



Investigation of biodegradability of doped composite oxide coated AZ91 alloy in blood plasma

Ebru Emine Şüküroğlu^{1*}, Ayşenur Çelik²

¹Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Gumushane University, Gumushane, 29100, Turkey

²Department of Biotechnology, Institute of Science, Gumushane University, Gumushane, 29100, Turkey

Highlights:

- Growing composite oxide layer by MAO method on AZ91 Mg alloy
- Growing of antibacterial composite oxide layer by MAO method
- Control of biodegradability of AZ91 Mg alloy

Keywords:

- Biodegradable implant materials
- AZ91 Magnesium alloy
- MAO method
- Ag nanoparticles and Hydroxyapatite doped composite oxide coating.

Article Info:

Research Article
Received: 20.04.2020
Accepted: 25.10.2021

DOI:

10.17341/gazimmfd.723464

Acknowledgement:

This work was supported by Research Fund of Gumushane University. (Project No: 18.F5111.02.01)

Correspondence:

Author: Ebru Emine Şüküroğlu
e-mail: eesukuroglu@gumushane.edu.tr
phone:+90 456 233 1000 /1642

Graphical/Tabular Abstract

Surface engineering; has been making intensive efforts in recent years to improve the biocompatibility and bioactivity of metals, especially those placed in the body. The use of magnesium-based metals as a soluble implant material has become attractive in medical practice in recent years as it can be easily dissolved in the body. Although magnesium alloys help the formation of new tissues in the body, they are the most attractive among metallic biomaterials due to their biodegradability from the body after the treatment process. However, the low corrosion properties of the magnesium alloys limit their used since they lead to biodegradability of the alloys before the treatment process is completed. Various surface modifications are being developed to overcome this limitation. For this purpose, different coatings were grown on the Magnesium alloy by micro arc oxidation method (MAO) and structural, antibacterial and biodegradability properties of these coatings were examined.

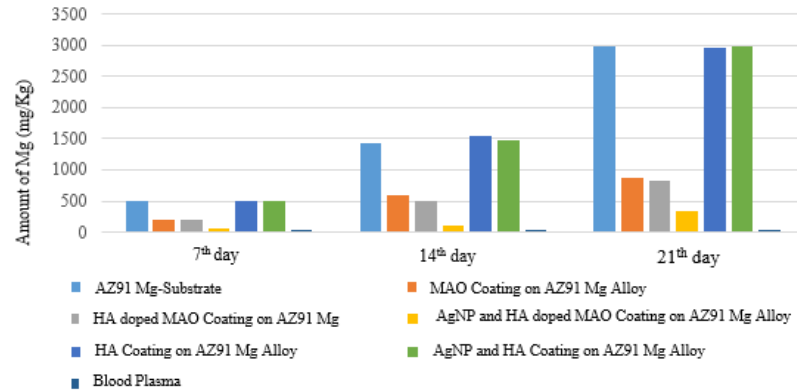


Figure A. Biodegradability test result graphics of AZ91 Mg alloys in blood plasma

Purpose: The purpose of this study is to control the biodegradability of AZ91 magnesium alloy by coated composite oxide layer. It is also to provide this layer to be antibacterial.

Theory and Methods: In this study; Ag nanoparticle (AgNP) and Hydroxyapatite (HA) doped composite oxide coatings were grown on AZ91 Mg Alloy by MAO method. Morphological properties of the coatings were determined by SEM and XRD instruments. The antibacterial properties of coatings were investigated. The biodegradability of the coated and uncoated materials were investigated in the blood plasma for 7 days, 14 days and 21 days.

Results: As a result of the experiments, bacteria activity development was prevented in the samples where MAO was applied with the addition of AgNP and HA to the standard solution. The Biodegradability rate of AZ91 Mg Alloy, which was applied MAO with the addition of AgNP and HA to the standard solution, was reduced. As a result of the soaking test in blood plasma, it was determined that AZ91 Mg alloy protects itself against dissolution with a rate of approximately 89%.

Conclusion: AgNP and HA doped composite oxide layer has been successfully coated on az91 alloy with MAO method. As a result of 24-hour incubation, the highest bacterial zone formation is observed in the composite oxide coated sample with AgNP and HA. It was observed that the base materials without coating were rapidly dissolved by soaking in plasma for 7,14 and 21 days. AZ91 Mg alloy which was coated with AgNP and HA composite oxide layer was reduced the biodegradability rate. As a result of the soaking test in the blood plasma, it has been found that the AZ91 Mg alloy protects itself against dissolution at a rate of about 89%.



Katkılı oksit kaplaması büyütülen AZ91 alaşımının kan plazması içerisindeki biyoçözünürlüğünün incelenmesi

Ebru Emine Şüküroğlu^{1*}, Ayşenur Çelik²

¹Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, 29100 Gümüşhane, Türkiye

²Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü, 29100 Gümüşhane, Türkiye

Ö N E Ç I K A N L A R

- AZ91 Mg alaşımı üzerine MAO yöntemiyle kompozit oksit tabakası büyütülmesi
- MAO yöntemiyle antibakteriyel kompozit oksit tabakası büyütülmesi
- AZ91 Mg alaşımının biyoçözünürlüğünün kontrol edilebilmesi

Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi
Geliş: 20.04.2020
Kabul: 25.10.2021

DOI:

10.17341/gazimmfd.723464

Anahtar Kelimeler:

Biyoçözünürlük,
AZ91 Mg alaşımı,
MAO,
Ag ve HA katkılı kompozit
oksit kaplama

Ö Z

Magnezyum alaşımları; sahip olduğu düşük toksik etki ve biyoçözünür özelliği ile metalik biyomalzemeler içerisinde yaygın kullanıma sahiptir. Bu alaşımlar vücut içerisinde yeni dokuların oluşumuna yardımcı olmakla birlikte kullanıldığı bölgenin iyileşmesi sonrası vücuttan çözünerek atılabilme özelliğinden dolayı diğer metalik biyomalzemelere karşı büyük avantajlar sağlamaktadır. Ancak sahip oldukları düşük korozyon direnci nedeni ile tedavi süreci tamamlanmadan vücut içerisinde çözülmesine neden olmaktadır. Bu durum magnezyum alaşımlarının kullanımlarını sınırlandıran en önemli dezavantajdır. Bu dezavantajın ortadan kaldırılması amacıyla çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Aşınmaya ve korozyona karşı dirençli bir kaplama sağlayabilen Mikro Ark Oksidasyon (MAO) yöntemi, magnezyum alaşımlarının yüzey özelliklerini iyileştirmek amacıyla uygulanan yüzey modifikasyon yöntemlerinden birisidir. Bu çalışmada; Ag nanopartikül ve Hidroksiapatit katkılı kompozit oksit kaplamalar MAO yöntemi ile büyütülmüştür. Kaplamaların morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu ve X Işınları Diffraktometre cihazları ile tespit edilmiştir. MAO yöntemiyle büyütülen kompozit oksit tabakasının, AZ91 Mg alaşımına kazandırdığı antibakteriyel özellikleri ve kaplanan/kaplanmayan taban malzemelerin kan plazması içerisindeki çözünabilirliği araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda Ag nanopartikül ve Hidroksiapatit katkısıyla MAO işlemi uygulanan örneklerde bakteri aktivite gelişimi önlenmiştir. Ayrıca AZ91 Mg Alaşımı üzerine yapılan yüzey işlemleri ile çözünme oranı düşürülmüştür. Kan plazmasında bekletme testi sonucunda ise AZ91 Mg alaşımının çözünmeye karşı kendisini yaklaşık %89'luk bir oranla koruduğu tespit edilmiştir.

Investigation of biodegradability of doped composite oxide coated AZ91 alloy in blood plasma

H I G H L I G H T S

- Growing composite oxide layer by MAO method on AZ91 Mg alloy
- Growing of antibacterial composite oxide layer by MAO method
- Control of biodegradability of AZ91 Mg alloy

Article Info

Research Article
Received: 20.04.2020
Accepted: 25.10.2021

DOI:

10.17341/gazimmfd.723464

Keywords:

Biodegradability,
AZ91 Mg alloy,
MAO,
Ag and HA doped composite
oxide coating

ABSTRACT

Magnesium alloys; It is widely used in metallic biomaterials with its low toxic effect and biodegradability. Although these alloys help the formation of new tissues in the body, they provide great advantages over other metallic biomaterials due to their ability to dissolve from the body after the area of use has healed. However, due to their low corrosion resistance, they cause it to dissolve in the body before the treatment process is completed. This is the major disadvantage that limits the use of magnesium alloys. Various surface modification methods are applied to magnesium alloys in order to eliminate this disadvantage. Micro Arc Oxidation (MAO) method, which can provide a coating resistant to wear and corrosion, is one of the surface modification methods applied to improve the surface properties of magnesium alloys. In this study; Composite oxide coatings with Ag nanoparticle and Hydroxyapatite were grown by MAO method. Morphological properties of the coatings were determined by Scanning electron microscope and X-Ray Diffraction instruments. The antibacterial properties of Ag nanoparticle and HA doped composite oxide layer which were grown by MAO method and the biodegradability of the coated/uncoated materials in the blood plasma were investigated. As a result of the experiments, the development of bacterial activity in the sample coated by MAO was prevented by adding Ag nanoparticle and Hydroxyapatite to the electrolyte solution. In addition, the biodegradation rate has been reduced by surface treatment on AZ91 Mg Alloy. As a result of the soaking test in blood plasma, it was determined that AZ91 Mg alloy protects itself against dissolution with a rate of approximately 89%.

*Sorumlu Yazar/Yazarlar / Corresponding Author/Authors : *eesukuroglu@gumushane.edu.tr, nur.armagan70@gmail.com /

