

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİTANYUM ALAŞIM YÜZEYLERİN SELEKTİF LAZER ERGİTME  
İŞLEMİ İLE KAPLANMASI SONRASI YÜZEY  
KARAKTERİZASYONUNUN SAOS-2 HÜCRE PROLİFERASYONU  
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dt. Emin Orkun OLCAY

Protez Programı  
DOKTORA TEZİ

ANKARA  
2017



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİTANYUM ALAŞIM YÜZEYLERİN SELEKTİF LAZER ERGİTME İŞLEMİ İLE  
KAPLANMASI SONRASI YÜZEY KARAKTERİZASYONUNUN SAOS-2  
HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Dt. Emin Orkun OLCAY**

**Protez Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Bahadır ERSU**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Ayşe ERCAN**

**ANKARA**

**2017**

**TİTANYUM ALAŞIM YÜZEYLERİN SELEKTİF LAZER ERGİTME İŞLEMİ İLE KAPLANMASI  
SONRASI YÜZEY KARAKTERİZASYONUNUN SAOS-2 HÜCRE PROLİFERASYONU  
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Dt. Emin Orkun OLCAY**

Bu çalışma 27/12/2017 tarihinde jürimiz tarafından “ Protez Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Hakan Terzioğlu*  
*Ankara Üniversitesi*



**Tez Danışmanı:** *Doç. Dr. Bahadır Ersu*  
*Hacettepe Üniversitesi*



**Üye:** *Prof. Dr. R. Şenay Canay*  
*Hacettepe Üniversitesi*



**Üye:** *Prof. Dr. Selim Erkut*  
*Başkent Üniversitesi*




**Üye:** *Prof. Dr. Kivanç Akça*  
*Hacettepe Üniversitesi*



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Tarih **28 Aralık 2017**



**Prof. Dr. Diclehan Orhan**

Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

**Tezimin 01.01.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

Dt. Emin Orkun OLCAY

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Bahadır Ersu danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

**Dt. Emin Orkun OLCAY**



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca mesleki olarak gelişmemde çok büyük katkısı olan, bu süre zarfında bana hem ağabeylik hem hocalık yapan, danışman hocam olduğu için bana kendimi çok şanslı hissettiren Sayın Doç. Dr. Bahadır Ersu'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan bana destek veren aynı zamanda ikinci danışman hocam olan Sayın Doç. Dr. Ayşe Ercan'a sonsuz teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesinde eğitim gördüğüm zaman zarfı içerisinde benden bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Şenay Canay'a, Sayın Prof. Dr. Mehmet Muhtaroğulları'na, Sayın Prof. Dr. Kıvan Akça'ya ve bölümümüzde görev yapan tüm değerli öğretim üyelerine sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora eğitimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen ve hep yanımda olduklarını bana hissettiren annem Dt. Hacer Sibel Olcay, babam Dt. Ömer Besim Olcay ve ikiz kardeşim Yük. Müh. Orçun Olcay'a

Desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen biricik dayım Prof. Dr. Mustafa Bahçeci, anneannem Sevim Bahçeci ve dedem İbrahim Bahçeci'ye

Ankara'da yaşadığım süre zarfında bana evlerini açan ve kendimi evimdeymiş gibi hissettiren babaannem Türkan Olcay ve dedem Mehmet Emin Olcay'a

Varlığıyla bana kuvvet veren, hiçbir desteğini ve güler yüzünü benden esirgemeyen, nezaman ihtiyacım olduğunda yanımda olduğunu ve ileride olacağını bana hissettiren, mutluluk kaynağım, yol arkadaşım, biricik nişanlım Uzman Dt. Merve Varol'a

Tüm kalbimle teşekkür ederim.

