub>2</sub>. In vitro biocompatibility tests were performed by holding the samples in a simulated body fluid for 30 days. The samples, which have the most apatite formation on their surfaces in the simulated body fluid, were then subjected to in-vivo biocompatibility tests in order to evaluate bone tissue on their surfaces.

**Keywords:** Ti6Al4V, micro arc oxidation, biocompatibility

\*\* İletişim yazarı

\* Bu makale 6-7 Kasım 2009 tarihlerinde Makina Mühendisleri Odası'nda düzenlenen III. Ulusal Tıbbi Cihazlar İmalatı Sanayi Kongresi ve Sergisi'nde bildiri olarak sunulmuştur

## GİRİŞ

**T**itanyum ve alaşımları, oda sıcaklığında dahi yüzeylerinde oluşan oksit filmine bağlı olarak yüksek korozyon dayanımı gösteren ve bu özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalar için en çok tercih edilen malzemelerdendir. Bu oksit filmi, malzemeye kimyasal kararlılık ve biyoyoumluluk sağlamaktadır. Günümüzde pek çok ticari titanyum alaşımı mevcut olmasına rağmen, biyomedikal uygulamalarda genel olarak saf titanyum ve Ti6Al4V alaşımı kullanılmaktadır. 240 -740 MPa arasında çekme dayanımına sahip olan saf titanyum genel olarak dental implantlarda kullanılmaktadır. Öte yandan, Ti6Al4V, en popüler titanyum alaşımı olarak bilinmekte ve dünya titanyum pazarında %50 gibi yüksek bir oranda kullanılmaktadır. Ti6Al4V alaşımının bu oranda tercih edilmesi, başlıca, yüksek korozyon direnci ve düşük yoğunluğu ile statik ve dinamik dayanımının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, diğer biyometallere (paslanmaz çelik ve Co-Cr alaşımları) göre Ti6Al4V alaşımının elastik modülünün kemiğin elastik modülüne daha yakın olması, bu alaşımın özellikle eklem uygulamaları için en çok tercih edilen metallere biri olmasını sağlamıştır [1-3].

Mikro ark oksidasyon işlemi, hafif metallerin yüzey modifikasyonu için kullanılan, elektrokimyasal esaslı bir yüzey modifikasyon tekniğidir. Bu teknikte, genellikle bazik esaslı bir elektrolit çözeltisi içinde (numune) ve katot arasında yüksek bir voltaj uygulanır ve bu yüksek voltaj belirli bir kritik voltaj değerini (bozunum voltajı) aştığında malzeme üzerinde mikro boyutta kıvılcımlar görülmeye başlar ve bir dizi karmaşık reaksiyon sonucu numune yüzeyinde poröz oksit tabakası oluşmaya başlar [4-5]. Biyomedikal uygulamalarda daha iyi kemik-implant bağlantısı sağladığı için poröz ve pürüzlü yüzeye sahip implantlar tercih edilmektedir. Mikro ark oksidasyon işleminin işlem parametrelerine göre, farklı yüzey özelliklerine sahip oksit tabakası elde edilebilmektedir [6-8]. Bu çalışmanın amacı, mikro ark oksidasyon işleminde işlem parametrelerinin malzemenin biyoyoumluluk özelliklerine etkisinin incelenmesidir.

