



POLİTEKNİK DERGİSİ

JOURNAL of POLYTECHNIC

ISSN: 1302-0900 (PRINT), ISSN: 2147-9429 (ONLINE)

URL: <http://dergipark.org.tr/politeknik>



NiTi alaşımının mikro ark oksidasyon sonrası in-vitro özelliklerinin araştırılması

Investigation of in-vitro properties of NiTi alloy after micro arc oxidation

Yazar(lar) (Author(s)): Süleyman ŞÜKÜROĞLU¹, Yaşar TOTİK², Ebru Emine ŞÜKÜROĞLU³, Rıdvan KÜŞÜKOSMAN⁴

ORCID¹: 0000-0003-4291-6378

ORCID²: 0000-0001-8638-5471

ORCID³: 0000-0003-2620-1989

ORCID⁴: 0000-0001-7432-7725

Bu makaleye řu şekilde atıfta bulunabilirsiniz(To cite to this article): Sukuroglu S., Totik Y., Sukuroglu E. E. ve Kucukosman R., "NiTi alaşımının mikro ark oksidasyon sonrası in-vitro özelliklerinin araştırılması", *Politeknik Dergisi*, 24(2): 373-382, (2021).

Eriřim linki (To link to this article): <http://dergipark.org.tr/politeknik/archive>

DOI: 10.2339/politeknik.682062

NiTi Alaşımının Mikro Ark Oksidasyon Sonrası İn-Vitro Özelliklerinin Araştırılması

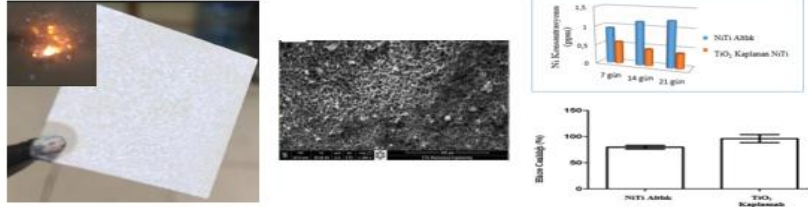
Investigation of In-Vitro Properties of Niti Alloy After Micro Arc Oxidation

Önemli noktalar (Highlights)

- ❖ Mikro ark oksidasyon yöntemi ile kaplama/ Coating by micro arc oxidation method
- ❖ Şekil hafızalı NiTi alaşımı/ Shape memory NiTi alloy
- ❖ Biyoaktivite özelliği/ Bioactivity properties

Grafik Özet (Graphical Abstract)

Bu çalışmada, NiTi alaşımı üzerine MAO yöntemiyle büyütülen kaplamaların yapısal ve biyoaktivite özellikleri ile birlikte kaplanmış ve kaplanmamış NiTi alaşımlarının Ni^{+2} salınımları araştırılmıştır./ In this study, the structural and bioactivity properties of the coatings that coated by MAO method on NiTi alloy and the Ni^{+2} release of coated and uncoated NiTi alloys were investigated.



Şekil. Süreç diyagramı /Figure. Process diagram

Amaç (Aim)

NiTi alaşımından imal edilen biyomalzemelerin biyouyumluluğunu ve biyoaktivitesini arttırmak amaçlanmıştır. Ayrıca NiTi alaşımlarının yüzeyleri üzerinde büyütülen TiO_2 kaplaması ile Ni^{+2} salınımının zehirli ve kanserojen etkisinin engellenmesi hedeflenmektedir./ It is aimed to increase the biocompatibility and bioactivity of biomaterials made of NiTi alloy. In addition, it is aimed to prevent the toxic and carcinogenic effects of Ni^{+2} release with the TiO_2 coating grown on the surfaces of NiTi alloys.

Tasarım ve Yöntem (Design & Methodology)

NiTi alaşımı üzerine MAO yöntemi uygulanarak büyütülen kaplamaların yapısal özellikleri araştırılmıştır. İn-vitro biyoaktivite testleri, Ni^{+2} salınımları ve inkübasyon süresi sonunda hücrelerdeki sitotoksosite belirlenmiştir./ The structural properties of the coatings grown by using the MAO method on NiTi alloy were investigated. In-vitro bioactivity tests, Ni^{+2} release and at the end of the incubation period, cytotoxicity in cells was determined.

Özgünlük (Originality)

NiTi alaşımı üzerine TiO_2 kaplaması ile Ni^{+2} salınımının zehirli ve kanserojen etkisinin engellenmesi / Prevention of toxic and carcinogenic effects of Ni^{+2} release with TiO_2 coating on NiTi alloy

Bulgular (Findings)

MAO yöntemiyle kaplanan NiTi malzemelerin toksik etkisi hem biyouyumluluk hem de biyoaktiflik özelliği artırılarak minimize edilmiştir./ The toxic effect of NiTi materials that coated with the MAO method is minimized by increasing both biocompatibility and bioactivity.

Sonuç (Conclusion)

Kaplama işlemiyle, NiTi alaşımlarının biyoaktif özelliklerinin arttığı tespit edilmiştir. Hücre canlılığında ise kaplanmış örneklerde istatistik olarak herhangi bir sitotoksositeye rastlanmamıştır./ It has been determined that the bioactive properties of NiTi alloys are increased by the coating process. In cell viability, no cytotoxicity was found statistically in the coated samples.

Etik Standartların Beyanı (Declaration of Ethical Standards)

Bu makalenin yazar(lar)ı çalışmalarında kullandıkları materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve/veya yasal-özel bir izin gerektirmediğini beyan ederler. / The author(s) of this article declare that the materials and methods used in this study do not require ethical committee permission and/or legal-special permission.

NiTi Alaşımının Mikro Ark Oksidasyon Sonrası in-Vitro Özelliklerinin Araştırılması

(Bu çalışma ICADET 2019 konferansında sunulmuştur. / This study was presented at ICADET 2019 conference.)

Araştırma Makalesi / Research Article

Süleyman ŞÜKÜROĞLU^{1*}, Yaşar TOTİK², Ebru Emine ŞÜKÜROĞLU³, Rıdvan KÜÇÜKOSMAN⁴

¹Sağlık Bilimleri Fakültesi İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü, Gümüşhane Üniversitesi, Türkiye

²Mühendislik Fakültesi, Makine Müh. Bölümü, Atatürk Üniversitesi, Türkiye

³Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Makine Müh. Bölümü, Gümüşhane Üniversitesi, Türkiye

⁴Mühendislik Fakültesi, Makine Müh. Bölümü, Tarsus Üniversitesi, Türkiye

(Geliş/Received : 30.01.2020 ; Kabul/Accepted : 29.03.2020)

ÖZ

Malzeme biliminin diğer alanlarda olduğu gibi tıp bilimine entegre olmasıyla biyomalzemelerin de çeşitliliği, gelişimi ve kullanım alanları artmaktadır. Bu çeşitlilik içerisinde yer bulan biyomalzemelerden biride NiTi alaşımlarıdır. Bu çalışma; şekil hafızalı NiTi alaşımının yüzey ve mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi amacı ile Mikro Ark Oksidasyon (MAO) yöntemi kullanılarak TiO₂ kaplamasının büyütülmesi üzerine odaklanmıştır. Büyütülen kaplamaların yapısal özellikleri SEM ve XRD cihazları kullanılarak analiz edilmiştir. Biyoaktivite özellikleri yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde bekletme testi analizi ile tespit edilmiştir. SBF içerisinde bekletme testleri sonrasında kaplanmış ve kaplanmamış şekil hafızalı NiTi altlıkların, buldukları ortama Ni⁺² salınımı kontrolü ise ICP-MS cihazı ile tespit edilmiştir. Büyütülen oksit tabakasıyla NiTi alaşımlarının kullanımını sınırlayan özellikleri önemli derece giderildiği gözlenmiştir. MAO yöntemiyle TiO₂ kaplanmış NiTi altlıkların biyoaktif özelliklerinin arttığı ve 72. saatin sonunda hücre canlılığında NiTi altlığına kıyasla istatistik olarak herhangi bir sitotoksositeye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: NiTi, MAO, in-vitro test, MTT test, in-vitro sitotoksosite, Ni⁺² salınımı.