Tel: +90 456 233 1000 /1642

1674

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Magnezyum (Mg) alaşımları, düşük yoğunlukları, yüksek özgül mukavemetleri, mükemmel dökümü, kesme performansı ve daha kolay geri dönüşümü nedeniyle umut verici mühendislik malzemeleri ve biyomalzeme olarak kabul edilmektedir [1, 2]. Mg alaşımları diğer metal alaşımlara göre hafif ve düşük yoğunlukları sayesinde birçok alanda kendine kullanım alanı bulmaktadır. Özellikle son yıllarda biyomalzeme alanında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılmasında Mg'nin büyük oranda kemik dokularında depolanması ve kemik metabolizması için gerekli bir element olmasıdır. Yeni kemik dokusunun oluşumunu teşvik edebilmektedir. Biyomalzeme olarak, düşük toksik etkisi ve biyoçözünür olmasından dolayı magnezyum alaşımları diğer metalik biyomalzemelere oranla büyük avantajlar sağlamaktadır. Mg alaşımları vücut içerisinde yeni dokuların oluşumuna yardımcı olmakla birlikte kullanıldığı bölgenin iyileşmesi sonrası vücuttan çözünerek atılabileme özelliğine sahiptir. Bu sayede kemik iyileşmesi sonrası vücuttan atılarak ikinci bir ameliyatı ortadan kaldırmaktadır, bu durum metalik biyomalzemeler içinde magnezyum alaşımlarının en çok ilgilenilen malzeme olmasını sağlamaktadır [3, 4]. Birçok avantajının yanı sıra dezavantaja da sahip olan magnezyumun standart potansiyeli $-2,37 \text{ eV}$ 'dir, bu durum magnezyumun nemli bir ortamda korozyona eğilimli olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla Mg implantının vücut içerisine yerleşimi sonrası 12 haftalık tedavi süreci tamamlanmadan çözünmesi implant olarak kullanılan alanlardaki en büyük dezavantajlardan birisi olmaktadır. Bu durum Mg alaşımının kullanımını kısıtlamaktadır. Bu kısıtlamaların giderilmesi için çeşitli yüzey işlemleri geliştirilmektedir. Mg alaşımları için kimyasal kaplamalar, fiziksel buhar biriktirme (PVD), mikro ark oksidasyon (MAO), polimerik kaplamalar, soğuk püskürtme, termal işlemler ve mekanik işlemler gibi çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Mg alaşımları için mevcut yüzey işlemlerinin tümü arasında MAO, sert, çizilmeye aşınmaya ve korozyona karşı dayanıklı bir kaplama sağlayabilen Mg'yi korumak için yeni bir teknik olmaktadır [5]. Oksit kaplamaların MAO tarafından oluşum mekanizması, elektrokimyasal, plazma kimyasal ve termal kimyasal reaksiyon içerdiği için karmaşıktır. Oksit kaplamanın oluşumu, dielektrik bozulma, önceden var olan filmin çözünmesi ve anodik gaz oluşumundan oluşmaktadır. Bu reaksiyonlardan herhangi birinin baskınlığı, Mg alaşımının bileşiminin, elektrolitlerin tipinin ve kullanılan çeşitli akım bileşenlerinin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olmaktadır. MAO yöntemi elektrolit içerisine batırılmış anot malzemeye negatif voltaj, katot da ise pozitif voltaj kullanılmasıyla anot üzerinde ark oluşumuyla malzeme yüzeyinde oksit tabakası oluşabilmektedir [6]. MAO kaplama oluşumunun ana aşamaları şu şekilde özetlenebilir: (i) ilk birkaç saniye oksidasyon sırasında bir anodik bariyer film oluşumu; (ii) bariyer filmin dielektrik dağılımı, (iii) kıvılcım alanlarındaki oksit filminin lokal olarak kalınlaşması; (iv) oksit tabakasında gözeneklerin

oluşumu; (v) oksit tabakasının kıvılcım varlığında sürekli büyümesi; ve (vi) büyük ve çıkıntılı gözeneklere yol açan, daha büyük kıvılcımlar ve kırılma kanalları oluşumu [7].

Son zamanlarda gümüş nanopartikülleri (AgNP), fizikokimyasal ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle tıbbi ve biyomalzeme alanında büyük ilgi görmektedir. AgNP'lerin etkinliği in-vitro olarak test edilmektedir ve literatürde son yıllarda vurulanmaktadır [8, 9]. Antik çağda gümüş, toksik olmayan ve güvenli antibakteriyel özellikleri nedeniyle enfeksiyonları kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise, AgNP'lerin aktif rolü, antimikrobiyal jel formülasyonu, ortopedik uygulamalar, tıbbi kateterler, kanla temas eden implantlar, kardiyovasküler implantlar, endodontik dolgu malzemeleri dahil olmak üzere biyomedikal uygulamalar alanında çok yönlü olarak kullanılmaktadır [10]. AgNP'lerin antibakteriyel mekanizmaları, çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmaktadır. Bakteriyel hücre zarları, kükürt oluşturu proteinler ve kükürt içeren amino asitler içerir; hücre zarı gümüşün içinde ve dışında bakteri inaktivasyonu ile onlarla etkileşime girebilmektedir. Ek olarak, AgNP'lerden salınan gümüş iyonu, DNA'daki fosforla ve ayrıca kükürt içeren proteinlerle etkileşime girerek enzim aktivitelerinin inhibe edilmesine neden olmaktadır [11].

Bu çalışmada; biyomalzeme olarak kullanılan AZ91 Mg alaşımı örneklerin yüzeyinde, poroz yapıda bir katkılı kompozit oksit tabakası MAO yöntemi ile büyütülmüştür. Büyütülen bu oksit tabakası AgNP ve HA içermektedir. HA kemik yapısına en uygun özellikte olması nedeniyle kemik-implant malzeme arasındaki bağlanmayı hızlandırmak amacıyla, gümüş iyonları ise operasyon sonrası sıklıkla görülen ve kemik-implant malzeme arasındaki bağlanmayı azaltan enfeksiyonlara karşı antibakteriyel özelliğe sahip olması nedeniyle tercih edilmiştir. Kaplamaların morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve X-ışınları difraksiyonu (XRD) cihazları ile tespit edilmiştir. AgNP ve HA'nın taban malzemeye kazandırdığı özellikler ve kan plazması içerisindeki biyoçözünürlüğü araştırılmıştır.

2. DENEYSEL METOT (EXPERIMENTAL METHOD)

2.1. Malzemeler ve Hazırlama Teknikleri (Materials and Preparation Techniques)

Bu çalışmada $20 \times 20 \times 2$ mm boyutlarında kimyasal bileşimleri Tablo 1'de verilen AZ91 alaşımı taban malzemesi olarak kullanılmıştır. MAO işleminden önce taban malzemeler 800 ve 1200 tane boyutlu SiC zımpara ile parlatıldıktan sonra örnekler, etanol ve saf su ile temizlenmiştir.

2.2. Mikro Ark Oksidasyon İşlemi (Micro Arc Oxidation Process)

Mikro ark oksidasyon işleminde Şekil 1'de gösterilen güç ve kontrol ünitesine, anot uca, paslanmaz çelik havuza, soğutma

suyu girişine ve çıkışına sahip olan bir MAO ünitesi kullanılmıştır. Mikro ark oksidasyon işlemi elektrolit olarak kullanılan Potasyum Hidroksit (KOH), Kalsiyum Asetat ($C_4H_6O_4Ca$) ve Sodyum Beta-Glisero Fosfat Pentahidrat ($(HOCH_2)_2CHOPO(ONa)_2 \cdot 5H_2O$) sulu çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Elektroliti oluşturan her bir kimyasal malzeme ticari olarak temin edilmiştir. İşlem parametreleri ve örnek grupları sırasıyla Tablo 2 ve Tablo 3’de verilmiştir. MAO işlemi DC güç kaynağı kullanılarak unipolar modda gerçekleştirilmiştir. MAO prosesi boyunca tüm deneylerde örnekler anot ve paslanmaz çelik banyo duvarları ise katod olarak kullanılmıştır. Proses sürecinde elektrolit karıştırılmış ve $30^\circ C$ ’in üzerine çıkmaması için paslanmaz çelik cidarlarından geçen şebeke suyu ile soğutulmuştur. MAO işlemi sonrasında hem örnek üstünde büyütülen AgNP ve HA’lerin homojenliğini sağlamak hem de sterilizasyon sağlamak amacıyla örnekler sırasıyla; fırınlanmış ve otoklavda bekletilmiştir. Örnekler 6 ana gruba ayrılmıştır. İlk grup kontrol grubu olarak değerlendirileceğinden MAO işlemine tabii tutulmamış taban malzemeden oluşmaktadır.

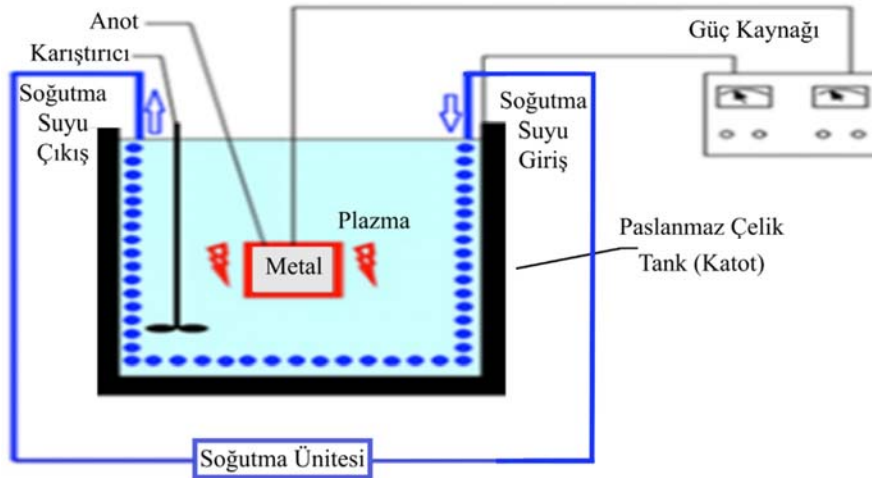
Tablo 3’de ikinci olarak verilen grup elektrolit olarak kullanılan KOH, $C_4H_6O_4Ca$ ve $(HOCH_2)_2CHOPO(ONa)_2 \cdot 5H_2O$ sulu çözeltisinde, üçüncü olarak verilen grup kullanılan elektrolit çözeltisine HA ilave edilerek, dördüncü olarak verilen grup ise elektrolit çözeltisine AgNP ve HA eklenerek gerçekleştirilmiştir. Tablo 3’de verilen son iki gruba ise taban malzemeye MAO işlemine tabii tutulmadan sırasıyla AgNP ve HA-HA büyütülmesiyle gerçekleştirilmiştir.

2.3. Bakteri Adezyon Testi (Bacteria Adhesion Test)

Mikro ark oksidasyon işlemi sonrasında tüm örnekler in vitro ortamda anti-bakteriyel etkinlik deneyleri yapılmıştır. Çalışmada bakteri adezyon deneyleri için uluslararası standartlara sahip ATCC 29213 numaralı *Staphylococcus aureus* suşu kullanılmıştır. Tüm deney steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Stoktan ($-80^\circ C$) çıkarılan bakteri ile bir miktar serum fizyolojik kullanılarak 0,5 McFarland standardına sahip bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır (0,5

Tablo 1. AZ91 Mg alaşımının % ağırlık cinsinden kimyasal bileşimleri (Chemical compositions of AZ91 Mg alloy (% by weight))

Alaşım	% Mg	% Al	% Zn	% Fe	% Cu	% Ni
AZ91	Bal.	8,7 - 8,9	0,8 - 0,9	<0,005	< 0,001	< 0,001



Şekil 1. Mikro Ark Oksidasyon sisteminin şematik gösterimi (Schematic picture of the Micro Arc Oxidation system)

Tablo 2. MAO İşlem Parametreleri (MAO Process Parameters)

Pozitif Voltaj (V)	Frekans (Hz)	Duty Cycle (%)	Kaplama Süresi (dk)
550	250	10	5

Tablo 3. Örnek Grupları (Sample Groups)

	Standart Çözelti ile MAO	HA Katkısı	HA + AgNP Katkısı
1AZ91 Mg Alaşımı	-	-	-
2MAO İşlemi Uygulanan AZ91 Mg Alaşımı	+	-	-
3HA katkılı MAO işlemi uygulanan AZ91 Mg Alaşımı	+	+	-
4AgNP ve HA katkılı MAO İşlemi uygulanan AZ91 Mg Alaşımı	+	-	+
5HA kaplanan AZ91 Mg Alaşımı	-	+	-
6AgNP ve HA kaplanan AZ91 Mg Alaşımı	-	-	+

McFarland standardına sahip bir süspansiyon 150x106 cfu/ml yoğunluğunda bakteri hücreleri içermektedir). *S. Aeurus* tüpten mikro pipet yardımıyla 100 µl alınarak Mueller-Hinton Agara (MHA) drigalski spatülü ile yayılarak ekimi yapılmıştır. Ekim işleminin sonrası grup isimleri ile etiketlenen petri kaplarına alınan örnekler 36-37°C'lik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası örneklerin zon sınırları incelenmiş ve zon görüntüleri alınmıştır. Zon görüntüleri alınan örneklerin yüzeylerindeki bakteri varlığını tespit etmek için mikroskopik görüntüleme yapılmıştır. Mikroskopta bakterileri tespit edebilmek için ise gram boyama uygulanmıştır. Petri kaplarından çıkarılan örnekler sırayla 3 defa fosfat tamponlu tuz ile yıkanmıştır. Pastör pipeti yardımıyla her örnek yüzeyine %1'lik kristal viyole damlatılmıştır. Boyanan örnekler 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. 30 dakika sonunda örnekler bağlanmayan kristal viyoleyi uzaklaştırmak amacıyla pastör pipet yardımıyla distile su ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası örnek yüzeyine %95'lik etanol dağıtılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve bu süre sonunda bakteri görüntüleri elde edilip kaydedilmiştir.