## ÖZET

**Olçay, O., Titanyum Alaşım Yüzeylerin Selektif Lazer Ergitme İşlemi İle Kaplanması Sonrası Yüzey Karakterizasyonunun Saos-2 Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Protez Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2017.** Günümüzde dental implant materyali olarak en çok titanyum ve alaşımları tercih edilmektedir. Tornalanmış titanyum implantlar, en iyi kemik-implant temasının oluşturulması için çeşitli yüzey işlemlerinden geçirilmektedir. Dental implantların osseointegrasyon süresinin kısaltılması üzerine yapılan araştırmalar günümüzde önem kazanmaktadır. Bu sebeble çalışmamızda hem biyouyumluluğunun hem de yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla, tornalanmış Grade 5 titanyum disklerin, SLM işlemi ile Grade 23 titanyumla kaplanması sonrası Saos-2 hücrelerinin proliferasyonu değerlendirilecektir. Bu amaçla tornalanmış 6mm çapındaki toplam 48 adet titanyum Grade 5 örnek dört gruba ayrılmıştır (n=12). İlk gruba herhangi bir yüzey işlemi uygulanmamıştır (Kontrol grubu). Üçüncü gruba SLA prosedürü uygulanmıştır. İkinci ve dördüncü grup örneklerin yüzeyleri SLM yöntemi kullanılarak Grade 23 titanyumla kaplandıktan sonra, dördüncü grup örnek yüzeylerine ek olarak SLA prosedürü de yapılmıştır. Örneklerin yüzey topografileri AFM, SEM-EDX ve yüzey gerilim testleri ile değerlendirilmiştir. Ultraviyole ışık altında sterilizasyonu yapılan örnekler Saos-2 ekimi yapılmıştır (n=8). MTT deneyi ile 24, 48 ve 72 saatlerin sonunda yüzeylerdeki canlı hücrelerin yüzde değerleri hesaplanmıştır. Enzimatik ALP deneyi ile Saos-2 hücrelerinin fonksyonelliği belirlenmiştir. Hücrelerin modifiye titanyum diskler üzerindeki üç boyutlu yerleşimi flüoresan mikroskopi ile gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Selektif lazer ergitme, titanyum, SLA, dental implant, Saos-2 hücresi, osseointegrasyon

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (HÜBAB 11614).



## ABSTRACT

**Olçay, O., An Investigation of the Effect of Surface Characterization on Saos-2 Cell Proliferation After Coating of Titanium Alloy Surfaces with Selective Laser Melting Process, Hacettepe University Institute of Health Science, PhD Thesis in Prosthodontics, Ankara, 2017.** Nowadays, titanium and its alloys are the most common materials used in dental implants. Lathed-titanium implant surfaces are processed in various ways to produce the best bone-implant structure. Researches on shortening the duration of osseointegration of dental implants are gaining importance nowadays. For this reason this study will analyze the proliferation of Saos-2 cells after Grade 5 lathed-titanium disks are covered with titanium Grade 23 through the SLM process, in attempts to promote biocompatibility and surface features of implants. To do so, 48 lathed-titanium Grade 5, 6mm in diameter and 2mm in thickness, are separated into four sample groups (n=12). No surface process has been performed to the first group (control group). SLA procedure has been performed to the third group. Surfaces of the second and fourth group have been covered with Grade 23 titanium through the SLM procedure, and the SLA procedure has been performed on fourth group's surface. Surface topographies of all groups have been tested with AFM, SEM-EDX and surface tension tests. Saos-2 planting has been performed on samples that have been sterilized under ultraviolet light (n=8). MTT test has been used to test percentage values of living cells on surfaces at the end of 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup>, and 72<sup>nd</sup> hours. Functionality of Saos-2 cells is determined via enzymatic ALP test. Fluorescent microscope is used to show 3-D positioning of the cells on modified titanium disks.

**Key Words:** Selective laser melting, titanium, SLA, dental implant, Saos-2 cell, Osseointegration

This dissertation was supported by the Scientific Research Department of Hacettepe University (HÜBAB 11614).

**İÇİNDEKİLER**

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. İmplant Nedir?	4
2.2. Dental İmplantolojinin Gelişimi	4
2.3. Osseointegrasyon	6
2.3.1. Osseointegrasyon Nedir?	6
2.3.2. Osseointegrasyonda Başarı ve Başarısızlık	7
2.3.3. İmplant Başarısızlıklarının Sınıflandırılması	8
2.4. Dental İmplant Başarı Kriterleri	10
2.5. Dental İmplantların Sınıflandırılması	11
2.5.1. Kullanılan Materyal Tipine Göre	11
2.5.2. Yerleştirildikleri Yere ve Destek Dokulara Göre	13
2.5.3. Gövde Tasarımlarına Göre	13
2.5.4. Yüzey Özelliklerine Göre İmplantların Sınıflandırılması	14
2.6. Dental İmplant Tasarımı	14
2.7. Dental İmplant Formu	15
2.8. Dental İmplantların Yüzey Özellikleri	16
2.9. İmplant Yüzeylerinin Yüzey İşleme Yöntemleri	17
2.9.1. Mekaniksel Metodlar	17