Investigation of In-Vitro Properties of NiTi Alloy After Micro Arc Oxidation

ABSTRACT

As material science is integrated into medical science as in other fields, the variety, development and usage areas of biomaterials increase. One of the biomaterials in this variety is NiTi alloys. This study was focused on the coating of TiO₂ layer by using the method of Micro Arc Oxidation with the aim of the improvement of surface and mechanical properties of Shapedmemory and bio material NiTi alloy. Structural properties of the coatings were analysed by of SEM and XRD. In vitro ability was investigated by soaking the coated NiTi samples in simulated body fluid (SBF) at temperature 37 °C for various time periods. After soaking, Ni⁺² release was applied to the media where coated and uncoated shape-memory NiTi samples are available, and its control was made by means of ICP-MS device. The results also show that Toxic and carcinogenic effects of Ni⁺² release is significantly reduced by the TiO₂ coating. Thus, it is observed that the properties that limit the use of NiTi alloys has been substantially fixed by MAO coating. It was found that the bioactive properties of the TiO₂ coated NiTi substrate increased by MAO method and at the end of the 72 hour, there was no statistically any cytotoxicity in cell viability compared to the NiTi substrate.

Keywords: NiTi, MAO, in-vitro test, MTT test, in-vitro cytotoxicity, Ni⁺² release.

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler; kendisini çevreleyen dokular ile normal etkileşime giren dokuda iltihaplanma, pıhtı oluşumu, kireçlenme, doku uyumsuzluğu gibi olumsuz tepkiler oluşturmayan, sürekli veya belirli aralıklarla kan ya da doku sıvısı gibi vücut akışkanlarıyla temas halinde olan, doğal veya sentetik malzemelerdir [1-3]. Biyomalzemeler organ ve dokuların azalan aktivitelerini arttırmak için canlı bir yapının bir parçasını oluşturabildikleri gibi doğal bir fonksiyonu geliştirmek ya da değiştirmek için kullanılan biyomedikal bir aracın herhangi bir parçasını da oluşturabilmektedirler [4]. Yüksek mekanik dayanıma

sahip olan metalik biyomalzemeler, sert doku implantlarında (yapay kalça eklemleri, kemik plakaları, diş implantları vb.) ve tıbbi cihazların imalatı sürecinde sıkça tercih edilmektedir [5,6]. Dokulara göre çok sert olan bu malzemeler düşük biyouyumluluğa ve yüksek yoğunluğa sahip olmaları, korozyona uğramaları, toksik etkiye neden olabilecek metal iyonu salınımı gibi dezavantajlara sahiptir. Metalik biyomalzemelerden olan NiTi alaşımları; sahip oldukları şekil hafıza etkisinin yanı sıra çok iyi derecede biyouyumluluk göstermeleri, aşınmaya karşı yüksek direnç ve yükler altında yüksek dayanım göstermelerinden, korozyona karşı dirençlerinin yüksek olmasından, mekanik özelliklerinin ve elastik ya da süperelastik özelliklerinin iyi olmasından dolayı medikal uygulamalarda birçok uygulamayı elemine etmekte ve bugün diş hekimliğinin ortodonti ve

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author)
e-posta : ssukuroglu@gumushane.edu.tr

endodonti uygulamalarının yanı sıra dahili tıp biliminin gastroenteroloji, ortopedi, radyoloji ve kardiyovasküler cerrahi uygulamalarında da sıkça tercih edilmektedir.

Ancak NiTi alaşımına artan bu ilginin yanında servis şartlarında ortaya birtakım yüzey ve mekanik problemlerin ortaya çıktığı görülmektedir. Diğer taraftan özellikle sağlık uygulamalarında biyomalzeme ve kemik dokusu arasında sağlıklı bir mekanik bağlanmanın gerçekleşmesi, biyokimyasal olarak daha aktif bir yüzey elde edilmesi, biyomalzemenin ömrünün ve kalitesinin artırılması ve en önemlisi kanserojen etkisi bulunan Ni+2 salınımını azaltılması için yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi ihtiyacını da beraberinde getirmiştir. Meydana gelebilecek bu sorunları minimize eden, biyoyumlu ve biyoaktif yüzey elde etmek için çalışmalar, metalik biyomalzemelerin yüzeylerinin kaplanması üzerine yoğunlaşmıştır.

Ayrıca NiTi alaşımlarının yüzeyleri üzerinde büyütülen TiO₂ kaplaması ile Ni⁺² salınımının zehirli ve kanserojen etkisinin engellenmesi hedeflenmektedir.

2. MATERYAL VE METOD (MATERIAL and METHOD)

Altlık malzemesi olarak 25x25x3 mm boyutlarında Çizelge 1’de kimyasal bileşenleri verilen NiTi malzemesi seçilmiştir. Altlık yüzeyleri sırasıyla 220, 600, 800 ve 1200 tane boyutlu SiC zımpara ile Ra-0,180µm pürüzlülük değerine kadar parlatıldıktan sonra saf su ve alkol ile temizlenip kurutulmuştur.

NiTi altlıklar üzerine TiO₂ tabakası Plasma Technology Ltd. tarafından üretilen PEO-15 sistemi ile alternatif akım modunda (AC) büyütülmüştür. Kaplama işlemi öncesi MAO işlemi üzerinde etkin olan parametreler literatür paralelinde [12,16, 18-22] sabit olarak seçilmiş

Çizelge 1. Altlığın kimyasal bileşimi (% ağırlık) (Chemical composition of the substrate (by weight%))[20,21]

NiTi	Ti	Ni	Fe	H	N+O	Nb	Cr	Cu	Co	C
Denge		54.5	0.05	0.005	0.05	0.025	0.01	0.01	0.05	0.05

Kaplama ile biyomalzemelerin vücut içinde kalma süresinin uzatılması, vücut dokuları ile bağ yapabilme ve uyumluğunu artırılması, toksik etkisinin azaltılması, korozyona, oksidasyona, erozyona ve bakteriyel kolonizasyona karşı dayanıklı olması sağlanmaktadır [5-8].

Kemik-implant bağlantısını daha uyumlu hale getirmek ve yüzeyde gözenekli ve pürüzlü bir yapı elde etmek için uygulaması kolay, altlık malzemeyle çok güçlü adeziv bağ sağlayan, çevre dostu, yatırım maliyeti düşük ve homojen kaplama imkanı gibi avantajları nedeniyle mikro ark oksidasyon (MAO) yöntemi NiTi alaşımlarının kaplanmasında son yıllarda en çok tercih edilen yöntemlerden biridir [9-12].

ve Çizelge 2’de verilmiştir. TiO₂ tabakasının büyütülmesi işlemi pH değeri 11 olan, 2 litre olarak hazırlanan sodyum alüminat (NaAlO₂) 0.15M, sodyum hipofosfit (NaPO₂H₂) 0.01M, NaOH 2 gr, Na₂SO₄ 2 gr kimyasallarından oluşan elektrolit içerisinde gerçekleştirilmiştir. MAO işleminde altlık (NiTi) anot, paslanmaz çelik banyo duvarları da katot olarak seçilmiştir. Elektrolitin homojen dağılımını sağlamak amacıyla elektrolit bir karıştırıcı ile karıştırılmıştır.