2.4. Bekletme Testi (Soaking Test)

2.4.1. Kan temini (Supplying the blood)

Deneyde kullanılacak olan kan Gümüşhane Belediyesi bünyesindeki mezbahadan karşılanmıştır. Kesimi yapılacak olan TR050001047086 küpe numaralı Holstein-SA ırkı erkek sığırdan kesim esnasında akan kandan 500 ml kan alınmıştır (Orman ve Su İşleri Bakanlığı Hayvan Denepleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğinin 2. Bölüm Madde 8 8. Fıkra k Bendi; "Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetüsler ile yapılan prosedürler" HADYEK iznine tabi değildir.). Kesilecek olan sığırdan kesim esnasında akan kan alındığı için bu kan mezbaha materyali kapsamına girmektedir.

2.4.2. Plazmanın hazırlanması ve bekletme testinin uygulanması

(Preparation of plasma and application of soaking test)

Kesim esnasında alınan kan daha sonra antikoagülanlı tüplere aktararak pıhtılaşması önlenmiştir. Alınan örnekler 10 dk ve 3000 rpm de santrifüj edilerek kanın plazma, eritrosit ve lökositlerine ayrışması sağlanmıştır. Petri kaplarına yerleştirilen örneklerin üzerine plazma kısmı otomatik pipet yardımıyla eklenmiştir. Her bir grup örnek 7,14 ve 21 gün 37°C 'ye ayarlanmış etüvde kan plazmasında bekletilmiştir. 7., 14. ve 21. gün sonlarında plazmadan örnek alınıp İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) cihazında teste tabii tutularak plazmaya salınan Mg miktarı incelenmiştir. Plazmada bekletilen örnekler SEM, EDS ve XRD cihazlarında incelenmiştir.

2.5. Morfoloji ve Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları (Morphology and Structural Characterization)

Yapılan yüzey işlemleri sonrasında oluşan kaplamaların morfolojik ve yapısal karakterizasyonu; makro ve mikro

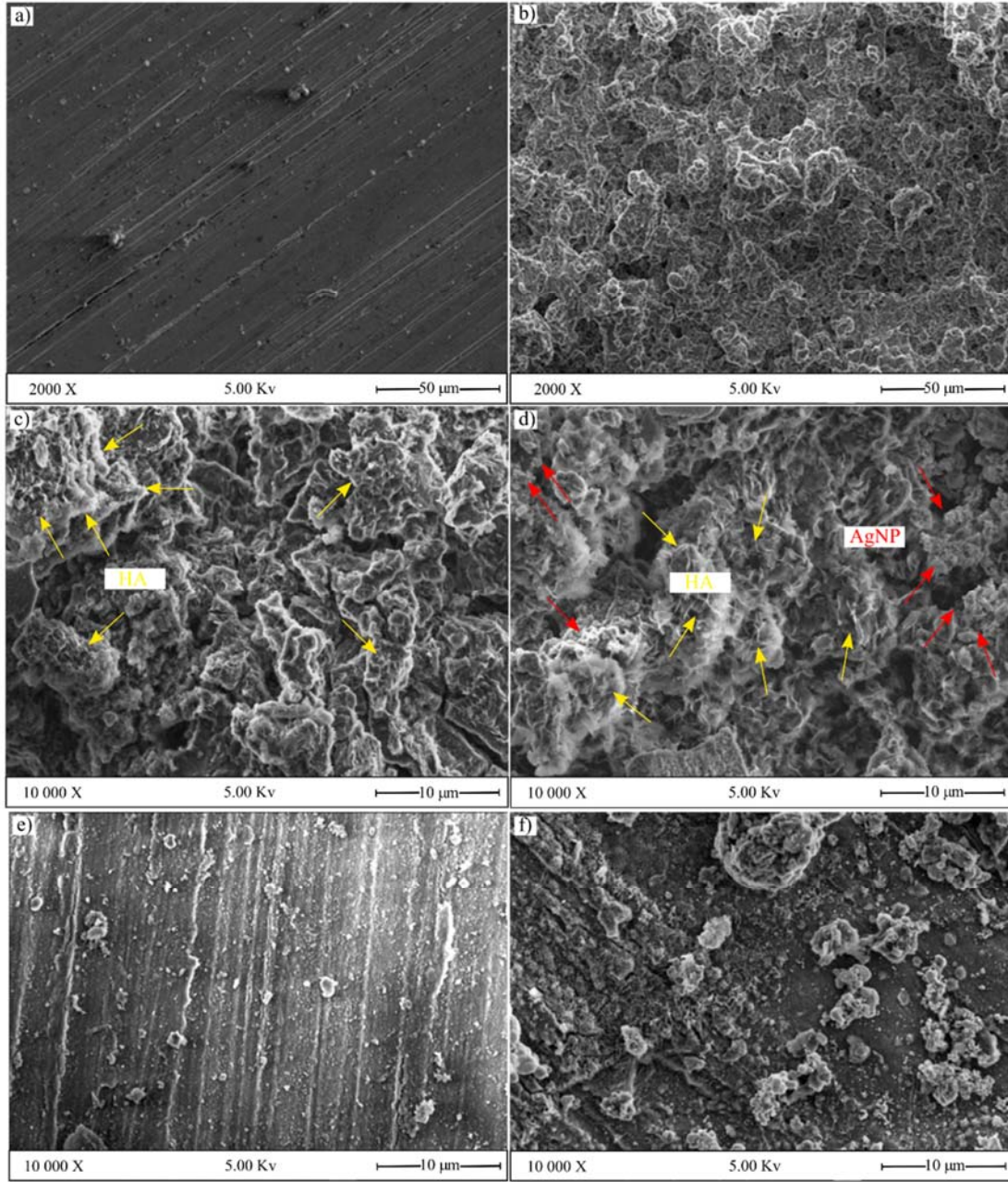
yüzey incelemeleri, kesit incelemeleri, XRD analizi ve EDS analizi deneyleri ile yapılmıştır. XRD ölçümleri; Cu-Kα kaynaklı Empyrean markalı difraktometre cihazı ile yapılmıştır. Ölçüm değerleri, 10°-100° tarama aralığında ve 0,1 derece tarama adımında gerçekleştirilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

3.1. Kaplamaların Yapısal Karakterizasyonu (Structural Characterization of Coatings)

Şekil 2'de MAO işlemi sonrası taban malzemelerde elde edilen kaplamalar karşılaştırılmış yüzey görüntüleri ve yüzey morfolojileri verilmiştir. MAO işlemi uygulanarak yüzeyde MgO tabakasının oluşması sağlanan örneklerin kaplama yüzeylerinde pürüzlü ve mikro gözeneklere sahip bir yapı gözlenmiştir. Mg alaşımlarında MAO kaplamanın oluşumu, başlangıçtaki metal çözünmesi ve bir bariyer filmin büyümesi ile ilerler. Bariyer filmin oluşumuna oksijen evrimi eşlik eder. Bariyer filmin dielektrik kırılması, daha az direnç sunan yerlerde ince kıvılcım deşarjlarının oluşmasıyla sonuçlanmaktadır [7]. Yüzeyin tümünde hızlı bir şekilde hareket eden kıvılcımlar gözlenmektedir [12]. Kıvılcımlar kaybolduğunda çevresindeki oksit filmi elektrolit tarafından söndürülmektedir. Fazla miktarda oksijen gazı açığa çıkması kıvılcımların çevresinde gözenek oluşumunu teşvik etmektedir. Bu reaksiyonların kaplamanın farklı alanlarında tekrar tekrar yapılması, kaplama kalınlığının ve yüzey pürüzlülüğünün artmasına neden olmaktadır [13]. Şekil 2b incelendiğinde; standart elektrolit çözeltisi ile MAO işlemi uygulanmış örnek pürüzlü bir yüzeye ve mikro gözeneklere sahip bir yapı gözlenmiştir. Kaplama yüzeyinde oluşan bu pürüzlülüğün ve mikro gözeneklerin, biyomalzemenin yüzey alanını artırdığı düşünülmektedir. Bu durumun ise örneklerin uygulanacağı kemik yüzeyine bağlanma oranını artıracak olduğu düşünülmektedir. Şekil 2d'de elektrolit içine AgNP ve HA ilavesiyle kaplama yüzeyinde AgNP ve HA gözlenmektedir. Kaplama yüzeyinde daha yüksek bir gözenek yoğunluğunun varlığı, etkili yüzey alanını ve dolayısıyla aşındırıcı ortamın bu gözeneklere absorbe ve konsantre olma eğilimini arttırmaktadır [7]. AgNP ve HA'lerin varlığını doğrulamak amacıyla mikro gözenekler içerisinden EDS analizi yapılmıştır (Şekil 3b) ve sonucunda kalsiyum, fosfat ve Ag iyonuna rastlanmıştır. EDS sonuçlarına göre Ca/P stokiometrik oranı HA katkılı MAO işlemi uygulanan, AgNP ve HA katkılı MAO işlemi uygulanan, HA kaplanan ve AgNP ve HA kaplanan numuneleri için sırasıyla 1,62, 1,64, 1,15 ve 1,08 olarak tespit edilmiştir.