2.9.2. Kimyasal Metodlar	17
2.9.3. Fiziksel Metodlar	17
2.10. Dental İmplantların Yüzey Modifikasyon Tipleri	18
2.10.1. Tornalanmış Yüzeyler	18
2.10.2. Asitlenmiş Yüzeyler (Etched Surfaces):	18
2.10.3. İki Defa Asit Uygulanmış Yüzeyler (Dual - etched Surfaces)	18
2.10.4. Hidroksiapatit Kaplı Yüzeyler	19
2.10.5. Sol - Jel Kaplı İmplantlar	19
2.10.6. Kumlanmış ve Asit Uygulanmış Yüzeyler (SLA ve Modifiye SLA)	20
2.10.7. Kumlanmış Yüzeyler (Grit-blasted Surfaces)	20
2.10.8. Oksitlenmiş Yüzeyler	21
2.10.9. Florür Uygulanmış Yüzeyler	21
2.10.10. Lazerle Pürüzlendirilmiş Yüzeyler	22
2.10.11. Antibiyotik Kaplama	22
2.10.12. Sentetik Peptid Kaplama	23
2.10.13. Plazma Sprey Kaplı Yüzeyler	23
2.11. Lazer	23
2.11.1. Lazer Nedir?	24
2.11.2. Lazerin Tarihsel Gelişimi	24
2.11.3. Lazerin Fiziği ve Doku ile Etkileşimi	25
2.11.4. Lazer Sisteminin Bileşenleri	26
2.11.5. Lazer Işığının Özellikleri	26
2.11.6. Lazer Sinterleme Nedir?	27
2.12. Yüzey Pürüzlülüğü	28
2.12.1. Yüzey Pürüzlülüğünün Ölçümünde Kullanılan Parametreler	29
2.12.2. Oral İmplantların Yüzey Pürüzlülüğünün Değerlendirilmesi için Yöntemler	30
2.13. Biyouyumluluk	32
2.13.1. Biyouyumluluk Nedir?	32
2.13.2. Biyouyumluluğun Dinamik Süreci	33
2.13.3. Biyouyumluluk Test Tipleri	34
2.13.4. Biyouyumluluk Testleri Arasındaki Korelasyon	36
2.14. Hücre Canlılığı Belirleme ve Sitotoksikite Testleri	37

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>38</b>
3.1. Titanyum Disklerin Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi	39
3.1.1. Selektif Lazer Ergitme İşlemi	40
3.1.2. SLA Uygulaması	41
3.2. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Ölçümü	42
3.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Ölçümü	44
3.3.1. Enerji Ayırımı X – Işını Spektroskopisi (EDX Dedektörü)	45
3.4. Temas Açısı Ölçümü	46
3.5. Saos-2 Hücrelerinin Titanyum Diskler Üzerindeki Biyokimyasal Değerlendirmesi	49
3.5.1. Sterilizasyon Koşulları	49
3.5.2. Saos-2 Hücrelerinin Ekimi ve Pasajlanması	49
3.5.3. Thoma Kamarası Kullanarak Hücrelerin Sayılması	51
3.5.4. MTT Canlılık Deneyi	53
3.5.5. Hücrelerin Fluoresan Mikroskopta Görüntülenmesi	56
3.5.6. Saos-2 Hücrelerinde Alkalen Fosfataz Aktivitesi Ölçümü	57
3.5.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizleri	59
<b>4. BULGULAR</b>	<b>60</b>
4.1. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Ölçümü Bulguları	60
4.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleri	65
4.3. Enerji Ayırımı X- Işını Spektroskopisi (EDX) Ölçümleri	69
4.4. Yüzey Temas Açısının Ölçümü	73
4.5. Saos-2 Hücrelerinin Çoğalma Davranışının İzlenmesi	79
4.6. Titanyum Diskler Üzerindeki Saos-2 Hücrelerinin Canlılık Yüzdesi	80
4.7. MTT Deneyinin İstatistiksel Analizi	83
4.8. Titanyum Diskler Üzerindeki Saos-2 Hücrelerinin Alkalen Fosfataz Aktivitesi	86
4.9. Titanyum Diskler Üzerindeki Saos-2 Hücrelerinin Fluoresan Mikroskopi ile Görüntülenmesine Ait Bulgular	89
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>93</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>105</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>106</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>123</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
$\mu\text{m}$	Mikrometre
3D	Üç boyutlu
AA	Aritmetik ortalama
$\text{Al}_2\text{O}_3$	Alüminyum oksit
ALP	Alkalen fosfataz
AM	Additive Manufacturing
CAD	Computer-aided design
CAM	Computer-aided manufacturing
CFM	Kimyasal kuvvet mikroskobu
CLA	Merkez hat ortalaması
cm	Santimetre
$\text{cm}^2$	Santimetrekare
$\text{cm}^3$	Santimetreküp
CNC	Computer Numerological Control
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
Co-Cr	Kobalt-Krom
$\text{Cr}_2\text{Na}_2\text{O}_7$	Sodyum Dikromat
CRT	Cathode Ray Tube
df	Dilüsyon Faktörü
dk	Dakika
DLMS	Direct Laser Metal Sintering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetil Formamid
DTM	Desktop Manufacturing