Banyo duvarlarından geçirilen soğutma suyu vasıtasıyla elektrolit sıcaklığı 30°C’de sabit tutulmuştur. Kaplama işlemi sonrası numuneler saf su ve alkol ile temizlenmiş ve kurularak 250°C’de 2 saat bekletilerek hem yapının homojenliği sağlanmış hemde kaplama sonrası yüzeyde

Çizelge 2. MAO yöntem parametreleri (MAO process parameters)[20,21]

MAO Yöntem Parametre ve Seviyeleri			
Uygulanan Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Duty Cycle (%)	Kaplama Süresi (dk)
400	100	5	60

Genellikle bazik karakterli elektrolitlerin kullanıldığı işlemde, güç kaynağının pozitif kutbuna (anot) altlık, negatif kutbuna ise (katot) paslanmaz çelik malzeme bağlanmaktadır. Anot ve katot arasına uygulanan voltaj sonucu ve elektrolitteki OH iyonları, altlık malzeme üzerinde oksit oluşturmak için çok hızlı olarak zıt yönde hareket etmektedirler. Malzemede, kritik voltaj (bozulma voltajı) değerine ulaşıldıktan sonra yüzey tabakasının dielektrik özelliğinin bir sonucu olarak, mikro arklar üretilerek gözenekli ve pürüzlü yapı elde edilir [11-15]. MAO yöntemi ile elde edilen oksit tabakaların biyoyumluluğu arttırdığı gözlemlenmiştir [14-18].

Bu çalışmanın amacı ise; şekil hafızalı NiTi alaşımından imal edilen biyomalzemelerin, temas ettiği kan hücresi veya vücut sıvısı gibi agresif yüzeylerdeki biyoyumluluğunu ve biyoaktivitesini arttırmaktır.

bulunan gözeneklerin iç kısımlarının da tamamen kurutulması sağlanmıştır.

Altlığın, MAO işlemleri sonrası elde edilen kaplamaların yapısal analizleri (XRD ölçümleri) Cu-Kα kaynağından λ=1.5404 Å dalga boyunda, 20-80° tarama aralığında, 2 derece/dk tarama hızında ve 0,1 derece tarama adımında Rigaku-2200D/Max marka X-Ray Difraktometresi ile test edilmiştir. MAO yöntemi kullanılarak kaplanan numunelerin yüzey topografyası ve in-vitro deneylerinden sonra yüzeydeki değişimleri görüntülemek için INSPECT S50 marka taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM) kullanılmıştır. Kaplama kalınlıkları ise JEOL JIB-4601F marka MultiBeam FIB-SEM sistemiyle tespit edilmiştir. Kaplama öncesi ve kaplama sonrası yüzey

pürüzlülükleri Mahr marka yüzey pürüzlülük ölçüm cihazıyla tespit edilmiştir.

Kokubo ve çalışma arkadaşları [23] tarafından önerilen ve bilim dünyası tarafından kabul gören gerçek vücut sıvısına en yakın yapay vücut sıvısı (SBF) in-vitro testlerinde kullanmak amacıyla hazırlanmıştır. PH değeri 7,40 olan 1 litrelik yapay vücut sıvısı hazırlamak için gerekli olan reaktif maddeler ve miktarları Çizelge 3’de verilmiştir.

3. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME (RESULTS AND DISCUSSION)

3.1. Yapısal Karakterizasyon (Structural Characterization)

NiTi altlık ve MAO işlemi ile TiO₂ büyütülen NiTi altlıkların yüzey pürüzlülük değerleri Çizelge 4’de verilmiştir.

Çizelge 4’de görüldüğü gibi MAO yöntemi sonrası yüzeyde büyütülen TiO₂ tabakası yüzey pürüzlülük değerini artırmıştır. Şekil 1’deki SEM görüntülerinden

Çizelge 3. 1 litre SBF hazırlanmak için gerekli kimyasal malzemeler ve miktarları (Chemical materials and quantities required to prepare 1 liter SBF)[20-21]

Sıralama	Kimyasal Malzeme	Miktar (g)
1	NaCl	7,996
2	NaHCO ₃	0,350
3	KCl	0,224
4	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0,228
5	MgCl. 6H ₂ O	0,305
6	1 kmol/m ³ HCl	40 cm ³
7	CaCl ₂	0,278
8	Na ₂ SO ₄	0,071
9	(C ₂ H ₅ OH) ₃ CNHz(TRIS)	6,057
10	1 kmol/m ³ HCl	pH’ı 7,40 olacak kadar

NiTi altlığın ve MAO yöntemi ile kaplanan numunelerin biyoaktivite testi; örneklerin SBF sıvısı içerisinde bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Aynı ayrı beherlerde altlı gruplar halinde 100 ml’lik SBF sıvısında 37°C’de etüv fırınında 7, 14 ve 21 gün sürede bekletilmiştir. İki gün aralıklarla sıvıların pH değerleri kontrol edilmiştir. Bekletme işleminden sonra 0,001 g hassasiyetli hassas terazi ile tartılıp, ağırlıklarındaki değişimler kaydedilmiştir. SBF sıvısı içerisinde 7 - 14 ve 21 gün ve vücut sıcaklığı olan 37°C’de bekletilen örneklerin buldukları ortama Ni⁺² salınımı yapıp yapmadıklarının tesbiti Agilent 7700 serisi Endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometre sistemi (ICP-MS) ile gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon şartları, biyomateryalin canlıda etkileşimde bulunduğu şartlar da göz önüne alınarak 37°C’de 24 saat, 37°C’de 72 saat ve 121°C’de 1 saat olabilir. ISO 10993-12’ye uygun olarak hazırlanan ekstraktlar, 1/2, 1/4, 1/8 vb. gibi oranlarda seyreltilerek hücre kültürüne eklenir ve belirli bir inkübasyon süresi sonunda hücrelerdeki sitotoksosite, canlı hücrelerin sayımı yöntemiyle direkt olarak ya da in direk canlılık testleri yapılarak belirlenmiştir (ISO 10993-5:2009). MTT; canlı hücre sayılarını belirlemeye yarayan, hızlı ve kolay sonuç alınabilen bir test yöntemidir. Bu çalışmada; çözelti 96’lık kuyucuklara alınıp reaksiyonu-Quant, BioTek Instruments, Winoski, Vermont, USA marka ve modelindeki ELISA cihazında okunup kantite edilmiştir.

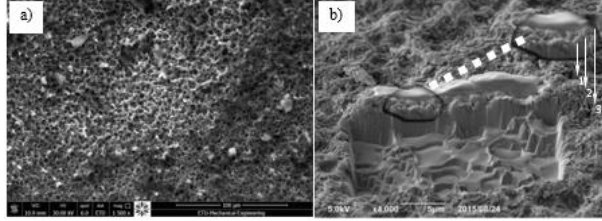
de açıkça belli olduğu gibi MAO yönteminin doğasından kaynaklanan micro discharge (mikro boşalmalar) altlıklar üzerine büyütülen kaplamaların yüzeylerinde pürüzlülükler sebebiyet vermiştir. Bu pürüzlülükler; işlem esnasında altlık üzerinde meydana gelen mikro ergimelerden kaynaklı değişik boyutlardaki çok sayıda tepecikler ve bu tepeciklerin uç kısımlarındaki mikro gözeneklerden kaynaklanmaktadır [12, 16,18]. Yüzeyde bulunan gözeneklerin; kanallar içerisindeki bölgesel ergimelerin yüzeyin her noktasında farklı olmasından dolayı uniform ve uniform olmayan bir dağılım sergilediği gözlenmiştir. Bu durum literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir [19,24-25].