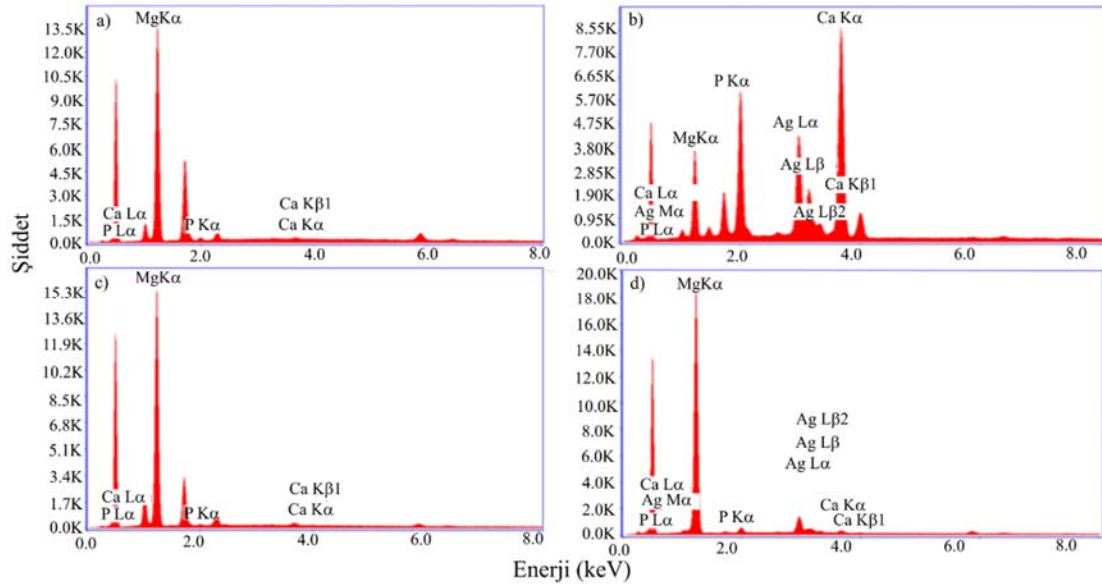
Şekil 2e'de taban malzeme üzerine HA büyütülen örnek, Şekil 2c de ise HA katkılı MAO işlemi uygulanan örnek gösterilmiştir. Şekil 2e incelendiğinde HA'nın yüzeye tutunamadığı gözlenmektedir. Şekil 2c incelendiğinde ise HA katkılarının yüzeyde tutunurluğunun; MAO işleminin yüzeyde oluşturduğu mikro gözenekler sayesinde olduğu düşünülmektedir. İki grubun EDS sonuçları incelendiğinde yüzeyde bulunan kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) iyonlarının varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3a ve Şekil 3c). Aynı durum standart elektrolit çözeltisine AgNP ve HA katkılı oksit



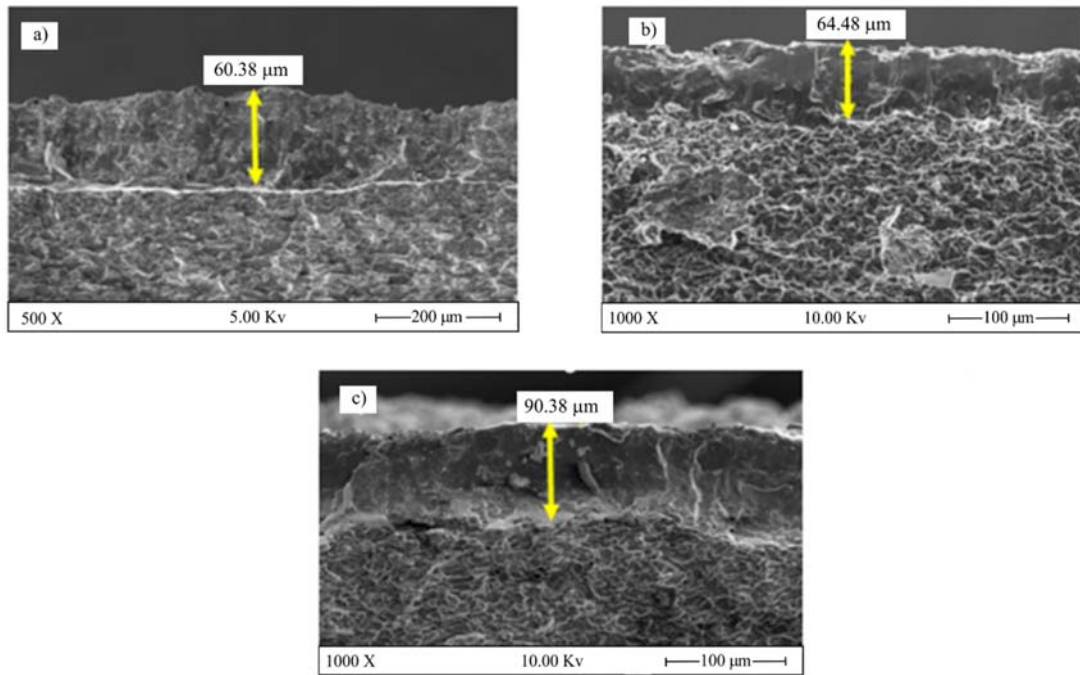
Şekil 2. Kaplama Sonrası YüzeYden Alınan SEM Görüntüleri: a) AZ91 Mg Alaşımı, b) MAO İşlemi Uygulanan, c) HA katkılı MAO işlemi uygulanan, d) AgNP ve HA katkılı MAO İşlemi uygulanan, e) HA kaplanan ve f) AgNP ve HA kaplanan (SEM Images after Coating: a) AZ91-substrate, b) MAO coated, c) HA doped MAO coated, d) AgNP and HA doped MAO coated, e) HA coated and f) AgNP and HA coated)

tabakası oluşturulan örnek ve taban malzeme üzerine HA büyütülen örnek içinde söz konusudur (Şekil 3b ve Şekil 3d). Sonuç olarak her iki grupta da AgNP ve HA büyütülmesine rağmen MAO işlemi uygulanan örneklerde AgNP ve HA büyümesinin MAO işlemi uygulanmayan örneklerle oranla daha fazla olduğu ve bu büyümenin yüzey alanını daha fazla artırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca MAO işlemi uygulanan örneklerde Ca/P oranlarının MAO işlemi uygulanmayan örneklerle oranla daha fazla olduğu ve düşük Ca/P oranlarının yer yer kümeleşme oluşturduğu gözlenmektedir. Şekil 4. İncelendiğinde ise; MAO standart elektrolitine HA katkılı

kompozit oksit tabakası büyütülen ve MAO standart elektrolitine AgNP ve HA katkılı oksit tabakası büyütülen örneklerdeki kalınlığın, sadece MAO işlemi uygulanan örneklerle oranla daha fazla olduğu gözlenmektedir. Alınan kesit görüntülerinde AgNP ve HA katkısının kaplama kalınlığını artırdığı gözlenmektedir. Elektrolite eklenen AgNP ve HA'lerin bozunum voltajını düşürmesinin kaplamaların daha homojen ve kalın olmasına neden olduğu düşünülmektedir. Standart elektrolit çözeltisi ile MAO işlemi ve MAO standart elektrolitine AgNP ve HA katkılı AZ91 Mg (Şekil 4c) alaşımında elde edilen kaplamanın diğer



Şekil 3. Kaplama Sonrası Yüzeyden Alınan EDS Analizleri: a) HA katkıli MAO işlemleri uygulanan, b) AgNP ve HA katkıli MAO İşlemleri Uygulanan, c) HA kaplanan ve d) AgNP ve HA kaplanan
(EDS Analyzes After Coating: a) HA doped MAO, b) AgNP and HA doped MAO, c) HA coated and d) AgNP and HA coated)

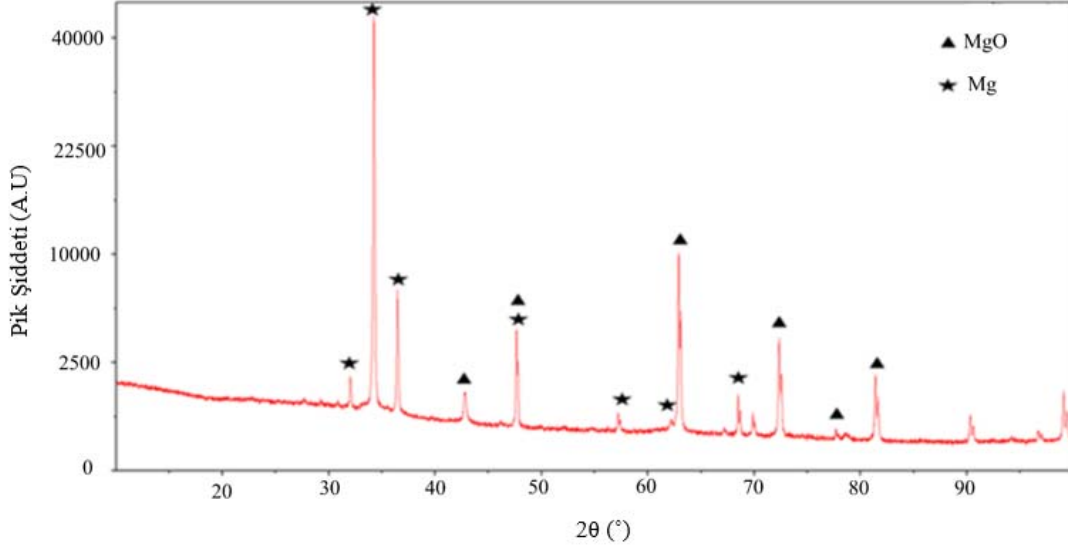


Şekil 4. Kaplanan AZ91 Mg Alaşımı Kesit Yüzeyinden Alınan SEM Görüntüleri: a) MAO işlemleri uygulanan, b) HA katkıli MAO İşlemleri Uygulanan ve c) AgNP ve HA katkıli MAO İşlemleri uygulanan
(Cross Section-SEM Images of the Coated AZ91 Mg Alloy: a) MAO, b) HA doped MAO and c) AgNP and HA doped MAO)

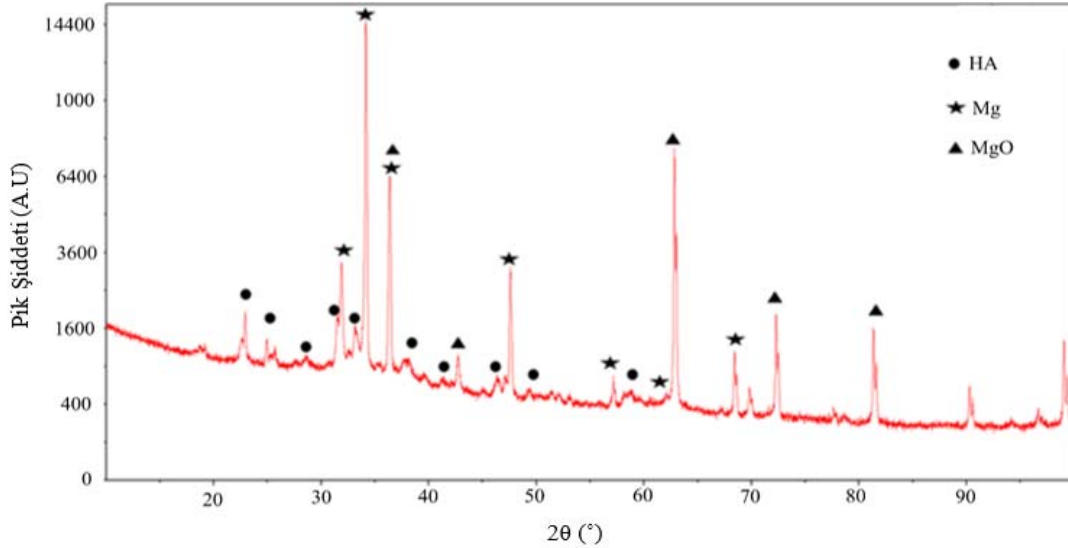
kaplamalara göre daha homojen morfolojiye sahip olduğu ve kaplama kalınlığının daha fazla olduğu gözlenmektedir. Bir üst katman olarak AgNP ve HA katkısı, örneklerin daha etkili korunmasını sağlayabilecek delaminasyon olmadan homojen olduğu gözlenmektedir [14].

