

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ )**

**SODYUM TETRABORAT TOZU İLE  
PÜRÜZLENDİRİLMİŞ TİTANYUM YÜZEYLERİNDE  
OSTEOBLASTİK AKTİVİTENİN İN-VİTRO OLARAK  
İNCELENMESİ**

**UĞUR SORKUN**

**DANIŞMAN  
DOÇ.DR. BARIŞ ALTUĞ AYDİL**

**AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI  
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ )**

**SODYUM TETRABORAT TOZU İLE  
PÜRÜZLENDİRİLMİŞ TİTANYUM YÜZEYLERİNDE  
OSTEOBLASTİK AKTİVİTENİN İN-VİTRO OLARAK  
İNCELENMESİ**

**UĞUR SORKUN**

**DANIŞMAN  
DOÇ.DR. BARIŞ ALTUĞ AYDİL**

**AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI  
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

## TEZ ONAYI

### DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, doktora programında Doktora öğrencisi Uğur Sorkun tarafından Doç.Dr. Barış Altuğ Aydıllı'nın danışmanlığında hazırlanan "SODYUM TETRABORAT TOZU İLE PÜRÜZLENDİRİLMİŞ TİTANYUM YÜZEYLERİNDE OSTEOLASTİK AKTİVİTENİN İN-VİTRO OLARAK İNCELENMESİ" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 14/09/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

#### Jüri Başkanı

Prof.Dr. Hülya KOÇAK BERBEROĞLU  
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi  
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı

#### Jüri-Danışman

Doç.Dr. Barış Altuğ AYDIL  
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi  
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve  
Cerrahisi Anabilim Dalı

#### Jüri

Prof.Dr. M. Kamil GÖKER  
M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi  
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve  
Cerrahisi Anabilim Dalı

#### Jüri

Prof.Dr. Nurullah KEKİLİKOĞLU  
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi  
Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı

#### Jüri

Prof.Dr. Hüseyin ÇİMENÖĞLU  
İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fakültesi,  
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Uğur SORKUN



## İTHAF

Hazırlamış olduğum doktora tez çalışmamı iyi ve kötü günde, hastalık ve sağlıkta, her zaman ve her koşulda desteklerini esirgememiş olan annem Ayşe Sorkun, babam Hüseyin Yaşar Sorkun, ağabeyim Hasan Onur Sorkun ve eşi Güliz Kılınçoğlu Sorkun'a ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen tez danışmanım Doç.Dr. Barış Altuğ AYDİL'e,

Doktora çalışmamın takibinde ilgi, bilgi ve desteğini esirgemeyen Prof.Dr. Özen DOĞAN ONUR, Prof.Dr. Hülya KOÇAK BERBEROĞLU ve Prof.Dr. Nurullah KEKLİKOĞLU'na,

Doktora çalışmamdaki materyallerin yüzey kaplaması işlemlerinde ilgi, bilgi ve desteğini esirgemeyen Prof.Dr. Hüseyin ÇİMENÖĞLU'na ve Araş.Grv. Faiz MUHAFFEL'e,

Doktora çalışmamın histolojik değerlendirmesindeki yardımları için Doç.Dr. Fatıma YÜCEL ve Dr. Arzu TAŞ'a, yüzey analizi ve ileri görüntüleme değerlendirmesindeki yardımları için Araş.Grv. Sina KHOSHİMA'ya,

Doktora eğitimim süresince deneyimlerinden yararlandığım, ilgi, bilgi ve desteğini esirgemeyen Prof.Dr. Cengizhan KESKİN, Doç.Dr. A. Burak ÇANKAYA, Doç.Dr. Fırat SELVİ, Doç.Dr. Cem TANYEL, Doç.Dr. Sırmahan ÇAKARER ve Dr. M. Cihan BABUCCU'ya,

Yirmi seneyi aşkın arkadaşlığıyla desteğini hiç esirgemeyen Serhat ÖZDEMİR'e, her zaman desteğini yanımda hissettiğim İnci YILMAZLI TROUT'a, Dr. Mert TAYŞİ'ye ve Yrd.Doç.Dr. Ayşegül ERTEN TAYŞİ'ye

teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                         |      |
|-------------------------------------------------------------------------|------|
| TEZ ONAYI .....                                                         | İİ   |
| BEYAN.....                                                              | İİİ  |
| İTHAF.....                                                              | İV   |
| TEŞEKKÜR.....                                                           | V    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                       | VI   |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                   | Vİİİ |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                  | İX   |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                                   | Xİ   |
| ÖZET .....                                                              | Xİİİ |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                   | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                 | 3    |
| 2.1. Biyouyumluluk nedir? .....                                         | 3    |
| 2.2. Titanyum biyouyumluluğu.....                                       | 3    |
| 2.3. Osteoentegrasyon.....                                              | 4    |
| 2.4. Osteoentegrasyonda Yüzey Özelliklerinin Etkisi .....               | 5    |
| 2.4.1.1. Machined (işlenmemiş) Yüzey .....                              | 6    |
| 2.4.1.2. Asit dağlama yöntemi .....                                     | 6    |
| 2.4.2. Yüzey Kimyası.....                                               | 7    |
| 2.4.2.1. Mikro-ark oksidasyon yöntemi (MAO) .....                       | 8    |
| 2.5. İmplant çevresinde kemik oluşum mekanizması .....                  | 9    |
| 2.6. Bor.....                                                           | 11   |
| 2.7. Hücre Kültürü .....                                                | 12   |
| 2.7.1. Hücre kültürlerinin avantajları .....                            | 12   |
| 2.7.2. Hücre kültürlerinin dezavantajları .....                         | 13   |
| 2.8. Hücre canlılık oranı ve hücre sayısını değerlendirme testleri..... | 13   |
| 2.8.1. Hücre Canlılık Değerlendirme Testleri .....                      | 14   |
| 2.8.2. Proliferasyon Değerlendirme Testleri .....                       | 14   |
| 2.9. Osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon nedir?.....                    | 15   |
| 2.10. SEM nedir? .....                                                  | 15   |
| 2.10.1. SEM'in kullanım alanları .....                                  | 16   |

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| 2.10.2. SEM’de Fiksatifler ve Fiksasyon .....                | 16 |
| 2.10.3. Dehidrasyon .....                                    | 17 |
| 2.10.4. SEM’de Kurutma .....                                 | 17 |
| 2.10.5. SEM’de Örneklerin Kaplanması .....                   | 18 |
| 2.10.5.1. Altın Kaplama Basamakları .....                    | 18 |
| 2.11. Gama ışınları ile sterilizasyon.....                   | 18 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                      | 21 |
| 3.1. Titanyum disklerin hazırlanması.....                    | 21 |
| 3.2. Titanyum disk yüzeylerinin hazırlanması .....           | 22 |
| 3.3. Deneysel gruplar .....                                  | 24 |
| 3.4. Hücre Ekimi Öncesi Yüzeylerin SEM ile İncelenmesi.....  | 24 |
| 3.5. Hücre Ekimi Sonrası Yüzeylerin SEM ile İncelenmesi..... | 26 |
| 3.6. Osteoblast-titanyum yüzey etkileşim çalışmaları .....   | 30 |
| 3.7. Osteoblast Hücre Kültürü .....                          | 30 |
| 3.8. SEM örneklerinin hazırlanması .....                     | 31 |
| 3.9. Osteokondüktivite testi .....                           | 31 |
| 4. BULGULAR.....                                             | 56 |
| 4.1. Sitotoksikite Testi Bulguları.....                      | 56 |
| 4.2. Osteokondüktive Testi Bulguları .....                   | 57 |
| 4.2.1. WST -1 Analizi (500 hücre/ disk).....                 | 57 |
| 5. TARTIŞMA .....                                            | 62 |
| KAYNAKLAR .....                                              | 69 |
| HAM VERİLER .....                                            | 83 |
| FORMLAR .....                                                | 84 |
| ETİK KURUL KARARI .....                                      | 85 |
| PATENT HAKKI İZNİ .....                                      | 86 |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....                              | 87 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                               | 88 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 4- 1: WST analiz 1 (500 hücre/disk) verileri.....                             | 57 |
| Tablo 4- 2: 3. Gün verilerinin incelenmesi .....                                    | 58 |
| Tablo 4- 3: 7. Gün verilerinin incelenmesi .....                                    | 59 |
| Tablo 4- 4: 14. Gün verilerinin incelenmesi .....                                   | 59 |
| Tablo 4- 5: WST-1 analiz (500 hücre/disk) özetleri (A) ve ortalama tablosu (B)..... | 60 |
| Tablo 4- 6: WST-1 analiz (500 hücre/disk) grafik sonuçları.....                     | 61 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil3- 1: CNC torna cihazı, İstanbul Çekmeköy (Hanwha XP16S, South Korea) .....                                                                  | 21 |
| Şekil3- 2: 6mm çapındaki kuyu içerisine yerleştirilecek olan 6 mm çapındaki Ti diskler .....                                                      | 22 |
| Şekil3- 3: Mikro Ark oksidasyon Cihazı, İstanbul Teknik Üniversitesi.....                                                                         | 23 |
| Şekil3- 4: 6 µm kesit 10000 K büyütmede B kaplı disk yüzeyi .....                                                                                 | 25 |
| Şekil3- 5: 3 µm kesit 22499 K büyütmede B kaplı disk yüzeyi ve içerik grafiği.....                                                                | 25 |
| Şekil3- 6: 2 µm kesit 24967 K büyütmede B kaplı disk yüzeyi .....                                                                                 | 26 |
| Şekil3- 7: Saha Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu ZEİSS ULTRA PLUS ve taramalı elektron mikroskobu ZEİSS EVO LS15, İstanbul KUYTAM (121) ..... | 27 |
| Şekil3- 8: 10000 K büyütmede SEM yüzey görüntüleri (A) AE yüzey, (B) MS yüzey, (C) Bor ile kaplanmış yüzey .....                                  | 28 |
| Şekil3- 9: Kültür kaplarında kuyularına yerleştirilmiş ve hücre ekimi yapılmış Ti yüzeyler.....                                                   | 30 |
| Şekil3- 10: MS grubu 1. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K büyütme, (B) 10.000 K büyütme, (C) 20.000 K büyütme .....                           | 32 |
| Şekil3- 11: AE grubu 1. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme.....                                            | 34 |
| Şekil3- 12: Bor grubu 1. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme.....                                           | 36 |
| Şekil3- 13: MS grubu 3. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme.....                                            | 38 |
| Şekil3- 14: AE grubu 3. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme.....                                            | 40 |
| Şekil3- 15: Bor grubu 3. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme.....                                           | 42 |
| Şekil3- 16: MS grubu 7. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme.....                                            | 44 |
| Şekil3- 17: AE grubu 7. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme.....                                            | 46 |

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil3- 18: Bor grubu 7. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme..... | 48 |
| Şekil3- 19: MS grubu 14. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 1.240 K, (B) 2.500 K, (C) 5.000 K büyütme.....   | 50 |
| Şekil3- 20: AE grubu 14. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 1.240 K, (B) 2.500 K, (C) 5.000 K büyütme.....   | 52 |
| Şekil3- 21: Bor grubu 14. Gün Hücre SEM görüntüleri (A) 1.240 K, (B) 2.500 K, (C) 5.000 K büyütme.....  | 54 |



## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

|                        |                                                     |
|------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>B</b>               | Bor                                                 |
| <b>HA</b>              | Hidroksiapatit                                      |
| <b>MAO</b>             | Mikro Ark Oksidasyon                                |
| <b>Ti</b>              | Titanyum                                            |
| <b>TiO<sub>2</sub></b> | Titanyum Dioksit                                    |
| <b>Ni</b>              | Nikel                                               |
| <b>Co</b>              | Kobalt                                              |
| <b>Cr</b>              | Krom                                                |
| <b>C</b>               | Karbon                                              |
| <b>Nb</b>              | Niyobyum                                            |
| <b>Ta</b>              | Tantalum                                            |
| <b>Zr</b>              | Zirkonyum                                           |
| <b>Al</b>              | Aluminyum                                           |
| <b>Mo</b>              | Molibden                                            |
| <b>TGF-β1</b>          | Transforme edici büyüme faktörü-Beta 1              |
| <b>PGE2</b>            | Prostaglandin E2                                    |
| <b>PDGF</b>            | Trombosit kaynaklı büyüme faktörü                   |
| <b>FGF</b>             | Fibroblast büyüme faktörü                           |
| <b>VEGF</b>            | Vasküler endotelyal büyüme faktörü                  |
| <b>AE</b>              | Asitle dağlama                                      |
| <b>Knt</b>             | Kontrol                                             |
| <b>SAOS-2</b>          | Sarkoma Osteojenik Hücre Kültürü                    |
| <b>TUBİTAK</b>         | Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu     |
| <b>DMSO</b>            | Dimetil Sülfoksit                                   |
| <b>EDTA</b>            | Etilen-diamin tetra asetik asit                     |
| <b>CO<sub>2</sub></b>  | Karbon dioksit                                      |
| <b>Nm</b>              | Nanometre                                           |
| <b>V/V</b>             | 100 birim çözültide bulunan çözünenin hacimce kesri |

|                    |                                                                                                       |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Rpm</b>         | Revolutions per Minute (sabit bir ekseninde, 1 dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş/devir sayısı) |
| <b>Dk</b>          | Dakika                                                                                                |
| <b>µm</b>          | Mikrometre                                                                                            |
| <b>µg</b>          | Mikrogram                                                                                             |
| <b>ml</b>          | Mililitre                                                                                             |
| <b>KUYTAM</b>      | Koç Üniversitesi Yüzey Teknolojileri Araştırma Merkezi                                                |
| <b>SEM</b>         | Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)                                           |
| <b>IM</b>          | Inverted Microscope (Işık Mikroskobu)                                                                 |
| <b>FCS</b>         | Fetal Calf Serum (Buzağı Fetus Serumu)                                                                |
| <b>PBS</b>         | Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)                                                   |
| <b>DMEM-F12</b>    | Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12                                                |
| <b>ISO 10993-5</b> | In vitro sitotoksikite testi                                                                          |
| <b>MTT</b>         | 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolyum bromid                                              |
| <b>XTT</b>         | 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid                                 |
| <b>WST</b>         | 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H-tetrazolyum                                    |
| <b>MC3T3-E1</b>    | Preosteoblastik hücre dizisi                                                                          |
| <b>DNA</b>         | Deoksiribo Nükleik Asit                                                                               |
| <b>RNA</b>         | Ribonükleik Asit                                                                                      |
| <b>mRNA</b>        | Mesajcı Ribonükleik Asit                                                                              |
| <b>ACC 243</b>     | In vitro osteoblast hücresi                                                                           |
| <b>COL I</b>       | Kollojen I                                                                                            |
| <b>OPN</b>         | Osteopontin                                                                                           |
| <b>BSP</b>         | Kemik sialoprotein                                                                                    |
| <b>OCN</b>         | Osteokalsin                                                                                           |

## ÖZET

Sorkun U. (2018). Sodyum tetraborat tozu ile pürüzlendirilmiş titanyum yüzeylerinde osteoblastik aktivitenin in vitro olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi, Doktora Tezi. İstanbul.

Dental implantların osteoentegrasyonu ve uzun dönem başarısında yüzey özelliklerinin oldukça önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda osteoentegrasyonun kemik iyileşmesi ve kemiğin yeniden şekillenmesine bağlı olduğu bildirilmiştir. Dental implanta karşı verilen kemik dokusu cevabının fiziksel faktörlere, kimyasal faktörlere, implant dizaynına ve yüzey özelliklerine bağlı olduğu bilinmektedir. Dental implantların yüzey başarısı bu yüzeylerde ideal seviyede osteoblast hücrelerinin kolonize olması, yüzeylerde bölünerek çoğalması ve yüzeyde tutunmasına bağlıdır. Hücre bölünmesi ve tutunmasındaki artış titanyum yüzeylerin pürüzlülüğüne bağlı olarak değişmektedir. Literatürde birçok çalışmada bor mineralinin antimikrobiyal etkinliğinden söz edilmiştir. Ancak bor mineraliyle kaplanmış dental implant yüzeyinin osteoblast hücreleri üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda hücre proliferasyon etkinliği daha önceden yapılan çalışmalarla kanıtlanmış asit dağlama yöntemi ile henüz bir çalışma yapılmamış olan bor minerali ile kaplanmış implantların osteoblast canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda 6mm çapında, 3.5mm kalınlığında her deney grubunda 12'şer örnek olacak şekilde üç deney grubu ve bir kontrol grubu oluşturulmuştur. Pilot çalışmalarda yüzey örneklerinin içerdiği mineraller görüntülenmiş ve yüzeyde kaplanmış olan bor minerali ve biyouyumlu olan kalsiyum örnekler üzerinde tespit edilmiştir. Sitotoksisite testi de yapılarak pilot çalışma tamamlanmıştır. Yüzey pürüzlülüğünün korelasyonunun yapılabilmesi için işlenmemiş titanyum yüzeyler birinci grup, asitle dağlanmış yüzeyler ikinci grup ve osteoblastik aktivitenin inceleneceği bor kaplanmış titanyum yüzeyler üçüncü grup olarak çalışmaya alınmıştır. Tez çalışma gruplarında 1., 3., 7. ve 14. günlerdeki osteokondüktivite değerleri histolojik olarak ölçülmüş ve sonuçlar toplanmıştır. 1., 3., 7. ve 14. günde her gruptan birer örnek SEM görüntüleri alınması için rastgele seçilmiştir.

Tez çalışmamızın sonuçları ile bor mineralinin titanyum yüzeylerde osteoblast hücre proliferasyonu ve canlılığına olumlu yönde katkısı olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bor, titanyum yüzeyi, osteoblast, dental implant, osteokondüktivite

## **ABSTRACT**

Sorkun U. (2018). In vitro examining of osteoblastic activity on sodium tetraborate coated titanium surfaces. İstanbul University, Institute of Health Science, Oral and Maxillofacial Surgery Department. Doctorate thesis. İstanbul.

Surface structures in osseointegration of implants are important for long term success. Studies show that osseointegration is related with bone healing and bone remodelling. Bone tissue response against dental implants depends on physical factors, chemical factors, design of implants and its surface structures. Surface success of dental implants depends on the ideal level of colonization, proliferation and adhesion of osteoblast cells on these surfaces. The increase of cell proliferation and adhesion differs to the ruggedness of titanium surfaces. Numerous studies in literature show the antimicrobial activity of boron element, however there is no study showing the activity of osteoblast cells on boron coated dental implant surfaces.

The aim of this study is to examine the osteoblast cell activity on boron coated implant surfaces. In the study, 6mm diameter and 3.5mm height cylindric shaped 9 samples in each three groups were created. In the pilot study, boron coated surface samples were monitored and both boron and biocompatible calcium were found on the samples. Additionally, cytotoxicity tests were performed with one control group and three experimental groups of titanium machined surface, acid etched titanium surface, and boron coated titanium surfaces. Histological measurements were performed for osteoconductivity levels on the 1st, 3rd, 7th, and 14th days, and SEM analysis was performed on a sample randomly selected from each group. The results indicated that boron coated titanium surfaces have positive effects on cell proliferation and cell vitality.

**Keywords:** Boron, titanium surface, osteoblast, dental implant, osseointegration

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Titanyum ve alaşımları, iyi mekanik özellikleri, mükemmel korozyon direnci ve yüksek biyouyumluluk derecesi nedeniyle, ortopedik ve dental implantların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Titanyumun biyouyumluluğu yüzey oksit tabakasının özellikleri ile yakından ilişkilidir (2).  $TiO_2$  tabakası biyolojik olarak uyumlu olmasına rağmen, kemiğe doğrudan bir bağ oluşturacak kadar biyoaktif değildir, bu da uzun dönemde osteoentegrasyon kaybına bağlı olarak implant başarısızlığına yol açabilir (3).

Titanyum implantların biyoaktivitesini arttırmak için, son yıllarda kimyasal, fiziksel ve biyokimyasal teknikleri içeren çeşitli uygulamalar geliştirilmiştir (4, 5). Yüksek voltaj altındaki elektrolit solüsyonu kullanılan, metal veya seramik gibi porözlü yüzeylerin kaplanması için geliştirilmiş ileri elektrokimyasal bir teknik olan Mikro-Ark Oksidasyon (MAO) tekniği uygulamaların en ilgi çekenidir (Haan ve ark. 2008). Çünkü bu yöntemle titanyum yüzeyi üzerinde implantın şekline bakılmaksızın mikro gözenekli bir oksit filmi oluşturabilmekte ve aynı zamanda elektrokimyasal süreç sayesinde yüzey topografisini ve kimyasını değiştirebilmektedir (6). MAO yöntemi ile elde edilen filmin morfoloji, gözeneklilik ve kimyasal bileşim gibi özellikleri, MAO yönteminin işlem parametrelerinden açıkça etkilenebilir (7, 8). MAO ile elde edilmiş filmlerin tüm özelliklerinden, özellikle oksitlenmiş implantların yüzey kimyası özelliğinin kemik cevabını etkilediği ve yüzeye kaplanan materyaller ile implantların antimikrobiyal etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Borik asit esterlerinin, klinikte kullanılan eritromisin, gentamisin ve streptomisin gibi antibiyotikler ile kıyaslanabilir olduğu rapor edilmiştir. Bor, oldukça geniş bakteri, mantar ve maya spektrumuna karşı etkili bir antimikrobiyaldir (9).

Bor (B) organizmanın temel mikro elementlerinden olup, osteogenezde ve kemiğin korunmasında da önemli bir rol oynamaktadır. Son zamanlarda, Gorustovich ve ark. yaptığı çalışmada farelerde diyet boron yoksunluğunun periodontal alveoler kemik modellemesini ve kemik oluşumunu inhibe ederek yeniden yapılanmayı değiştirebileceğini bildirmiştir (10). Hakkı ve ark. nın osteoblastlarda B'un moleküler düzeyde ve olası mekanizmalarındaki etkileri üzerine yaptığı bir çalışmada; B'un, hücre dışı matriks proteinlerinin (COL I, OPN, BSP ve OCN) mRNA ekspresyonunu ve

kemik morfojenezi ile ilgili protein ekspresyonunu (BMP-4, -6 ve -7) düzenleyerek osteogenezi uyandıracak ümit verici bir element olabileceğini savunmuşlardır (11).

Huang ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada MAO yöntemiyle Ti yüzeyinde B-TiO<sub>2</sub> film oluşturmuş ve bu filmin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktivitesi karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda B-TiO<sub>2</sub> film yüzeyinin TiO<sub>2</sub> filminden morfolojik olarak farklı olmadığı, yüzeydeki TiO<sub>2</sub> filme B infiltrasyonunun hidrofilik özelliği ve biyoaktiviteyi artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda bu konuda daha fazla in-vitro ve in-vivo çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır (12).

Tez çalışma dönemimizin başlangıcında konuyu belirlerken B'nin tüm bu ümit verici özelliklerinin dental implant çalışmalarına uyarlanması hedeflenmiştir. Tez konusunu belirttiğimiz aşamada B'nin dental implantlara yönelik uyarlama çalışmalarına literatürde rastlanmamıştır. Dünya B rezervlerinin %73,5'ine sahip olmamız B bileşiklerinin dental implant yüzeylerine uyarlandığında üretim maliyetini büyük ölçüde düşüreceği öngörülmüştür. Tüm bu fikirlerden dolayı doktora tez çalışmamızda; B'un MAO yöntemiyle Ti diskler üzerinde B-TiO<sub>2</sub> film oluşturulması sonucu osteoentegrasyonun geliştirilmesi amacıyla ümit vaadeden bir yüzey elde edilebileceği düşünülmüştür. Titanyum yüzeyin kemik iyileşmesini tetikleyici etkisi bizim için klinik açıdan tedavi süresini kısaltmak ve başarıyı artırmak için önemli bir faktördür. Çalışmamızda elde ettiğimiz B katkılı yüzeyler, 1., 3., 7. ve 14. günlerde osteoblast hücre ekimi yapılarak diğer pürüzlü yüzeylerle karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyouyumluluk nedir?