Yüzey pürüzlülüğü özellikle kemik-implant bağının oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir. Bu bağın oluşumu, yüzey pürüzlülüğün yanı sıra, implantın kimyasal bileşimine, yüzey modifikasyonuna ve ara yüzeyde oluşan reaksiyonlara da bağlıdır [26].

İmplant ile doku arasında bağ oluşumunun sağlanabilmesi için yüzeyde büyütülen oksit tabakasının kararlı ve uniform olması gerekmektedir [27-31]. Oksit kaplamaların biyolojik tepkisi ise kimyasal bileşimlerine (kalitatif ve kantitatif analizler, sitokiyometri, safsızlıklar ve alaşım elementleri), kalınlığa, pürüzlülüğe ve yapının kristalliğine bağlıdır [32]. Literatürdeki kaynaklar doğrultusunda MAO yöntemi sonucunda elde edilen pürüzlülük değerlerinin bağ dokularının oluşumu için yeterli olacağı söylenebilmektedir.

Çizelge 4. Yüzey pürüzlülük değerleri (Surface roughness values) [20,21]

Numuneler	Yüzey Pürüzlülük Değerleri (μm)
NiTi Altlık	≈ 0.180
Kaplanmış NiTi (TiO_2)	≈ 1.350

**Şekil 1.** NiTi alaşımı üzerine MAO işlemi büyütülen kaplamaların a) yüzey morfolojisi ve b) kesit görüntüsü ((a) surface morphology and b) cross-sectional view of coatings whose MAO process is grown on NiTi alloy) [20,21]

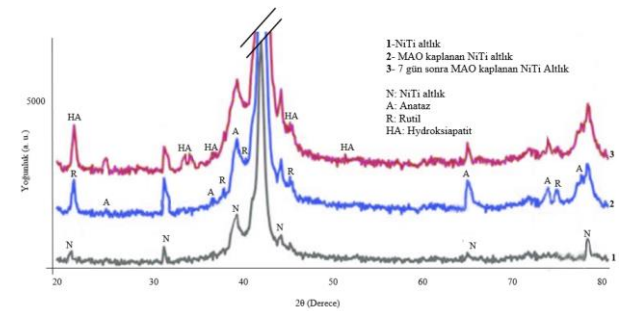
MAO yöntemi kullanılarak büyütülen kaplamalar üç farklı bölgeden oluşmaktadır. Bu bölgeler; ince geçiş bölgesi, fonksiyonel ana bölge ve kayıp porozlu bölge olarak adlandırılmaktadır. Şekil 1’de gösterilen kesit görüntüsünde de belirtildiği gibi 1. bölge altlık üzerinde büyüyen yoğun “ince geçiş bölgesi”, bu tabakayı izleyen 2. bölge yoğun “fonksiyonel ana bölge” ve en dışta oluşan 3. bölge ise yoğun olmayan gözenek içeren “kayıp porozlubölge” olarak sıralanmaktadır. Kaplama ve altlık arasındaki bölge geçiş tabakası olup kuvvetli bir şekilde altlığa bağlanır. Ana bölgenin en dıştaki kayıp bölge ile karşılaştırıldığında daha kusursuz bir yapıya ve daha az sayıda gözeneklere sahip olduğu gözlenmiştir. En dış yoğun olmayan tabaka oldukça poroz ve kırılğan bir yapıya sahiptir. Bu özelliğinden dolayı yüzeyde ince yüzey çatlakları oluşabilmektedir. Ancak bu oluşabilecek ince yüzey çatlakları fonksiyonel ana tabakaya nüfus etmemektedir [16,18,33,34]. Bu bölgenin deney sonuçlarını etkilememesi adına kaplama işlemi sonrası bu kayıp bölge, elmas pasta ile ince parlatılarak kaldırılmıştır. Kaplama kalınlığı yaklaşık olarak $1,5 \mu\text{m}$ olarak tespit edilmiştir.

MAO yöntemi ile NiTi altlık üzerine büyütülen TiO_2 kaplamaların XRD grafikleri Şekil 2’de verilmiştir. NiTi şekil hafızalı metal; Ti, Mg ve Al gibi hafif metallerle karşılaştırıldığında yüzeyinde büyütülecek olan oksit tabakasının oluşumu, yüksek Ni içeriğinden dolayı büyütme işleminin çok zor olduğu tespit edilmiştir.

Bu yüzden NiTi şekil hafızalı metalinin MAO işlemi ile oksit tabakası büyütülmesinde kullanılan elektrolit çok önemlidir. Elektrolitin içeriğinde kullanılan kimyasalların oranları, uygulanan kaplama parametresi büyütme işlemi için çok büyük önem teşkil etmektedir. Titanyum ve alaşımları için yüzeyde oksit biriktirmek birçok elektrolitle mümkündür ancak NiTi için durum daha farklıdır. Kullanılacak olan elektrolitler NiTi alaşımını için çok sınırlıdır. Öncelikle; NiTi altlıklar

elektrolit içerisinde pasivizasyon nedeniyle oksitlenmelidir. Yüzeyde oluşan bu oksit filmi oldukça ince, yalıtkan, nikel oksit ve titanyum oksit ihtiva eden özellik sergilemektedir [35,36]. Bu bariyer tabaka yüzeyin her yerinde homojen özellik sergilememekte ancak yeterince yoğun bir tabaka olarak gözlenmiştir. Kaplama işlemi devam ettikçe yüzeyde bulunan nikel oksit kararlı bir özellik sergilememekte ve kaplama sırasında elektrolitte çözünmektedir. Neticede ise NiTi altlık yüzeyinde sadece TiO_2 kalmaktadır. İşlem sonunda katot olarak kullanılan paslanmaz çelik banyo içerisinde ise Ni partikülleri gözlemlenebilmektedir. Nikel oksitin elektrolit içerisinde çözülmesiyle, homojen ve oldukça yoğun TiO_2 nin yüzeyde büyüdüğü tespit edilmiştir. Bu durum NiTi alaşımlarının yüzeyinde TiO_2 bir tabaka büyütülmek istendiğinde neden oldukça uzun bir işlem süresi gerektiğini açıklamaktadır [35,36].

MAO işlemi ile büyütülen TiO_2 ’nin farklı kristal yapılarda büyüdüğü literatürde detaylı bir şekilde verilmektedir. Anataz, rutil ve brookite kristal yapısında büyüyen TiO_2 ’nin termodinamik olarak en kararlı yapısı rutil fazıdır. MAO ile büyütülen kaplamalar düşük sıcaklıklarda yarı kararlı faz olan anataz ve yüksek sıcaklıklarda kararlı rutil fazından oluşmaktadır [21, 37-41]. Şekil 2’de NiTi üzerine büyütülen kaplamanın XRD grafikleri incelendiğinde; TiO_2 ’yi karakterize eden rutil ve anataz fazlarına rastlanmıştır. Kararlı rutil fazının oluşumunda yüksek voltaj değerinin etkisi MAO işlemi sırasında boşalma kanalları içerisindeki sıcaklığın ve basıncın (2.104K ve 102MPa) çok yüksek değerlere ulaşması ile açıklanabilir [24]. Yüksek basınç ve sıcaklık rutil fazının oluşumuna yardımcı olmaktadır. Diğer taraftan uzun kaplama süresinin rutil fazı üzerindeki etkisi ise kaplama öncesi yapılan ön deneylerden elde edilen bilgidir. Yüzeyde büyütülen düşük termal iletkenliğe sahip TiO_2 ; termal bariyer gibi davranarak kaplamanın ısınmasına neden olur ve rutil fazının oluşumu kolaylaşır [42].