XRD analiz sonuçları incelendiğinde standart elektrolitte MAO işlemleri ile örnek yüzeylerinde oluşan oksit tabakaları

esas olarak MgO fazından oluşmakla birlikte taban malzeme olan AZ91 Mg alaşımından gelen magnezyuma ait pikler de görülmektedir [15]. MAO işlemleri uygulanan ve HA katkıli örneklerin XRD analizi incelendiğinde (Şekil 5 ve Şekil 6) Mg (ICCD: 35-0821) ve MgO (ICCD: 30-0794) pikleriyle birlikte HA pikleri de gözlenmektedir. MAO işlemlerine HA katkısıyla oluşan kaplama kalınlığındaki artış MgO piklerinin şiddetini de arttırmıştır. MAO işlemlerine AgNP



Şekil 5. MAO İşlemi Uygulanan AZ91 Mg alaşımı XRD analizi
(XRD analysis of AZ91 Mg alloy coated by MAO)



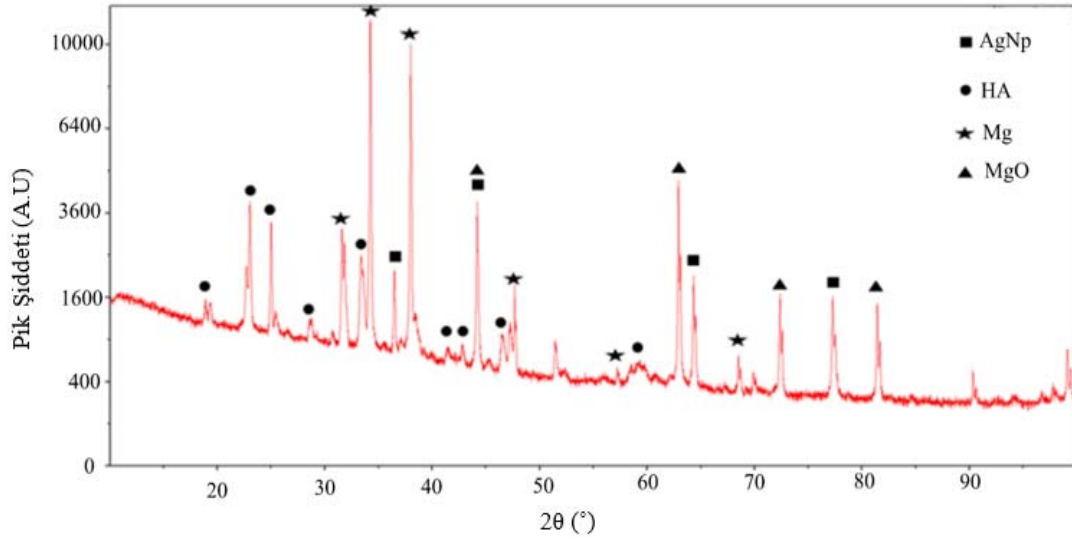
Şekil 6. HA katkılı MAO işlemi uygulanan AZ91 Mg alaşımı XRD analizi
(XRD analysis of HA doped MAO coated AZ91 Mg alloy)

(ICCD: 04-0783) ve HA (ICCD: 01-076-0694) katkılı AZ91 Mg alaşımı örneklerin XRD analizi Şekil 7’de verilmiştir. XRD paterni incelendiğinde MgO piklerinin şiddetinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu durumun kaplama kalınlığındaki artıştan meydana geldiği düşünülmektedir. HA piklerinin şiddeti Şekil 5 ile karşılaştırıldığında AgNP katkılı olan örnekte HA pikinin şiddetinin daha fazla olduğu görülmektedir.

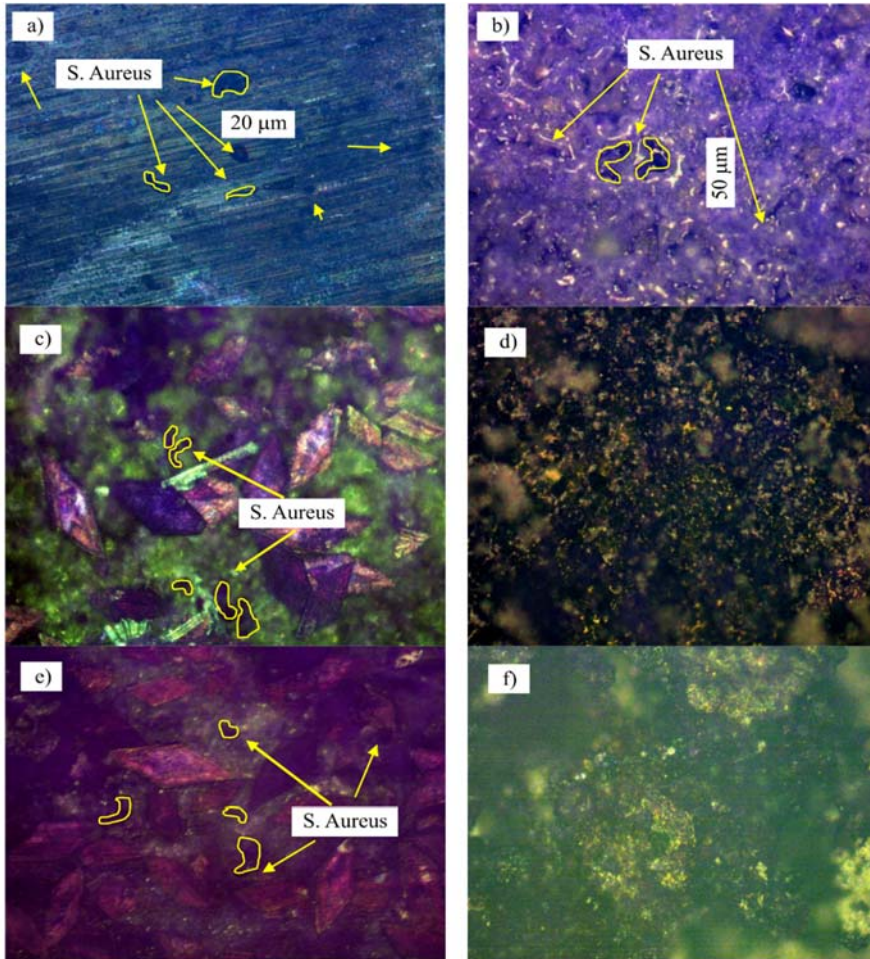
3.2. Bakteri Adezyon Testi Sonuçları (Results of Bacterial Adhesion Test)

İn vitro testlerde bakteri adezyonunun değerlendirilmesinde kullanılmak üzere *S. Aureus* suşu %1’lik kristal viyole ile örnek yüzeylerinde işaretlenmiştir. 24 saatlik inkübe sonunda örnek yüzeylerine uygulanan işaretleme sonrası 1680

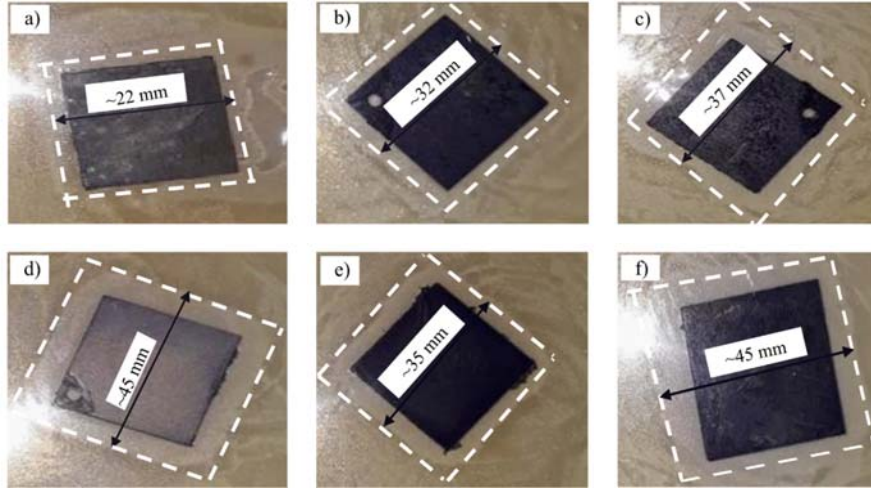
mikroskopik görüntüleri (Şekil 8) alınmıştır. Şekil 8a, kaplama işlemine tabi olmayan AZ91 Mg alaşımını göstermektedir. Şekil 8a incelendiğinde, belirgin bakterilerin koloni nedeniyle koyu renkte olduğu görülmektedir. Görüntüler incelendiğinde işlem uygulanmamış AZ91 Mg alaşımı, MAO işlemi uygulanmış AZ91, HA katkılı MAO işlemi uygulanmış AZ91 ve taban üzeri HA katkılı AZ911 örneklerinde bakterilere rastlanırken AgNP ve HA katkılı MAO işlemi uygulanmış AZ91 ve taban üzeri AgNP ve HA katkılı AZ91 görüntülerinde örnekler yüzeylerinde bakteri ve/veya koloni olmadığı gözlenmiştir. Bu durum göz önüne alındığında bu örneklerde AgNP’lerin antiseptik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 8b ve Şekil 8c incelendiğinde HA katkılı örnek yüzeyinde bakteri aktivite gelişiminin önlenmesi Şekil 8b’ye oranla daha az olduğu gözlenmiştir.