## DENEYSEL ÇALIŞMALAR

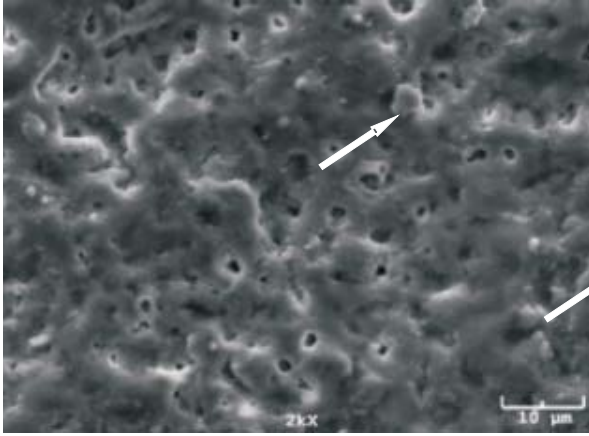
Bu çalışmada Ti6Al4V alaşımından hazırlanan 30 mm çapında ve 5 mm kalınlığında numunelere mikro ark oksidasyon işlemi uygulanmıştır. Numuneler ön işlem olarak zımparalanmış, saf su ile yıkanmış ve etanol ile temizlenmişlerdir. Mikro ark oksidasyon işleminde, katot olarak paslanmaz çelik kap kullanılmıştır. Oksidasyon işlemi, bazik karakterli bir elektrolit içerisinde 5 dakika süre ile 500-550V değerlerinde iki ayrı sabit pozitif voltaj değeri uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında numuneler saf su ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuşlardır.

Oksitlenmiş yüzeylerin karakterizasyonu, mikroskobik

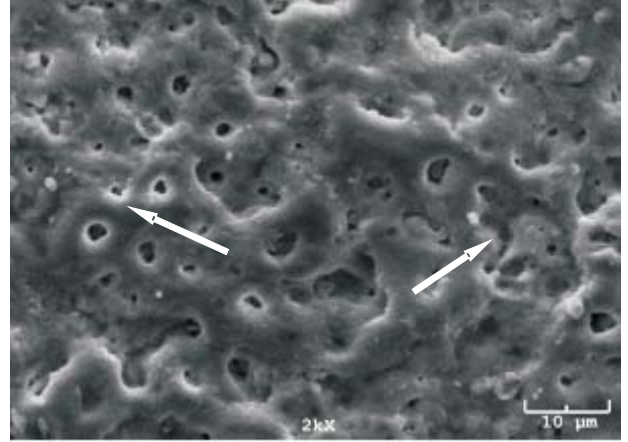
incelemeler, X-ışınları analizi, pürüzlülük ölçümleri, temas açısı ölçümleri ve biyoyoumluluk deneyleri ile yapılmıştır. Mikroskobik incelemeler EDS donanımlı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Oksit tabakasının kalitatif faz analizi CuK $\alpha$  radyasyonu kullanan bir X-ışını difraktometresi (XRD, GBC-MMA) ile gerçekleştirilmiştir. Temas açısı ölçümleri KSV CAM200 cihazında malzeme yüzeyine 8  $\mu$ l saf su damlatılıp ölçüm yapılarak, yüzey pürüzlülüğü ölçümleri ise Veeco Dektak 6M profilometre cihazı ile numune yüzeylerinin ortalama yüzey pürüzlülüğü (Ra) ölçülerek gerçekleştirilmiştir. *In vitro* biyoyoumluluk deneylerinin ilk bölümü numunelerin 30 gün boyunca 37°C'de yapay vücut sıvısı (YVS) içerisinde bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Numuneler YVS içerisinde çıkarıldıktan sonra saf su ile yıkanmış ve hava ile kurutulmuştur. *In vitro* deneylerin ikinci bölümünde Human Osteosarcoma (Saos-2) hücre büyümesi testleri yapılmıştır. Numuneler sterilize edilerek aseptik şartlarda hücre tohumlaması yapılmış, CO<sub>2</sub> inkübatörü içinde 37°C sıcaklıkta 2 gün süre ile bekletilmiş ve Cell titer 96TM Nanradioactivity Cell Proliferation (MTS) düzeneği ile numune üzerinde hücre yoğunluğu belirlenmiştir. *In vivo* biyoyoumluluk deneylerinde 1,2 mm çapında ve 5 mm uzunluğunda hazırlanan vidalara mikro ark oksidasyon işlemi uygulanmış ve bu vidalar ağırlığı, 2-3 kg arasında değişen 14 adet 6-8 aylık sağlıklı dişi Yeni Zelanda tavşanlarının kemiklerine gerekli cerrahi prosedür uygulanarak monte edilmişlerdir. 4 hafta ve 8 hafta sürelerle deneklerden vidalar çıkarılarak kesitleri alınmış, hematoksilen eozin boyama ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında histopatolojik incelemeye tabi tutulmuş, işlem görmüş ve işlem görmemiş numuneler arasındaki değişim incelenmiştir.

## SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

Şekil 1'de mikro ark oksidasyon uygulanmış numunelerin yüzeyinin SEM görüntüleri verilmiştir. Yüzeyin poröz bir morfolojide olduğu, porların yüzeyde homojen olarak dağıldığı ve por çapının 1-3  $\mu$ m arasında değiştiği görülmektedir. Bu tür porlu yüzeyler implantlarla hücre arasındaki bağlanmayı artırdığından çoğu medikal uygulamalarda tercih edilmektedir. SEM çalışmaları sırasında 500 V ve 550V'da mikro ark oksidasyon uygulanmış numunelerin yüzeyinde (Şekil 1'de ok işareti ile gösterilmiştir) açık renkli küçük boyutlu partiküllerin mevcut olduğu dikkat çekmiştir. Elektron dağılım spektroskopisi (EDS) çalışmaları, bu partiküllerin, Ca/P oranı 1.64 olacak şekilde Ca ve P'ce zengin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hidroksiapatitin Ca/P oranına (1.67) çok yakın olması nedeniyle söz konusu küçük partiküllerin hidroksiapatit olduğu düşünülmektedir. Hidroksiapatit (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) kemik ve dişin en önemli inorganik bileşeni olduğundan, implantların yüzeyinde bulunması biyoyoumluluk açısından olumlu bir durum olarak değerlendirilmektedir.



(a)