**Şekil 2.** NiTi üzerine büyütülen kaplamanın XRD grafikleri (XRD graphics of the coating on NiTi)

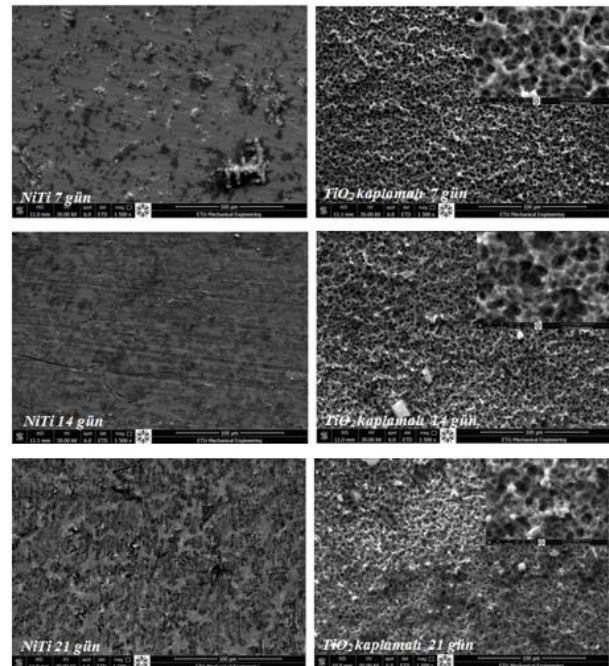
Yine Şekil 2 de bekletme deneyleri sonrası elde edilen XRD grafikleride gösterilmektedir. Bekletme deneyleri sonrasında yüzeyde biriken malzemelerin Hidroksiapatit (HA) olduğu XRD grafiklerinden tespit edilmiştir. MAO yöntemiyle TiO_2 kaplanmış NiTi malzemelerin biyoaktif özelliklerinin artmasına yüzeyde biriken HA’ın neden olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 5. SBF içerisinde bekletilen numunelerin ağırlıklarındaki değişim çizelgesi (Changes in the weight of the samples kept in SBF) [20,21]

Numune Adı	Ağırlık (g)		
	Başlangıç	1 günlük bekleme	Değişim miktarı
NiTi Altlık	10.872	10.872	0
Kaplanmış NiTi (TiO ₂)	11.345	11.345	0
Numune Adı	Ağırlık (g)		
	Başlangıç	7 günlük bekleme	Değişim miktarı
NiTi Altlık	10.874	10.892	0,018
Kaplanmış NiTi (TiO ₂)	11.052	11,105	0,053
Numune Adı	Ağırlık (g)		
	Başlangıç	14 günlük bekleme	Değişim miktarı
NiTi Altlık	10.886	10.906	0,020
Kaplanmış NiTi (TiO ₂)	11,190	11,286	0,096
Numune Adı	Ağırlık (g)		
	Başlangıç	21 günlük bekleme	Değişim miktarı
NiTi Altlık	10.945	10.973	0,028
Kaplanmış NiTi (TiO ₂)	11.356	11.464	0.108

3.2. Biyoaktivite Testleri (Bioactivity Tests)

NiTi altlık üzerine MAO yöntemi büyütülen TiO₂ tabakaları yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde vücut sıcaklığı olan 37°C’de etüv fırını içerisinde 7 - 14 ve 21 günlük bekleme deneylerine tabi tutulmuştur. Zamana bağlı olarak numunelerin ağırlıklarındaki değişim dikkate alınarak numunelerin biyoaktiflik özellikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen ağırlık değişimleri Çizelge 5’de, SEM görüntüleri ise Şekil 3’de verilmiştir. Çizelge 5’den görüldüğü gibi NiTi altlığın ve MAO yöntemi ile yüzeyde TiO₂ büyütülen numunelerin SBF içerisinde 1 günlük bekleme süresinde ağırlıklarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Buna karşın bekleme süreleri arttıkça ağırlıklarında ki değişim de artmaktadır. Bu durum uzun süreli in-vitro testlerinde numunelerin SBF sıvısı içerisinde biyoaktif hale gelmesiyle açıklanabilir [43,44].



Şekil 3. SBF içinde bekletilen numunelerin SEM görüntüleri (SEM images of samples kept in SBF) [20,21]

Şekil 3’de SBF içerisinde bekletilen numunelere ait SEM görüntüleri verilmiştir. XRD grafiklerinden yüzeyde biriken oluşumların HA olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3 deki görüntülerde de açık bir şekilde gösterildiği gibi bekletme süresi arttıkça yüzeyde biriken HA miktarı da artmaktadır.

tutulduktan sonra SBF sıvıları içerisinde Ni tespiti için ICP-MS test cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 6’da bekletme sıvıları içerisinde tespit edilen Ni miktarları ppm cinsinden verilmiştir. Nikelin toksik seviyesi ise 1 ppm’dir [48,49].

Çizelge 6. SBF sıvıları içerisindeki Ni konsantrasyonu (Ni concentration in SBF fluids) [20,21]

	Ni Konsantrasyonu [ppm]		
	7 gün	14 gün	21 gün
NiTi Altlık	0,943597	1,143597	1,209845
TiO ₂ Kaplamalı NiTi	0,578629	0,437818	0,396592

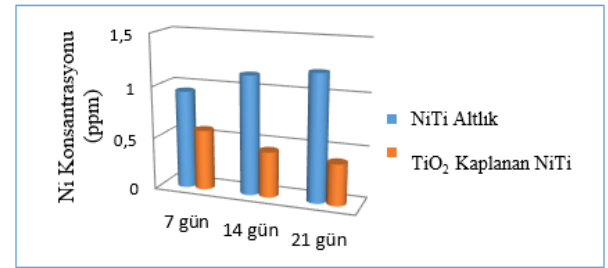
Özellikle MAO yöntemi ile yüzeyde TiO₂ büyütülen numunelerin SBF içerisinde bekletildikten sonra yüzeylerinde HA miktarında artış olduğu dikkat çekmektedir. Çizelge 5’de de gösterildiği gibi en fazla ağırlık artışı 21 gün süreyle bekletilen numune üzerinde gerçekleşmiştir. Yüzeylerin 10.000 kat büyütülmüş görüntüleri SEM görüntülerinin sağ üst köşesinde gösterilmiştir. MAO yönteminin doğasından kaynaklanan porozlu yapı numune yüzey alanını artırmış bu durumun da HA tutunma miktarındaki artışa sebep olduğu düşünülmektedir [12,18,22]. MAO yönteminin doğasından kaynaklanan bu poroz yapının kaplanmış örneklerin biyoaktiflik özelliğini artırdığı sonucu çıkartılmıştır.

3.3. Ni⁺² Salınımının Tespiti (Detection of Ni⁺² Release)

Gelişen teknolojiyle beraber gelen ihtiyaçlara bağlı olarak çeşitlilik kazanan metalik implant malzemelerinin sahip olması gereken en önemli özelliklerden birisi de içinde buldukları ve temas edecekleri biyolojik çevre ile uyumlu olmalarıdır. İmplant malzemelerin biyoyoumluluk değerlendirmeleri; sistemik ve lokal toksisite, allerji, mutajenite ve karsinojenite incelemeleri ile yapılmaktadır [45,46]. Metal alaşımları ile doğrudan temasta olan çevre dokularına salınan metal iyonlarının olumsuz etkileri olabileceği bildirilmektedir [45,47]

NiTi altlığı üzerine MAO yöntemi büyütülen TiO₂ tabakaları yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde vücut sıcaklığı olan 37°C’de etüv fırını içerisinde 7 - 14 ve 21 günlük bekletme deneylerine tabi tutulmuştur. Literatürdeki çalışmalar paralelinde zamana bağlı olarak NiTi numunelerinin içinde buldukları ortamlara Ni⁺² salınımı gerçekleştirdiği bilinmektedir [48]. Ni⁺² salınımı toksik etkiler gösterdiği ve insan sağlığını tehdit ettiği için önlenmesi gereken bir durumdur. MAO yöntemi ile NiTi altlıkların yüzeyleri TiO₂ kaplanarak bu salınımın minimize edilmesi amaçlanmıştır.