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EDX	Enerji ayrımlı X ışınlı spektroskopi
Er: YAG	Erbiyum: Yttrium-Alüminyum-Garnet
FBS	Fetal Bovine Serum
Fe-Cr-Ni	Demir-Krom-Nikel
GPa	Gigapaskal
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfirik asit
HA	Hidroksiapatit
HCl	Hidroklorik asit
He-Ne	Helyum- Neon
HF	Hidroflorik asit
HNO <sub>3</sub>	Nitrik asit
ISO	International Organization for Standardization
MFM	Manyetik kuvvet mikroskobu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mm <sup>3</sup>	Milimetreküp
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
Nd: YAG	Neodymium: Yttrium-Alüminyum-Garnet
Ni-Cr	Nikel- Krom
nm	Nanometre
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polietilen
pH	Power of Hydrogen
PMMA	Polimetilmetakrilat
pNPP	P-Nitrofenilfosfat
PSF	Polisülfon
PTFE	Polietrafloroetilen
Ra	Roughness average

Rz	Ortalama Pürüz Yüksekliği
sa	Saat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Scanning Electron Microscopy
Si	Silisyum
Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Silisyum Nitrür
SLA	Sand blasted, large grid, acid etching
SLM	Selective Laser Melting
SLS	Selective Laser Sintering
Sn	Saniye
SPM	Taramalı prob mikroskobu
SPSS	Statistical Packages for the Social Sciences
TiO <sub>2</sub>	Titanyum dioksit
Ti-6Al-4V	Titanyum-Alüminyum-Vanadyum
TiF <sub>4</sub>	Titanyum tetraflorit
TiN	Titanyum nitrit
TPS	Titanyum Plazma Sprey
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
UV	Ultraviyole
VdW	Van der Waals
W	Watt

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Osseointegrasyon yapısı	7
2.2. Pürüzlülük diyagramı	29
2.3. Ölçüm ucunun yarı çapının ölçülen profil üzerindeki etkisi	30
2.4. Biyouyumluluk diyagramı	33
2.5. Yeni materyallerin biyouyumluluk değerlendirmesi için klasik paradigma	34
3.1. 4 ayrı gruba ayırdığımız disklerin görüntüsü	38
3.2. CNC torna tezgahı (Hanwha, XP16S, South Korea)	40
3.3. Wattson ultrasonik yıkama cihazı	41
3.4. Titanyum diskin AFM cihazındaki görüntüsü (Veeco MultiMode V)	43
3.5. Titanyum disklerin AFM ile yüzey topografisinin belirlenmesi	44
3.6. Titanyum diskin SEM ve EDX görüntüsü (QUANTA 400F Field Emission)	45
3.7. Temas açısı ( $\theta$ )	46
3.8. Temas açısı ölçüm cihazı (Attension Theta)	46
3.9. (A) Su damlasının disk yüzeyine temas ettiği an, (B) Bilgisayar ekranındaki görüntüsü görülmektedir.	47
3.10. Temas açısı etkileşim diyagramı	48
3.11. Saos-2 hücrelerinin T75 flaskta DMEM besiyeri içerisindeki görüntüsü	50
3.12. Laminar akış kabini	50
3.13. Sanyo MCO-18 model hücre kültür inkübatörü	51
3.14. Thoma lamının üst ve yan kesiti	51
3.15. Thoma lamının sayım bölmelerinin milimetrik gösterimi	52
3.16. Lamda sayılan hücrelerin görüntüsü	53
3.17. 24 kuyucuklu plakalarda hücre ekimi	54
3.18. Formazan kristallerinin görüntüsü	55
3.19. ELISA plak okuyucu	55
3.20. Dil boyasının yapısı ve eksitasyon/emisyon değerleri	56
3.21. Zeiss Examiner A1 floresan mikroskobu	57
3.22. Enzimatik ALP aktivitesinin spektrofotometrik prensibi	58
4.1. Titanyum kontrol disklerinin AFM görüntüleri.	61
4.2. Lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin AFM görüntüleri.	62
4.3. SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin AFM görüntüleri.	63
4.4. Lazer ve SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin AFM görüntüleri.	64
4.5. Titanyum kontrol disklerinin SEM görüntüleri.	65
4.6. Lazer ile işlenmiş titanyum disklerin SEM görüntüleri	66
4.7. SLA ile işlenmiş titanyum disklerin SEM görüntüleri	67
4.8. Lazer+SLA ile işlenmiş titanyum disklerin SEM görüntüleri	68