Yaygın olarak kullanılan resmi tanımlamaya göre biyouyumluluk, bir materyalin spesifik bir uygulama sonucu uygun konak cevabı göstermesidir (12). ISO standartlarına göre (ISO 10993-1) bir dizi test tanımlanmış olup bu testlerden geçen bir materyal biyouyumlu olarak tanımlanmaktadır. Bu testler; hayvan çalışmalarını, genotoksisiteyi ve karyojenik etkiyi, çoğalma üzerindeki toksisiteyi, kanla etkileşim testlerini, *in vitro* sitotoksisite testlerini, implantasyon sonrası lokal etkilerin ve sterilizasyon artıklarının saptanmasını, materyallerin bozunmasını, irritasyon ve sensitiviteyi, sistemik toksisiteyi, örneklerin hazırlanmasını, bozunma ürünlerinin saptanmasını ve miktarının tayinini içeren testlerdir (13).

### 2.2. Titanyum biyouyumluluğu

Bazı metallerin enflamatuvar yanıtı sebep olduğu ve hipersensitivite reaksiyonu meydana getirdiği çok iyi bilinmektedir. Nikel (Ni), kobalt (Co) ve krom (Cr) gibi metallerin *in vivo* ve *in vitro* reaksiyonlara neden oldukları gösterilmiştir (14, 15). Fakat titanyum materyallerin diğer metallere göre biyolojik sistem tarafından daha kolay kabul edildiği birçok çalışma tarafından gösterilmiştir (16,17).

Maurer ve ark., vanadyum ve titanyum tuzlarının hücre tarafından alınmasını inceledikleri çalışmada titanyumun hücrelerde toksik etki oluşturmadığını, buna karşın vanadyumun 10 µg/ml 'den fazla olduğu değerlerde toksit etki gösterdiğini bildirmişlerdir (18). Başka bir çalışmada, sıçanlara serum fizyolojik içerisinde TiO<sub>2</sub> intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve karaciğer, dalak ve akciğer gibi organlar histolojik olarak değerlendirilmiştir (19, 20). Organların parenkiminde titanyuma bağlı bir doku hasarı tespit edilmemiştir. Ayrıca, titanyumun allerjik reaksiyon meydana getirme potansiyelinin düşük olması diğer metallere göre üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Literatürde titanyum allerjisi bildirilmesine rağmen (20), bu oranın nikel

ve krom gibi metal allerjilerine göre görülme sıklığı daha azdır (21). Aydil B. tarafından yapılan doktora tez çalışmasında titanyum metallerinin diğer metallere göre daha az genotoksik etkiye sahip olduğu bilgisini desteklemiştir (22).

Saf titanyum materyallerin korozyona direncini ve biyomekanik stabilitesini arttırmak için çoğunlukla alaşım metalleri uygulanmaktadır. Fakat, titanyum alaşımlarında diğer elementlerin varlığı çoğunlukla biyouyumluluğu etkilemektedir. Korozyon ve iyon salınımı çevre dokularda alaşım elementlerin toksisitesini arttırmaktadır. Eisenbarth ve ark., yaptıkları çalışmada alaşım metallerinin biyouyumlulukları değerlendirilmiş ve en yüksek biyolojik uyumluluğa sahip olan elementten en düşüğe doğru sıralamışlardır: Niyobyum (Nb) > Tantalum (Ta) > Titanyum (Ti) > Zirkonyum (Zr) > Alüminyum (Al) > 316L (Molibden içeren 18Cr-8Ni paslanmaz çelik) > Molibden (Mo). Bu materyallerin arasında titanyum, nispeten güvenilir bir metal olarak göze çarpmaktadır (23).

Metal implantların biyolojik uyumu, metal salınımı ve protein bağlama kapasitesi gibi yüzey özelliklerine bağlıdır. Krom-kobalt (Co-Cr-Mo) ve titanyum implantların karşılaştırıldığı çalışmada, krom salınımının titanyuma göre daha fazla olduğu görülmüş ve iki yüzeyin protein bağlama ve konformasyon mekanizmalarında farklılıklar olduğu bildirilmiştir (24). Metal ve alaşımının tipine bağlı biyofilmin kompozisyonu ve metal iyon salınımı, implant alaşımların biyoreaktivitesini belirlemektedir. Titanyum metalinin üstün biyouyumluluğu, düşük iyon salınımına ve vücut sıvıları ile karşılaştığı zaman yüzeyinde meydana gelen protein konformasyonuna bağlıdır.

### **2.3. Osteoentegrasyon**

İlk olarak, Brånemark ve ark. dental titanyum implantların uzun dönemli fonksiyonel yüklemeye dayanabilen direkt kemik ankrajını “osteoentegrasyon” olarak tanımlamışlardır (25).

American Academy of Implant Dentistry tarafından 1986’da yapılan tanımlamaya göre osteoentegrasyon, implanttan kemiğe devamlı bir kuvvet iletimini ve dağılımını sağlayacak şekilde kemik ile implant arasında kurulan bağlantıdır.

Histolojik olarak implant materyali etrafında fibröz doku kapsülünün olmaması implantın osteoentegre olarak kabul edilmesinin şartıdır (26). Fakat bu histolojik

tanımlamanın klinik olarak belirlenmesi zordur. Bu sebeple son yıllarda birçok araştırmacı, osteoentegrasyon prensibini bir biyomekanik fenomen olarak değerlendirmekte ve klinik olarak fonksiyonel yükleme sırasında asemptomatik rijit fikse (osteoentegre) alloplastik implant materyalleri osteoentegre olarak kabul etmektedir (27, 28).

Osteoentegrasyon fenomeni, ilk ortaya atıldığından beri çoğunlukla titanyum ve kemik arasında gerçekleşen bağlantıyı tanımlamak için kullanılmıştır. Farklı implant materyalleri de kemik içerisine yerleştirildiklerinde fibröz doku kılıfı oluşturmada osteoentegre olabilmektedirler. Daha önce de bahsettiğimiz gibi, kullanılan materyalin cinsi osteoentegrasyonun kalitesini belirlemektedir. Albrektsson ve ark., yaptıkları çalışmalarda titanyumun, zirkonyum ve paslanmaz çeliğe göre çok daha ince bir proteoglikan tabakası ile sarıldığını, kalsifiye dokunun titanyum implant yüzeyine daha kısa bir mesafede oluştuğunu ve böylece osteoentegrasyon kalitesinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (29, 30). Ayrıca birçok çalışma titanyumun diğer konvansiyonel implant materyallerine göre daha az yabancı materyal reaksiyonu meydana getirdiğini ortaya koymuştur (20, 22).

#### **2.4. Osteoentegrasyonda Yüzey Özelliklerinin Etkisi**

İmplant yüzeyinin özellikleriyle kemik arasında ilişki yıllardır biyomateryal bilimi tarafından en çok araştırılan konulardan biridir. Çalışmalar, yüzey topografisi ve yüzeyin fizikokimyasal yapısı gibi başlıca iki yüzey özelliğinin doku ile implant arasında gerçekleşen olayları yönlendirdiğini belirtmektedir (31, 32). Son yıllarda, araştırmalar, osteoentegrasyonu optimize edebilmek ve hızlandırabilmek için bu yüzey özelliklerinde bir takım modifikasyonlar yapmak üzere yoğunlaşmıştır. Fakat bu zamana kadar yapılan çok sayıda yüzey çalışmasının “deneme yanılma” şeklinde yürütülmüş olması sebebiyle bazı araştırmacılar doku cevabında etkili olan yüzey özelliklerinin ortaya konulması gerekliliğinin üzerinde durmaktadırlar (27, 33). Fakat yüzey morfolojisinde yapılan düzenlemeler çoğunlukla yüzey kimyasında da bir takım değişimlere sebep olduğu için birbirlerinden bağımsız değerlendirilme imkanları bazen zorlaşmaktadır.

### 2.3.1. Yüzey Topografisi

İmplant yüzeyini daha pürüzlü hale getirerek kemik-implant aralığında yüzey alanını artırmanın böylece daha iyi kemik-implant bağlantısı sağlayabilme fikri yıllardır kabul gören bir yaklaşımdır (34, 35). Kumlama, asitle dağlama, titanyum plazma sprey ve anodizasyon gibi birçok teknikle yüzey topografisinde değişiklikler yapılabilmekte ve yüzey pürüzlülüğü artırılabilir (36, 37, 38, 39). Yüzeyin üç boyutlu morfolojisi, hücre-yüzey etkileşimlerini değiştirerek osteoentegrasyonu destekleyecek şekilde etkilemektedir (40).

#### 2.4.1.1. Machined (işlenmemiş) Yüzey

Direkt olarak implant freze makinesinden çıkan implantların yüzey yapı özelliğidir. Machined yüzeyli implantlarda, implantın uzun aksı boyunca 0.1mm derinlik ve genişlikte dairesel paralel çizgilerin mevcut olması esastır.

#### 2.4.1.2. Asit dağlama yöntemi

Yapılan araştırmalarda asit dağlama yönteminin implant yüzeyinde oluşan kemik miktarını artırdığı gösterilmiştir (31). Asit dağlama yöntemi, hidroklorik asit/sülfirik asit ( $HCl/H_2SO_4$ ) ile ya da %2 Hidroflorik asit / %10 nitrik asit banyosu ile yapılabilmektedir (41). Asit dağlama yöntemi yüzey alanını artırmanın yanında metal yüzey üzerindeki artık maddelerin giderilmesini sağlayarak da kemik-implant bağlantısının iyileşmesinde rol oynamaktadır.

Cochran ve ark., ise asit dağlama ve kumlama yöntemlerinin uygulandığı implantlarda yükleme öncesi ve sonrası boyun bölgesi kemik rezorpsiyonlarında azalma olduğunu vurgulamıştır (41). Buser ve ark., yaptıkları bir çalışmada; asit dağlama ve kumlama yapılan implantların sökülmesinde belirgin olarak çok daha yüksek tork uygulanması gerektiği bildirilmiştir (42).

#### 2.4.2. Yüzey Kimyası

Yüzey topografisi gibi fiziksel özelliklerin yanında, yüzey kimyasındaki değişimlerin de implant çevresindeki osteogenez üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir (33). Yüzey kompozisyonu, yüzey yükü ve yüzey enerjisi gibi fizikokimyasal yüzey özellikleri, kemik biyomateryal ilişkisinde önemli rol oynayan; osteoblastların bağlanma, çoğalma ve özelleşmeleri için önemli parametrelerdir (43). Titanyum yüzey kaplamaları için plazma sprey (44, 45), sol-jel metodu (46), elektroforetik depozisyon (47), katodik depozisyon (48), iyon-beam teknikleri (49) ve film kaplama teknikleri (50) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır.

Topografiye ve kompozisyona bağlı olarak değişiklik gösteren yüzey enerjisi, hücrelerin bağlanacağı protein tabakasının adsorbsiyonunda ve konformasyonunda değişiklik meydana getirmektedir (43). İmplant materyali, serum, tükürük veya kültür besiyeri gibi sıvılar ile karşılaştığı zaman, yüzey enerjisine bağlı olarak proteinlerin yapısal değişime uğrama potansiyellerinde farklılıklar meydana gelir. Böylece iyonlar, mineraller, su, protein ve diğer moleküllerin yüzey bağlanma oryantasyonu değişerek, hücrenin yüzeye bağlanma davranışı değişikliğe uğrar (33). Bazı araştırmacılar, yüksek yüzey enerjisinin doku bağlanmasını arttırdığını savunmaktadırlar (51).

Baier ve ark., ilk olarak yüzey enerjisinin önemini vurgulamışlar ve plazma temizleme işlemi ile titanyum yüzeyinden hidrokarbon kontaminasyonunu uzaklaştırarak yüksek yüzey enerjisi elde etmişlerdir (52). Zhao ve ark., yüksek yüzey enerjisine sahip modifiye implant yüzeylerde kültüre edilen osteoblastların, artan alkalen fosfataz aktivitesi ve osteokalsin üretimi ile birlikte yüksek TGF- $\beta$ 1 ve PGE2 yapımına bağlı olarak daha özelleşmiş bir fenotip sergilediklerini ve yüksek yüzey enerjisinin osteoblastlarda stimüle edici bir etki gösterdiğini savunmuşlardır (51). Fakat, literatürde zıt bulguların da olması sebebiyle (53, 54), yüzey enerjisinin peri-implantal osteogenez üzerine etkisi hakkında ilave çalışmaların ve sistematik derlemelerin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır.

Yüzey yüküne bağlı değişim gösteren ve osteoblast fonksiyonlarında etkili olan bir başka yüzey özelliği ise interfasiyel gerilim veya ıslanabilirliktir. Möller ve ark., farklı ıslanabilirlik değerlerine sahip titanyum yüzeylerde yaptıkları çalışmada, ıslanabilirlik ve osteoblast reaksiyonları arasında herhangi bir korelasyon bulamamışlardır (55). Redey ve ark, ise düşük osteoblast bağlanması ve kollajen

üretimini, yüzeyin düşük ıslanabilirliğine bağlamışlardır (56). Ferguson ve ark., aynı pürüzlülük değerlerine sahip, hidrofilik ve hidrofobik titanyum yüzeyleri *in vivo* olarak karşılaştırmışlardır. Islanabilirlik değeri yüksek, su temas açısı düşük hidrofilik implantlarda, hidrofobik yüzeylere göre daha fazla kemik apozisyonu ve interfasiyel koparma kuvveti elde etmişlerdir (57).

Bu sonuçlara bakıldığı zaman biyomateryalin yüzey kimyasının osteoblast fonksiyonları üzerine önemli bir etkisi olduğu göze çarpmaktadır ve bu yüzden birçok çalışma yüzey kimyası üzerine yoğunlaşmıştır. Fakat bugüne kadar kemik rejenerasyonu için altın standart sağlayacak bir yüzey kimyası ortaya konulmamıştır (58).

#### **2.4.2.1. Mikro-ark oksidasyon yöntemi (MAO)**

Bu yöntem, yüksek voltaj altındaki elektrolit solusyonu kullanılan, metal veya seramik gibi porözlü yüzeylerin kaplanması için geliştirilmiş ileri elektrokimyasal bir tekniktir. MAO yöntemi Ca ve/veya P iyonlarının elektrolit kompozisyon ve konsantrasyonunun kontrol edilmesiyle yüzeyin kaplanmasıdır (59, 60). Biyomedikal uygulamalar açısından bu işlemin önemi; MAO işlemi sırasında elektrolitteki Ca ve  $PO_3$  iyonlarının seramik tabaka içine girerek titanyum gibi alaşımların biyoaktivite potansiyelini arttırabilmesidir (61).

MAO işlemi sırasında, elektrolite daldırılmış Ti örnek üzerine pozitif voltaj uygulanarak titanyumun anodizasyonu sonucu yüzeyde oksit tabakası oluşturulur. Uygulanan voltaj belli bir noktaya kadar artırıldığında oksit tabakada bozulmanın (yalıtkan madde bozulması) başladığı noktada mikro-ark gözlenmektedir. Yalıtkan madde bozulmasının olduğu anda Ti iyonları ve elektrolitteki OH iyonları ters yönde hareket etmeye başlayarak en kısa zamanda bozulan oksit tabakayı tamir ettikleri görülmüştür. Bu yeni oluşan tabaka sıkıca tutunmuş poröz yapıdadır ki bu form biyoaktif yüzeyler için oldukça avantajlı bir durumdur (59, 60, 62).

Son yıllarda Ti implantların biyolojik cevabının iyileştirilmesi konusunda yapılan çalışmalarda MAO yöntemi, yüzey modifikasyonu için en iyi yöntemlerden biri olarak nitelendirilmiştir (63, 64).

## 2.5. İmplant çevresinde kemik oluşum mekanizması

Kemik içine yerleştirilen implant çevresindeki hasar gören doku bu duruma, kemik iyileşmesi ve rejenerasyonun normal mekanizmaları ile cevap vermektedir. Hasarın olduğu yüzeye komşu kemik yüzeylerindeki kan damarlarında hasar meydana gelir ve hazırlanan implant yuvasında hemoraji, pıhtı veya hematoma meydana gelir. İmplant yerleştirilirken vücutta ilk olarak kan ile temas eder. İmplant, biyolojik sıvıların mevcut olduğu ortama girdikten saniyeler sonra, yüzeyinde proteinlerden oluşan bir tabaka meydana gelir. Yüzeyde meydana gelen bu protein modifikasyonu bütün implant materyallerinde aynı şekilde gerçekleşir. Fakat materyalin cinsi ve yüzey özellikleri, oluşan protein tabakasının yapısı ve konformasyonunda belirleyicidir (65).

Yüzeydeki protein modifikasyonunu takiben, implant yüzeyi trombositlerle temas eder. Yara yüzeyindeki trombosit agregasyonu sonucu, pıhtılaşma mekanizmaları devreye girerken, diğer bir taraftan da trombositlerin granüllerinden, transforming büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi bir takım büyüme faktörleri ile serotonin ve histamin gibi bazı vazodilatör faktörlerin salınımı gerçekleşir. Trombositler tarafından salgılanan bu kemoatraktanlar, çeşitli hücrelerin migrasyonunu ve çoğalmasını stimüle ederek implant-iyileşme mekanizmalarında yönlendirici etkiye sahiptirler. Örneğin, PDGF enflamatuar lökositler, osteoblastlar, düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi çok çeşitli hücrelerde mitojenik ve migratif etkilere sahiptirler (66, 67).

İmplantasyon sonrası, nötrofiller de trombositler gibi bölgeye ilk ulaşan ve ilk enflamatuar yanıtta görevli hücrelerdir. Nötrofiller ilk 1-2 gün kemik-implant aralığını domine ederler. Bölgede bakteri ve endotoksin bulunmadıkça, nötrofil sayısı azalır. Dokuda meydana gelen yaralanmadan bir gün sonra, monosit migrasyonu ve makrofaj akümüülasyonu meydana gelmeye başlar (28). Nötrofiller ve makrofajlar, ölü hücreleri, ekstraselüler matriks kalıntılarını ve bakteriler gibi yabancı cisimleri uzaklaştırırlar. Makrofajlar, enflamatuar fazdaki fagositik görevlerinin yanında fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi çeşitli sitokinler de salgırlar. Böylece osteojenik ve endotel hücrelerinin göçünü stimüle ederek bir sonraki proliferatif fazın gerçekleşmesi için gerekli kimyasal sinyalleri sağlarlar.

Vazoaktif aminlerin serbestlenmesi, trombosit ve lökosit infiltrasyonu, pıhtı ve fibrin ağının oluşumu ve makrofaj aksiyonu ile birlikte ilk enflamatuar faz gerçekleşir. Beş güne kadar uzayabilen bu enflamatuar yanıtı, nötrofillerin ve takiben monositlerin pıhtıyı ortadan kaldırmaları ve anjiogenezin başlaması takip eder (68). Periimplant iyileşme kompartmanının hipoksik ve asidik ortamında makrofajlardan ve endotelial hücrelerden salgılanan çeşitli büyüme faktörlerinin (primer olarak FGF ve VEGF) fibrin ağının içerisine yeni kapillerlerin gelişimini stimüle eder (69). Böylece endotelial hücrelerin çoğalması, maturasyonu ve yeni kapiller tüplere organizasyonu gerçekleşirken yeni oluşan dokunun oksijen ve besin ihtiyacı karşılanır.

Kan hücrelerinin, kemik-implant aralığında oluşan fibrin bazlı yapısal matriksteki davranışlarının iyileşme üzerine etkileri tartışılmaz bir gerçektir. Fakat implant çevresinde meydana gelecek ossifikasyonun kalitesi, bölgeye göç edecek osteojenik hücrelerin çoğalma ve migrasyon kapasitesi ile doğru orantılıdır (35). Osteoblastların, implantın yerleştirilmesinden hemen bir gün sonra yüzeye yapışmaya başladıklarını göstermişlerdir. Bu bulgu, Davies 'in, belirttiği gibi mezenkimal kök hücre göçünün ve kolonizasyonunun implantın yerleştirilmesinden kısa bir süre sonra meydana geldiğini; alyuvar, fibrin ve trombositlerin modülasyonu sonucu ortaya çıktığını göstermektedir (70). Pıhtılaşma mekanizması sonucu oluşmuş geçici fibrin matriksin üç boyutlu yapısı ve bölgeye ilk ulaşan hücrelerin salgıladıkları migratif büyüme faktörleri, osteojenik hücrelerin optimum göçü için önemli bir rol oynamaktadır. Bu sebeple, implante edilen materyalin kimyası ve yüzey özellikleri, oluşacak fibrin bağlama kapasitesini ve büyüme faktörlerinin salınımını etkileyerek mezenkimal hücrelerin göçünü doğrudan yönlendirmektedir (71).

Titanyum implant materyalleri, yüzeylerinde ideal bir fibrin retansiyonu meydana getirirler. Bu fibrin matriks sayesinde migrasyon yeteneğine sahip osteojenik hücreler implantın yüzeyine ulaşırlar ve doğrudan yüzeyde yeni kemiğin üretimine başlarlar. Davies, bu ossifikasyon konseptini *de novo* kemik yapımı olarak tanımlamaktadır (28). İlk önce özelleşmiş olan osteojenik hücreler, kalsiyum fosfat mineralizasyonu için kollajensiz organik matriksi (sement çizgileri/lamina limitans) salgırlar. Çoğunlukla osteopontin ve kemik sialoprotein gibi iki tane kollajen olmayan proteinden oluşan ve yoğun olarak proteoglikan içeren bu tabakada mineralizasyon meydana gelir (72). Kalsiyum fosfat çökmesini takiben kollajen fibrillerin oluşumu ve mineralizasyonu gerçekleşir. Böylece kontak osteogenezi sonucu, implant ve yüzeyindeki kalsifiye

kollajen kompartmanın arasında kollajen olmayan bir doku oluşur. Bu doku, titanyum gibi toksik olmayan bir implant materyali ile kemik arasında meydana gelen bağlantıyı gösteren yapıdır.

İmplant yüzeyinde bu kalsifiye matriksin oluşumunu takiben örgü (woven) kemik ve kemik trabekülleri tekrar düzenlenirler (73). İmplant çevresinde kaybolan kemik devamlılığını tekrar kazandırmak için hızlı bir örgü kemik yapımı başlar. Örgü kemik, gevşek şekilde paketlenmiş çeşitli boylarda ve düzensiz kollajen fibrillerinden meydana geldiğinden dolayı lameller kemik kadar düzenli olması ve mekanik stabilite sağlaması olanaksızdır. Fakat ilk üç ay içerisinde büyük oranda remodele olarak lameller kemiğe dönüşür. İmplantasyondan üç ay sonra implantların çevresinde çoğunlukla örgü ve lameller kemik karışımından meydana gelen doku kendini gösterir (74, 75, 76). İmplant çevresinde meydana gelen yeni lameller kemiğin oluşumu ve remodelasyonu, ilik dokusunun yoğun olduğu bölgelerde mononükleer öncü hücrelerin mevcudiyetine bağlı olarak kortikal kemiğe göre çok daha hızlı gerçekleşir (28). Bu sebeple, implantasyondan hemen sonra kortikal kemikte daha iyi primer mekanik stabilite sağlanırken, implantın asıl biyolojik fiksasyonu trabeküler kemikte daha çabuk gerçekleşir.

## **2.6. Bor**

Bor (B), organizmaların ana mikro-besinlerinden biri olmakla beraber, osteogenezis ve kemik yapımında önemli bir rol oynamaktadır (77, 78). Kemik sağlığı için B, kalsiyum, protein, magnezyum vb. element ve vitaminlerin diet ile alınması çok önemlidir. Eksikliklerinde kemik kaybı ve kemik yapılanmasında azalma görülebilir (10,79,80).