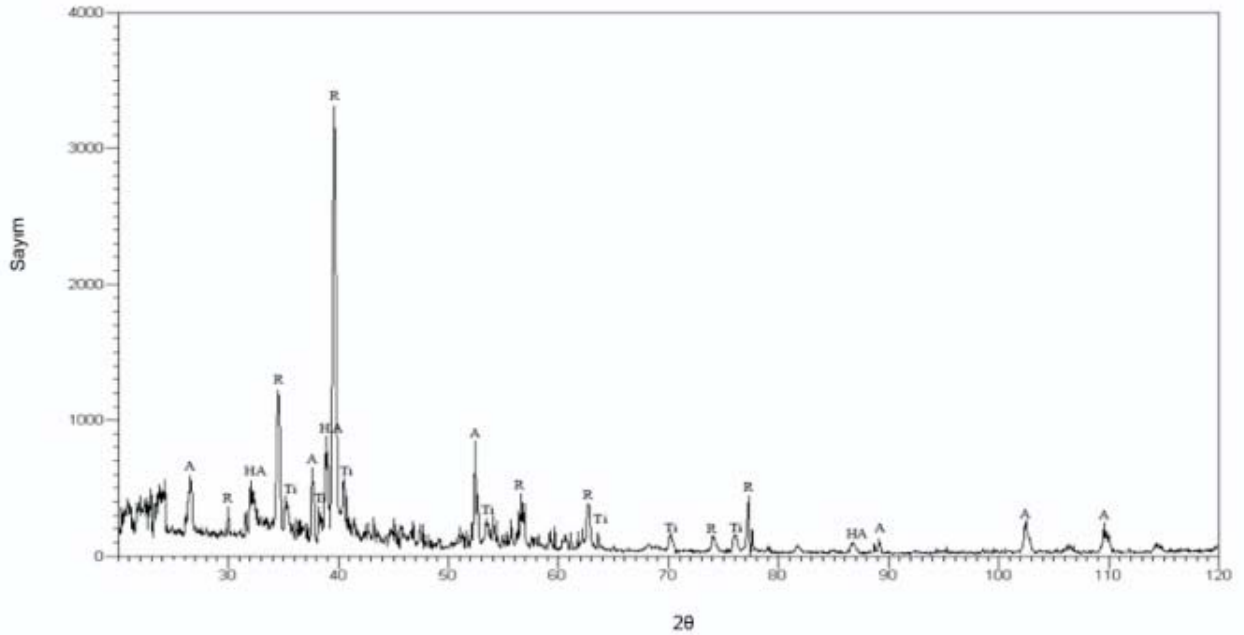


(b)

Şekil 1. (a) 500 V ve (b) 550 V Değerlerinde Mikro Ark Oksidasyon İşlemi Uygulanmış Ti6Al4V Numunelerinin Yüzeyinin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Ti6Al4V alaşımına 500V ve 550V'da uygulanan mikro ark oksidasyon işlemi sonrası yüzeyde oluşan fazları kalitatif

özelliği bulunduğu, bu bakımdan da biyoyumluluğa katkıda bulunduğu bilinmektedir [9-11].



Şekil 2. 500V'da Mikro Ark Oksidasyon Uygulanan Ti6Al4V Alaşımının XRD Paterni

olarak belirlemek amacıyla XRD çalışması yapıldı ve örnek olarak 500V'da mikro ark oksidasyon işlemi uygulanan numunenin XRD paterni Şekil 2'de verilmiştir. Buna göre numunelerin yüzeyinde oluşan oksit tabakasının anataz ve rutil morfolojisinde  $TiO_2$  fazından ibaret olduğu, ayrıca yüzeyde mikro ark oksidasyon işlemi sonrası hidroksiapatit oluştuğu da görülmüştür. Rutil ve anataz titanyum oksitinin poliformları olup, suyu tutarak yüzeyde Ti-OH grubu oluşumuna neden olmaktadır. Temel hidroksit gruplarının apatit çekirdeklenmesi ve kristalizasyonunu teşvik edici bir

Tablo 1'de, 500V ve 550V değerinde mikro ark oksidasyon

Tablo 1. Orijinal Haldeki ve Mikro Ark Oksidasyon Uygulanmış Numunelerin Ortalama Yüzey Pürüzlülüğü ve Temas Açısı Değerleri

	Orijinal	Mikro ark oksidasyon	
		500V	550V
Ortalama yüzey pürüzlülüğü, $R_a$ , $\mu m$	0.08	0.6	0.7
Temas açısı, derece	44	35	35

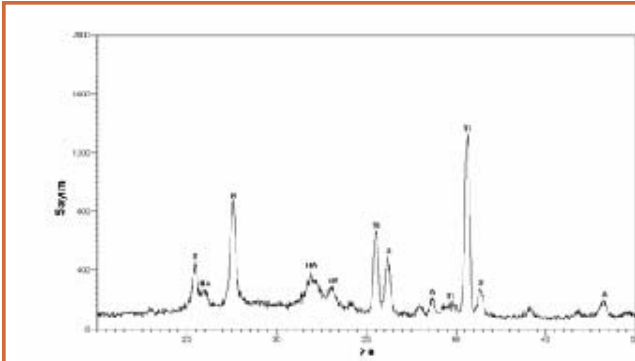


(a)

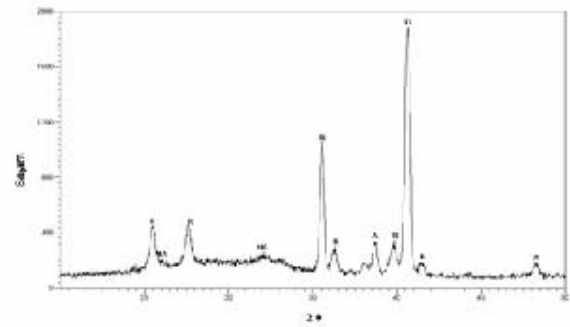


(b)

Şekil 3. YVS içerisinde 30 Gün Tutulan Numunelerin SEM Görünümleri (a) 500 V (b) 550 V.