Bu bağlamda NiTi altlığın ve bu altlık üzerine MAO yöntemi ile TiO₂ büyütülen numuneler yapay vücut sıvısı (SBF) içerisinde vücut sıcaklığı olan 37°C’de etüv fırını içerisinde 7 - 14 ve 21 günlük bekletme deneylerine tabi



Şekil 4. Ni konsantrasyonunun zamana göre değişimi (Change of Ni concentration over time) [20,21]

Şekil 4’de de gösterildiği gibi Ni konsantrasyonu TiO₂ büyütülen numunelerin bulunduğu SBF ortamlarında toksik seviyenin altındadır. Ancak üzerinde herhangi bir kaplama olmayan NiTi altlıkların bulunduğu SBF ortamında Ni miktarı zamana paralel olarak artmaktadır. Bu durum zaman içerisinde toksik etki sınırının artacağını göstermektedir. Oysa MAO yöntemi ile TiO₂ büyütülen numunelerde bu değer zamana bağlı olarak azalmakta ve toksik değerin oldukça altında olduğu tespit edilmiştir.

3.4. Hücre sitotoksitesite Analizi (MTT analizi) ((Cytotoxicity Analysis (MTT Analysis))

MTT ajanının uygulanmasından 1 gün önce 12’lik plak içerisinde her kuyucuğa 105L929 fibroblast hücre hatları gelecek şekilde 1000 µl kültür medyumunu ile hücrelerin ekimi yapılmıştır. Mikroplak 24 saat 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlanmıştır. Bu yolla tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararlar ortadan kaldırılmıştır. Bu protein ve faktörlerin yeniden sentezlenebilmesi için 24 saatlik bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır [50]. 24 saatlik inkübasyonlardan sonra iki farklı materyal gruplara bölünerek kuyucuklara eklenerek birinci sütun NiTi altlık, ikinci sütun ise TiO₂ kaplamalı NiTi olarak ayarlanmıştır.

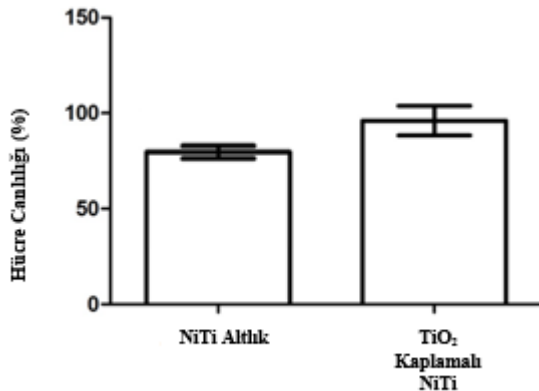
Tüm madde uygulamalarından sonra hücre hatları 24 saat süreli inkübasyonda tutulmuş olup, MTT yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem analizine başlanmadan önce

12'lik plaklarda bulunan medyum uzaklaştırılarak 1000 µl taze medyum eklenmiştir.

NiTi altlık ve TiO₂ kaplamalı NiTi materyalin sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücreler 72. saatlerde aynı büyüklüklerde 5 kuyucuk olacak şekilde 12'lik mikropelatelerde MTT (2,3,-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit tuzu) solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Reaktifler 50/1 (işaretleme ajanı/aktivasyon ajanı) oranında olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olmakla beraber canlı hücrede mitokondrilerindeki dehidrogenazenzimi ile parçalandığında çözülebilir formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Çözelti 96'lık kuyucuklara alınıp reaksiyon ELISA cihazında okunup kantite edilmiştir. ELISA cihazında 490 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbanans değeri okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

Gruplara Mann-Whitneytest istatistiksel analizi uygulanıp "p" değeri 0.05'in altında olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Oluşturulan tüm deney koşulları hücre hattında kendi içinde üçer kez çalışılıp, sonuçlar ortalama ±SD olarak verilmiştir.

Şekil 5'de NiTi altlık ve TiO₂ kaplamalı NiTi materyallerinin 72. saatin sonunda L929 hücre canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi gösterilmiştir. MTT redüksiyon sonuçları kontrol (NiTi altlık) hücre canlılıklarının yüzde oranı olarak verilmiştir. Şekil 5'de gösterildiği gibi, L929 hücrelerine 72 saat boyunca 37°C'de inkübe edilerek agregasyonu sağlanan NiTi altlık ve TiO₂ kaplamalı NiTi materyalinin ilave edilmesinin 72. saatin sonunda hücre canlılığında NiTi altlığa kıyasla istatistik olarak herhangi bir sitotoksitesite tespit edilememiştir.



Şekil 5. Materyallerin 72. saatlerin sonunda L929 hücre canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi (Evaluation of the effects of materials on L929 cell viability at the end of the 72th hour with MTT reduction method) [20,21]

6. SONUÇ (CONCLUSION)

Bu çalışma; şekil hafızalı NiTi alaşımının yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi amacı ile Mikro Ark Oksidasyon (MAO) yöntemi kullanılarak TiO₂ tabakası büyütülmesi üzerine odaklanmıştır. Çalışmanın amacı ise şekil hafızalı NiTi alaşımından imal edilen biyomalzemelerin; temas ettiği kan hücresi veya vücut sıvısı gibi agresif yüzeylerde biyouyumluluğunu ve biyoaktivitesini arttırmaktır. Ayrıca NiTi alaşımlarının yüzeyleri üzerinde büyütülen TiO₂ kaplaması ile Ni⁺² salınımının zehirli ve kanserojen etkisinin engellenmesi hedeflenmektedir. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir;

- NiTi altlık üzerine MAO yöntemi ile büyütülen TiO₂ tabakasının pürüzlü bir yapı sergilediği gözlenmiştir. Bu pürüzlülükler; kaplama işlemi esnasında altlık üzerinde meydana gelen mikro ergimelerden kaynaklı değişik boyutlardaki çok sayıda tepecikler ve bu tepeciklerin uç kısımlarındaki mikro gözeneklerden kaynaklandığı tespit edilmiştir
- MAO yöntemi kullanılarak büyütülen TiO₂ kaplamasının üç farklı bölgeden oluştuğu tespit edilmiştir.
- NiTi şekil hafızalı metali; Ti, Mg ve Al gibi hafif metallerle karşılaştırıldığında yüzeyinde büyütülecek olan oksit tabakasının oluşumu, yüksek Ni içeriğinden dolayı büyütme işleminin çok zor olduğu tesbit edilmiştir. Bu yüzden NiTi şekil hafızalı metalinin MAO işlemi ile oksit tabakası büyütülmesinde kullanılan elektrolitin çok önemli olduğu tespit edilmiştir.
- TiO₂'yi karakterize eden rutil ve anataz fazlarına rastlanmıştır.
- Bekletme deneyleri sonrasında yüzeyde biriken malzemelerin Hidroksiapatit (HA) olduğu XRD grafiklerinden tespit edilmiştir. MAO yöntemiyle TiO₂ kaplanmış NiTi malzemelerin biyoaktif özelliklerinin artmasına yüzeyde biriken HA'in neden olduğu düşünülmektedir.
- SBF içerisinde bekletilen numunelere ait SEM görüntülerinin açık bir şekilde gösterildiği gibi bekletme süresi arttıkça yüzeyde biriken HA miktarı da artmaktadır. Özellikle MAO yöntemi ile yüzeyde TiO₂ büyütülen numunelerin SBF içerisinde bekletildikten sonra yüzeylerinde HA miktarında artış olduğu dikkat çekmektedir.
- MAO yönteminin doğasından kaynaklanan porozlu yapı numune yüzey alanını artırmış bu durumun da HA tutunma miktarındaki artışa sebep olduğu düşünülmektedir. MAO yönteminin doğasından kaynaklanan bu poroz yapının kaplanmış örneklerin biyoaktiflik özelliğini artırdığı sonucu çıkarılmıştır.
- Nikelin toksik seviyesi ise 1 ppm'dir .Ni konsantrasyonu TiO₂ büyütülen numunelerin bulunduğu SBF ortamlarında toksik seviyenin