B'nin insanlarda steroid hormon metabolizmasını olumlu yönde etkileyen, kalsiyum eliminasyonunu ve kemik demineralizasyonunun önleyen önemli bir elementtir. Menapoz döneminde ve sonrasındaki kadınlarda B takviyesinin belirgin bir şekilde idrarla kalsiyum ve magnezyum atılımını azalttığı, serum estradiol seviyesini, kalsiyum emilimini artırdığı belirtilmektedir (81, 82).

Ying ve ark. tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada, B'un osteojenik farklılaşmayı uyarak kemikleşmeyi arttırdığı belirtilmiştir (83).

Huang ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada MAO yöntemiyle Ti yüzeyinde B-TiO<sub>2</sub> film oluşturmuş ve bu filmin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktivitesi karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda B-TiO<sub>2</sub> film yüzeyinin TiO<sub>2</sub> filminden morfolojik olarak farklı olmadığı, yüzeydeki TiO<sub>2</sub> filme B infiltrasyonunun hidrofilik özelliği ve biyoaktiviteyi arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda bu konuda daha fazla in-vitro ve in-vivo çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır (12). Bu çalışmaya paralel olarak, tez çalışmamızda MAO yöntemiyle B-TiO<sub>2</sub> film oluşturulan Ti disk yüzeyindeki osteoblastik aktivitenin, işlenmemiş ve asit dağlama yöntemi uygulanmış diskler ile karşılaştırılmıştır.

## **2.7. Hücre Kültürü**

Hücre kültürleri üç ana başlık altında toplanabilir:

### **1. Organ kültürleri**

Organların belli sürelerde vücut dışında canlı kalmalarının sağlanmasıdır.

### **2. Doku eksplant kültürleri**

Doku parçacıklarının canlılıklarının in vitro koşullarda devamının sağlanmasıdır.

### **3. Hücre kültürleri**

Hücre kültürü, spontan migrasyon, mekanik veya enzimatik parçalanma ile dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir (84).

#### **2.7.1. Hücre kültürlerinin avantajları**

- Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal koşullar daha iyi kontrol edilebilir. Sıcaklık, pH, ozmotik basınç, O<sub>2</sub>, ve CO<sub>2</sub> kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültürlerinde daha kolay sağlanırken bu koşulların in vitro olarak sağlanması daha zordur.
- Hücre kültürlerinde homojenite sağlanabilmektedir.
- Hücre kültürleri ekonomiktir (85)

### 2.7.2. Hücre kültürlerinin dezavantajları

- In vitro çalışmalarda sterilite, kültürlerinin hazırlanması ve mikroskopik inceleme uzmanlığı gerektirir.
- Primer kültür ile başladığında birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşır ve mutlaka bir miktar ölüm gerçekleşir.
- Bazı durumlarda kullanılan ekipmanların son derece pahalı olması, hücre kültürlerinin ekonomik olmamasına yol açabilir (86).

### 2.8. Hücre canlılık oranı ve hücre sayısını değerlendirme testleri

Hücre canlılık testleri kültürlerde toksik etki sonucu canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Canlılık testleri, bütünlüğü bozulmuş hücre membranlarında membran içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyalar ile yapılabilir. Membran bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerin membran içerisine alınan florasan ya da nötral kırmızı boyaları kullanılması ile yapılır (87, 88).

Nötral kırmızı canlı hücre içerisinde birikebilen vital bir boyadır. Bu sayede yaşayan hücreler tespit edilebilmektedir. Boyama işleminden sonra hücre süspansiyonu hemositometre adı verilen cam üzerine yerleştirilir. Optik mikroskop altında hemositometredeki canlı hücrelerin oranı tespit edilir (89).

Tripan mavisi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde biriken, non-vital bir boyadır. Hemositometre yardımıyla hücre oranı tespit edilir (Powers). Vital ve non-vital boyaların kullanıldığı test yöntemlerinde mikro-plaka okuyucuları kullanılarak spektrofotometrik olarak sitotoksik etkiler değerlendirilir (90).

Floresan metodunda ise; diasetil floresan canlı hücre içerisine girebilen bir boyadır. Propidium iodide boyası da diasetil florasan gibi membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine girerek DNA ve RNA'yı da etkiler. Florasan boyalar ile boyanmış hücreler ışık kaynağı ve filtrelelere sahip floresan mikroskobu ile değerlendirilirler. Bu değerlendirmede florasan boya ile görüntü veren hücreler ölmüş hücre anlamına gelmektedir (91).

### **2.8.1. Hücre Canlılık Değerlendirme Testleri**

Kısa dönem testleri hızlı ve kolay uygulanabilir olmasına rağmen sadece değerlendirme esnasındaki ölü hücreleri göstermektedir. Bununla birlikte toksik etkilere maruz kalan hücrelerde etkiler birkaç saat, gün veya daha geç görülmektedir. Bu nedenle canlılık oranının belirlenmesinde, kısa dönemde ortaya çıkan toksisite reaksiyonlarda geri dönüşüm olabildiğinden uzun dönem testleri kullanılmaktadır (Fresney 2005).

Hücre yaşamı seyreltilmiş tek tip hücre süspansiyonundan hücrelerin ayrı ayrı koloni oluşturabilme kabiliyeti olarak tanımlanır. Düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma düzeyi (plating efficiency) hücre yaşamının belirlenmesinde kullanılan yöntemdir (Freshney 2015, 94).

### **2.8.2. Proliferasyon Değerlendirme Testleri**

Hücre aktivite testleri bazı maddelerin turnover hızları üzerine dayalıdır. Bu sayede, bir enzimin veya bir grup enzimin yada diğer maddelerin aktiviteleri ölçülmektedir. MTT testi hücrelerin proliferasyonunun, canlılığının ve sitotoksisitesinin ölçümünde kullanılan kantitatif ve kolorimetrik bir testtir. Sarı tetrazolium tuzunun, ayrılarak suda çözünmeyen koyu mavi formazan kristalleri oluşturmaya dayanmaktadır. Bu ayrılma, sadece yaşayan hücrelerin süksinat dehidrogenaz adlı mitokondri enzimlerinde yer almaktadır. Suda çözünmeyen formazan kristalleri, izopropil alkol veya başka bir organik çözücü ile çözülebilir hale gelmektedir. Çözünen materyalin optik yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek koyu mavi renge dönüşen boyanın emilimi, konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak elde edilmektedir ki bu da kültürdeki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğrudan ilişkilidir (95). Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (96, 97).

## 2.9. Osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon nedir?

Osseoindüksiyon, osseogenezisin başlamasına yol açan aşamadır. Bu aşamada olgunlaşmamış hücreler uyarılarak preosteoblast hücrelere dönüşmesi sağlanır. Kemikte gelişen hasar sonrası kemik iyileşmesi büyük oranda bu aşamaya bağlıdır (98).

Kemik ve komşu dokular; osteoblast, osteoklast ve osteosit gibi farklılaşmış kemik hücrelerinin yanı sıra çok sayıda farklılaşmamış hücre de içermektedir. Bu farklılaşmamış hücreler, kemik iyileşmesi ve osteointegrasyon için oldukça önemlidir çünkü osteoprojenitör hücrelere, zamanla da kemik hücrelerine dönüşebilmektedirler. Doğru stimulus ile farklılaşmamış mezenkim hücreleri, kemik oluşumunu başlatan preosteoblastlara dönüşebilir (99).

Osteokondüksiyon, genellikle kemik içi implantların yüzeyinde kemik oluşumunu ifade eder. Osteokondüktif yüzey, üzerinde ve tübüllerinin içine doğru kemik büyümesine izin veren yüzey anlamına gelmektedir (100).

İmplant yüzeyinde kemik oluşumu farklılaşan kemik hücrelerinin aktivitesine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu hücreler daha önceden var olan, travma ile aktive olan osteoblastlardan ya da osteoindüksiyon sonucu oluşan primitif mezenkimal hücrelerden köken alabilmektedir. Dolayısıyla osteokondüksiyon, bir önceki aşama olan osteoindüksiyon ile direkt olarak ilişkilidir. Kemik oluşunda çeşitli kemik büyüme faktörleri (BGF) önemli rol oynamaktadır. Bu BGF'lerden hemen hemen hepsi; insulin-like büyüme faktörü (IGF I-II), fibroblast büyüme faktörü (FGF), PDGF ve TGF- $\beta$  içermektedir. Büyüme faktörleri hücre sinyal ajanları olarak görev yapan küçük proteinlerdir (101).

Kemik içi implant vakalarında, kemik tamiri, sadece kemik kondüksiyonuna değil, kullanılan materyalin tipi ve reaksiyonuna da bağlıdır. Çalışmamızda bu durum göz önünde bulundurularak implant yüzeyinde osteokondüktif olabilecek bir yüzey modifikasyonu yapılmıştır.

## 2.10. SEM nedir?

SEM (Scanning Electron Microscope- Taramalı Elektron Mikroskobu), Biyolojik botanik, hücre biyolojisi, tıp (Adli Tıp, anatomi, mikrobiyoloji, biyokimya, fizyoloji, toksikoloji, patoloji), madde bilimleri ve yer yüzü bilimlerinden elde edilen

örnekleri 100.000 kez büyütürken yüzey yapılarını görüntüleyerek yüzeyde meydana gelen farklılıklar değerlendirilir. Üç boyutlu hayali bir görüntü oluşturur. Her geçen gün geliştirilen özellikleri ile SEM, IM'undan 300 defa daha fokus derinliğine ve 20 ile 100.000 arasında net görme oranına sahiptir (102).

### 2.10.1. SEM'in kullanım alanları

**Medikal kullanım:** Sağlıklı, sağlıklı kan ve doku örneklerini veya hastalığa sebep olan etkenleri belirlemede, ilaç verilen hastalarla verilmeyenler arasındaki farkları gözleyerek ilacın hasta üzerindeki etkilerini belirlemede kullanılabilir.

**Adli Tıp:** Metal parçaları, boya ve mürekkep gibi maddeleri karşılaştırmada ya da saç veya iplik gibi maddeleri inceleyerek polis laboratuvarlarında delilleri incelemeye kullanılabilir.

**Metaller:** Soğuk ve sıcak gibi farklı koşullar altında metallerin dayanıklılığını belirlemede, güvenlik nedeniyle güçlü bir metal kullanımı gerektiren uçak, tren, gemi ve otomobil gibi araçların yapımında kullanılan metallerin dayanıklılığını belirlemede kullanılır.

**Bilimsel Araştırmalar:** Biyologlar bitki ve hayvan dokularına bakmak, kimyagerler mikroskopik kristalleri incelemek, metallerin, plastiklerin ve seramiklerin yapısını incelemek gibi bilimsel araştırmalarda SEM'in kullanılabileceği pek çok farklı alan vardır (103, 104, 105).

### 2.10.2. SEM'de Fiksatifler ve Fiksasyon

Fiksasyon SEM için biyolojik örneklerin hazırlanmasındaki ilk basamaktır. Amacı alınan örneği canlı organizmayla karşılaştırıldığında mümkün olduğunca en az farklılık oluşturacak şekilde hazırlamak ve örnekten bloklar oluşturmaktır. Dehidrasyon, gömme ve elektron demetine maruz kalmada bile ultrastrüktürel ilişkilerin korunduğu şekle getirip sabitlemeyi amaçlamaktadır (106, 107).

### 2.10.3. Dehidrasyon

Dehidrasyonun asıl etkisi örneklerden lipitlerin çıkarılmasıdır. Bu oran %95'i bulur. Proteinlerin ise % 4'ü çıkarılır. Bu oranlar fazla olursa dokuların hücre ve hücre içi yapıları büzüşür (108).

Dehidrasyonda kullanılan ajanlar: Aseton, etanol, etilen glikol, polietilen glikol ve propilen oksit'tir.

Bunlar içerisinde en fazla tercih edilen etanol ve aseton'dur.

**Standart Dehidrasyon İşlemi:** Dehidrasyonda kullanılacak çözeltinin miktarı numune hacminin 10 katı olacak şekilde kullanılır. Dehidrasyon oda ısısında yapılmalıdır. Şayet dehidrasyon soğukta başlamışsa ısı oda ısısına yükseltilir (109, 110).

**SEM'de Dehidrasyon çizelgesi:** - % 25'lik, -% 50'lik, -% 75'lik, 2x % 96'lik, 2x-% 100'lük aseton veya etanol içinde 15-20 dk. (111)

### 2.10.4. SEM'de Kurutma

**Hava ile kurutma (Air drying):** Havada kurutulmaya bırakılan canlı örneklerin (yumuşak dokularda) yüzeyinde ıslaklıktan kaynaklanan bir su tabakası mevcuttur. Bu su tabakası ile hava arasında yüksek gerilim kuvvetlerine sahip bir ara yüz oluşur. Havada kurutma nedeni ile su tabakasında buharlaşma yolu ile uzaklaştırılan moleküller su- hava ara yüzündeki yüksek yüzey gerilim kuvvetlerine karşı koyamaz. Bu durum incelenen canlı örneklerin yüzeyindeki hassas yapıların zarar görmesiyle sonuçlanan büzüşmelere neden olur. Bu nedenle havada kurutma sert dokuların kurutulmasında (ör: kemik,diş) tercih edilir (112) .

**Kritik noktada kurutma (Critical point drying):** Dokudaki aseton,etanol veya amil asetat ile sıvı CO<sub>2</sub>'in yer değiştirmesi esasına dayanır. Sıvı CO<sub>2</sub> kritik noktada, belirli basınç ve sıcaklıkta gaz haline geçerken örnek deforme olmadan kurumuş olur (113).

#### **Kritik Noktada Kurutma Basamakları**

Örnekler saf aseton içeren bir havuzun içerisine bir sepet yardımıyla yerleştirilerek cihazın vanaları kapatılır ve içerisine sıvı CO<sub>2</sub>'in dolması sağlanır.10 dk.sonra hava vanası açılır. Tekrar sıvı CO<sub>2</sub> almaya başlanır (bu işlem 3 defa tekrarlanır). 3-10 dk.

sonunda sıcak su vanası açılır. Sıcaklık 35 0C olduğunda su vanası kapatılarak, tüm vanalar açılır ve basınç düşürülerek örnek alınır (114).

#### **2.10.5. SEM’de Örneklerin Kaplanması**

Yüzeyin görüntülenmesi için elektronları yansıtacak bir madde ile kaplanması gereklidir. Bu madde gold paladium’dur. Kaplamanın kalınlığı örneğe göre ayarlanır ki genellikle 100 Angström’dur. Kaplamada kullanılan materyalin yüzeyinde küme şeklinde toplanmamasına dikkat edilmelidir (115, 116).

##### **2.10.5.1. Altın Kaplama Basamakları**

Örnekler metal üzerine iki taraflı yapışkan bant ile yapıştırılır. Gerekirse örnek çevresine gümüş boyası sürülerek kaplama cihazına yerleştirilir. Yüzeyin parlamasını önlemek için argon gazıyla havanın yer değiştirmesi sağlanır. Plazma fazına geçen gold paladium sayesinde kaplama gerçekleşir. Kaplanan örnekler desikatörde saklanmalıdır (117).

#### **2.11. Gama ışınları ile sterilizasyon**

Gama ışınları tıpkı radyo, tv dalgaları, mikrodalga, görünür ışık veya x-ışınları gibi elektromagnetik enerjidir.

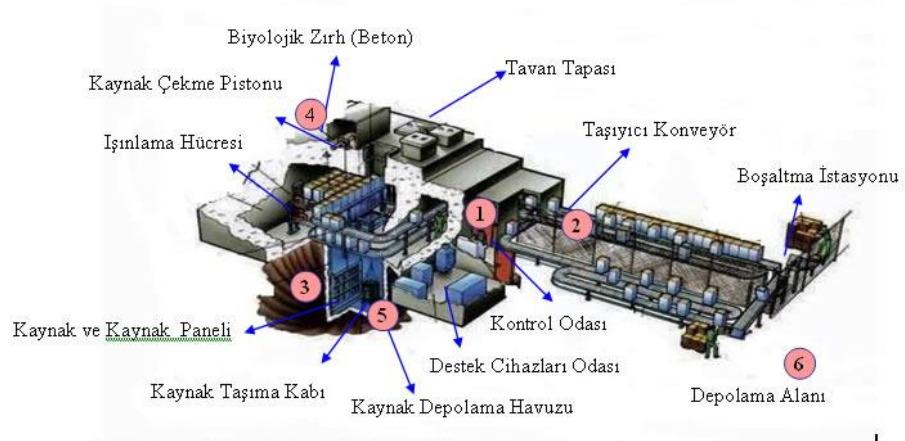
Gama ışınlarının özellikleri;

- İyonlaştırıcı ışın türü olması; madde içerisinden geçerken atom veya moleküllerden elektron kopararak elektrik yüklü parçacıklar yani iyonlar meydana getirmesi
- Diğer ışın türlerine göre daha enerjik olduğundan madde içerisindeki penetrasyonunun yüksek olması
- Elektromanyetik spektrumun en kısa dalga boyu ve en yüksek enerji seviyesinde bulunması
- Gama ışınlarının, kütesiz, yüksüz olup ışık hızıyla yayılabilir olmasıdır.

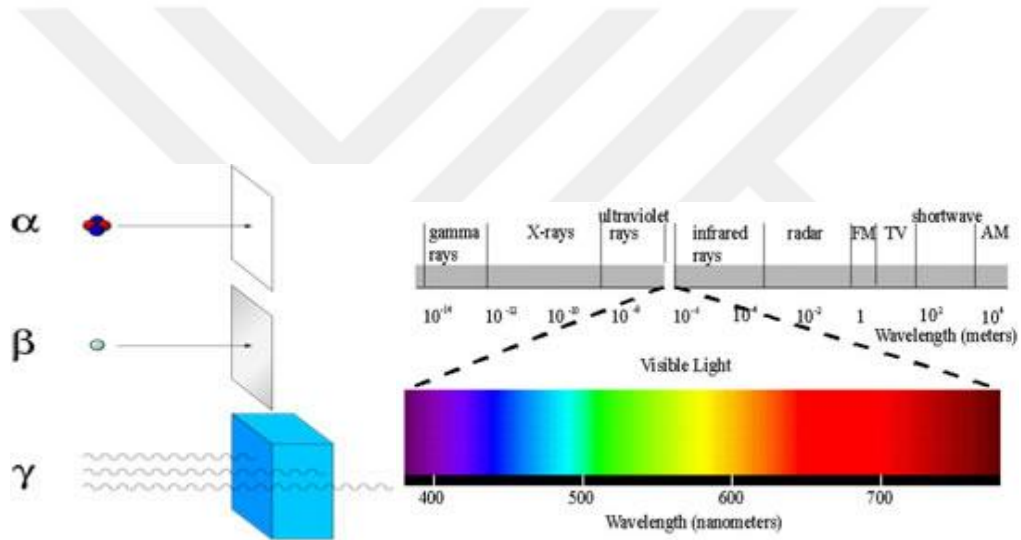
Gama ışınlamadan medikal alanlarda yaygın olarak yararlanılmaktadır. Örneğin; gama yöntemiyle sterilizasyon, güvenilir, kullanışlı ve giderek yaygınlaşan alternatif sterilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu amaç için, Co-60 kaynağından yayınlanan gama ışınlarından faydalanılır. Gama ışınları iyonlayıcı ışın türündedir. İyonlayıcı ışınlar madde ile etkileşim yaptığında atomlardan elektron koparabilirler. Bu işleme iyonizasyon denilmektedir. Serbest elektronlar kimyasal reaksiyonlara katılabilir veya canlı organizmalardan DNA moleküllerini koparabilirler. Bu işlem bakteri, parazit, küf, maya, mantar gibi organizmaları ışınlama ile öldürmenin temelini oluşturmaktadır.

Ek olarak gama ışınları, genellikle biyomateryallerin ve medikal aletlerin sterilizasyonunda kullanılmaktadır. Gama ışınları, sahip oldukları iyonize yüksek enerji sayesinde toksik kalıntı bırakmayarak dna hasarı yaratabilmektedir. İyi penetrasyon derinliği sebebiyle kalın paketlenmiş ürünlerin sterilizasyonunda kullanımları çok uygundur (118, 119, 120).

Çalışmamızda tüm örnekler ultrasonik temizleyiciden sonra sterilizasyon paketlerine yerleştirilerek gama ışınları ile 25kGy doz ile 12 saat steril edilmiştir.



Şekil2- 1: Co-60 ışınlama cihazı (Gamma-Pak sterilizasyon San. Ve Tic. A.Ş., Türkiye)



Şekil2- 2: Gama ışınları (Gamma-Pak sterilizasyon San. Ve Tic. A.Ş., Türkiye)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

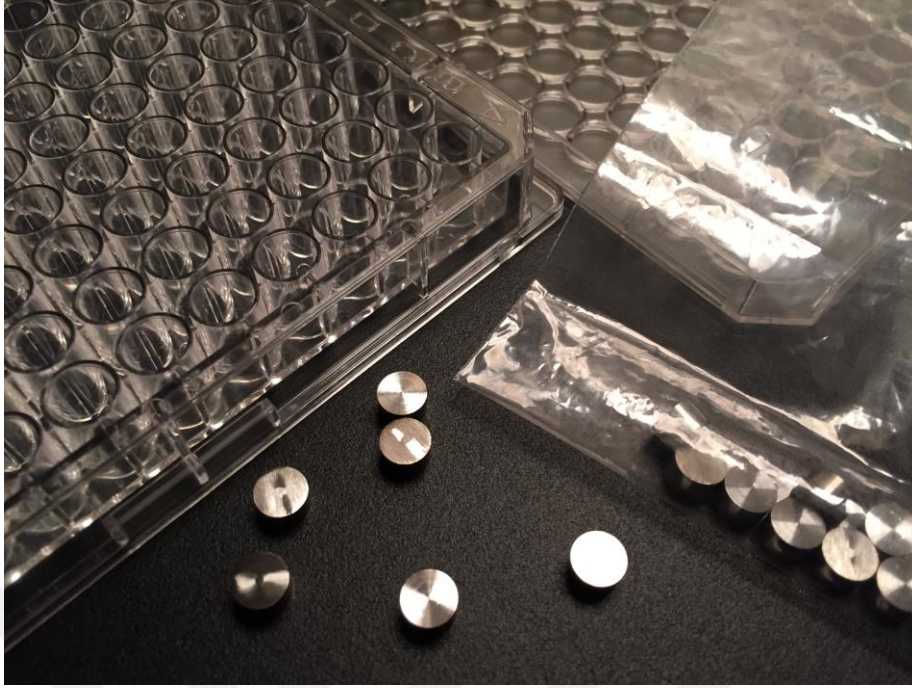
Çalışmamızda, 2 farklı yüzey işlemi uygulanmış (asitle pürüzlendirilmiş, B katkılı) ve işlenmemiş (machined surface) medikal grade 5 titanyum disklerde insan kaynaklı osteoblast öncülü hücre serisinin adezyon kuvveti ve proliferasyonunun in vitro koşullarda karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

#### 3.1. Titanyum disklerin hazırlanması

3.5 mm kalınlıkta ve 6 mm çapında toplam 36 adet titanyum disk elde etmek amacıyla, 5 adet 3.5 metre uzunlukta 6 mm çapındaki medikal grade-5 titanyum çubuk CNC torna cihazında (Hanwha XP16S, South Korea) yağ soğutması altında, 10000 devir/dak hızda dilimlenerek hazırlanmıştır (Şekil 3-1, 3-2).



Şekil3- 1: CNC torna cihazı, İstanbul Çekmeköy (Hanwha XP16S, South Korea)



**Şekil3- 2: 6mm çapındaki kuyu içerisine yerleştirilecek olan 6 mm çapındaki Ti diskler**

### **3.2. Titanyum disk yüzeylerinin hazırlanması**

Yüzeylerin üretimi İstanbul Teknik Üniversitesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Fakültesi'nde gerçekleştirilmiştir.