(a)



(b)

Şekil 4. Numunelerin YVS Deneyi Sonrası XRD Paternleri (a) 500 V, (b) 550 V (A: anataz, R: rutil ve Ti: titanyum, HA: hidroksiapatit)

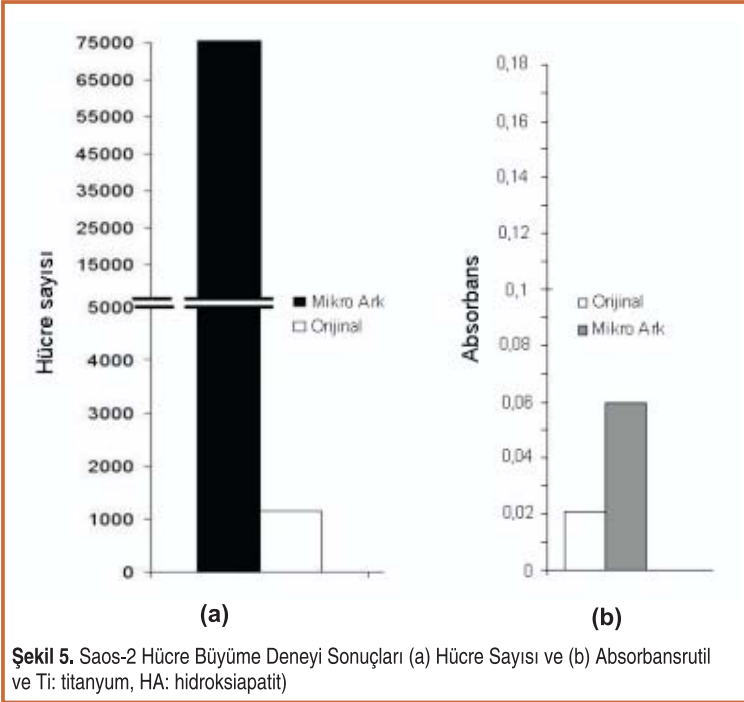
uygulanmış numunelerin yüzeylerinin ortalama yüzey pürüzlülüğü ve temas açısı değerleri, orijinal hâldeki numunenin değerleri ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

İncelenen Ti6Al4V alaşımına mikro ark oksidasyon işlemi uygulandığında, ortalama yüzey pürüzlülüğünün orijinal hâldeki alaşıma göre önemli ölçüde arttığı, temas açısı değerinin ise düştüğü görülmektedir. Yüzeyde oluşan oksit tabakasının nispeten daha pürüzlü olması, implant ile biyolojik ortam arasındaki etkileşimi artırarak kemikle bütünleşmeyi geliştirici bir faktör olarak bilinmektedir [12,13]. Öte yandan daha düşük temas açısı değerleri (daha yüksek ıslatılabilirlik), biyolojik sıvı ve implant arayüzündeki etkileşimi geliştirmesi bakımından istenen bir özellik olarak değerlendirilmektedir [14]. Bu etkileşimin bir sonucu olarak, daha düşük temas açısına sahip yüzeyler, hücre büyümesini, osteoblastik hücrelerin yüzeye yapışmasını [14,15] ve YVS içerisinde apatit oluşma kabiliyetini arttırabilmektedir [12].