Şekil 7. AgNP ve HA katkı MAO işlemi uygulanan AZ91 Mg alaşımı XRD analizi (XRD analysis of AgNP and HA doped MAO coated AZ91 Mg alloy)



Şekil 8. Örneklerin boyama sonrası mikroskopik görüntüleri: a) AZ91 Mg Alaşımı, b) MAO İşlemi Uygulanan, c) HA katkı MAO işlemi uygulanan, d) AgNP ve HA katkı MAO İşlemi uygulanan, e) HA kaplanan ve f) AgNP ve HA kaplanan (Microscopic images of the samples after painting: a) AZ91-substrate, b) MAO coated, c) HA doped MAO coated, d) AgNP and HA doped MAO coated, e) HA coated and f) AgNP and HA coated)



Şekil 9. AZ91 Mg alaşımı örneklerin bakteri adezyon testi sonrası zon oluşumu görüntüleri: a) AZ91 Mg Alaşımı, b) MAO İşlemi Uygulanan, c) HA katkılı MAO işlemi uygulanan, d) AgNP ve HA katkılı MAO İşlemi uygulanan, e) HA kaplanan ve f) AgNP ve HA kaplanan (AZ91 Mg alloy samples' zone formation images after bacterial adhesion test: a) AZ91-substrate, b) MAO coated, c) HA doped MAO coated, d) AgNP and HA doped MAO coated, e) HA coated and f) AgNP and HA coated)

Bu durum kaplamaya HA'nın da eklenmesiyle yeni yüzey özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İşlem uygulanmamış yüzeyde (Şekil 8a) bakterilerin çok yoğun olduğu, kaplanmış yüzeyde ise çok daha az olduğu (Şekil 8b ve Şekil 8c) gözlemlenmiştir. Taban üzeri HA katkılı örnekte (Şekil 8e) HA katkılı MAO işlemi uygulanan (Şekil 8c) örneklerle oranla daha çok bakteri bulunduğu gözlemlenmiştir. Şekil 8d ve Şekil 8f'de AgNP ve HA katkısı bulunan örneklerde ise hiç bakteri bulunmadığı gözlemlenmiştir. Şekil 8f'de ki örnekte MAO yapılmamasına rağmen üzerinde AgNP büyütülmesi bakteri aktivitesini önlediği düşünülmektedir. Bu, bakteri üremesini engelleme yeteneklerini gösteren AgNP'lerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu açıdan, AgNP'lerin bakteriyel enzimleri engellediği, elektron taşınmasını engellediği ve DNA'ya bağlandığı düşünülmektedir [16]. AgNP ve HA'nın antibakteriyel performansı temel olarak hücre zarını bozabilecek ve hücre içi içeriklerle etkileşime girebilecek gümüş iyonlarının oluşumuna bağlıdır. Ag^+ aynı zamanda, proteinleri denatüre etme, lipidler ve DNA ile sonuçlanan ve sonunda bakterileri yok eden hidroksil radikallerinin oluşumunu da indükler [17]. Başka bir çalışma, Ag^+ iyonlarının varlığının antimikrobiyal performans için çok önemli olduğunu göstermiştir. Negatif yüklü hücre zarı ile pozitif yüklü Ag^+ arasındaki elektrostatik çekim, membranın geçirgenliğine müdahale eder [16,17]. Bu nedenle, Ag^+ dahil edilmesi, bakteriler arasında etkileşime neden olur ve sonuç olarak mikroorganizmaların daha fazla inhibisyonuna neden olur [14].

AZ91 Mg alaşımı örnekleri *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel etki zon oluşumu ile değerlendirilmiştir. Zon oluşumu, bir maddenin varlığına karşılık gelen belirlenmiş bir bölge içinde bir organizmanın büyümesinin inhibisyonunu temsil etmektedir [8]. Tablo 4'de 24 saatlik inkübasyondan sonra, zon sınırlarının sırasıyla yaklaşık 22, 32, 37, 45, 35 ve 45 mm olduğunu göstermektedir. Şekil 9'da

gösterilen Ag Katkılı örnekler (d ve f) incelendiğinde diğer örneklerle oranla daha çok zon oluşumu gözlemlenmiştir. Şekil 1a ve Şekil 1f; AgNP ve HA katkılı yüzeylerinin SEM görüntüleri incelendiğinde yüzeyde AgNP'lerin varlığı zon oluşumunun fazla olmasına neden olmuştur. Yapılan benzer bir çalışmada AZ91 Mg alaşımına Ag katkılı MAO işlemi uygulanmıştır. Bakteri adezyon testi sonuçlarında inhibisyon zon sınırı 40 mm olarak bulunmuştur [18]. SNV 195920-1992 standardına göre, 1 mm'den daha fazla inhibisyon performansının varlığı, örneklerin yüksek antibakteriyel performansını göstermektedir [19].

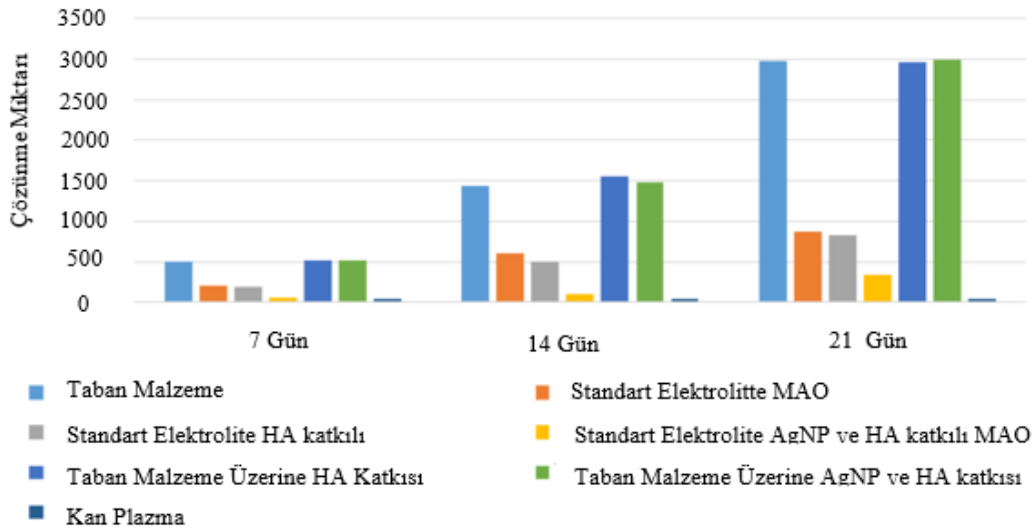
3.3. Bekletme Testi Sonuçları (Results of Soaking Test)

Çalışmada kullanılan AZ91 alaşım yüzeylerine yapılan işlemler sonrasında örnekler 7, 14 ve 21 gün süresince $37^{\circ}C$ 'ye ayarlanmış etüvde kan plazmasında bekletilmiştir. 7., 14. ve 21. gün sonlarında plazmadan 0,50ml alınıp ICP-MS cihazında teste tabii tutularak plazmaya salınan Mg miktarı incelenmiştir. Salınan Mg miktarı ölçülerek aşağıda verilen Şekil 10'da gösterilmiştir. Bekletme testi sonucunda örnek yüzeylerinde oluşan değişimlerin incelenmesi ve değerlendirilmesi için SEM ile görüntülenmiştir (Şekil 11., Şekil 12. ve Şekil 13.).

Şekil 10; 7, 14 ve 21 gün boyunca plazmada bekletilen tüm örneklerin çözünme miktarlarını mg/Kg cinsinden göstermektedir. İlk bekletme periyodu (7 gün), ikinci bekletme periyodu (14 gün) ve son bekletme periyodu (21 gün) boyunca Mg çözünme miktarına karşılık gelmektedir. Şekil 10'da verilen grafikte kaplama işlemi uygulanmayan taban malzeme ile MAO elektrolitine AgNP ve HA katkılı kompozit oksit büyütülmüş örnek karşılaştırıldığında yüzey işlemi uygulanmamış taban malzemenin 7, 14 ve 21 gün boyunca hızlı bir şekilde çözündüğü gözlemlenmiştir. Bu çözünme oranı 12 haftalık tedavi sürecine oranlandığında AZ91 Mg alaşımının bu süreç içerisinde tamamının

Tablo 4. Bakteri Adezyon Testi Sonrası İnhibisyon Zon Sınırları
(Inhibition Zone Boundary after Bacterial Adhesion Test)

Örnek Grupları	İnhibisyon Zon Sınırları (mm)
AZ91 Mg Alaşımı	22
MAO İşlemi Uygulanan AZ91 Mg Alaşımı	32
HA katkılı MAO işlemi uygulanan AZ91 Mg Alaşımı	37
AgNP ve HA katkılı MAO İşlemi uygulanan AZ91 Mg Alaşımı	45
HA kaplanan AZ91 Mg Alaşımı	35
AgNP ve HA kaplanan AZ91 Mg Alaşımı	45

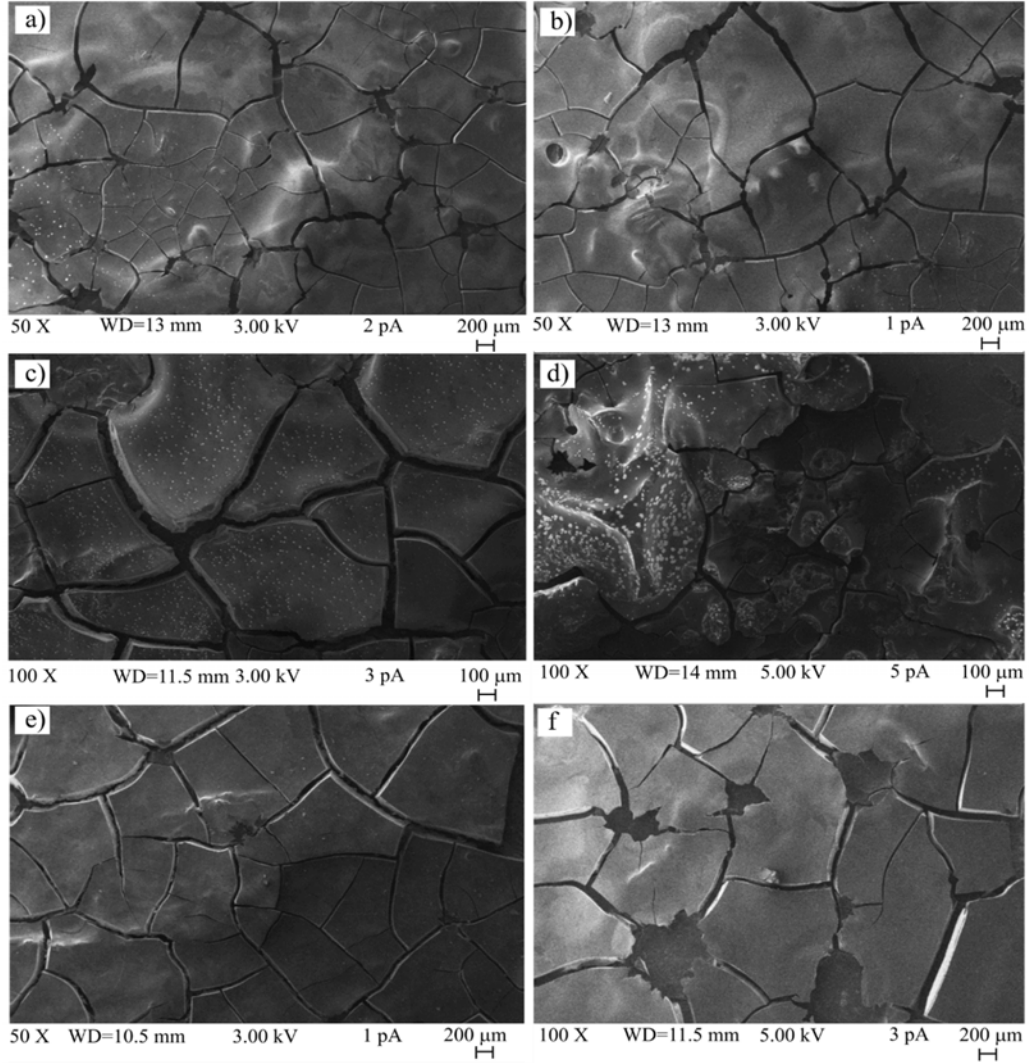
**Şekil 10.** AZ91 Mg alaşımlarının kan plazması içerisindeki bekletme testi sonuç grafiği
(Biodegradability test result graphics of AZ91 Mg alloys in blood plasma)

çözündüğünü göstermektedir. Yüzey kaplanması olmayan Mg alaşımın zaman içinde bozulduğu ve 12-16 hafta sonra tamamen ortadan kalktığı bilinmektedir [20]. MAO yöntemiyle kaplanan AgNP ve HA katkılı kompozit oksit tabakası büyütülen örneklerin, taban malzemeye oranla 12 haftalık süreç içerisinde alaşımın yaklaşık %11'lik bir çözünme oranına sahip olduğu yani plazma da bekletme işleminde malzeme çözünmeye karşı kendisini yaklaşık %89'luk bir oranla koruduğu gözlenmektedir. MAO yöntemiyle kaplanan Mg alaşımının, 12 haftalık implantasyonda özelliklerinin yaklaşık %80'ini koruyabildiği ve bu, periyot boyunca kırık fiksasyonu için yeterli olduğu bilinmektedir [21]. MAO yöntemiyle kaplanan Mg alaşımının gözenekli yapısının, sürekli artan yüzey alanı/hacim oranına bağlı olarak homojen olmayan bir bozunma sağladığı bilinmektedir. İlk birkaç hafta boyunca yavaş bir bozulma oranı ve sonraki aşamalarda hızlandırılmış bir bozulma, biyomedikal uygulama için umut verici bir yüzey modifikasyonu yaklaşımı olarak MAO yöntemi önerilmektedir [20].