Ti diskler %2'lik Mikro-90 (International Product Corporation, Burlington, NJ) temizleme solüsyonu ile 15 dakika ultrasonik temizleme cihazında bekletilmiştir. Ultrasonik temizleme cihazından çıkartılan Ti diskler distile su ile yıkanmış, 2 atm basınçlı hava ile kurutulmuş ve sterilizasyon paketleriyle tek tek paketlenmiştir. İşlenmemiş yüzeyli 12 adet Ti disk sterilizasyon paketleri içerisinde korunmuştur.

Asitle dağlanmış yüzey oluşturmak için 12 adet Ti disk oda sıcaklığında hidroklorik ve sülfürik asit karışımından oluşan çözeltide (%1 HF + %30 HNO<sub>3</sub>) 60 dakika boyunca dağlanmıştır.

3. gruptaki 12 adet Ti disk etil alkol ile temizlendikten sonra mikro-ark oksidasyonu için anot, katod olarak paslanmaz çelik tabaka, elektrolit içeren cam kap ve güç kaynağından oluşan sistemde elektrolit içerisine yerleştirildi. Toplam hacmi 2,5lt olan elektrolit çözeltisi içerisinde 24 g/L sodyum tetraborat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O), 10 gr/L kalsiyum asetat monohidrat (Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O) ve distile su bulunmaktadır.

Çalışmamızda B-TiO<sub>2</sub> film oluşturmak için elektrolit içerisinde, 0.02 mol/L disodyum tetraborat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O) eklendi. MAO işlemi sırasında 400 V pozitif voltaj, 80 V negatif voltaj, 50 Hz frekans, 10% periyot ile 3 dk boyunca uygulama yapıldı. Banyo sıcaklığının 50 °C'nin altında tutulması için ayrıca soğutucu bir sistem mevcuttur. MAO işlemi sonrası örnekler deionize su ile yıkanıp kurutuldu. MAO yöntemi ile B katkılı diskler elde edilmiş oldu.

Asitle dağlanmış ve B katkılı iki grubun Ti diskleri debris içermemesi için ultrasonik temizleme cihazında 30 dakika 65-70 °C distile su içerisinde bekletilmiş, çıkartıldığı gibi 2 atm basınçlı hava ile kurutulmuş ve sterilizasyon paketlerinde tek tek paketlenmiştir. Ülkemizde birisi Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK) bünyesinde Ankara, diğeri ise Gamma-Pak A.Ş. bünyesinde Tekirdağ'da kurulmuş iki adet ışınlama tesisi bulunmaktadır. Çalışmamızda Gamma-Pak A.Ş. bünyesinde sterilizasyon paketlerine alınmış tüm Ti diskler Farmakopelerce uygun olarak kabul edilen 25 kGy ışınlama dozunda 12 saat süreyle gamma sterilizasyona tabi tutulmuştur.



Şekil3- 3: Mikro Ark oksidasyon Cihazı, İstanbul Teknik Üniversitesi

### 3.3. Deneyisel gruplar

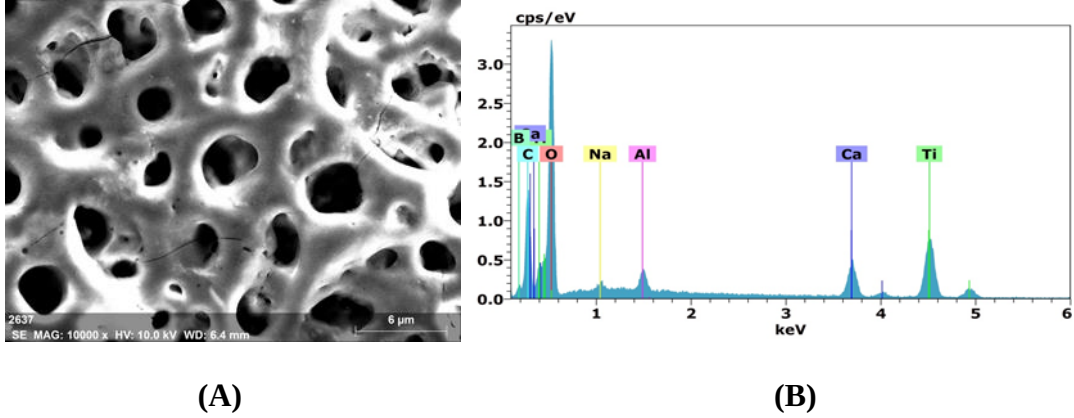
Çalışmamızda titanyum diskler her grupta 12'şer örnek olacak şekilde 3 deney grubu ve 1 kontrol grubuna ayrılmıştır.

1. **grup n= 12:** İşlenmemiş yüzeyli Ti diskler (MS)
2. **grup n= 12:** Asitle pürüzlendirilen Ti diskler (AE)
3. **grup n=12 :** Bor katkılı Ti diskler (B)
4. **grup:** Kontrol grubu Ti disk yerleştirilmedi, hücre ekimi yapıldı

### 3.4. Hücre Ekimi Öncesi Yüzeylerin SEM ile İncelenmesi

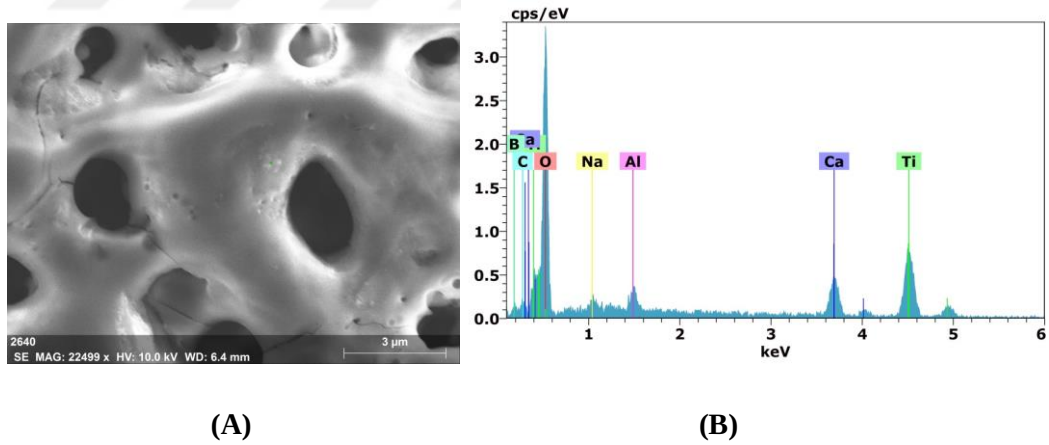
Disk yüzeyleri, Koç Üniversitesi Hücre Yüzey Araştırma Merkezi'nde, taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımıyla görüntülenmiştir. Bu amaçla Saha Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu ZEİSS ULTRA PLUS ve taramalı elektron mikroskobu ZEİSS EVO LS15 ile 10 kV 'da çalıştırılmıştır. Disk yüzeyleri, 2, 3 ve 6 µm kesitlerde farklı büyütme ölçeklerinde görüntülenmiştir (Şekil 3-3, 3-4, 3-5).

Pilot çalışmalarımızda, MAO yönteminde elektrolit kompozisyon ve konsantrasyonu için kullanılan fosfor (P), bor (B) ile birlikte işleme tabi tutulduğunda, periyodik cetvelde birbirine yakın atom ağırlığına sahip oldukları için, titanyum yüzey üzerine afinitesi P'nin B'a göre daha yüksek olduğunu, dolayısıyla titanyum yüzeyde B yerine P tutulumunun görüldüğünü SEM analizinde farkettilik. Bu nedenle MAO yönteminde elektrolit kompozisyon ve konsantrasyonunda Ca kullanılmasını uygun gördük. Kemik biyokimyasında da mevcut olan Ca'un MAO yöntemiyle elde edilecek B katkılı yüzey üzerinde de görülebilecek olması materyalin biyouyumluluğunu olumlu yönde etkileyebileceğini düşündük.



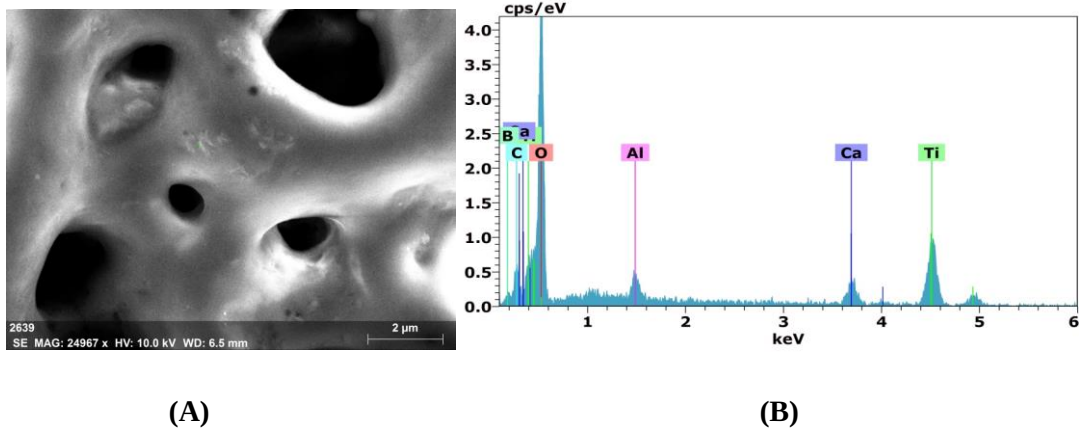
Şekil3- 4: 6 µm kesit 10000 K büyütmede B katkılı disk yüzeyi

(A) 6 µm kesit 10000 K büyütmede B katkılı disk yüzeyinde 1 µm'den 4 µm'ye kadar farklılık gösteren porlar, yüzeyin süngerimsi yapısı ile derinliklere doğru trabeküler topografisi materyalin yüzey alanındaki artışı izlenebilmektedir. (B) Yüzey analizinde B'un 0.2 keV'da 2.0 cps/eV değeri, Ca'un 3.65 keV'da 1.7 cps/eV değeri, Ti'un 4.45 keV'da 1.7 cps/eV ve O'in 0.5 keV'da 3.4 cps/eV değeri izlenebilmektedir. Yüzeyde B %8.62, Ca %14.06, O %49.33, Ti %25.13, Al %0.80, Na %1.55 oranında bulunmuştur.



Şekil3- 5: 3 µm kesit 22499 K büyütmede B katkılı disk yüzeyi ve içerik grafiği

(A) 3 µm kesit 22499 K büyütmede B katkılı disk yüzeyinde 1 µm'den 3 µm'ye kadar farklılık gösteren porlar, yüzeyin süngerimsi yapısı ile derinliklere doğru trabeküler topografisi materyalin yüzey alanındaki artışı izlenebilmektedir. (B) Yüzey analizinde B'un 0.2 keV'da 2.0 cps/eV değeri, Ca'un 3.65 keV'da 1.7 cps/eV değeri, Ti'un 4.45 keV'da 1.7 cps/eV ve O'in 0.5 keV'da 3.4 cps/eV değeri izlenebilmektedir. Yüzeyde B %6.75, Ca %6.66, O %50.31, Ti %30.85, Al %1.52, Na %0.27 oranında bulunmuştur.



**Şekil3- 6: 2 µm kesit 24967 K büyütmede B katkılı disk yüzeyi**

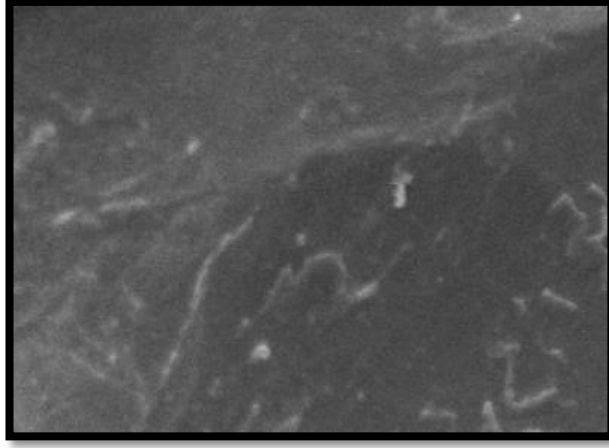
(A) 2 µm kesit 24967K büyütmede B katkılı disk yüzeyinde 1 µm'den 4 µm'ye kadar farklılık gösteren porlar, yüzeyin süngerimsi yapısı ile derinliklere doğru trabeküler topografisi materyalin yüzey alanındaki artışı izlenebilmektedir. (B) Yüzey analizinde B'un 0.2 keV'da 2.4 cps/eV değeri, Ca'un 3.65 keV'da 2.1 cps/eV değeri, Ti'un 4.45 keV'da 2.1 cps/eV ve O'in 0.5 keV'da 4.2 cps/eV değeri izlenebilmektedir. Yüzeyde B %6.52, Ca %9.33, O %48.06, Ti %33.84, Al %1.09, Na %0.49 oranında bulunmuştur.

### 3.5. Hücre Ekimi Sonrası Yüzeylerin SEM ile İncelenmesi

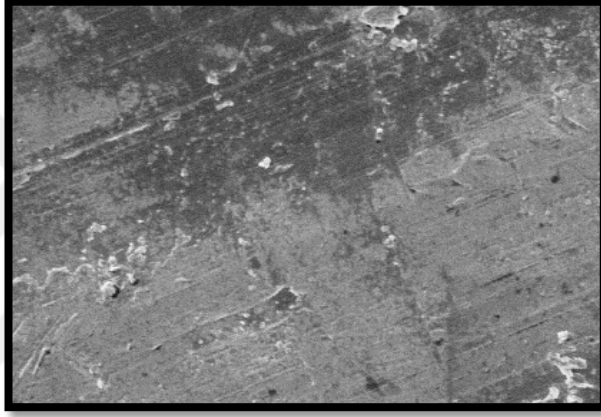
Disk yüzeyleri, Koç Üniversitesi Hücre Yüzey Araştırma Merkezi'nde (KUYTAM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımıyla görüntülenmiştir. Disklerin steril ortamda, fiksasyon solüsyonundan arındırılması için alkolle basınçsız yıkanması, stabil kurutulması ve altın püskürtülerek kaplanmasıyla SEM cihazına alınmasına hazırlık evresi yapılmıştır. Bu amaçla Saha Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu ZEİSS ULTRA PLUS ve taramalı elektron mikroskobu ZEİSS EVO LS15 ile 10 kV 'da çalıştırılmıştır (Şekil 3-6). Disk yüzeyleri, 2, 3 ve 6 µm kesitlerde farklı büyütmelerde görüntülenmiştir (Şekil 3-7).



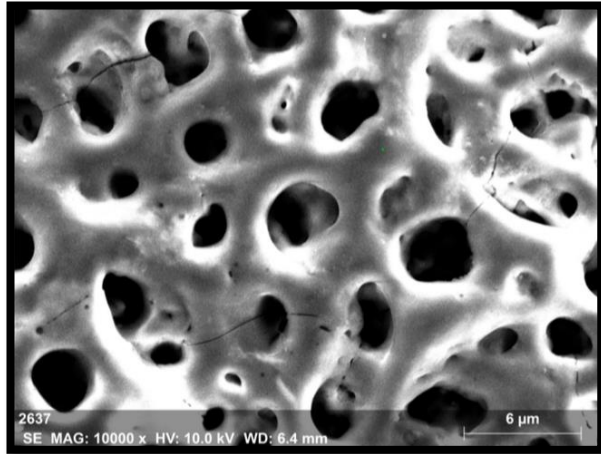
**Şekil3- 7: Saha Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu ZEİSS ULTRA PLUS ve taramalı elektron mikroskobu ZEİSS EVO LS15, İstanbul KUYTAM (121)**



(A)



(B)



(C)

**Şekil3- 8: 10000 K büyütmede SEM yüzey görüntüleri  
(A) AE yüzey, (B) MS yüzey, (C) Bor katkıli yüzey**

10000K büyütmede SEM görüntülerinde; MS yüzeydeki CNC torna cihazından çıkan titanyum örneklerin yüzeyindeki paralel çizgiler izlenmekte(B), AE yüzeyin homojen görüntüsü bu çizgilerin kaybolduğunu ve yüzeyin asitle dağıldığını göstermektedir(A). Bor katkılı yüzeyde ise 1 $\mu$ m'den 4 $\mu$ m'a kadar trabeküler yapı halinde yüzey kaplaması izlenmektedir (C).



### 3.6. Osteoblast-titanyum yüzey etkileşim çalışmaları

Bütün hücre deneyleri TÜBİTAK Gen mühendisliği ve biyoteknoloji enstitüsünde yapıldı. İnsan kaynaklı SAOS-2 osteoblast hücreleri kullanılmıştır. Titanyum yüzeyler hücre ekimi öncesinde kuyucuklu kültür kaplarına yerleştirildi. 1., 3., 7. ve 14. günlerde yüzeydeki osteoblast hücre sayıları ölçülmüştür (Şekil 3-3).



Şekil3- 9: Kültür kaplarında kuyularına yerleştirilmiş ve hücre ekimi yapılmış Ti yüzeyler

### 3.7. Osteoblast Hücre Kültürü

Çalışmamızda osteoblast hücreleri (Saos-2, ACC 243) kullanılmıştır. Bu kapsamda 1 vial pasaj 10 osteoblast hücresi sıvı azottan alınarak (-196 °C) 37 °C'lik su banyosunda eritilmiştir. Eritilen hücreler içerisinde besiyeri (McCoy + %15 FCS + %1 antibiyotik) bulunan 15 ml'lik tüplere alınmış ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından üst sıvı aspire edilmiş ve altta kalan hücre peleti besiyeri ile sulandırılarak 100 mm çapındaki petri kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin petri yüzeyini kaplamasının (konfluent) ardından hücreler pasajlanmış ve yeniden ekilmiştir. Pasajlama işleminde; konfluent olan petrilere eski besiyeri aspire edilmiş ve DPBS ile yıkanmıştır. DPSN'in aspire edilmesinden sonra %0.25 Trypsin-EDTA konulmuş ve 2-3

dk 37°C % CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletilmiştir. Sürenin sonunda hücrelerin petri yüzeyinden kalkma durumları mikroskop ile kontrol edilmiş ve tripsinin iki katı kadar besiyeri uygulanmıştır. Hücreler pipetlenerek homojen hale getirilmiş ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından hücre peleti sulandırılarak ekim gerçekleştirilmiştir.

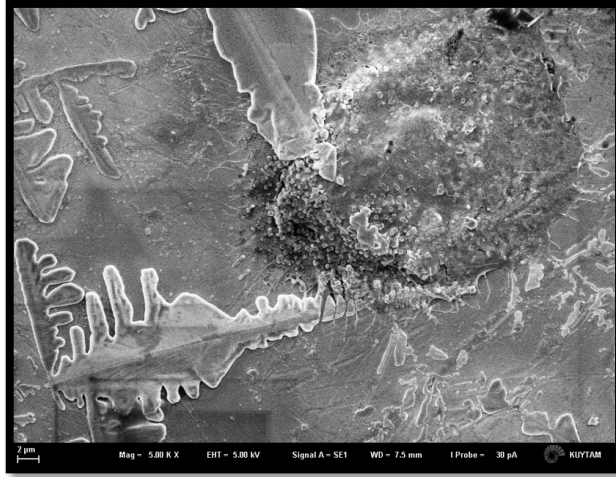
Deney gruplarını hazırlamak için; yukarıda açıklanan protokol ile hücreler pasajlanmıştır. Santrifüj sonrasında hücre peleti 1ml besiyeri ile sulandırılmış ve hücre sayımları %4'lük Tripan blue boyası ile gerçekleştirilmiştir. Sayılan hücreler diskler üzerine direkt olarak ekilmiştir. Osteokondüktivite testi için 500 hücre/disk olacak şekilde 1, 3, 7 ve 14 günlük gruplar oluşturulmuştur.

### **3.8. Osteokondüktivite testi**

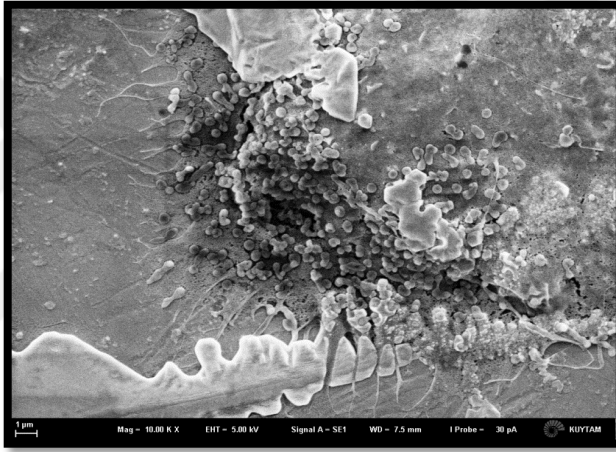
Diskler üzerine hücrelerin ekimlerini takiben 1, 3, 7 ve 14 gün boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonlar sonucunda eski besiyeri aspire edilmiş ve besiyeri içerisinde hazırlanan % 10 (V/V) WST-1 ajanı kuyulara eklenmiş ve 2-3 saat sonra canlılık testi için mikropate okuyucuda 450 Nm'de ve 630 Nm referans dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

### **3.9. SEM örneklerinin hazırlanması**

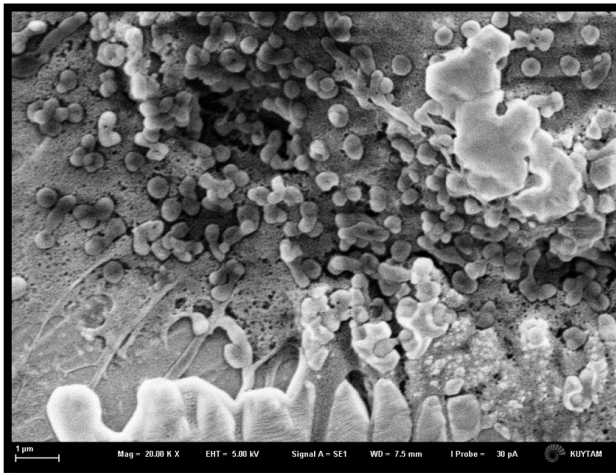
Örnekler üzerine hücre ekimleri yapıldıktan 1, 3, 7 ve 14 gün sonra hücreler fikse edilmiştir. Fiksasyon için; besiyerinin uzaklaştırılmasını takiben PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkamayı takiben PBS içerisinde hazırlanmış olan %2.5 Gluteraldehit solusyonu ile hücreler +4°C 1 saat boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında hücreler, PBS ile yıkanmış ve yine PBS içerisinde incelenmek üzere KUYTAM SEM laboratuvarına götürülmüştür. TUBİTAK laboratuvarınca verilen randevu süresi tez çalışma süremizi aştığı için SEM görüntülerinin elde edilmesinde KUYTAM tercih edilmiştir. TUBİTAK'ta fiksasyon yapıldığı gün KUYTAM'da analizlere başlanmıştır. AE, MS ve Bor örneklerinin farklı büyütme ölçeklerinde ve günlerde yüzey görüntüleri alınmıştır (Şekil 3-9, 3-10, 3-11, 3-12, 3-13, 3-14, 3-15, 3-16, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20).