<b>4.9.</b>	Titanyum kontrol disklerinin EDX sonuçları	69
<b>4.10.</b>	Lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin EDX sonuçları	70
<b>4.11.</b>	SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin EDX sonuçları	71
<b>4.12.</b>	Lazer+SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin EDX sonuçları	72
<b>4.13.</b>	Titanyum kontrol disklerinin yüzey temas açısı ölçümü	75
<b>4.14.</b>	Lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin yüzey temas açısı ölçümü	76
<b>4.15.</b>	SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin yüzey temas açısı ölçümü	77
<b>4.16.</b>	Lazer+ SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin yüzey temas açısı ölçümü	78
<b>4.17.</b>	Saos-2 hücrelerinin farklı günlerde (1, 3, 7 ve 10. günler) gösterdikleri büyüme davranışının ışık mikroskobu altında 10 X büyütme ile izlenmesi	79
<b>4.18.</b>	Saos-2 hücrelerin 2. gündeki yüzde canlılık değerleri	80
<b>4.19.</b>	Saos-2 hücrelerin 3. gündeki yüzde canlılık değerleri	81
<b>4.20.</b>	Saos-2 hücrelerin 7. gündeki yüzde canlılık değerleri	82
<b>4.21.</b>	Saos-2 hücrelerinde gruplar arası anlamlılığın kutu grafiği ile gösterimi	85
<b>4.22.</b>	Saos-2 hücrelerinde gruplar arası anlamlılığın kutu grafiği ile gösterimi	86
<b>4.23.</b>	Saos-2 hücrelerin 2. gündeki alkalen fosfataz aktivite değerleri	87
<b>4.24.</b>	Saos-2 hücrelerin 3. gündeki alkalen fosfataz aktivite değerleri	87
<b>4.25.</b>	Saos-2 hücrelerin 7. gündeki alkalen fosfataz aktivite değerleri	88
<b>4.26.</b>	Kontrol disklerinin üzerine ekilmiş Saos-2 hücrelerinin flüoresan mikroskobi altındaki A) 10X ve B) 40X büyütme görüntüleri.	89
<b>4.27.</b>	Lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin üzerine ekilmiş Saos-2 hücrelerinin flüoresan mikroskobi altındaki A) 10X ve B) 40X büyütme görüntüleri.	90
<b>4.28.</b>	SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin üzerine ekilmiş Saos-2 hücrelerinin flüoresan mikroskobi altındaki A) 10X ve B) 40X büyütme görüntüleri.	91
<b>4.29.</b>	Lazer ve SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin üzerine ekilmiş Saos-2 hücrelerinin flüoresan mikroskobi altındaki A) 10X ve B) 40X büyütme görüntüleri.	92

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Dental implantın başarılığına sebep olan faktörler	9
<b>3.1.</b> Grade 5 titanyumun kimyasal bileşimi	39
<b>3.2.</b> Grade 23 titanyumun kimyasal bileşimi	39
<b>4.1.</b> AFM kullanılarak elde edilen Ra ölçümleri tablosu	60
<b>4.2.</b> Örneklerin EDX sonuçlarının tablo halinde gösterimi	73
<b>4.3.</b> Temas açısı $\theta$ değerleri	74
<b>4.4.</b> Saos-2 hücrelerin 2. gündeki yüzde canlılık tablosu	80
<b>4.5.</b> Saos-2 hücrelerin 3. gündeki yüzde canlılık tablosu	81
<b>4.6.</b> Saos-2 hücrelerin 7. gündeki yüzde canlılık tablosu	82
<b>4.7.</b> Saos-2 Hücrelerinin 48. ve 72. saatteki canlılık yüzdelerine ait ortalama ve standart sapma verilerinin istatistik değerlendirmesi özet tablosu	84
<b>4.8.</b> Saos-2 Hücrelerinin 48. saatteki canlılık yüzdelerinin gruplar arası anlamlılığının tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirmesi	84
<b>4.9.</b> Saos-2 Hücrelerinin 72. saatteki canlılık yüzdelerinin gruplar arası anlamlılığının Welch testi ile değerlendirmesi	85

## 1. GİRİŞ

30 yılı aşkın süredir dental implantlar kullanılmaktadır. Dental implantların kullanımı oral ve maksillofasiyal cerrahide gözle görülür bir şekilde gelişim göstermektedir. Yaşlanma, kazalar veya estetik sebeplerden kaynaklanan tek veya çoklu diş kayıplarında implantlar sıklıkla kullanılmaktadır. Dental implantlar ayrıca kraniyal rekonstrüksiyonlar da ve ortodontik tedavilerde de kullanılmaktadır (1, 2).