Şekil 10'da da gösterildiği gibi AgNP ve HA katkılı kompozit oksit kaplaması en düşük bozunma oranını göstermektedir. AgNP ve HA katkısının; Mg alaşımının bozunmaya karşı etkili bir şekilde korunmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. AZ91 Mg alaşımının en dış

yüzeyinde AgNP ve HA katkılı oksit tabakası, hemen altında bulunan iç tabakanın gözenekliliğini doldurarak ilk koruma sağladığı ve kan plazmasının iç tabakaya ulaştığında, MgO filmi ikinci bir koruma rolü sağlamaktadır. Böylece, korozyon direnci önemli ölçüde iyileştirilmektedir [14].

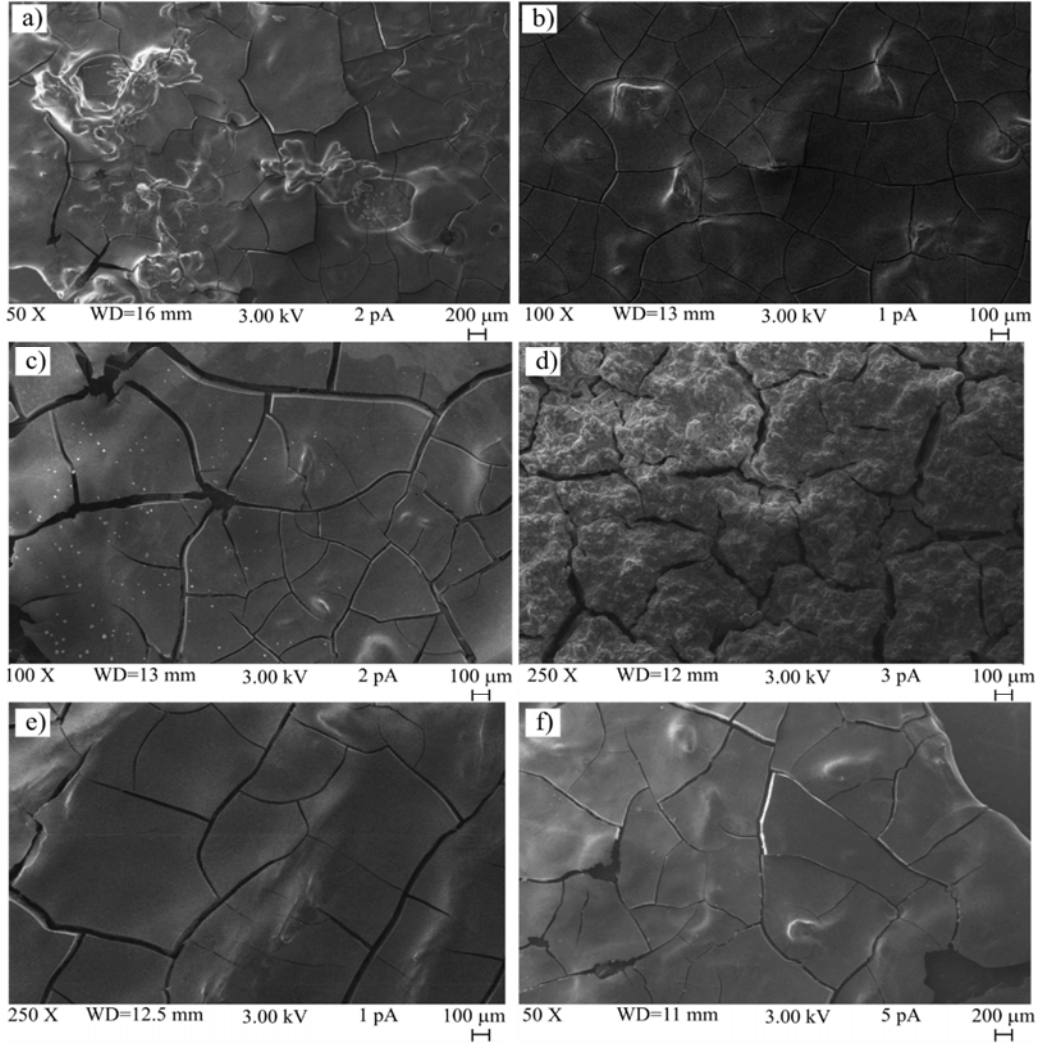
HA katkılı MAO işlemi uygulanan ve 7 gün plazmada bekletilen örnekler den Şekil 11c ve Şekil 11d incelendiğinde her iki örneğin de yüzeyinde beyaz renge sahip partiküller gözlenmiştir. Bu partiküllerin bekletme sıvısı olarak kullanılan plazmadan kaynaklı kalsiyum olduğu düşünülmektedir. Şekil 12c ve Şekil 12d; HA katkılı MAO işlemi uygulanan ve AgNP ve HA katkılı oksit tabakası büyütülen örneklerin bekletme testinde 14. gün sonundaki görüntülerini göstermektedir. Görüntüler incelendiğinde HA katkılı MAO işlemi uygulanan örneklerin bozunma yoğunluğu Şekil 11 ile kıyaslandığında artarken AgNP ve HA katkılı kompozit oksit tabakası büyütülen örneklerin daha homojen yapıda bir görüntü sergilemiştir. Bu durumun elektrolitte HA'ya ek olarak AgNP katkısından ve plazmadan kaynaklı yüzeyde oluşan kalsiyum fosfat partiküllerinden meydana geldiği düşünülmektedir. Yüzeydeki kalsiyum ve kalsiyum karbonat filminin oluşumu, sadece biyolojik etkinliği arttırmakla kalmayıp aynı zamanda korozyon direncini de iyileştirmektedir [22].



Şekil 11. 7 gün plazmada bekletilen örneklerin SEM görüntüleri: a) AZ91 Mg Alaşımı, b) MAO İşlemi Uygulanan, c) HA katkılı MAO işlemi uygulanan, d) AgNP ve HA katkılı MAO İşlemi uygulanan, e) HA kaplanan ve f) AgNP ve HA kaplanan (SEM images of samples which kept in plasma for 7 days: a) AZ91-substrate, b) MAO coated, c) HA doped MAO coated, d) AgNP and HA doped MAO coated, e) HA coated and f) AgNP and HA coated)

21. günün sonunda taban malzeme olan AZ91 alaşımı ve AgNP ve HA katkılı kompozit oksit tabakası büyütülen grubun SEM görüntüleri karşılaştırıldığında (Şekil 13-a ve d) taban malzemenin yüzeyinde oluşan bekleme sonrası bozunma oranının AgNP ve HA katkılı kompozit oksit tabakası büyütülen örneklere oranla daha fazla olduğu gözlenmektedir. AgNP ve HA'nın MAO kaplama elektrolitine eklenmesinin, Mg'nin çözünme oranını azalttığı açıkça görülmektedir. Yüzeyde gözlenen beyaz renkli partiküllerin plazmadan kaynaklı Ca ve P olduğu düşünülmektedir. P ve Ca elementlerinin içeriği Ag ve HA katkısıyla artmaktadır. Bu da HA'nın daha fazla birikmesini göstermektedir. Bekletme süresinin artmasıyla birlikte, bütün kaplamalarda çözünme miktarı artmıştır. AgNP ve HA katkısı, kaplamanın yüzey alanını etkilemiş olabileceği yani gözenek konsantrasyonunu arttırmış olabileceği düşünülmektedir. MAO işleminde uygulanan voltaj kritik bir

değeri aştığında, malzeme yüzeyinde ark oluşumu başlamış olmaktadır. Bu kritik değer bozunum voltajı olarak tanımlanmaktadır. Elektrolite eklenen partiküller bozunum voltajını düşürmektedir. Bu durum ise kaplama yüzeyinin daha kalın olmasına neden olmaktadır [23]. Taban malzeme ve taban malzemeye sırasıyla HA ve AgNP ve HA kaplanan örneklerde 7,14 ve 21 gün süre boyunca doğrusal bir hızla Mg'nin çözünme miktarının arttığı gözlenmektedir. Böylece; MAO işlemi uygulanmadan yüzeyde büyütülen HA ve AgNP ve HA kaplamalarının bozunmayı geciktirmede başarılı olamadığı görülmektedir. 7,14 ve 21 gün boyunca plazmada bekletilen taban malzeme (Şekil 11a, Şekil 12 a ve Şekil 13a), HA katkılı taban malzeme (Şekil 11e, Şekil 12e ve Şekil 13e) ve AgNP ve HA kaplanan taban malzemenin (Şekil 11f, Şekil 12f ve Şekil 13f) SEM görüntüleri incelendiğinde; oluşan bekleme sonrası bozunmanın bekleme süresi boyunca arttığı gözlenmiştir.



Şekil 12. 14 gün plazmada bekletilen örneklerin SEM görüntüleri: a) AZ91 Mg Alaşımı, b) MAO İşlemi Uygulanan, c) HA katkılı MAO işlemi uygulanan, d) AgNP ve HA katkılı MAO İşlemi uygulanan, e) HA kaplanan ve f) AgNP ve HA kaplanan (SEM images of samples which kept in plasma for 14 days: a) AZ91-substrate, b) MAO coated, c) HA doped MAO coated, d) AgNP and HA doped MAO coated, e) HA coated and f) AgNP and HA coated)

MAO uygulanmadan malzeme yüzeyinde AgNP ve HA kaplamasının malzeme yüzeyine tutunamadığı ve bu durumun taban malzemeyle eşdeğer oranda bozunmaya uğradığını göstermektedir (Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13). MAO işlemi uygulanarak büyütülen Kaplamaların yüzeyinde daha yüksek bir gözenek yoğunluğunun varlığı, etkili yüzey alanını ve dolayısıyla aşındırıcı ortamın bu gözeneklere absorbe ve konsantre olma eğilimini artırır. Gözenek yoğunluğu, gözeneklerin dağılımı ve gözeneklerin taban malzemeyle birbirine bağlanabilirliği, bozunmanın koruyucu yeteneğine karar veren önemli faktörlerdir [24].