Numunelerin yapay vücut sıvısı içinde 30 gün tutulması

şeklinde gerçekleştirilen in vitro deneyler sonunda, numune yüzeylerinin SEM görüntüleri Şekil 3'te, XRD paternleri ise Şekil 4'te verilmiştir. Yapılan EDS analizi ile her iki yüzeyin de Ca ve P'ca zengin olduğu belirlenmiş, XRD incelemeleri Rutil ve Anataz fazlarına ilaveten YVS içerisinde 30 gün bekleme sonrası hidroksiapatitin de oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. Hidroksiapatit piklerinin nisbi şiddeti ve pik genişliği dikkate alındığında, 500V'da yapılan mikro ark oksidasyon sonrası oluşan hidroksiapatit piklerinin, gerek 550V'da mikro ark oksidasyon uygulanan numuneye göre, gerekse, mikro ark oksidasyon sonrası YVS deneyi uygulanmayan numuneye göre (Şekil 2) daha belirgin olduğu görülmektedir (Şekil 4).

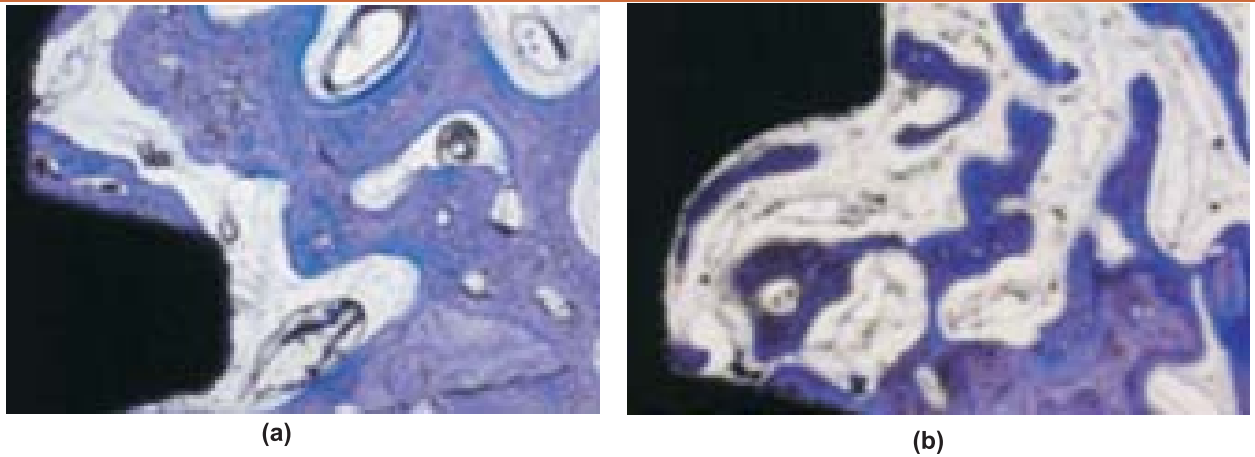
Yapay vücut sıvısı içinde gerçekleştirilen biyoyoumluluk deneylerinde 500V'da mikro ark oksidasyon uygulanan numunenin yüzeyinde hidroksiapatit piklerinin nisbi şiddetlerinin daha yüksek olması nedeniyle, hücre büyüme deneyleri ve in vivo hayvan deneyleri bu numuneler kullanılarak yapılmıştır. Şekil 5'te orijinal hâldeki ve mikro ark oksidasyon uygulanmış numunelerin Saos-2 hücre büyüme testi sonuçları, hücre sayısı ve absorbans değerleri