Titanyum 1971 yılında amatör mineralog William Gregor tarafından keşfedilmiştir. 1975 yılında Alman kimyacı Martin Heinrich Klaproth tarafından isimlendirilmiştir. Saf titanyum dünyada en fazla bulunan metallere dendir. 2. Dünya savaşından sonra titanyum medikal cerrahide ve dental aletlerde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde saf titanyum ve alaşımları titanyumun öne çıkan mekanik ve fiziksel özellikleri sayesinde ortopedik ve dental implant yapımında kullanılmaktadır. Korozyona olan direnci, yüksek elastisite gerilimi ve mükemmel biyouyumluluğa sahip oluşu bu özellikler arasında gösterilmektedir (3). Saf titanyumdan sonra Titanyum-6-Alüminyum-4-Vanadyum (Ti-6Al-4V) alaşımları da ortopedik ve dental implantlar başta olmak üzere biomedikal uygulamalarda gelişmiş mekanik kuvvetinden ötürü sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca Ti6-4 ve Ti grade 5 olarak da adlandırılmaktadır (4).

Titanyum ve alaşımlarının mükemmel fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip olmasının bir örneği de havayla temas ettiğinde kendiliğinden oluşan doğal oksit tabakasına ( $TiO_2$ ) sahip olmalarıdır (5). Bu tabaka nanometre düzeyinde bir kalınlığa sahiptir (6). Aynı zamanda oksit tabakası, titanyumun kimyasal stabilitesini, kimyasal olarak reaksiyona girmemesini, korozyon rezistansını ve biyouyumlu olmasını sağlar (5).

Titanyum oksit tabakası iyonları, proteinleri, polisakkaritleri ve proteoglikanları absorbe etmeye başlar (7, 8). Daha sonra makrofajlar, nötrofiller ve osteoprogenitör hücreler kemik ve implant ara yüzeyine göç ederek implant yüzeyinde kemik appozisyonunu başlatır (8). Kemik ve implant arasında direkt kontak olsa da bu durumun gerçekleşmediği durumlar da olabilmektedir. 20-50 nm

kalınlığında (9) ince bir amorf bölge veya lamina limitans oluşabilir (8-10). Başka çalışmalarda 400nm'ye kadar yayıldığı gösterilmiştir (10). Osseointegrasyonun başarılı olabilmesi için en az 3 ile 5 ay arasında bir zamana ihtiyaç duyulmaktadır (7). Ayrıca dental implantlarda hemen yükleme protokolü uygulandığı zaman osseointegrasyon süreci daha da karmaşık bir hal alabilmektedir. Bu nedenle aşağıda belirtilen sebepler üreticileri yeni titanyum alaşımlara ve farklı yüzey işlemleri uygulamaya teşvik etmektedir (11).

- Yüksek korozyon direnci, düşük elastisite modülü, yüksek mekanik kuvvet ve yıpranma dolayısıyla olabilecek kırıklardan kaçınmak.
- Biyolojik kayıplardan kaçınmak amacıyla alerjik reaksiyonların olmadığı, sitotoksiteden ve kanserojenik etkilerden uzak daha biyouyumlu bir yapı elde etmek.
- Daha biyoaktif yüzeyler sayesinde daha hızlı ve gelişmiş osseointegrasyon elde etmek.
- Antimikrobiyal özellikleri arttırarak enfeksiyona bağlı kayıpları azaltabilmek.