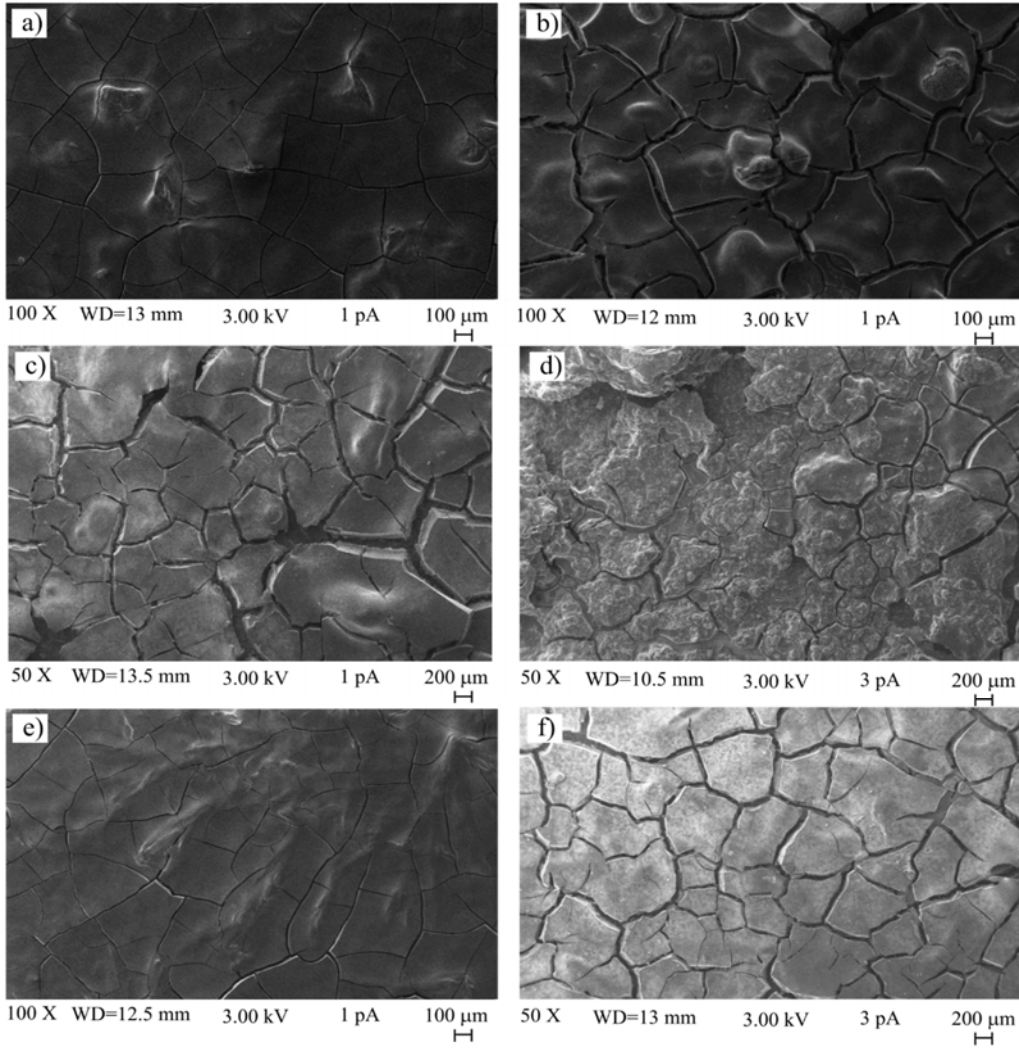
4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Bu çalışmada; biyomalzeme olarak kullanılan AZ91 Mg alaşım örneklerin yüzeyinde, poroz yapıda AgNP ve HA katkılı kompozit bir oksit tabakası Mikro Ark Oksidasyon (MAO) yöntemi ile büyütülmüştür. Kaplamaların kan

plazması içerisindeki çözünme miktarları ve AgNP ve HA katkısının taban malzemeye kazandırdığı özellikleri incelemeye yönelik deneysel bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

Deneyler sonunda elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

- MAO işlemi ile kaplama büyütülen örneklerde yüzey alanının arttığı ve yüzeyde mikro-boşluklara sahip bir yapı oluşturduğu gözlenmiştir. AgNP ve HA katkısının kaplamaya daha homojen bir yapı sağladığı gözlenmiştir. AgNP ve HA katkılı kompozit oksit tabakası büyütülen örneklerde kaplama kalınlığının arttığı gözlenmiştir.
- Kaplama büyütülmeyen taban malzeme üzerinde yapılan bakteri adezyon testi sonucunda belirgin ve koyu renkli bakteri kolonilerine rastlanırken AgNP ve HA katkılı kompozit oksit tabakası büyütülen örneklerde bakteri aktivite gelişiminin önlediği gözlenmiştir.



Şekil 13. 21 gün plazmada bekletilen örneklerin SEM görüntüleri: a) AZ91 Mg Alaşımı, b) MAO İşlemi Uygulanan, c) HA katkılı MAO işlemi uygulanan, d) AgNP ve HA katkılı MAO İşlemi uygulanan, e) HA kaplanan ve f) AgNP ve HA kaplanan (SEM images of samples which kept in plasma for 21 days: a) AZ91-substrate, b) MAO coated, c) HA doped MAO coated, d) AgNP and HA doped MAO coated, e) HA coated and f) AgNP and HA coated)

- 24 saatlik inkübasyon sonucunda en yüksek zon oluşumu AgNP ve HA katkılı kompozit oksit tabakası büyütülen örneklerde görülmektedir.
- 7,14 ve 21 gün plazmada bekletilen Taban malzemenin ICP-MS sonucunda hızlı bir şekilde çözünmeye uğradığı gözlenmiştir.
- AgNP ve HA'nın MAO elektrolitine eklenmesinin Mg'nin çözünme oranını azalttığı gözlenmiştir.
- AgNP ve HA katkılı kompozit oksit tabakası büyütülen örneklerin kan plazmasında bekletme testi sonucunda AZ91 Mg alaşımının çözünmeye karşı kendisini yaklaşık %89'luk bir oranla koruduğu bulunmuştur.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışma; Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim dalında tez olarak başarıyla tamamlanmıştır. Ayrıca Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel

Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce 18.F5111.02.01 kodlu projenin bir kısmını kapsamaktadır ve maddi olarak bu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Kainer K.U., Magnesium Alloys and Technology, John Wiley & Sons, New York, A.B.D, 2013.
2. Mordike B.L., Ebert T., Magnesium: properties-applications-potential, Science and Engineering A, 302, 37-45, 2001.
3. Gnedenkov A.S., Sinebryukhov S.L., Mashtalyar D.V., Gnedenkov S.V., Protective properties of inhibitor-containing composite coatings on a Mg alloy, Corrosion Science, 102, 348-354, 2016.
4. Yin Z. Z., Qi W. C., Zeng R.C., Chen X. B., Gu C. D., Guan S.K., Zheng Y.F., J. Magnesium Alloys, 8, 42-65, 2020.

5. Rehman Z. U., Choi D., Investigation of ZrO₂ nanoparticles concentration and processing time effect on the localized PEO coatings formed on AZ91 alloy, *Journal of Magnesium and Alloys*, 7 (4), 555-565, December 2019.
6. Sukuroglu S., Totik Y., Sukuroglu E. E. ve Kucukosman R., NiTi alaşımının mikro ark oksidasyon sonrası in-vitro özelliklerinin araştırılması, *Politeknik Dergisi*, doi: 10.2339/politeknik.682062, 2020.
7. Sankara T.S.N., Park, S., Lee M.H., Strategies to improve the corrosion resistance of microarc oxidation (MAO) coated magnesium alloys for degradable implants: Prospects and challenges, *Progress in Materials Science*, 60, 1–71, 2014.
8. 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.
9. Shimabukuro, M., Antibacterial Property and Biocompatibility of Silver, Copper, and Zinc in Titanium Dioxide Layers Incorporated by One-Step Micro-Arc Oxidation: A Review, *Antibiotics-Basel*, 9:10, 716-729, 2020.
10. Kumar S.S.D., Rajendran N.K., Hourelid N.N., Abrahamse H., Review Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 165–175, 2018.
11. Deshmukha S.P., Patila S.M., Mullania S.B., Delekara S.D., Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review, *Materials Science & Engineering*, 97, 954–965, 2019.
12. Shi L., Xu Y., Li K., Yao Z., Wu S., Effect of additives on structure and corrosion resistance of ceramic coatings on Mg–Li alloy by micro-arc oxidation, *Current Applied Physics*, 10, 719–723, 2010.
13. Durdu S., Aytac A., Usta M., Characterization and corrosion behavior of ceramic coating on magnesium by micro-arc oxidation, *Journal of Alloys and Compounds*, 509, 8601–8606, 2011.
14. Bakhsheshi-Rad H.R., Hamzah E., Ismai, A.F., Aziz M., Karaman E., Iqbal N., Bioactivity, in-vitro corrosion behavior, and antibacterial activity of silver-zeolites doped hydroxyapatite coating on magnesium alloy, *Trans. Nonferrous Met. Soc.*, 28, 1553-1562, 2018.
15. Gözüaçık N.K., AZ91 Magnezyum Alaşımının Mikro Ark Oksidasyonunda Elektrolit Bileşiminin Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 17-18-19-20s. 2012.
16. Mashitah M.S., Malek N.A.N.N., Characterization and antibacterial activity of silver exchanged regenerated NaY zeolite from surfactant-modified NaY zeolite, *Materials Science and Engineering*, 59, 70–77, 2016.
17. Pereyra A.M., Gonzalez M.R., Rodrigues T.A., Luterbach M.T.S., Basaldella E.I., Enhancement of biocorrosion resistance of epoxy coating by addition of Ag/Zn exchanged a zeolite, *Surface and Coatings Technology*, 270, 284–289, 2015.
18. Sukuroglu E.E., Investigation of Antibacterial Susceptibility of Ag-Doped Oxide Coatings onto AZ91 Magnesium Alloy by Microarc Oxidation Method, *Advances in Materials Science and Engineering*, 7, 1-7, 2018.
19. Prociak J. P., Banach M., Silver nanoparticles a material of the future?, *Open Chemistry* 14, 76-91, 2016.
20. Fischerauer S.F., Kraus T., Wu X., Tangl S., Sorantin E., Hanzi A.C., Löffler J.F., Uggowitz P.J., Weinberg A.M., In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: A micro-CT study in rats, *Acta Biomater.*, 9, 5411-5420, 2013.
21. Imwinkelried T., Beck S., Iizuka T., Schaller B., Effect of a plasmaelectrolytic coating on the strength retention of in vivo and in vitro degraded magnesium implants, *Acta Biomater.*, 9, 8643-8649, 2013.
22. Razavi M., Fathi M.H., Meratian M., Microstructure, mechanical properties and bio-corrosion evaluation of biodegradable AZ91-FA nanocomposites for biomedical applications, *Materials Science and Engineering*, 527, 26, 6938-6944, 2010.
23. Krishna L.R., Sundararajan G., Mechanisms underlying the formation of thick alumina coatings through the MAO coating, *Surf. Coat. Technol.*, 167, 269–277, 2003.
24. Malayoglu U., Tekin K.C., Shrestha S., Influence of post-treatment on the corrosion resistance of PEO coated AM50B and AM60B Mg alloys, *Surface Coating Technology*, 205, 1793–1798, 2010.