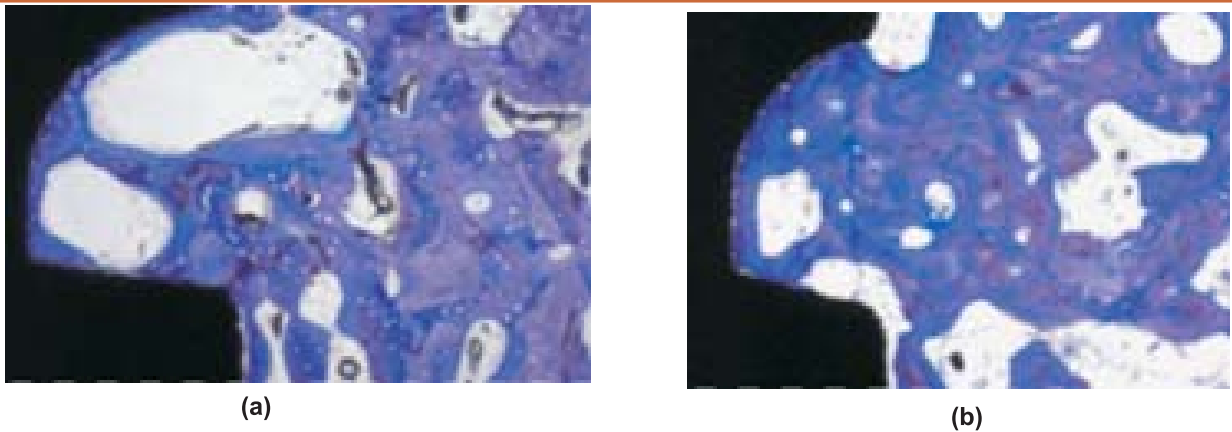
Şekil 5. Saos-2 Hücre Büyüme Deneyi Sonuçları (a) Hücre Sayısı ve (b) Absorbansrutil ve Ti: titanyum, HA: hidroksiapatit)

olarak verilmiştir. Mikro ark oksidasyon işleminin, üreyen hücre sayısı ve absorbans değerlerini arttırdığı, dolayısıyla osseointegrasyon kapasitesini geliştirdiği görülmektedir.

Hücre büyüme deneylerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, denek olarak tavşanların kullanıldığı in vivo biyouyumluluk deneyleri yapılmıştır. Bu deneylerde, vidaların denek hayvanlara takılmasından sonraki dördüncü ve sekizinci hafta sonunda alınan implantlara ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 6 ve Şekil 7'de verilmiştir. Dördüncü haftada alınan implantlar üzerinde yapılan incelemede, mikro ark oksidasyon işlemi uygulanmış vida yüzeyinin kemik kontak yüzdesi ve uzunluğunun anlamlı derecede farklı olduğu gözlemlenmiştir. Erken dönem stabilizasyon oluşumunda mikro ark oksidasyon işlemi uygulanmış grubun anlamlı derecede üstün olduğu belirlenmiştir. Sekizinci haftada alınan implantlarda ise kemik formasyonları değerlendirildiğinde mikro ark oksidasyon işlemi uygulanmış grubun anlamlı derecede yüksek lamellar kemik formasyonuna sahip



Şekil 6. Dördüncü ve Sekizinci Hafta Sonunda İşlem Görmemiş İmplantlara Ait Optik Mikroskop Görüntüleri (a) 4 Hafta ve (b) 8 Hafta



Şekil 7. Dördüncü ve Sekizinci Hafta Sonunda İşlem Mikro Ark Oksidasyon İşlemi Görmüş İmplantlara Ait Optik Mikroskop Görüntüleri (a) 4 Hafta ve (b) 8 Hafta

olduğu gözlemlenmiştir. Histolojik açıdan daha olgun ve düzenli olan lameller kemik, mikro ark oksidasyon işlemi uygulanmış grubun yüzey çevresinde daha fazla yer tutmaktadır.