İmplant yüzey işlemleri genellikle, titanyum ve titanyum alaşımlarının tornalanmasının ardından yapılsa da, lazer metal sinterleme yöntemleri kullanılarak da yüzey pürüzlülüğü uygun hale getirilebilir (12). Bu işlem hızlı bir prototipe dayanır. Bilgisayar destekli tasarım / bilgisayar destekli üretim (CAD/CAM) verileri sayesinde yüksek kuvvetteki lazer ışınları metal toz yatağına odaklanır, metallerin eriyerek birleşmesini ve ince bir metal tabaka oluşmasını sağlar. Bu süreç tabakaların birbirleriyle birleşerek, belirlenen üç boyutlu şekil elde edilene kadar devam eder (13, 14). Sonuçta ortaya çıkan yüzeyin gözeneklilik derecesi uzun eksene dik olarak gözlemlenir ayrıca yüzey yüksek poroziteye sahiptir. Bunlara ek olarak lazer sinterleme işleminden sonra oluşan bu poröz yapı, birbirini tekrar eden ve aynı zamanda birbirine bağlı gözeneklerden meydana gelir. Bu da potansiyel olarak osseointegrasyonu arttıran bir yapı oluşmasına sebep olur (15, 16). Oluşan bu kademeli yapı, titanyumun elastik modülü ile titanyumu çevreleyen kemik arasındaki elastik modülüs arasındaki uyumsuzluğu azalttığı için ara yüz gerilmesinde arzu edilen bir düşüş gözlemlenmiş olur (14).

Çalışmamızın amacı, (Ti-6Al-4V) alaşımı olan Grade 5 tornalamış titanyum materyal yüzeyinin, SLM yöntemi kullanılarak Grade 23 titanyum alaşımı ile kaplanması sonrası oluşan pürüzlü yüzeyde, kemikten köken alan adherent özellikli osteoblast-benzeri insan Saos-2 hücrelerinde proliferasyonunun değerlendirilmesidir. Çalışma ana hatlarıyla iki kısımdan meydana gelmektedir; yüzeyi pürüzlendirilen titanyum disklerin ileri karakterizasyonu ve canlı hücreler kullanılarak in vitro yaklaşımla biyoyumluluğun tespit edilmesi. Karakterizasyonu belirlemek için yüzey temas açısı ölçümü, atomik kuvvet mikroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi ve enerji ayırmalı x- ışını spektroskopi yöntemleri kullanılacaktır. Burada amaç yüzeylerin topografik farklılıklarının AFM ve SEM gibi 3 boyutlu görüntüleme teknikleriyle kalitatif ve kantitatif parametrelere dayanarak gösterilmesidir. Saos-2 hücreleri yüksek osteojenik hücre başkalaşımına sahip olması ve farklı matrikslerle kuvvetli etkileşime sahip olması nedeniyle insan kaynaklı çalışmalara uygun in vitro bir modeldir. Çalışmanın biyoyumluluk kısmında hücrelerin canlılığını ve çoğalma yeteneğini belirlemek için MTT testi, Saos-2 hücrelerinin osteoblastik başkalaşımını ve hücrelerin çoğalırken fonksiyonelliğini koruduğunu göstermek için enzimatik Alkalen fosfataz (ALP) testi uygulanacaktır. Farklı yüzeylerde hücrelerin üç boyutlu yerleşimini göstermek amacıyla flüoresan ajan ile boyamayı takiben mikroskopik inceleme yapılacaktır. Çalışmanın temelinde dört farklı pürüzlendirme işlemi uygulanmış titanyum diskler artan hassasiyette biyoyumlu yüzeyler oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Böylelikle ortaya içsel mekanik kuvveti yüksek, farklı topografilere sahip, canlı hücrelerin yüksek bağlılıkla tutunmasına ve karakteristiklerini kaybetmeden çoğalmasına elverişli yüzeyler oluşturulması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda öngörülen sonuç osseointegrasyon sürecini hızlandırmak böylelikle protetik yükleme protokollerinin süresini kısaltmaktır. Bu sayede literatüre yeni bir yüzey işleme tekniğinin sunulması planlanmaktadır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. İmplant Nedir?

İmplant sözcük olarak Latince bitki ekmek anlamını taşıyan 'implantare' fiilinden gelmektedir. Dental implantlar; çürük, periodontal hastalık, travma, neoplazi ve konjenital defektler sebebiyle kaybedilen dişler veya orafasiyel yapıları yerine koyabilmek için maksilla ya da mandibulaya yerleştirilen soy ve alloplastik materyallerdir.

Günümüzde implantlar saf titanyum veya titanyumun temel bileşenlerini içeren titanyum alaşımları olarak bulunmaktadır. Ancak seramik, alüminyum oksit veya diğer bileşikler de içeren (altın, nikel-krom-vanadyum) implantlar mevcuttur. İmplantlar genellikle erken osseointegrasyonu sağlayabilmek için plazma püskürtülerek kaplanmış bir yüzeye veya hidroksiapatit ile kaplanmış bir tabakaya sahiptir (17).