oldukça altındadır. Ancak üzerinde herhangi bir kaplama olmayan NiTi altlıkların bulunduğu SBF ortamında Ni miktarı zamana paralel olarak artmaktadır. Bu durum zaman içerisinde toksik etki sınırının artacağını göstermektedir. Oysa MAO yöntemi ile TiO₂ büyütülen numunelerde bu değer zamana bağlı olarak azalmakta ve toksik değerler oldukça altında olduğu tespit edilmiştir.

- MTT testi için hazırlanan gruplara Mann-Whitney test istatistiksel analizi uygulanıp “p” değeri 0.05’in altında olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Oluşturulan tüm deney koşulları hücre hattında kendi içinde üçer kez çalışılıp, sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.
- L929 hücrelerine 72 saat boyunca 37°C’de inkübe edilerek agregasyonu sağlanan NiTi altlık ve TiO₂ kaplamalı NiTi materyalinin ilave edilmesinin 72. saatin sonunda hücre canlılığında NiTi altlığa kıyasla istatistik olarak herhangi bir sitotoksitesite tespit edilememiştir.

Sonuç olarak; şekil hafızalı NiTi malzemelerin hem biyouyumluluk hem de biyoaktiflik özelliğinin artırılabilmesi ayrıca toksik etkisini minimize etmek için TiO₂ tabakasının büyütülmesi başarısı in-vitro analizlerinden elde edilen sonuçlarla ispat edilmiştir. Mevcut çalışmadan elde edilen bilgi birikimi ile biyomalzemeler üzerine biyouyumlu TiO₂ kaplamaların büyütülebileceği ve gerçek vücut şartlarında in-vivo analizleri ile gelecek çalışmaların dahada güçlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışma; Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Makine Mühendisliği Anabilim Dalında Tez Çalışması olarak başarıyla tamamlanmıştır.

ETİK STANDARTLARIN BEYANI (DECLARATION OF ETHICAL STANDARDS)

Bu makalenin yazar(lar)ı çalışmalarında kullandıkları materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve/veya yasal-özel bir izin gerektirmediğini beyan ederler.

YAZARLARIN KATKILARI (AUTHORS’ CONTRIBUTIONS)

Süleyman ŞÜKÜROĞLU: Deneyleri yapmış, sonuçlarını analiz etmiş ve makalenin yazım işlemini gerçekleştirmiştir.

Yaşar TOTİK: Sonuçlarını analiz etmiştir.

Ebru Emine ŞÜKÜROĞLU: Sonuçlarını analiz etmiştir.

Rıdvan KÜÇÜKOSMAN: Makalenin yazım işlemine destek vermiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI (CONFLICT OF INTEREST)

Bu çalışmada herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Ling R. and Yang K., “Bip-functional design for metal implants, a new concept for development of metallic biomaterials”, *Journal of Materials Science and Technology*, 29(11): 1005-1010, (2013).
- [2] Özcan T., “Biyonanoimplantların biyouyumluluğu”, *Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, (2010).
- [3] Güven Ş.Y., “Ortopedik malzemelerin biyouyumlulukları ve mekanik özelliklerine göre seçimi”, *2. Ulusal Tasarım İmalat ve Analiz Kongresi*, Balıkesir, 472-484, (2010).
- [4] Bose S., Robertson S.F., Bandyopadhyay A., “Surface modification of biomaterials and biomedical devices using additive manufacturing”, *Acta Biomaterialia*, 66:6-22, (2018).
- [5] Gümüşdereioğlu M., “Biyomalzemeler”, *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*, 23: 2-4, (2002).
- [6] Niinomi M., “Recently metallic materials for biomedical applications”, *Metalurgical and Materials Transactions-A*, 33: 477-486, (2002).
- [7] Ibrahim A. and Hamdy, A.S., “Microstructure, corrosion and fatigue properties of alumina-titania nanostructured coatings”, *Journal of Surface Engineered, Materials and Advanced Technology*, 1: 101-106, (2011).
- [8] Akbaba G. B., “Biyomedikal teknolojilerde kullanım potansiyeli olan bazı nanomateryallerin in vitro biyouyumluluklarının araştırılması”, *Doktora Tezi*, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, (2013).
- [9] Fan X., Feng B., Di Y., Lu X., Duan K., Wang J. and Weng J., “Preparation of bioactive tio film on porous titanium by micro-arc oxidation”, *Applied Surface Science*, 258 (19): 7584–7588, (2012).
- [10] Tang G., Zhang R., Ya Y. and Zhu Z., “Preparation of porous anatase titania film”, *Materials Letters*, 58(12-13): 1857-1860, (2004).
- [11] Karabudak F., Yesildal R., Sukuroglu E.E., Sukuroglu S., Zamanlou H., Dikbas N., Bayındır F., Sen S. and Totik Y., “An investigation of corrosion resistance and antibacterial sensitivity properties of nano-Ag-doped TiO₂ coating and TiO₂ coating grown on niti alloy with the micro-arc oxidation process”, *Arab J Sci Eng*, 42: 2329–2339, (2017).
- [12] Wang H.R., Liu F., Zhang Y.P., Yu D.Z. and Wang F.P., “Preparation and properties of titanium oxide film on NiTi alloy by micro-arc oxidation”, *Applied Surface Science*, 257(13): 5576-5580, (2011).
- [13] Ly X. N. and Yang S. “Influence of current mode on microstructure and corrosion behavior of micro-arc oxidation (MAO) biodegradable Mg-Zn-Ca alloy in hank’s solution”, *Surface and Coatings Technology*, 358: 331-339, (2019).
- [14] Rui L., Zhongde L., Feixiang Y., Yang K. and Yingtao Z., “The biocompatibility of hydroxyapatite film deposition on micro-arc oxidation Ti6Al4V alloy”, *Applied Surface Science*, 266: 57-61, (2013).
- [15] Yi W., Huijun Y., Chuazhong C. and Zhihuan Z., “Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys”, *Materials & Design*, 85: 640-652, (2015).