(A)



(B)



(C)

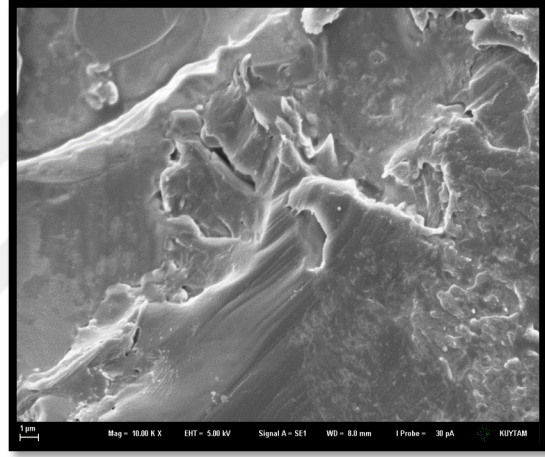
**Şekil3- 10: MS grubu 1. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 5.000 K büyütme, (B) 10.000 K büyütme, (C) 20.000 K büyütme**

MS grubu 1.gün SEM görüntülerinde fiksasyonun irrigasyonundan sonra oluşan tuz kristalleri ve ekilmiş osteoblast hücreleri izlenmektedir (A). Osteoblast hücrelerinin üst üste kümелendiđi izlenmektedir (B). Kümelenmiş osteoblast hücrelerinin Ti yüzey üzerindeki temasta olduğu bölgelerde hücrelerin adezyon (osteoentegrasyon) gösterdiği ve yüzeye yayılımı izlenmektedir (C).

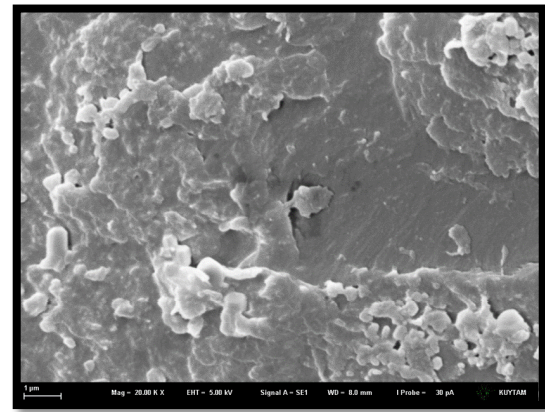




(A)



(B)

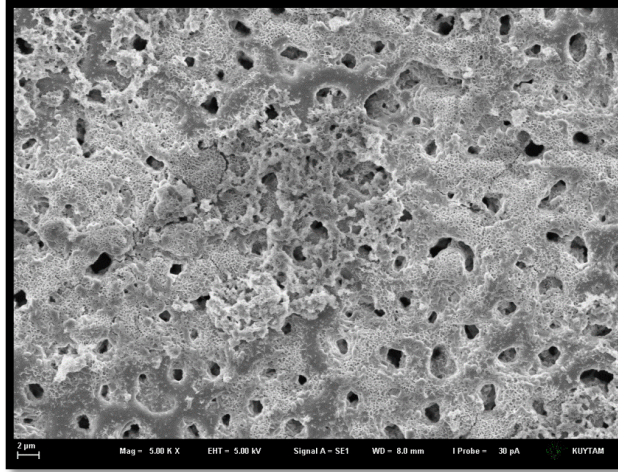


(C)

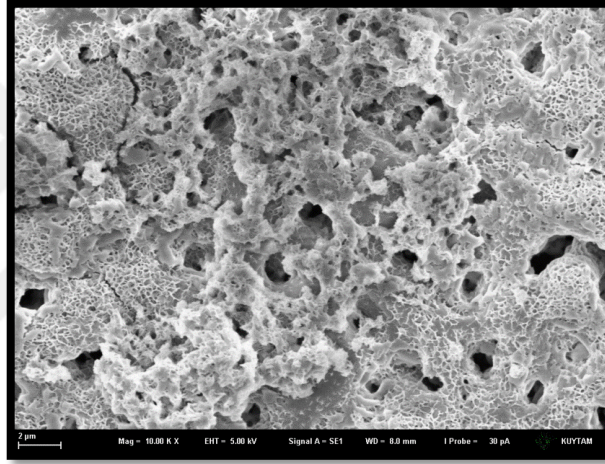
**Şekil3- 11: AE grubu 1. Gün Hücre SEM görüntüleri**  
**(A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme**

AE grubu 1. gün SEM görüntülerinde fiksasyon sonrasındaki irrigasyona bağılı oluşmuş tuz kristalleri izlenmektedir (A). 10.000K büyütmede osteoblast hücreleri MS yüzeyde elde edilen paralel çizgileri takiben yüzeyde homojen yayılım göstermiştir (B). 20.000K büyütmede osteoblast hücrelerinin yüzeye tamamen adapte olduğu izlenmektedir (C).

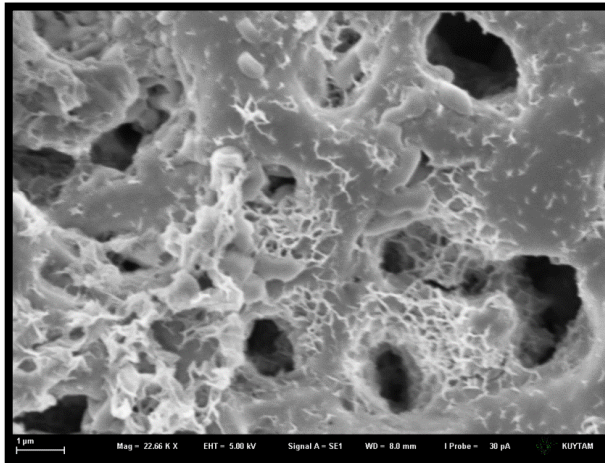




(A)



(B)

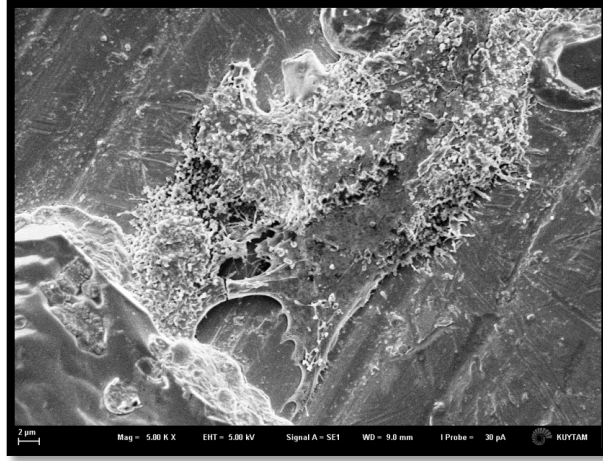


(C)

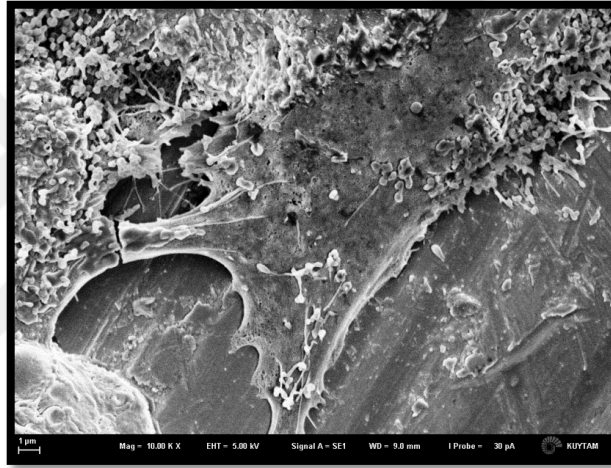
**Şekil3- 12: Bor grubu 1. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme**

Bor grubu 1. gün SEM görüntülerinde osteoblast hücrelerinin ekildiği alanda trabeküler yapı içerisine doğru yayılımı izlenmektedir (A). Osteoblast hücrelerinin trabeküler yapıya yayılıp derinliklerine doğru uzandığı izlenmektedir (B). Osteoblast hücrelerinin trabeküler yüzey üzerinde homojen yayılımı ve yüzeye adaptasyonu izlenmektedir (C).

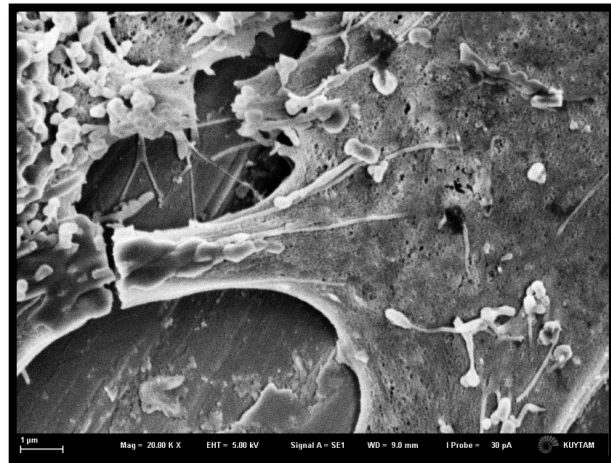




(A)



(B)

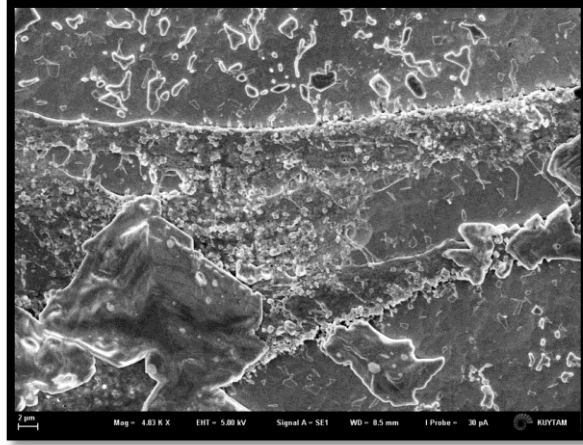


(C)

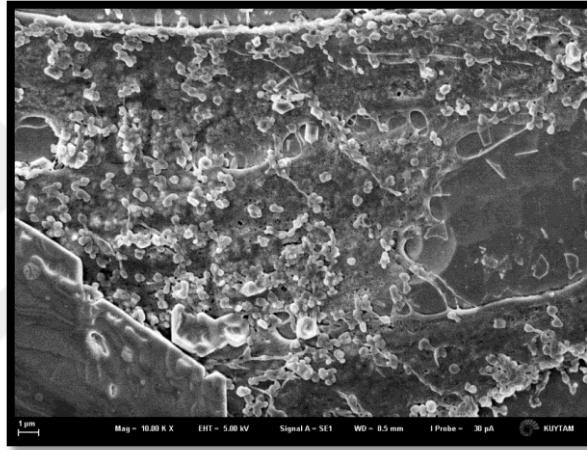
Şekil3- 13: MS grubu 3. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme

MS grubu 3. gün SEM görüntülerinde ekilmiş osteoblast hücrelerinin Ti yüzey üzerindeki paralel çizgiler arasında kolonize olduğu izlenmektedir (A). Osteoblast hücrelerinin Ti yüzey üzerindeki paralel çizgiler arasında oluşturduğu adezyon izlenmektedir (B). Ti yüzey üzerinde osteoblast hücrelerinin oluşturduğu adezyon, fiksasyon sonrasındaki irrigasyon ve örneklerin altın kaplanması sonucunda oluşmuş fraktür izlenmektedir (C).

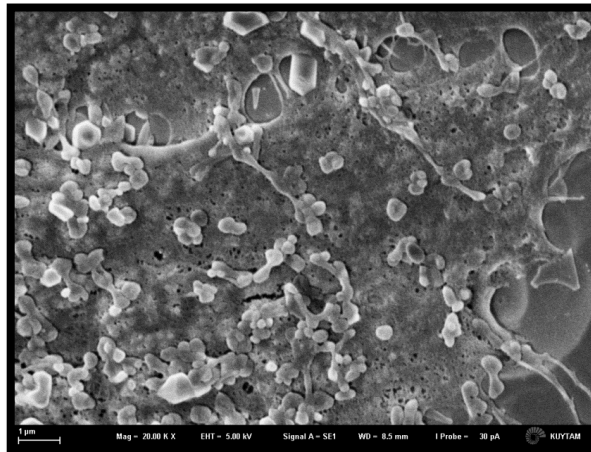




(A)



(B)

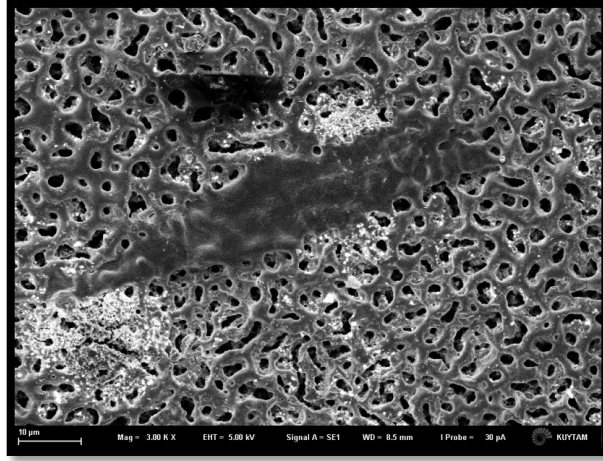


(C)

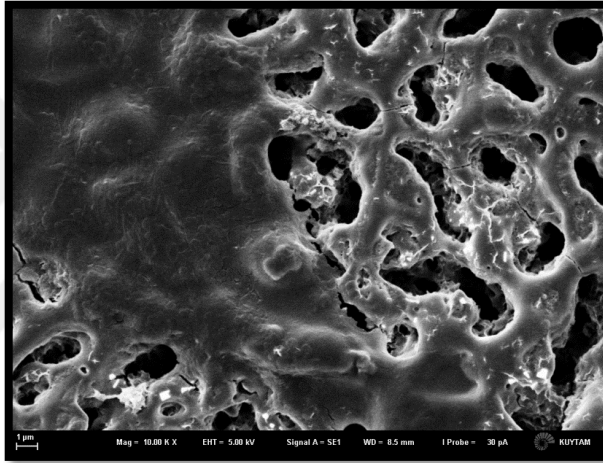
**Şekil3- 14: AE grubu 3. Gün Hücre SEM görüntüleri**  
**(A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme**

AE grubu 3. gün SEM görüntülerinde tuz kristalleri arasında kolonize olmuş osteoblast hücreleri izlenmektedir (A). Osteoblast hücrelerinin Ti yüzeydeki paralel çizgiler üzerindeki homojen yayılımı izlenmektedir (B). Ti yüzeyle temasta olan osteoblast hücrelerinin gösterdiği adezyon ve yüzeydeki homojen yayılımı izlenmektedir (C).

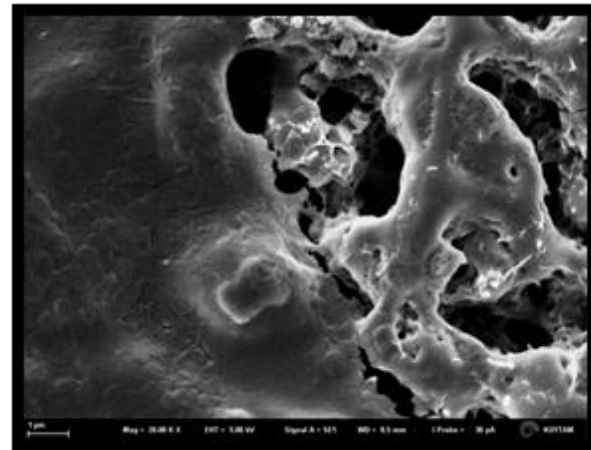




(A)



(B)

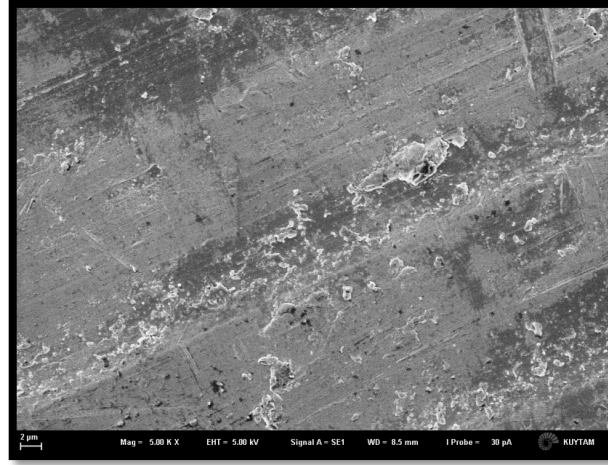


(C)

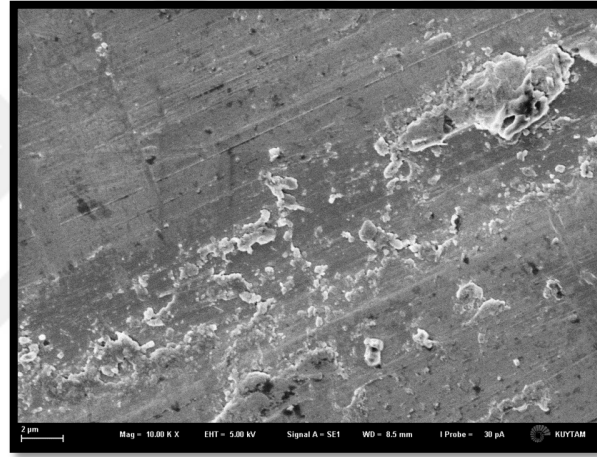
**Şekil3- 15: Bor grubu 3. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme**

Bor grubu 3. gün SEM görüntülerinde lüsent görüntü içerisinde izlenen alanda ekilmiş olan osteoblast hücreleri izlenmektedir (A). Ekilmiş olan osteoblast hücrelerinin B katkılı yüzeyin trabeküler yapısı içerisine doğru yayılımı izlenmektedir (B). Ti yüzeye ekilen tüm osteoblast hücrelerinin Ti yüzeyle temasa geçip yüzeye yayılarak adezyon gösterdiği ve Ti yüzeyi kapladığı izlenmektedir (C).

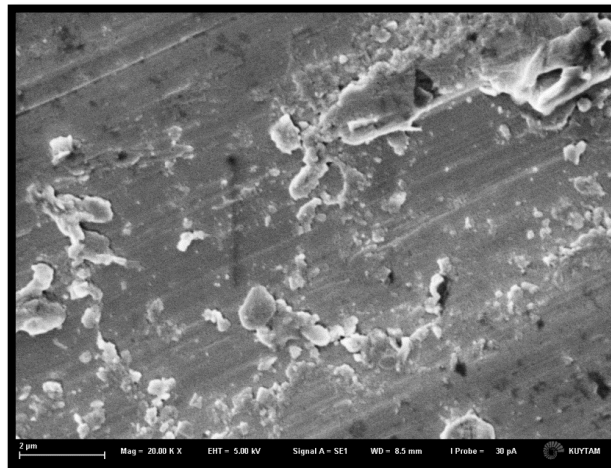




(A)



(B)

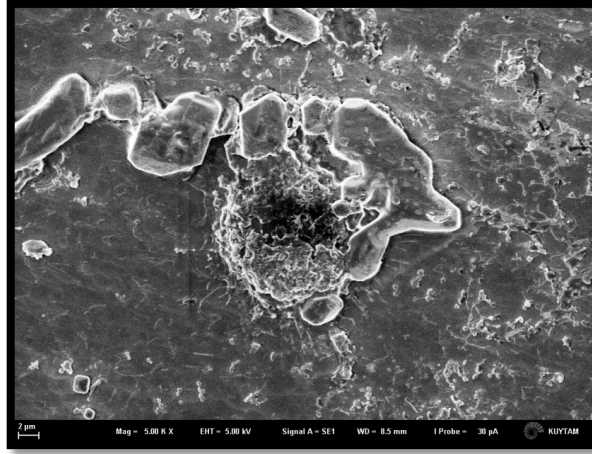


(C)

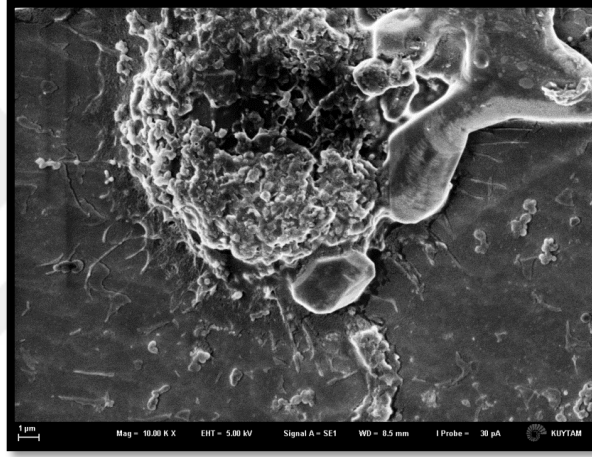
**Şekil3- 16: MS grubu 7. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme**

MS grubu 7. gün SEM görüntülerinde osteoblast hücrelerinin Ti yüzey üzerindeki paralel çizgiler üzerindeki tutulumu ve homojen yayılımı izlenmektedir (A). Ti yüzey üzerinde homojen yayılım gösteren osteoblast hücrelerinin kümülasyonu izlenmektedir (B). Ti yüzeyi tamamen örtecek şekilde yayılmış osteoblast hücreleri ve opak görüntüyle farkedilen osteoblast hücrelerinin tutunacak yüzey bulamadığı izlenmektedir (C).

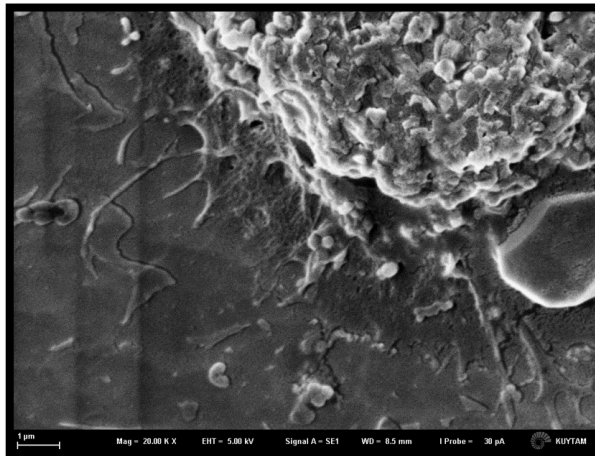




(A)



(B)

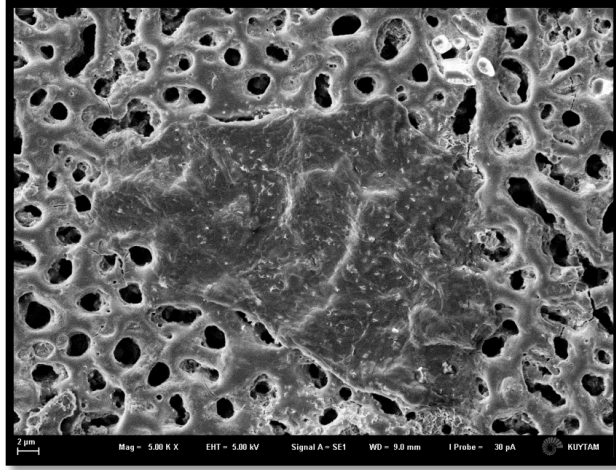


(C)

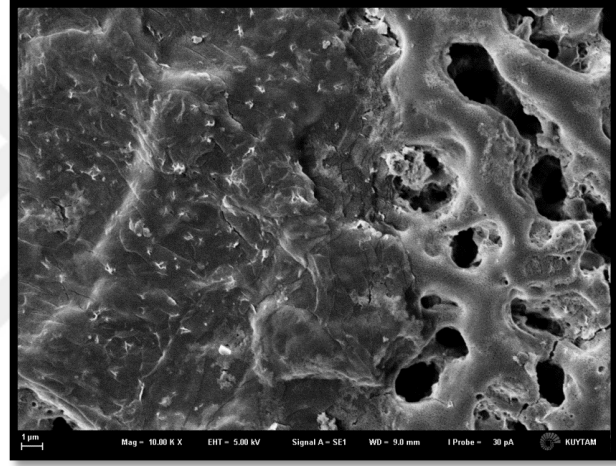
**Şekil3- 17: AE grubu 7. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme**

AE grubu 7. gün SEM görüntülerinde ekilmiş olan osteoblast hücreleri izlenmektedir (A). Ti yüzeye ekilen osteoblast hücrelerinin Ti yüzeyle temasta olmayan alanlarındaki hücre ölümleri izlenmektedir (B). Ti yüzeyle temasta olan osteoblast hücrelerinin adezyonu izlenmektedir (C).