### GENEL SONUÇLAR

Yapılan çalışmalarda elde edilen verilerle sonuç aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Mikro ark oksidasyon işlemi sonucunda yüzeyde anataz ve rutilden oluşan poroz bir oksit tabakası meydana gelmekte, yüzeyde ayrıca hidroksiapatit oluşmaktadır.
2. Mikro ark oksidasyon işlemi sonrası elde edilen yüzey, orijinal Ti6Al4V alaşımına göre daha yüksek pürüzlülük ve ıslatılabilirlik değerlerine sahiptir.
3. Mikro ark oksidasyon uygulanan örnekler yapay vücut sıvısı içinde 30 gün bekletildiğinde yüzeyde hidroksiapatit oluşumu belirlenmiştir. 500V'da yapılan mikro ark oksidasyon sonrası yüzeyde belirlenen hidroksiapatit pikleri daha belirgindir.
4. Saos-2 hücre büyüme deneyleri sonrasında, mikro ark oksidasyon işlemi uygulanmış numunelerin yüzeyinde daha yüksek sayıda hücre üremesi gerçekleşmektedir.
5. *In vivo* deneyler sonucunda mikro ark oksidasyon işlemi görmüş implant yüzeylerinin kemik kontak yüzdesi ve uzunluğu, orijinal alaşıma göre anlamlı derecede artmıştır.

### TEŞEKKÜR

Bu bildiri 105M062 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında yapılan çalışmaların bir kısmını içermektedir.

### KAYNAKÇA

1. **Leyens, C., and Peters, M.** 2003. Titanium and Titanium Alloys, WILEY-WCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, p.22.
2. **Brunette, D.M. et al.** 2001. Titanium in medicine, material science, surface science, engineering, biological

response and medical applications. Berlin, Germany, Springer.

3. **Yerokhin, A.L., Nie, X., Leyland, A., and Matthews, A.** 2000. Surface and Coatings Technology, 130, 195-206.
4. **Li, L., Kong, Y., Kim, H., Kim, Y.** 2004. Biomaterials, 25, 2867-2875.
5. **Nie, X., Leyland, A., Song H.W., Yerokhin, A.L., Dowey, S.J., Matthews, A.** 1999. Surface and Coatings Technology, 116-119, 1055-1060.
6. **Song, W., Jun, Y., Han, Y., and Hong, S.** 2004. Biomaterials, 25, 3341-3349.
7. **Sun, J., Han, Y., Huang, X.** 2004. Biomaterials, 25, 2867-2875.
8. **Tang, G., Zhang, R., Yan, Y., Zhu, Z.** 2004. Materials Letters, 58, 1857-1860.
9. **Kasuga, T., Kondo, H., Nogami, M.** 2002. Apatite Formation on TiO<sub>2</sub> in Simulated Body Fluid, Journal of Crystal Growth, 235, 235-240.
10. **Wanga, X.X., Yana, W., Hayakawab, S., Tsurub, K., Osaka, A.** 2003. Apatite Deposition on Thermally and Anodically Oxidized Titanium Surfaces in a Simulated Body Fluid, Biomaterials, 24, 4631-4637.
11. **Sun, J., Han, Y., Cui, K.** 2008. Microstructure and Apatite-Forming Ability of the MAO-Treated Porous Titanium, Surface and Coatings Technology, 202, 4248-4256.
12. **Das, K., Balla, V.K., Bandyopadhyay, A., Bose, S.** 2008. Surface Modification of Laser-Processed Porous Titanium For Load-Bearing Implants, Scr. Mater. 59, 822-825.
13. **Mo, A.C., Liao, J., Xu, W., Xian, S.Q., Li, Y.B., Bai, S.** 2008. Preparation and Antibacterial Effect of Silver Hydroxyapatite/Titania Nanocomposite Thin Film On Titanium, Appl. Surf. Sci. 255, 435-438.
14. **Ou, K.L., Shih, Y.H., Huang, C.F., Chen, C.C., Liu, C.M.** 2008. Preparation Of Bioactive Amorphous-Like Titanium Oxide Layer On Titanium by Plasma Oxidation Treatment, Appl. Surf. Sci., 255, 2046-2051.
15. **Le Guehennec, L., Lopez-Heredia, M.A., Enkel, B., Weiss, P., Amourig, Y., Layrolle, P.** 2008. Osteoblastic Cell Behaviour on Different Titanium Implant Surfaces, Acta Biomater. 4, 535-543.

*Daha Etkin Bir ODA için  
Üyelik Aidatlarımızı  
ÖDEYELİM*