- [16] Liu F., Xu J.L., Yu D.Z., Wang F.P. and Zhao L.C., "Wear resistance of micro-arc oxidation coatings on biomedical NiTi alloy", *Journal of Alloys and Compounds*, 487(1-2): 391-394, (2009).
- [17] Ying L., Fang L., Honglong L., Wenjun Z. and Guoxin N., "Corrosion mechanism of micro-arc oxidation treated biocompatible AZ31 magnesium alloy in simulated body fluid", *Progress in Natural Science: Materials International*, 24(5): 516-522, (2014).
- [18] Hsieh S.F., Ou S.F. and Chou C.K., "The influence of the substrate on the adhesive strength of the micro-arc oxidation coating developed on TiNi shape memory alloy", *Applied Surface Science*, 392: 581-589, (2017).
- [19] Yesildal R., Karabudak F., Sukuroglu E.E., Sukuroglu S., Zamanlou H., Bayindir F., Sen S. and Totik Y., "Differential scanning calorimetry (DSC) and Ni²⁺ release analysis of NiTi-shape-memory dental alloys coated by micro-arc oxidation (MAO) method", *Applied Physics A*, 124(8): 572, (2018).
- [20] Şüküroğlu S., "NiTi alaşımının mikro ark oksidasyon (MAO) sonrası in-vitro özelliklerinin araştırılması", *Yüksek Lisans Tezi*, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, (2015).
- [21] Sukuroglu S., Totik Y., Sukuroglu E.E. and Kucukosman R., "In-vitro properties of MAO coated NiTi implant material", *3rd International Conference on Advanced Engineering Technologies*, Bayburt, 789-798, (2019).
- [22] Sukuroglu E.E., Sukuroglu S., Akar K., Totik Y., Efeoglu İ. and Arslan E., "Effect of TiO₂ coating on biological NiTi alloys after micro-arc oxidation treatment for corrosion resistance", *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 231(8): 699-704, (2017).
- [23] Kokubo T. and Takadama H., "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, 27(15): 2907-2915, (2006).
- [24] Matykina E., Berkani A., Skeldon P. and Thompson G.E., "Real-time imaging of coating growth during plasma electrolytic oxidation of titanium", *Electrochimica Acta*, 53(4): 1987-1994, (2007).
- [25] Demirci, E.E., "Manyetik sıçratma (CFUBMS) ve mikro ark oksidasyon (mao) teknikleri ile ti6al4v alaşımının dubleks yüzey modifikasyonu", *Doktora Tezi*, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, (2014).
- [26] Murugan, R. and Ramakrishna S., "Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation.", *Tissue Eng*, 13(8): 1845-66, (2007).
- [27] Padera R.F. and Schoen F.J., "Cardiovascular medical Devices", *Biomaterials Science: An Introduction To Materials In Medicine*, 470-491, (2004).
- [28] Demri B., Hage-Ali M., Moritz M., Kahn J.L. and Muster D., "Surface characterization of C/Ti-6Al-4V coating treated with ion beam", *Biomaterials*, 18(4): 305-310, (1997).
- [29] Lausmaa J., "Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials", *Journal of Electron Spectroscopy Related Phenomena*, 81(3): 343-361, (1996).
- [30] Gardella J. A. Jr. and Hernandez de Gatica N.L., "The determination of structure and reactivity at the surfaces of materials used in biology: needs and requirements for electron and ion spectroscopy for surface analysis", *Journal of Electron Spectroscopy Related Phenomena*, 81(3): 227-236, (1996).
- [31] Vogler E.A., "On the biomedical relevance of surface spectroscopy", *Journal of Electron Spectroscopy Related Phenomena*, 81(3): 237-247, (1996).
- [32] Casaletto M.P., Ingo G.M., Kaciulis S., Mattogn, G., Pandolfi L. and Scavia G., "Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings", *Applied Surface Science*, 172(1-2): 167-177, (2001).
- [33] Tillous E.K., Toll-Duchanoy T. and Bauer-Grosse E., "Microstructure and 3D microtomographic characterization of porosity of MAO surface layers formed on aluminium and 2214-T6 alloy", *Surface and Coatings Technology*, 203(13): 1850-1855, (2009).
- [34] Lee J. H., Kim H. E. and Koh Y. H., "Highly porous titanium (Ti) scaffolds with bioactive microporous hydroxyapatite/TiO₂ hybrid coating layer", *Materials Letters*, 63(23): 1995-1998, (2009).
- [35] Wang H., Liu F., Zhang Y., and Wang F., "Structure, corrosion resistance and apatite forming ability of NiTi alloy treated by micro-arc oxidation in concentrated H₂SO₄", *Surface and Coatings Technology*, 206(19-20): 4054-4059, (2012).
- [36] Wang H., Liu F., Zhang Y., Yu D. and Wang, F., "Preparation and properties of titanium oxide film on NiTi alloy by micro-arc oxidation", *Applied Surface Science*, 257(13): 5576-5580, (2011).
- [37] Yerokhin A.L., Leyland, A. and Matthews, A., "Kinetic aspects of aluminium titanate layer formation on titanium alloys by plasma electrolytic oxidation", *Applied Surface Science*, 200(1-4): 172-184, (2002).
- [38] Yerokhin A.L., Nie X., Leyland A., Matthews A. and Dowe S.J., "Plasma electrolysis for surface engineering", *Surface and Coatings Technology*, 122(2-3): 73-93, (1999).
- [39] Wang Y.M., Jiang B.L., Lei T.Q. and Guo L.X., "Microarc oxidation coatings formed on Ti6Al4V in Na₂SiO₃ system solution: Microstructure, mechanical and tribological properties", *Surface and Coatings Technology*, 201(1-2): 82-89, (2006).
- [40] Wang Z.G., Zu X.T., Feng X.D., Mo H.Q. and Zhou, J.M., "Calorimetric study of multiple-step transformation in NiTi shape memory with partial transformation cycle", *Material Letters*, 58(25): 3141-3144, (2004).
- [41] Yao Z., Jiang Y., Jia F., Jiang Z. and Wang, F., "Growth characteristics of plasma electrolytic oxidation ceramic coatings on Ti-6Al-4V", *Alloy Applied Surface Science*, 254(13): 4084-4091, (2008).
- [42] Krishna, R.L., Somaraju K.R.C. and Sundararajan G., "The tribological performance of ultra-hard ceramic composite coatings obtained through microarc oxidation", *Surface and Coatings Technology*, 163-164: 484-490, (2003).
- [43] Ceyhan T., Gunay V., Capoglu A., Sayrak H. and Karaca C., "Production and characterization of a glass-ceramic biomaterial and in vitro and in vivo evaluation of its biological effects", *Acta Orthop Traumatol Turc*, 41(4): 307-313, (2007).
- [44] Guleryuz H. and Çimenoglu H., "Oxidation of Ti6Al4V Alloy", *Journal of Alloys and Compounds*, 472(1-2): 241-246, (2009).
- [45] Ergün, G., Sağesen, M. L., Özgünlük, İ. ve Bek, B., "Kron-köprü döküm alaşımlarının sitotoksitelerinin in vitro değerlendirilmesi", *Ankara Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28(1): 73-81, (2001).

- [46] Akpınar G. G., Can G. ve Can A., “Dental döküm alaşımlarının fibroblastların mitotik aktivitesi üzerindeki etkisi”, *Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 30(1): 51-56, (2003).
- [47] Yanlian L., Ruiyue H., Ya Z., Long B., Yonghua S., Xiaohong Y., Husheng J., Bin T., Ruiqiang H., “The effects of annealing temperature on corrosion behavior, Ni²⁺ release, cytocompatibility, and antibacterial ability of Ni-Ti-O nanopores on NiTi alloy”, *Surface and Coating Technology*, 352:175-181, (2018).
- [48] Yan Y., Neville A. and Dowson, D., “Tribo-corrosion properties of Cobalt based medical implant alloys in simulated biological environments”, *Wear*, 263(7-12): 1105-1111, (2007).
- [49] Ruiqiang H., Yanlian L., Si L., Long B., Ang G., Xiangyu Z., Xiaobo H., Bin T., Paul K.C., “Size-dependent corrosion behavior and cytocompatibility of Ni-Ti-O nanotubes prepared by anodization of biomedical NiTi alloy”, *Corrosion Science*, 103: 173-180, (2016).
- [50] Huang H.L., Hsing H.W., Lai T.C., Chen Y.W., Lee, T.R., Chan H.T., Lyu P.C., Wu C.L., Lu Y C., Lin S.T., Lin C.W., Lai C.H., Chang, H T., Chou H.C. and Chan H.L., “Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells”, *Journal of Biomedical Science*, 17(36): 2-10, (2010).