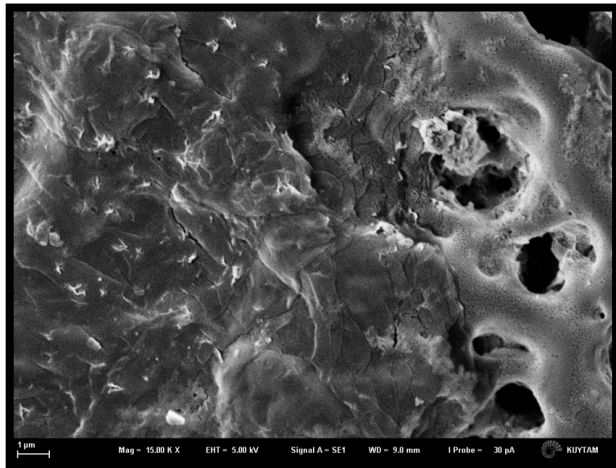




(A)



(B)

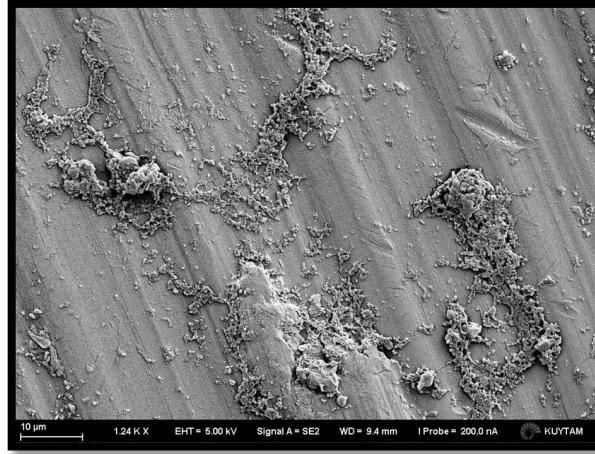


(C)

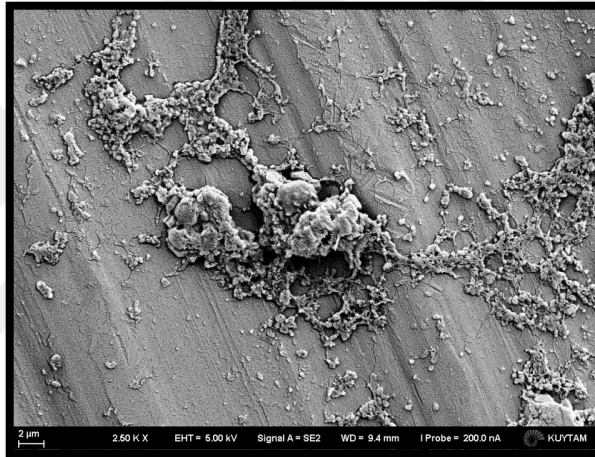
**Şekil3- 18: Bor grubu 7. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 5.000 K, (B) 10.000 K, (C) 20.000 K büyütme**

Bor grubu 7. gün SEM görüntülerinde Ti yüzeyin trabeküler yapısına yayılmış ve adapte olmuş osteoblast hücreleri izlenmektedir (A). Ti yüzeye tamamen yayılmış, adezyon göstermiş ve Ti yüzeyde osteokondüktivite göstermiş osteoblast hücreleri izlenmektedir (B). Ti yüzey üzerine homojen olarak yayılmış osteoblast hücreleri ve adezyonu hücre ölümü olmaksızın izlenmektedir (C).

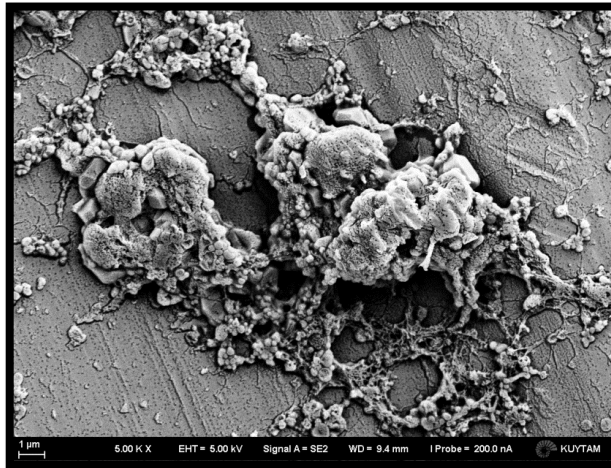




(A)



(B)



(C)

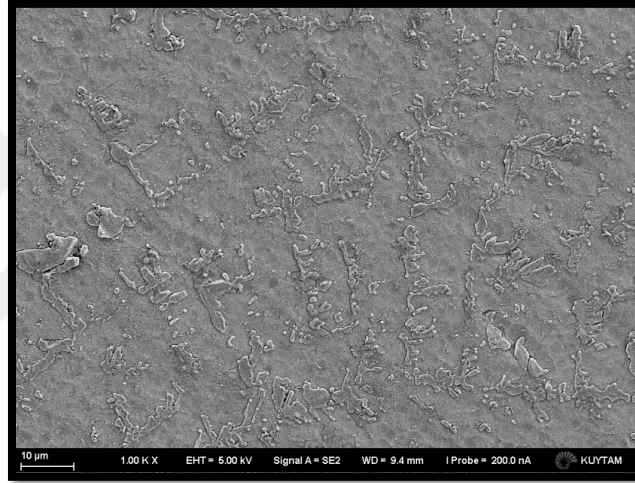
**Şekil3- 19: MS grubu 14. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 1.240 K, (B) 2.500 K, (C) 5.000 K büyütme**

MS grubu 14. gün SEM görüntülerinde Ti yüzey üzerindeki paralel çizgilerin takip edildiği ve osteoblast hücrelerinin Ti yüzey üzerindeki kümülasyonu izlenmektedir (A). Ti yüzey üzerinde osteoblast hücrelerinin adezyon ve osteokondüktivite kaybı izlenmektedir (B). Ti yüzey üzerindeki osteoblast hücrelerinin adezyonda artış göstermediği, Ti yüzeye yayılmadığı ve nekroz olduğu izlenmektedir (C).

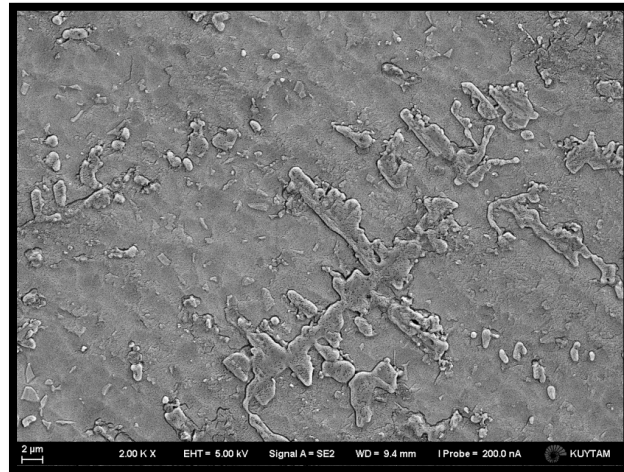




(A)



(B)

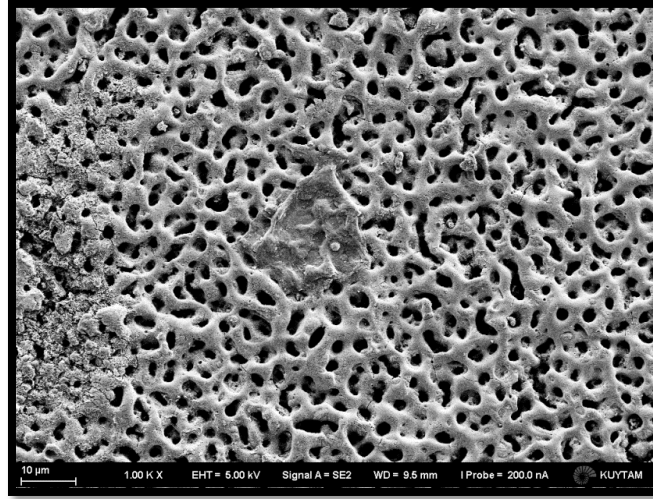


(C)

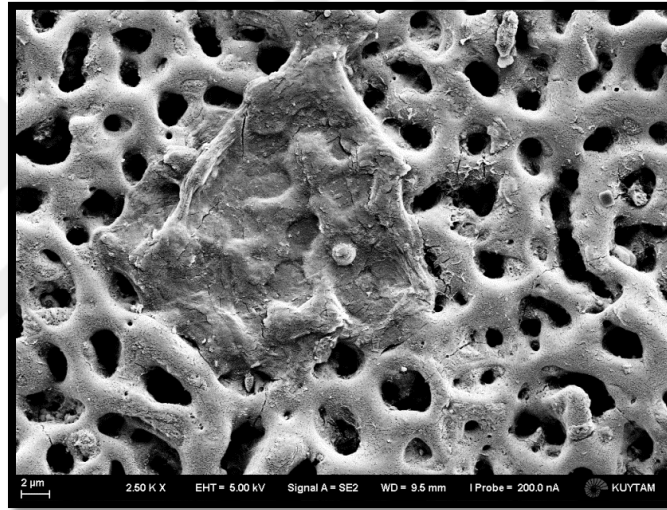
**Şekil3- 20: AE grubu 14. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 1.240 K, (B) 2.500 K, (C) 5.000 K büyütme**

AE grubu 14. gün SEM görüntülerinde Ti yüzeyi tamamen kaplamış osteoblast hücreleri izlenmektedir (A). Ti yüzey üzerinde osteoblast hücrelerinin adezyonu izlenmemektedir (B). Fiksasyon sonrasındaki irrigasyona bağlı tuz kristalleri ve nekroz olan osteoblast hücreleri izlenmektedir (C).

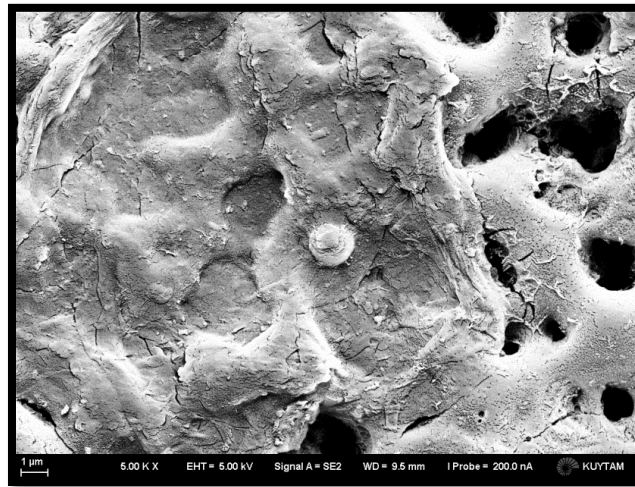




(A)



(B)



(C)

**Şekil3- 21: Bor grubu 14. Gün Hücre SEM görüntüleri  
(A) 1.240 K, (B) 2.500 K, (C) 5.000 K büyütme**

Bor grubu 14. gün SEM görüntülerinde Ti yüzey üzerine ekilen osteoblast hücre alanı izlenmektedir (A). Ti yüzeyin trabeküler yapısı içerisine doğru adezyon göstermiş ve Ti yüzeye adapte olmuş osteoblast hücre yapısı izlenmektedir (B). Ti yüzey üzerinde adezyon gösteren osteoblast hücrelerinin dışında tek osteoblast hücresinde görülen nekroz izlenmektedir (C).



## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksisite Testi Bulguları

Pilot çalışmalarımızda Ti yüzeylerinde B-TiO<sub>2</sub> film oluşturulmasının ardından B'un osteoblastlar üzerine sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla, yaptığımız uygulamayı sitotoksisite testi ile anlamlandırdık.

Değerlendirme kriterlerine göre L929 hücre kültürü 24 saat “Bor katkılı titanyum” ekstraktına maruz bırakılarak kontrole göre hücre ölümüne sebep olma potansiyeli incelenmiştir ve biyoyumluluk kapsamında yapılan ISO 10993-5 sitotoksisite testi sonucunda kontrole göre hücre canlılığı %80.19 +/- 13.02 olarak bulunmuştur. “Bor katkılı titanyum” numunenin sitotoksisitesi; Numunelerin absorbans değerleri %100 canlılık için, numunelere paralel olarak inkübe edilen DMEM-F12 ekstraktının absorbans değerleri kullanılarak normalize edilmiştir. Her bir örnek için üç tekrarlı olarak çalışmanın sonucu elde edilmiştir.

“Bor katkılı titanyum” örneği ekstraksiyon metoduyla yapılan canlılık testine göre sitotoksik etki göstermemiştir.

## 4.2. Osteokondüktive Testi Bulguları

### 4.2.1. WST -1 Analizi (500 hücre/ disk)

| grup | 1. gün     | 3.gün  | 7. gün | 14. gün | P value <sup>b</sup> |        |
|------|------------|--------|--------|---------|----------------------|--------|
| MS   | N          | 3      | 3      | 3       | 0.042*               |        |
|      | Mean       | ,2530  | ,3757  | ,3620   |                      | ,2657  |
|      | Std. Sapma | ,01229 | ,02050 | ,03800  |                      | ,01739 |
|      | Median     | ,2580  | ,3870  | ,3720   |                      | ,2720  |
|      | Minimum    | ,24    | ,35    | ,32     |                      | ,25    |
|      | Maksimum   | ,26    | ,39    | ,39     |                      | ,28    |
| AE   | N          | 3      | 3      | 3       | 0.060                |        |
|      | Mean       | ,2667  | ,3977  | ,3690   |                      | ,2850  |
|      | Std. Sapma | ,02013 | ,02570 | ,01587  |                      | ,01249 |
|      | Median     | ,2640  | ,3940  | ,3750   |                      | ,2890  |
|      | Minimum    | ,25    | ,37    | ,35     |                      | ,27    |
|      | Maksimum   | ,29    | ,43    | ,38     |                      | ,30    |
| Bor  | N          | 3      | 3      | 3       | 0.532                |        |
|      | Mean       | ,2883  | ,2870  | ,2987   |                      | ,2950  |
|      | Std. Sapma | ,01973 | ,04279 | ,02444  |                      | ,02022 |
|      | Median     | ,2790  | ,3060  | ,3040   |                      | ,2870  |
|      | Minimum    | ,28    | ,24    | ,27     |                      | ,28    |
|      | Maksimum   | ,31    | ,32    | ,32     |                      | ,32    |
| Knt  | N          | 3      | 3      | 3       | 0.122                |        |
|      | Mean       | ,2767  | ,4853  | ,5757   |                      | ,5037  |
|      | Std. Sapma | ,02316 | ,05811 | ,14698  |                      | ,06734 |
|      | Median     | ,2830  | ,5010  | ,6570   |                      | ,4720  |
|      | Minimum    | ,25    | ,42    | ,41     |                      | ,46    |
|      | Maksimum   | ,30    | ,53    | ,66     |                      | ,58    |

<sup>a</sup> Kruskal-Wallis test sonuçları <sup>b</sup> Friedman test sonuçları \* p<0,05 istatistiksel anlamlılık

Tablo 4- 1: WST analiz 1 (500 hücre/disk) verileri

Gruplar arasında belirli günlerdeki fark Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 4-1). İstatistiksel olarak anlamlı günlerde, farkın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için Mann-Whitney U testi yapılmıştır. P değerleri Bonferroni düzeltmesi yapılarak yorumlanmıştır.

Buna göre;

1. günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

3.Günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu fark sadece bor-knt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıdır  $p=0,016$  ( $p<0,05$ ) (Tablo 4-2).

| Örnek 1- Örnek 2 | Test İst. | Standart Sapma | Std. Test İst. | Sig. | Adj. Sig. |
|------------------|-----------|----------------|----------------|------|-----------|
| Bor – MS         | 3,667     | 3,648          | 1,005          | ,315 | 1,000     |
| Bor – AE         | 5,667     | 3,648          | 1,553          | ,120 | 1,000     |
| Bor – Knt        | -11,500   | 3,648          | -3,152         | ,002 | ,016      |
| MS – AE          | -2,000    | 3,648          | -,548          | ,584 | 1,000     |
| MS – Knt         | -7,833    | 3,648          | -2,147         | ,032 | ,318      |
| AE – Knt         | -5,833    | 3,648          | -1,599         | ,110 | 1,000     |

**Tablo 4- 2: 3. Gün verilerinin incelenmesi**

7. günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu fark sadece bor-knt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıdır  $p=0,016$  ( $p<0,05$ ) (Tablo 4-3).

| Örnek 1- Örnek 2 | Test İst. | Standart Sapma | Std. Test İst. | Sig. | Adj. Sig. |
|------------------|-----------|----------------|----------------|------|-----------|
| Bor – MS         | 4,000     | 3,648          | 1,096          | ,273 | 1,000     |
| Bor – AE         | 4,500     | 3,648          | 1,233          | ,217 | 1,000     |
| Bor – Knt        | -10,500   | 3,648          | -2,878         | ,004 | ,040      |
| MS – AE          | -,500     | 3,648          | -,137          | ,891 | 1,000     |
| MS – Knt         | -6,500    | 3,648          | -1,782         | ,075 | ,748      |
| AE – Knt         | -6,000    | 3,648          | -1,645         | ,100 | 1,000     |

**Tablo 4- 3: 7. Gün verilerinin incelenmesi**

14. günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu fark sadece ms-knt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıdır  $p=0,035$  ( $p<0,05$ ) (Tablo 4-4).

| Örnek 1- Örnek 2 | Test İst. | Standart Sapma | Std. Test İst. | Sig. | Adj. Sig. |
|------------------|-----------|----------------|----------------|------|-----------|
| MS – AE          | -3,000    | 3,651          | -,822          | ,411 | 1,000     |
| MS – Bor         | -4,000    | 3,651          | -1,095         | ,273 | 1,000     |
| MS – Knt         | -10,667   | 3,651          | -2,921         | ,003 | ,035      |
| AE – Bor         | -1,000    | 3,651          | -,274          | ,784 | 1,000     |
| AE – Knt         | -7,667    | 3,651          | -2,100         | ,036 | ,358      |
| Bor – Knt        | 1,667     | 3,651          | -1,826         | ,068 | ,679      |

**Tablo 4- 4: 14. Gün verilerinin incelenmesi**

|          | MS    | AE    | BOR   | KNT   |         | MS    | AE    | BOR   | KNT   |
|----------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|
| 1. gün   | 0,258 | 0,248 | 0,275 | 0,251 | 7. gün  | 0,32  | 0,381 | 0,272 | 0,406 |
|          | 0,239 | 0,288 | 0,279 | 0,296 |         | 0,394 | 0,351 | 0,304 | 0,664 |
|          | 0,262 | 0,264 | 0,311 | 0,283 |         | 0,372 | 0,375 | 0,32  | 0,657 |
| Ortalama | 0,253 | 0,267 | 0,288 | 0,277 |         | 0,362 | 0,369 | 0,299 | 0,576 |
|          | 0,253 | 0,267 | 0,288 | 0,277 |         | 0,362 | 0,369 | 0,299 | 0,576 |
|          | MS    | AE    | BOR   | KNT   |         | MS    | AE    | BOR   | KNT   |
| 3. gün   | 0,352 | 0,374 | 0,238 | 0,421 | 14. gün | 0,272 | 0,289 | 0,287 | 0,458 |
|          | 0,387 | 0,425 | 0,306 | 0,534 |         | 0,246 | 0,271 | 0,28  | 0,472 |
|          | 0,388 | 0,394 | 0,317 | 0,501 |         | 0,279 | 0,295 | 0,318 | 0,581 |
| Ortalama | 0,376 | 0,398 | 0,287 | 0,485 |         | 0,266 | 0,285 | 0,295 | 0,504 |
|          | 0,376 | 0,398 | 0,287 | 0,485 |         | 0,266 | 0,285 | 0,295 | 0,504 |

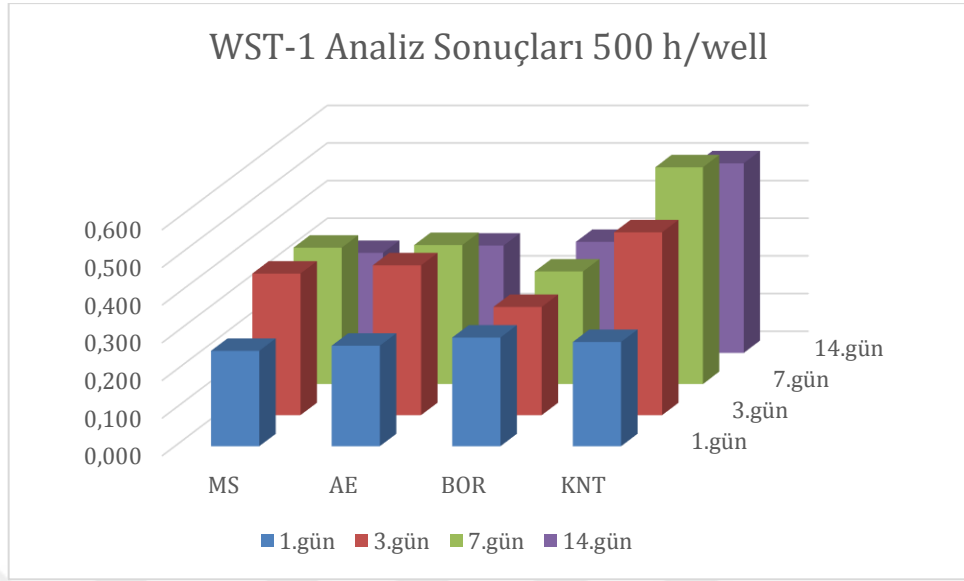
(A)

|     | 1.gün | 3.gün | 7.gün | 14.gün |
|-----|-------|-------|-------|--------|
| MS  | 0,253 | 0,376 | 0,362 | 0,266  |
| AE  | 0,267 | 0,398 | 0,369 | 0,285  |
| BOR | 0,288 | 0,287 | 0,299 | 0,295  |
| KNT | 0,277 | 0,485 | 0,576 | 0,504  |

(B)

**Tablo 4- 5: WST-1 analiz (500 hücre/disk) özetleri (A) ve ortalama tablosu (B)**

Her bir grubun kendi içinde zamana göre karşılaştırılmasında Friedman testi kullanılmıştır. Zaman içindeki değişimi anlamlı bulunan  $P < 0,05$  gruplarda bu farklılığın hangi zamanlarda arasında olduğunu tespit etmek için Wilcoxon testi kullanılmıştır. P değeri Bonferroni düzeltmesi yapılarak yorumlanmıştır. Düzeltme ile yorumlanan p değerleri gruplardaki örnek sayısı yeterli olmadığı için ikili karşılaştırmalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır  $p > 0,05$ . Yani Friedman testi sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunan grup içi değişim, istatistiksel olarak ispatlanamamıştır.



**Tablo 4- 6: WST-1 analiz (500 hücre/disk) grafik sonuçları**

MS, AE ve Kontrol gruplarının değerlerinde 7. güne kadar artış olmasına rağmen 14. günde değerlerde bir miktar düşüş görüldü. B grubunda ise 1. günden 14. güne kadar değerlerde düzenli bir artış tespit edildi. Bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış olsa da B grubundaki değerlerin düzenli artış göstermesi B'un hücreler üzerinde olumlu etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

Analiz sonuçları SEM sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde ise, B katkılı yüzeylerin MS ve AE yüzeylere göre daha yüksek miktarda porozite barındırmasıyla, B katkılı yüzeylere ekilen osteoblast hücrelerinin öncelikle yüzey üzerindeki poröz yapılar içine nüfus ettiğini, yüzeye adapte olan osteoblast hücrelerinin yüzeyde adezyon gösterdiğini ve bu sürecin ardından osteoblast hücrelerinin yüzeyde proliferasyon gösterdiğini düşündürmüştür. Osteoblast hücrelerinin B katkılı yüzeye olan adaptasyon ve adezyon sürecinden dolayı, WST-1 analiz sonuçlarında B grubunun MS ve AE grubuna göre daha az miktarda ancak sürekli proliferasyon göstermiş olabileceği düşünülmüştür.

## 5. TARTIŞMA

Titanyum ve titanyum alaşımları yapısındaki mükemmel biyouyumluluğa ve mekanik özelliklerine bağlı olarak implant materyallerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Titanyum ve titanyum alaşımları hava veya oksijen ile temas ettiğinde ince, doğal bir oksit tabakası oluşturarak kendini korumaktadır. Titanyum ve alaşımlarına korozyon direnci özelliği kazandıran ve yaklaşık 2-5 nm kalınlığında olan bu oksit tabakası kemik dokusu ve dental implant arasında direkt bir bağlantı oluşturacak kadar aktif değildir (122, 123).

Günümüzde implant materyalleri geliştirme çalışmalarının amacı titanyum yüzeylerini geliştirerek; mümkün olan en iyi osteoentegrasyona ve uzun süre sağkalım oranına sahip materyal elde etmeye yöneliktir. Bu amaçla tasarlanan implant yüzeyinin in-vitro çalışmaları, o implantın klinik uygulanabilirliği ve uzun vadede başarısı açısından önem taşımaktadır (124,125).

Genel olarak, dental implantların yüzey morfolojisi makro, mini, mikro ve nano dizayn altında incelenmektedir. Makrodizayn implantın şekli ile ilişkilirken, mini dizayn implantın boyutları yivlerin özellikleri ile ilişkilidir. İmplantın mikrodizaynını ise; yüzey aşındırma ve kumlama prosedürleri vb. işlemler ile ilişkili olarak yüzey pürüzlülüğü belirlemektedir. Mikrodizayn temel olarak hücresel boyutta cevap ile karakterizedir. Son olarak, implantın nanodizaynı ise yüzeyin moleküler bileşimini ifade etmektedir. Topografik, kimyasal ve yüzey enerjisi yönünden iyileştirilmeye çalışılan titanyum yüzeylere kumlama, asit ile aşındırma ve kaplama gibi farklı birçok yöntem uygulanabilmektedir (126, 127, 128).

Titanyum yüzlerin iyileştirilmesi için bor ile modifikasyonun tasarlandığı birçok çalışma mevcuttur. Bhat ve ark.; beta fazındaki titanyum alaşımlarının bor ile modifikasyonunu yaparak süperplastisitelerini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda Boronun geleneksel titanyum alaşımlarına eklenmesi ile pürüzlü mikroyapının stabil hale geldiğini ve deformasyonu engellediği sonucuna varmışlardır (129). Huang ve ark., nın yaptıkları bir çalışmada mikroark oksidasyon yöntemiyle bor kaplı pürüzlü titanyum yüzeyleri oluşturdukları çalışmada bu yüzeylerin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktivitesi karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda bor kaplı

titanyum yüzeylerin çalışmadaki diğer pürüzlü yüzeylerden farklı mekanik ve morfolojik yapıda olmadığını ortaya koymuşlar; fakat yüzeydeki bor infiltrasyonunun yapıya hidrofilik özellik katarak biyoaktiviteyi artırdığını bildirmişlerdir (58).

Mikroporöz titanyum yüzeylerin modifikasyonu ve üretiminde yüzey işleme yöntemlerinden özellikle anodizasyon ile yapılan çalışmaları yapının biyouyumluluğunu artırarak hücrealtı boyutta mimetik bir yüzey elde edilmesine olanak sağlamaktadır (130, 131, 132). B, mükemmel yüzey özelliklerine, mükemmel korozyon direncine, yüksek sertliğe sahip ve aynı zamanda birçok madde ile yüksek bağlanabilirliğe sahip bir materyaldir. Fakat son yıllara kadar materyal biliminde aktif kullanılamamıştır. Bunun sebebi ise termal spreyleme ya da homojen olarak buharlaştırılamamasıdır (133). Yüzeylere kaplanabilmesi ancak birkaç yöntemle uygulanabilmekte ve bu yöntemler hala geliştirilmektedir. Bu yöntemlerden bir tanesi de MAO yöntemidir (134). Bizim çalışmamızda titanyum disklerin bor ile kaplama tasarısı anodizasyon yöntemi esas alınarak, Mikro Ark Oksidasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullandığımız Mikro Ark Oksidasyonu sonucu oluşan yüzeyler SEM analizinde incelenmiş ve bor ile kaplı yüzeylerin mikropürüzlülüğü kanıtlanmıştır. Çalışmamız; yüzey pürüzlülüğü yaratılan yüzeylerin osteoblast hücreleri tarafından daha çok tercih edildiği ve bu hücrelerle daha iyi bağ kuran bir morfoloji olduğu sonucuna ulaşan diğer çalışmaları destekler niteliktedir.

Kalitesi ve karakteri yüzey morfolojisine bağlı olan dental implant biyomateryallerin üzerinde büyüyen osteoblastlar, doku cevabından esas sorumlu hücrelerdir. Dental implantların yüzey çalışmalarında in-vitro olarak sıklıkla osteoblast aktivitesine bakıldığı için tez çalışmamızda elde ettiğimiz mikropürüzlü yüzeylerin osteoblast affinitesi tespit edilmek istenmiştir. Yüzey modifikasyonunu hedefleyen çalışmamızda B'u tercih etmemizin bir diğer nedeni de alaşımlar içine eklenen veya üzerine işlenen B'nin osteoblastların canlılığı üzerinde minimal etkisinin olduğunun gösterilmesidir (135). Bu amaçla çalışmamızın başında bor ile kapladığımız disklerle sitotoksikite testi uygulanmış ve diğer çalışmalara paralel olarak osteoblastlar üzerinde minimal etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Canlı veya ölü hücre sayısının ve hücre çoğalmasının doğru ve hızlı bir şekilde değerlendirilmesi birçok deneysel yaklaşımda önemlidir. Genel olarak hücre canlılığı kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemler ile ölçülmektedir. Kolorimetrik metod, tertazolyum tuzları (MTT, XTT, WST) kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayanır (136, 137). MTT, XTT ve WST-1 testlerine metabolik testler de denilmektedir.

MTT, XTT ve WST-1 testleri kolorimetrik test metodları olup, hücrelerin spesifik boyanmasına dayanmaktadır. Bu testler içinde ilk geliştirilen test olan MTT testinde inceleme sırasında formazan oluşmakta ve bu formazanın dimetil sülfoksit (DMSO) vb. kimyasallar ile çözdürmek gerekmektedir. Çözücü olarak genellikle tercih edilen DMSO'nun hücreler üzerine olan toksik nitelikte olduğundan testin güvenilirliğini azaltmaktadır (138, 139). XXT ve WST testlerinde ise ek bir çözdürme işlemine gerek duyulmadan, deney süresince çeşitli zamanlarda absorbansın kaydedilmesi mümkün olmaktadır. Bu testlerin MTT'ye göre canlılığın değerlendirilmesi verileri daha hassas ve detaylıdır. Ek olarak bu testler hücre sayısı hakkında MTT testine nazaran daha hassas bilgi sunmaktadırlar (140). Çalışmamızda hücre canlılığı değerlendirmesinde ölçüm metodu daha güvenli olduğu için WST-1 testi uygulanmıştır.

Gong ve ark. yaptıkları çalışmada MAO yöntemi ile geliştirdikleri titanyum yüzeylerde osteoblast adezyonunun 4 saat sonra daha fazla olduğunu ve çalışmada osteoblast artışının yaratılan pürüzlülük oranı ile paralellik gösterdiği rapor etmişlerdir (141). Oh ve ark. yaptığı çalışmada MC3T3-E1 osteoblast öncül hücre kültürünü titanyumdioksit nanotüplerine ekerek yaptıkları çalışmalarında pürüzlü yüzey karakterlerinde başlangıç hücre yapışmasından sonraki 48 saat içinde %300 oranında artış gözlemişlerdir (142). Guehennec ve ark. yaptığı bir çalışmada, farklı uygulamalar ile elde ettikleri pürüzlü yüzeylerde, pürüzlülük oranı arttıkça MC3T3 osteoblast öncülü hücrelerin yapışma, yayılma, çoğalma yönünden artışıya sahip olduğunu gözlemlemişlerdir(143). Bu çalışmalara paralel olarak, çalışmamızda ilk gün osteoblast ekiminden birkaç saat sonra yüzeyi pürüzlü olan B ve AE gruplarında diğer gruplara oranla daha yüksek oranda osteoblast artışı görülmüştür.

Tian ve ark.'nın; yayınladıkları bir çalışmada ise yine MAO tekniği kullanarak pürüzlendirilen yüzeylerde, osteoblast hücre ayaklarının gözenek yapılarına doğru nüfuz ederek fiziksel bir kenetlenme yarattığını savunmuşlardır. Pürüzlü yüzey karakterinin, kemik matriksindeki trabeküler yapıya benzediğini vurgulayarak hücre adezyonunu ve osteoblast fonksiyonlarına uyumlu biyolojik olarak benzer bir çevre yarattığını bildirmişlerdir (144). Das ve ark., osteoblast hücre ekimlerini farklı elektrolitlerde anodize edilmiş titanyumlar üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 14 günlük inkübasyon sonrası tüm anodize yüzeylerdeki hücre sayısını ve enzim aktivitelerini kontrol gruplarına göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (145). Bu çalışmalara benzer olarak, çalışmamızda MAO yöntemiyle B katkılı Ti disk yüzeylerinden SEM ile alınan görüntülerde osteoblastların disk yüzeyine fiziksel bir kenetlenmeyle nüfuz ettiği görülmüştür.

Kaczmarek ve ark., B katkılı Ti yüzeyinin biyouyumluluğunu araştırdıkları bir çalışmada yüzeyin; oral implant uygulamalarında osteoentegrasyonu etkileyen hücreler olan insan osteoblast ve gingival fibroblastlar ile ilişkisi, hücrelerin proliferasyon ve canlılığı MTT testi uygulanarak incelenmiştir. Çalışmada B'un iki önemli özelliği belirtilmiştir, ilki osteoentegrasyonda ve ikincisi yara iyileşmesi için önemli olan bağ dokusunun uyarılması. B'un osteogeneze sadece osteoblast mineralizasyonunda değil, aynı zamanda kemik formasyonu, büyüme ve rejenerasyonu için de önemlidir. Ayrıca, insan dişeti fibroblastı ve osteoblastı kullanarak bor ile kaplı titanyum yüzeyleri üzerinde yaptıkları bu in-vitro çalışmada borun mikrokristal titanyum yüzey modifikasyonlarında kullanımının diş hekimliğindeki diğer konvansiyonel materyallerin fizikokimyasal özelliklerinin de değişimini sağlayacağını belirtmişlerdir (146). Çalışmamızda da osteointegrasyonda önemli rol oynayan ve çalışmalarda tercih edilen insan kaynaklı osteoblastların canlılığı ve proliferasyonu MTT testi ile ölçülmüştür. Ayrıca bu hücrelerin B ile ilişkisi incelenmiştir.

Benderdour ve arkadaşlarının Bor'un yara iyileşmesindeki rolünü incelemek için fibroblast kullandıkları çalışmada, B'un fibroblastlar üzerinde toksik etki yapmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca B'un endotelial hücreler gibi diğer hücreleri de kan damarları oluşumu için stimule ettiğini ve B ile tedavinin sonrasında anjiogeneze gözlemlendiğini bildirmişlerdir (147). Gorustovich ve arkadaşlarının ise, B ile modifiye edilmiş bioaktif seramiklerin biyouyumluluklarını inceledikleri çalışmada; borla modifiye edilmiş

partiküllerin fare tibiasındaki kemik iliğinde yeni kemik oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. B'un protein ile ilişkili mineralize dokuda mRNA düzenlemesi ve osteoblastik hücreler üzerinde doza bağlı olarak düzenleyici rol oynadığı göstermişlerdir (10). Bor kullanımının kemik formasyonunu stimüle ettiğine yönelik sonuçlar onun doku mühendisliğinde yüzey kaplama materyali olarak kullanımını arttırmıştır (148).

Gittens ve ark.'nın yaptığı çalışmada mikro ve nano kombine yüzeylerin osteoblast hücrelerin olgunlaşmasını sağladığını ve lokal faktör üretimini arttırıp geç dönem farklılaşma belirteci olan osteokalsinin üretimine etki ettiğini göstermişlerdir (149).

Bahl ve ark., T64 (Ti-6Al-4V) yüzeyleri bor ile kaplayarak fare kaynaklı osteoblast öncü hücrelerinin in-vitro olarak incelemesini 4. ve 7. Günlerde MTT analizi ile gerçekleştirmişler. Bor ile kaplı grupların 4. ve 7. Günlerindeki MTT analizleri sonucunda osteoblast öncü hücrelerinde artış gözükse de bu artış gruplar arasında anlamlı bulunmamıştır. 4. Günde Kontrol grubunda osteoblast seviyesi istatistiksel en yüksek bulunurken, 7. Günde kontrol ve bor ile kaplı grupların osteoblast seviyesi arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. 7. Günde kontrol ve bor gruplarının osteoblast seviyeleri çalışmada yer alan diğer tüm yüzeylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (135). Çalışmamızda B grubunda 1. günden 14. güne doğru düzenli bir artış görüldü. AE ve MS gruplarında 7. günden sonra hücre sayısında düşüş görüldü. Bu değer farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da özellikle 7. günden sonra B grubunda meydana gelen artış osteoblast hücrelerinin daha uzun süre canlı kaldığını göstermektedir. Bu durumun B'un antimikrobiyal ve osteokondüktif özelliğiyle ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

Wang ve ark.'nın yılında yaptıkları çalışmada, B katkılı TiO<sub>2</sub> yüzeylerin antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. TiO<sub>2</sub> yüzeyine dahil olan B atomlarının elektron yük dengesizliği yaratarak yüzeyde O<sub>2</sub> yüzey boşluğu oluşturduğu ve TiO<sub>2</sub>'in antimikrobiyal aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir (150).

Huang ve arkadaşlarının, in-vitro hücre kültürü çalışmalarında; Bor katkılı TiO<sub>2</sub> diskleri üzerindeki hücre çoğalma oranında 5. günden sonra saf TiO<sub>2</sub> disk örneklerindeki hücre çoğalma oranına göre düşüş gözlemlenmiştir. Osteoblast hücrelerinin aktivitelerini enzimsel olarak kanıtlamak için inceledikleri ALP değerlerinde %57 oranında genel artış gözlemlenmiştir; fakat 5. günden sonraki hücre

büyümesinde olan yavaşlamayı ise osteoblast hücrelerinin B katkılı TiO<sub>2</sub> yüzeyinde daha erken farklılaşmasına bağlamışlardır (58). Bizim çalışmamızda 3.günden 14. Güne doğru osteoblast değerlerinde artışa sadece bor ve kontrol gruplarında rastlanmıştır.

Huang ve ark'nın 2015 yılında yaptıkları çalışmada TiO<sub>2</sub> diskler MAO yöntemiyle B kaplandıktan sonra fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktivitesi B kaplanmamış TiO<sub>2</sub> disklerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak B kaplı TiO<sub>2</sub> disklerin hidrofilik özelliğinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca B-TiO<sub>2</sub> filmi oluşturulan yüzeylerin kontrol grubuna göre daha biyoaktif olduğunu bildirmişlerdir (12). Biyoaktivitenin artışını ise yüzeydeki B-OH gruplarından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Çalışmamızdaki SEM görüntülerinde hücrelerin yüzeye yayılarak tutunması da B ile yüzeyin hidrofilitesinde meydana gelen artışa bağlanabileceği düşünülmüştür.

Tez çalışmamızda ilk olarak bor katkılı yüzeylerin osteoblastik hücre kültüründe herhangi bir toksik etkiye neden olup olmadığı da WST-1 analizi ile değerlendirdik. Buna bağlı olarak yapılan diğer çalışmalarda (147, 151, 152, 153) olduğu gibi bor uygulamasının hücre canlılığını ve çoğalması yönünde herhangi bir olumsuzluk yaratmadığını gözlemledik. Çalışmamızın deney prosedüründe, yukarıda özetlenen diğer çalışmalarda olduğu gibi MAO yöntemiyle B-TiO<sub>2</sub> film oluşturulan Ti disk yüzeyindeki osteoblastik aktivitenin, işlenmemiş ve asitle pürüzlendirme yöntemi uygulanmış diskler üzerindeki etkisinin karşılaştırılmalı olarak incelenmesi sağlanmıştır. Çalışmamızda görüldüğü üzere alınan sonuçlar literatürler ile paralellik göstermiştir. Bor katkılı anodize edilen yüzeylerde ve diğer pürüzlü yüzeylerde osteoblastlarda gün bazında artış rapor edilmiştir.

Çalışmamızda osteoblast canlılığı ve proliferasyonu osteokondüktivite ile değerlendirildi. Osteoentegrasyon çalışmalarının tercih edilmeme sebebi bu tip çalışmalarda sadece hücre adezyonunun ölçülebilmesi fakat canlılık ve proliferasyonun tespit edilememesidir (154). Yüzey-hücre etkileşimini inceleyen çalışmalarda osteokondüktivite testlerinin tercih edilmesi çalışmamız için de örnek teşkil etmiştir (155, 156, 157, 158).

Osteokondüktivite testlerinde SEM görüntüleri alınarak hücre adezyonunun izlenebilmesi, hücre proliferasyonunun takip edilebilmesi sebebiyle çalışmamızda bu test yöntemini tercih ettik.

## 6. SONUÇ

- 3.Günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu fark sadece bor-knt1 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıdır  $p=0,016$  ( $p<0,05$ ).
- 7.Günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu fark sadece bor-knt1 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıdır  $p=0,040$  ( $p<0,05$ ).
- 14.Günde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu fark sadece ms-knt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıdır  $p=0,035$  ( $p<0,05$ ).
- Çalışmamızın sonunda kontrol grubunda ve pürüzlü yüzey grupları arasında ise sadece bor grubunda 3. günden 14. güne doğru osteoblast düzeylerinde artış görülmüştür. Bu da bor katkılı yüzeylerin osteoblastlar için belli bir affiniteye sahip olduğu olarak yorumlanmıştır.
- Çalışma tasarımımızın ana grubu olan bor katkılı yüzeylerin deney sonunda osteoblast ilişkisi SEM analizleri ile ortaya konmuştur.
- Bor katkılı titanium modifiye yüzeylerinin klinik olarak dental implantlara uyarlanabilmesi için immünohistokimyasal çalışmalar temelinde hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bütün bu sonuçların verileri ışığında, çalışmamızın sonuçları ile tezin içeriğinde bahsettiğimiz literatür sonuçları uyum göstermektedir. B katkılı Ti modifiye yüzeylerin osteoblastlar için afiniteye sahip olması dışında yüzey tasarımı olarak hem biyoyum, hem osteoentegrasyon, hem de periimplantitis açısından yeni bir fikir, yeni bir yol oluşturmaktadır. Bu sebepten bizim çalışmamızın hem in vivo hem de in vitro çalışmaların yapılmasının önünü açmasıyla beraber implant ve cerrahisi açısından önemli olduğu kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. NIINOMI, Mitsuo. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. *Science and technology of advanced Materials*, 2003, 4.5: 445.
2. LI, Long-Hao, et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials*, 2004, 25.14: 2867-2875.
3. ZHANG, Zhenxiang, et al. Osteoblast-like cell adhesion on porous silicon-incorporated TiO<sub>2</sub> coating prepared by micro-arc oxidation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2011, 97.2: 224-234.
4. AREVA, Sami, et al. Sol-Gel-derived TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> implant coatings for direct tissue attachment. Part II: Evaluation of cell response. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2007, 18.8: 1633-1642.
5. TSUI, Y. C.; DOYLE, C.; CLYNE, T. W. Plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium substrates Part 1: Mechanical properties and residual stress levels. *Biomaterials*, 1998, 19.22: 2015-2029.
6. VALLE, Cinzia Della, et al. A novel silicon-based electrochemical treatment to improve osteointegration of titanium implants. *Journal of applied biomaterials & functional materials*, 2013, 11.2.
7. SONG, Ho-Jun, et al. Surface characteristics and bioactivity of oxide films formed by anodic spark oxidation on titanium in different electrolytes. *Journal of Materials Processing Technology*, 2009, 209.2: 864-870.
8. HUANG, Qianli, et al. Enhanced hydrophilicity and in vitro bioactivity of porous TiO<sub>2</sub> film through the incorporation of boron. *Ceramics International*, 2015, 41.3: 4452-4459.
9. YUZHENG, W. A. N. G.; XIANGXIN, X. U. E.; HE, Y. A. N. G. Synthesis and antimicrobial activity of boron-doped titania nano-materials. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2014, 22.4: 474-479.

10. GORUSTOVICH, Alejandro A., et al. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Archives of oral biology*, 2008, 53.7: 677-682.
11. HAKKI, Sema S.; BOZKURT, Buket S.; HAKKI, Erdogan E. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2010, 24.4: 243-250.
12. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press, 1999.
13. TEXTOR, Marcus, et al. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. In: *Titanium in medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. p. 171-230.
14. WATAHA, John C. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 2000, 83.2: 223-234.
15. HOROWITZ, Stephen M., et al. The effects of cobalt chromium upon macrophages. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 1998, 41.3: 468-473.
16. KUDELSKA-MAZUR, D.; LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ, M.; KOMENDER, J. Human osteoblast in contact with various biomaterials in vitro. *Annals of transplantation*, 1999, 4.3-4: 98-100.
17. SCHMIDT, Carla; IGNATIUS, Anita A.; CLAES, Lutz E. Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2001, 54.2: 209-215.
18. MAURER, A. M.; MERRITT, K.; BROWN, S. A. Cellular uptake of titanium and vanadium from addition of salts or fretting corrosion in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1994, 28.2: 241-246.
19. OLMEDO, Daniel G., et al. Effect of titanium dioxide on the oxidative metabolism of alveolar macrophages: an experimental study in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2005, 73.2: 142-149.
20. THOMAS, Peter, et al. Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing, eczema, and T-cell hyperresponsiveness in vitro: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis*, 2006, 55.4: 199-202.

21. MERRITT, Katharine; BROWN, Stanley A. Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 1996, 329: S233-S243.
22. AYDIL, Barış Altuğ, Çene Kırıkları Tedavisinde kullanılan fiksasyon Apareylerinin Genotoksik Etkilerinin Kardeş Kromatid Değişim (KKD) Sıklığı Yöntemiyle Araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, 2005
23. EISENBARTH, E., et al. Biocompatibility of  $\beta$ -stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*, 2004, 25.26: 5705-5713.
24. HALLAB, Nadim James; SKIPOR, Anastasia; JACOBS, Joshua J. Interfacial kinetics of titanium-and cobalt-based implant alloys in human serum: Metal release and biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 65.3: 311-318.
25. BRANEMARK, P.-I. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.*, 1977, 16.
26. ALBREKTSSON, T.; HANSSON, H. A.; IVARSSON, B. Interface analysis of titanium and zirconium bone implants. *Biomaterials*, 1985, 6.2: 97-101.
27. OSHIDA, Y. Implant-related biological reactions. *Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials*, Elsevier, 2007, 157-214.
28. DAVIES, John E. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education*, 2003, 67.8: 932-949.
29. ALBREKTSSON, Tomas; JANSSEN, T.; LEKHOLM, U. Osseointegrated dental implants. *Dental Clinics of North America*, 1986, 30.1: 151-174.
30. ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 2001, 10.2: S96-S101.
31. MARTIN, J. Y., et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1995, 29.3: 389-401.
32. BOYAN, B. D., et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 $\alpha$ , 25-(OH) 2D3. *Journal of biomedical materials research*, 1998, 39.1: 77-85.

33. PULEO, David A.; THOMAS, Mark V. Implant surfaces. *Dental Clinics of North America*, 2006, 50.3: 323-338.
34. COOPER, Lyndon F. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 2000, 84.5: 522-534.
35. MEYER, U., et al. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomaterials*, 2004, 25.10: 1959-1967.
36. LOCCI, P., et al. Phenotype expression of human bone cells cultured on implant substrates. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 1997, 15.3: 163-170.
37. ROSA, Adalberto L.; BELOTI, Márcio M. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clinical Oral Implants Research*, 2003, 14.1: 43-48.
38. ZHU, Xiaolong, et al. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials*, 2004, 25.18: 4087-4103.
39. JUODZBALYS, Gintaras, et al. Titanium dental implant surface micromorphology optimization. *Journal of Oral Implantology*, 2007, 33.4: 177-185.
40. ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 2000, 21.7: 667-681.
41. COCHRAN, D. L., et al. Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results. *Clinical Oral Implants Research*, 1996, 7.3: 240-252.
42. BUSER, Daniel, et al. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 1998, 13.5.
43. KIESWETTER, K., et al. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1996, 7.4: 329-345.
44. GLEDHILL, H. C.; TURNER, I. G.; DOYLE, C. In vitro dissolution behaviour of two morphologically different thermally sprayed hydroxyapatite coatings. *Biomaterials*, 2001, 22.7: 695-700.

45. KHOR, K. A., et al. Microstructure investigation of plasma sprayed HA/Ti6Al4V composites by TEM. *Materials Science and Engineering: A*, 2000, 281.1-2: 221-228.
46. KIM, Hae-Won, et al. Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol–gel method. *Biomaterials*, 2004, 25.13: 2533-2538.
47. STOCH, A., et al. Electrophoretic coating of hydroxyapatite on titanium implants. *Journal of Molecular Structure*, 2001, 596.1-3: 191-200.
48. YEN, S. K.; LIN, C. M. Cathodic reactions of electrolytic hydroxyapatite coating on pure titanium. *Materials chemistry and physics*, 2003, 77.1: 70-76.
49. MAITZ, M. F., et al. Promoted calcium-phosphate precipitation from solution on titanium for improved biocompatibility by ion implantation. *Surface and Coatings Technology*, 2002, 158: 151-156.
50. ONG, J. L., et al. Bone response to radio frequency sputtered calcium phosphate implants and titanium implants in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2002, 59.1: 184-190.
51. ZHAO, G., et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2005, 74.1: 49-58.
52. BAIER, R. E.; MEYER, A. E. Future directions in surface preparation of dental implants. *Journal of dental education*, 1988, 52.12: 788-791.
53. CARLSSON, Lars V.; ALBREKTSSON, Tomas; BERMAN, Charles. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 1989, 4.3.
54. WENNERBERG, A.; BOLIND, P.; ALBREKTSSON, T. Glow-discharge pretreated implants combined with temporary bone tissue ischemia. *Swedish dental journal*, 1991, 15.2: 95-101.
55. MOLLER, K., et al. The influence of zeta-potential and interfacial-tension on osteoblast-like cells. *Cells and Materials*, 1994, 4.3: 263-274.
56. REDEY, Stéphane A., et al. Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface

- energy. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2000, 50.3: 353-364.
57. FERGUSON, Stephen John, et al. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2006, 78.2: 291-297.
  58. HUANG, Ling, et al. Enhancement of local bone remodeling in osteoporotic rabbits by biomimic multilayered structures on Ti6Al4V implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016, 104.6: 1437-1451.
  59. ISHIZAWA, Hitoshi; OGINO, Makoto. Characterization of thin hydroxyapatite layers formed on anodic titanium oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1995, 29.9: 1071-1079.
  60. ISHIZAWA, H.; OGINO, M. Hydrothermal precipitation of hydroxyapatite on anodic titanium oxide films containing Ca and P. *Journal of materials science*, 1999, 34.23: 5893-5898.
  61. HAN, Yong; SUN, Jifeng; HUANG, Xin. Formation mechanism of HA-based coatings by micro-arc oxidation. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10.4: 510-513.
  62. YEROKHIN, A. L., et al. Plasma electrolysis for surface engineering. *Surface and coatings technology*, 1999, 122.2-3: 73-93.
  63. SUL, Young-Taeg, et al. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Medical Engineering and Physics*, 2001, 23.5: 329-346.
  64. SUL, Young-Taeg, et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown:: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials*, 2002, 23.2: 491-501.
  65. DEE, Kay C.; PULEO, David A.; BIZIOS, Rena. Blood-Biomaterial Interactions and Coagulation. *An introduction to tissue-biomaterial interactions*, 2002, 53-88.

66. HELDIN, Carl-Henrik; WESTERMARK, Bengt. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews*, 1999, 79.4: 1283-1316.
67. DEREKA, X. E.; MARKOPOULOU, C. E.; VROTSOS, I. A. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors*, 2006, 24.4: 260-267.
68. STANFORD, Clark M.; KELLER, John C. The concept of osseointegration and bone matrix expression. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1991, 2.1: 83-101.
69. SCHLIEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2002, 31.5: 469-484.
70. PARK, Jun Y.; DAVIES, John E. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clinical oral implants research*, 2000, 11.6: 530-539.
71. PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 1999, 20.23-24: 2311-2321.
72. KLINGER, M. M., et al. Proteoglycans at the bone-implant interface. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1998, 9.4: 449-463.
73. MARCO, Franchi, et al. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*, 2005, 36.7-8: 630-644.
74. CHAPPARD, Daniel, et al. The early remodeling phases around titanium implants: a histomorphometric assessment of bone quality in a 3-and 6-month study in sheep. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 1999, 14.2: 189-196.
75. DAHLIN, Christer, et al. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 1989, 4.1.
76. SCHROPP, Lars; KOSTOPOULOS, Lambros; WENZEL, Ann. Bone healing following immediate versus delayed placement of titanium implants into extraction sockets: a prospective clinical study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2003, 18.2.
77. NIELSEN, Forrest H. Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats. *Biofactors*, 2004, 20.3: 161-171.

78. GALLARDO-WILLIAMS, Maria T., et al. Effects of boric acid supplementation on bone histomorphometry, metabolism, and biomechanical properties in aged female F-344 rats. *Biological trace element research*, 2003, 93.1-3: 155-169.
79. NAGHII, Mohammad Reza; TORKAMAN, Giti; MOFID, Mahmood. Effects of boron and calcium supplementation on mechanical properties of bone in rats. *Biofactors*, 2006, 28.3-4: 195-201.
80. NIELSEN, Forrest H., et al. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *The FASEB journal*, 1987, 1.5: 394-397.
81. NIELSEN, Forrest Harold. Boron deprivation decreases liver S-adenosylmethionine and spermidine and increases plasma homocysteine and cysteine in rats. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 2009, 23.3: 204-213.
82. BEATTIE, John H.; PEACE, Heather S. The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *British journal of nutrition*, 1993, 69.3: 871-884.
83. YING, Xiaozhou, et al. Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biological trace element research*, 2011, 144.1-3: 306-315.
84. ÇİÇEK, Candan; BİLGİÇ, Altınay. KLİNİK VİROLOJİ LABORATUVARINDA UZMANLIK ÖĞRENCİSİNE VERİLEN HÜCRE KÜLTÜRÜ EĞİTİM PROGRAMI: BİR MODEL. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 2006, 20.3: 231-241.
85. MARIN, Valerie, et al. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *Journal of immunological methods*, 2001, 254.1-2: 183-190.
86. TSAI, Ming- Song, et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second- trimester amniotic fluid using a novel two- stage culture protocol. *Human reproduction*, 2004, 19.6: 1450-1456.
87. FRESHNEY, R. Ian; FRESHNEY, Mary G. (ed.). *Culture of epithelial cells*. John Wiley & Sons, 2004.

88. FRESHNEY, R. Ian. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons, 2015.
89. JENKINS, Nigel, et al. (ed.). *Animal cell biotechnology: methods and protocols*. USA: Humana Press, 1999.
90. EKTESSABI, A. M., et al. Application of micro beam PIXE to detection of titanium ion release from dental and orthopaedic implants. *International Journal of PIXE*, 1994, 4.02n03: 81-91.
91. THULL, R. Physicochemical principles of tissue material interactions. *Biomolecular engineering*, 2002, 19.2-6: 43-50.
92. SUNDGREN, J. E.; BODÖ, P.; LUNDSTRÖM, I. Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1986, 110.1: 9-20.
93. BUSER, D., et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1991, 25.7: 889-902.
94. REYES, Catherine D., et al. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials*, 2007, 28.21: 3228-3235.
95. TUNCER, Safa; DEMİRCİ, Mustafa. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011, 2011.2.
96. CELIS, Julio E., et al. Human and mouse proteomic databases: novel resources in the protein universe. *FEBS letters*, 1998, 430.1-2: 64-72.
97. THULL, R. Physicochemical principles of tissue material interactions. *Biomolecular engineering*, 2002, 19.2-6: 43-50.
98. MOHARAMZADEH, Keyvan; BROOK, Ian M.; VAN NOORT, Richard. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*, 2009, 2.2: 514-548.
99. TRIPPEL, Stephen B., et al. Growth factors as therapeutic agents. *JBJS*, 1996, 78.8: 1272-1286.
100. MARX, Robert E., et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 1998, 85.6: 638-646.

101. ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 2001, 10.2: S96-S101.
102. CHEN, Ruth R.; MOONEY, David J. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharmaceutical research*, 2003, 20.8: 1103-1112.
103. TODOKORO, Hideo; EZUMI, Makoto. *Scanning electron microscope*. U.S. Patent No 5,872,358, 1999.
104. KHURSHEED, Anjam. *Scanning electron microscope*. U.S. Patent No 7,294,834, 2007.
105. KATAGAMI, Masumi; KANEYAMA, Miyuki. *Scanning electron microscope*. U.S. Patent No 6,528,787, 2003.
106. BOZZOLA, John J. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells. In: *Electron Microscopy*. Humana Press, 2007. p. 1-18.
107. GLAUERT, Audrey M.; ROGERS, G. E.; GLAUERT, R. H. A new embedding medium for electron microscopy. *Nature*, 1956, 178.4537: 803.
108. GLAUERT, Audrey M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. 1975.
109. DYKSTRA, Michael J.; REUSS, Laura E. *Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting*. Springer Science & Business Media, 2011.
110. HAYAT, M. Arif, et al. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. Edward Arnold., 1981.
111. NATION, James L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain technology*, 1983, 58.6: 347-351.
112. PALLADE, G. E. A study of fixation for electron microscopy. *Jour. Exp. Med*, 1952, 95: 285-298.
113. DEY, Sudip, et al. A new rapid method of air- drying for scanning electron microscopy using tetramethylsilane. *Journal of Microscopy*, 1989, 156.2: 259-261.

114. BRAET, F.; DE ZANGER, R.; WISSE, E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *Journal of microscopy*, 1997, 186.1: 84-87.
115. ARAUJO, Juliana C., et al. Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *Journal of electron microscopy*, 2003, 52.4: 429-433. BRUNK, Ulf; COLLINS, V. Peter; ARRO, Erik. The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM. *Journal of microscopy*, 1981, 123.2: 121-131.
116. FOLK, Robert L. SEM imaging of bacteria and nannobacteria in carbonate sediments and rocks. *Journal of Sedimentary Research*, 1993, 63.5: 990-999.
117. GOLDEN, JULIA. Golden oldies: Curating SEM specimens. In: *Collection Forum*. 1989. p. 17-26.
118. PREMNATH, V. W. H. M., et al. Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem. *Biomaterials*, 1996, 17.18: 1741-1753
119. COSTA, L., et al. Oxidation in orthopaedic UHMWPE sterilized by gamma-radiation and ethylene oxide. *Biomaterials*, 1998, 19.7-9: 659-668.
120. MOREAU, Marie Françoise, et al. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 2000, 21.4: 369-376.
121. <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/scanning-electron-microscopes.html>
122. ALBREKTSSON, Tomas O.; JOHANSSON, Carina B.; SENNERBY, Lars. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. *Periodontology* 2000, 1994, 4.1: 58-73.
123. WILLIAMS, D. F. Titanium and titanium alloys. in *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*, 1981, 9-44.
124. HUANG, Her-Hsiung. Effects of fluoride concentration and elastic tensile strain on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Biomaterials*, 2002, 23.1: 59-63.
125. SOLAR, R. J. Corrosion resistance of titanium surgical implant alloys: a review. In: *Corrosion and degradation of implant materials*. ASTM International, 1979.

126. MEACHIM, G.; WILLIAMS, D. F. Changes in nonosseous tissue adjacent to titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1973, 7.6: 555-572.
127. WILLIAMS, D. F.; MEACHIM, G. A combined metallurgical and histological study of tissue-prosthesis interactions in orthopedic patients. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1974, 8.3: 1-9.
128. WOODMAN, J. L., et al. Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons: A long-term study. *Journal of Orthopaedic Research*, 1983, 1.4: 421-430.
129. BHAT, Radhakrishna B.; TAMIRISAKANDALA, Seshacharyulu; MIRACLE, Daniel B. Beta phase superplasticity in titanium alloys by boron modification. *Journal of materials engineering and performance*, 2004, 13.6: 653-659.
130. DELIGIANNI, Despina D., et al. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*, 2001, 22.11: 1241-1251.
131. LAUSMAA, Jukka. Mechanical, thermal, chemical and electrochemical surface treatment of titanium. In: *Titanium in medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. p. 231-266.
132. DUCHEYNE, P., et al. In vivo metal-ion release from porous titanium-fiber material. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1984, 18.3: 293-308.
133. KLEPPER, C. C., et al. Amorphous boron coatings produced with vacuum arc deposition technology. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 2002, 20.3: 725-732.
134. TEXTOR, Marcus, et al. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. In: *Titanium in medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. p. 171-230.
135. BAHL, S., et al. Effect of boron addition and processing of Ti-6Al-4V on corrosion behaviour and biocompatibility. *Materials Technology*, 2014, 29.sup1: B64-B68.
136. TUBARO, A., et al. Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. *Toxicon*, 1996, 34.9: 965-974.

137. FEOKTISTOVA, Maria; GESERICK, Peter; LEVERKUS, Martin. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016, 2016.4: pdb. prot087379.
138. BARLTROP, John A., et al. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4, 5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1991, 1.11: 611-614.
139. STEVENS, Mark G.; OLSEN, Steven C. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Journal of Immunological Methods*, 1993, 157.1-2: 225-231.
140. MARKS, Denese C., et al. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells. *Leukemia research*, 1992, 16.12: 1165-1173.
141. GONG, Dawei, et al. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *Journal of Materials Research*, 2001, 16.12: 3331-3334.
142. OH, Seunghan, et al. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2006, 78.1: 97-103.
143. LE GUEHENNEC, Laurent, et al. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4.3: 535-543.
144. TIAN, Yuan, et al. Osteoblast growth behavior on porous-structure titanium surface. *Applied Surface Science*, 2012, 261: 25-30.
145. DAS, Kakoli; BOSE, Susmita; BANDYOPADHYAY, Amit. Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta biomaterialia*, 2007, 3.4: 573-585.
146. KACZMAREK, Mariusz, et al. In vitro biocompatibility of titanium after plasma surface alloying with boron. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 69: 1240-1247.

147. BENDERDOUR, M., et al. Boron modulates extracellular matrix and TNF $\alpha$  synthesis in human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998, 246.3: 746-751.
148. HAKKI, Sema S.; BOZKURT, Buket S.; HAKKI, Erdogan E. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2010, 24.4: 243-250.
149. GITTENS, Rolando A., et al. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta biomaterialia*, 2013, 9.4: 6268-6277.
150. WANG, J., et al. Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment. *Biomaterials*, 2004, 25.4: 583-592.
151. KOGA, Kenjiro, et al. Cytotoxic evaluation of cubic boron nitride in human origin cultured cells. *Toxicology in vitro*, 2006, 20.8: 1370-1377.
152. LUAN, Q., et al. Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial. *Journal of dental research*, 2008, 87.2: 148-152.
153. MAJUMDAR, P., et al. Influence of boron addition to Ti-13Zr-13Nb alloy on MG63 osteoblast cell viability and protein adsorption. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, 46: 62-68.
154. PAN, J., et al. Variation of oxide films on titanium induced by osteoblast-like cell culture and the influence of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 1998, 40.2: 244-256.
155. QIAN, Shi; LIU, Xuanyong; DING, Chuanxian. Effect of Si-incorporation on hydrophilicity and bioactivity of titania film. *Surface and Coatings Technology*, 2013, 229: 156-161.
156. MERRITT, K.; BROWN, S. Systemic effects of corrosion products. *Compatibility of Biomedical Implants*, 1994, 14-20.
157. OSBORN, J. F. The release of titanium into human bone from a titanium implant coated with plasma-sprayed titanium. *Adv. Biomater.*, 1994, 9: 75-80
158. LOPEZ, M., et al. Titanium Disk Surfaces Modulate Dental Implants Osseointegration. *European Journal of Inflammation*, 2012, 10.2\_suppl: 43-47.

## HAM VERİLER



## FORMLAR



## ETİK KURUL KARARI



# PATENT HAKKI İZNİ



2018/12337



2018-GE-367281

29.08.2018



PATENT BAŞVURU FORMU

P201

## 1. BAŞVURU BİLGİSİ

|                                    |                                                                                               |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Başvuru Şekli/Ana Başvuru Numarası | Yeni Başvuru                                                                                  |
| Erken Yayın Talebi                 | Var                                                                                           |
| Buluş Başlığı                      | TİTANYUM İMPLANTLARIN BOR İLE KAPLANMASIYLA OSTEDENTTEGRASYON SAĞLANMASINA YÖNELİK BİR YÖNTEM |
| Türkçe Çeviri Stire Talebi         | Yok                                                                                           |
| Referans No                        |                                                                                               |
| Patent Sınıfı                      |                                                                                               |
| Tarifname Dili                     | TUR                                                                                           |
| Tarifname                          | 10 Sayfa                                                                                      |
| İstem                              | 7 Adet                                                                                        |
| Özet                               | 1 Sayfa                                                                                       |
| Resim                              | 1 Sayfa                                                                                       |
| Genetik Kaynak                     | HAYIR                                                                                         |
| Kamu Desteği                       | HAYIR                                                                                         |

## 2. BAŞVURU SAHİBİ

|                          |                                                                            |               |        |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------|--------|
| Adı-Soyadı/Unvanı        | UĞUR SORKUN                                                                |               |        |
| Adres                    | Zeytinlik Mah. Cumhuriyeti Sk. Konak Apt. No:2 B Blok D:2 İstanbul TÜRKİYE |               |        |
| Uyruğu                   | TÜRKİYE                                                                    | Sahip Türü    | Gençek |
| TC Kimlik/Vergi Numarası | 20167929792                                                                | Sahip Profili | Diğer  |
| TPE Sahip Numarası       | 6609723                                                                    |               |        |

## 3. BULUŞ SAHİBİ

|                    |                                                                   |               |                |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------|----------------|
| Adı-Soyadı         | UĞUR SORKUN                                                       |               |                |
| Adres              | Zeytinlik Mah. Cumhuriyeti Sk. Konak Apt. No:2 B Blok D:2 TÜRKİYE |               |                |
| TC Kimlik Numarası | 20167929792                                                       | Sahip Profili | Diğer          |
| Uyruğu             | TÜRKİYE                                                           | Beyan         | Başvuru Sahibi |

## 4. RÜÇHAN BİLGİLERİ

| Rüçhan Çepidi | Ülke | Sergi Adı / Başvuru Numarası | Tarih |
|---------------|------|------------------------------|-------|
|---------------|------|------------------------------|-------|

\*\*\*Talep HARUN EKİNCİ E-Devlet girişi referans alınarak TÜRK PATENT kayıtlarına alınmıştır.  
\*\*\*Evrak ve ( 4 ) adet eki orijinalinin aynıdır. (TÜRK PATENT Bilgi İşlem)

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### SODYUM TETRABORAT TOZU İLE PÜRÜZLENDİRİLMİŞ TİTANYUM YÜZEYLERİNDE OSTEOLASTİK AKTİVİTENİN İN-VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

#### ORIJİNALLIK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>3</b>        | % <b>2</b>          | % <b>2</b> | % <b>1</b>       |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                                                                                           |             |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>dfd.atauni.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı                                                                              | % <b>2</b>  |
| <b>2</b> | <b>Submitted to TechKnowledge Turkey</b><br>Öğrenci Ödevi                                                                 | <% <b>1</b> |
| <b>3</b> | <b>www.dent.ege.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı                                                                            | <% <b>1</b> |
| <b>4</b> | <b>media.proquest.com</b><br>İnternet Kaynağı                                                                             | <% <b>1</b> |
| <b>5</b> | <b>www.unipr.it</b><br>İnternet Kaynağı                                                                                   | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <b>TUNCER, Safa and DEMİRCİ, Mustafa. "Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri", TUBİTAK, 2011.</b><br>Yayın | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <b>Jemat, A. Ghazali, M.J. Razali, M. Otsuk. "Surface modifications and their effects on</b>                              | <% <b>1</b> |

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                 |                        |                  |             |
|-----------------|------------------------|------------------|-------------|
| <b>Adı</b>      | Uğur                   | <b>Soyadı</b>    | Sorkun      |
| <b>Doğ.Yeri</b> | Eskişehir              | <b>Doğ.Tar.</b>  | 24.10.1985  |
| <b>Uyruğu</b>   | TC                     | <b>TC Kim No</b> | 20167929792 |
| <b>Email</b>    | ugursorkun@hotmail.com | <b>Tel</b>       | 05333876168 |

### Eğitim Düzeyi

|                 |                                                          |                  |
|-----------------|----------------------------------------------------------|------------------|
|                 | <b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>                          | <b>Mez. Yılı</b> |
| <b>Doktora</b>  | İ.Ü. Diş Hek.Fak. Ağız, Diş, Çene Hast. ve Cerrahisi ABD | 2018             |
| <b>Yük.Lis.</b> |                                                          |                  |
| <b>Lisans</b>   | Marmara Üni. Diş Hekimliği Fakültesi                     | 2010             |
| <b>Lise</b>     | Eskişehir Fatih Anadolu Lisesi                           | 2004             |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|    |               |              |                         |
|----|---------------|--------------|-------------------------|
|    | <b>Görevi</b> | <b>Kurum</b> | <b>Süre (Yıl - Yıl)</b> |
| 1. |               |              | -                       |
| 2. |               |              | -                       |
| 3. |               |              | -                       |

|                        |                          |                 |               |                       |                      |
|------------------------|--------------------------|-----------------|---------------|-----------------------|----------------------|
| <b>Yabancı Dilleri</b> | <b>Okuduğunu Anlama*</b> | <b>Konuşma*</b> | <b>Yazma*</b> | <b>KPDS/ÜDS Puanı</b> | <b>(Diğer) Puanı</b> |
| İngilizce              | İyi                      | İyi             | İyi           | 72.500                |                      |
|                        |                          |                 |               |                       |                      |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

|                      |                |                     |              |
|----------------------|----------------|---------------------|--------------|
|                      | <b>Sayısal</b> | <b>Eşit Ağırlık</b> | <b>Sözel</b> |
| <b>LES Puanı</b>     | 86.375         | 83.814              | 80.479       |
| <b>(Diğer) Puanı</b> |                |                     |              |

### Bilgisayar Bilgisi

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| <b>Program</b>   | <b>Kullanma becerisi</b> |
| Microsoft Office | İyi                      |
| SPSS             | Orta                     |
|                  |                          |

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Elektrogitar, DJ kontroller, Snowboard, Yüzme, Basketbol, İleri sürüş eğitimi ve Motorsporları.