### 2.2. Dental İmplantolojinin Gelişimi

1600'lü yılların ortalarında Avrupa'da periodontal olarak riskli dişler çeşitli yöntemlerle ağız içerisinde stabil duruma getirilmiştir. 1809'da J. Maggiolo yeni bir ekstraksiyon alanına altın bir implant tüpü yerleştirdi. Bu bölgenin iyileşmesi sağlandı ve daha sonra üzerine kron yaptı. Maalesef işlem sonrasında diş etinde yaygın inflamasyon gelişti. Daha sonraki süreçte sayısız madde implant olarak kullanıldı; Bunlar arasında gümüş kapsüller, oluklu porselen ve iridyum tüpleri bulunmaktadır (18).

1913'de Dr. EJ Greenfield, "24-karat altın ile lehimlenmiş iridyum-platin 24-gauge hollow latticed cylinder" yapay bir kök olarak "hastanın çene kemiğinde tam dairesel kesiyeye uyacak şekilde" yerleştirmiştir (19). 1930'larda iki kardeş Drs. Alvin ve Moses Strock, Vitalyum'dan (krom-kobalt alaşımı) yapılmış ortopedik vidaları incelemişlerdir. Bu vidaları, dişleri restore edebilmek için insanlara ve köpeklere yerleştirdiler. Bu sayede Vitalyum vidası, eksik dişin yerine konması için destek sağlamıştır (20). Böylece Strock kardeşlerin endosteal implant yerleştiren ilk başarılı kişiler olduğu düşünülmektedir (21).

1960'ların ortalarında, oral implantlar çok nadir kullanılmaktaydı. Tipik olarak kullanılan tasarımlar, subperiostal, transmandibular veya blade formunda olanlardı ancak

bunlardan hiçbiri klinik olarak düzgün bir şekilde belgelenememiştir. Brånemark, ilk oral implantını 1965 yılında yerleştirmiştir. Takip eden 5 yıl içerisinde, klinik sonuçları kabul edilemeyecek derecede zayıftı ve başarı oranları yaklaşık % 50 seviyesinde olmuştur. Brånemark'ın erken sonuçları, yabancı materyalin ağız boşluğunda, enfeksiyon riski de dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle işe yaramadığını doğrulamaktadır (22). Bunun üzerine implantlar bazı tasarım değişiklikleri ile daha geniş hale getirilmiştir, implant yerleşimi sonrası iyileşme süresi uzatılmış ve protetik tedavilere ilişkin değişiklikler yapılmıştır (23, 24).

Brånemark yaklaşımı belirsiz bir şekilde ilerlemesine rağmen, ilk yıllarda İsveç'te diş hekimleri tarafından ciddi bir şekilde eleştirilmiştir. Bu eleştirilerin ilk sebebi osseointegrasyon teriminin birçok kişi tarafından imkansız kabul edilmesidir. Bunun sebebi yabancı bir cismin asla kemikte düzgün bir şekilde bağlanamayacağını düşünülmesidir (25). İsviçre'deki vidalı implantların ilk nesli implant çevresindeki kemik oluşumunu tam sağlayamadığı için tartışmalara karşı koyamamıştır, aynı şekilde Almanya'da üretilen seramik implantlar da görülen kırılmalardan dolayı klinik kullanımdan çekilmiştir (26). Schröder implantlarının daha da geliştirilmesi, bugünkü Straumann SLA implantları (Straumann, Waldenburg, İsviçre) ile sonuçlanırken, Schulte'nin Frialit 1 seramik implantının yerini ticari olarak saf titanyum Dentsply Frialit-2 implantları (Dentsply, Woodbridge, Ont.) almıştır. Kuzey Amerika'daki gelişmeler ise başlangıçta 1978 Harvard konsensus konferansı ile sınırlıydı. Bu toplantıda, implant başarısı için bir takım kriterler kabul edilmiştir. Bunlara implant boyunun üçte birini aşmayan kemik kaybı ve 1mm'ye kadar implant hareketi dahil edilmiştir (27).

1977'de dış kulak eksikliği olan bir hasta ilk olarak implant ile tedavi edildi. Ekstraoral kraniyofasiyel implantlar üzerine ilk klinik raporlar 1981'de yayınlanmıştır (28, 29). Zarb ve arkadaşları ortopedik ameliyatlarda polimetil metakrilatı (PMMA) implant ankrajı amacıyla kullanmıştır ve halen kullanılmaktadır (30).

Zarb, ilk uluslararası ekibin osseointegrasyon ilkelerini öğrenmesini sağlamıştır. Bir cerrah ve bir radyolog da dahil olmak üzere beş klinisyen, Brånemark implant yerleştirme yöntemini öğrenmek için 1970'lerin sonlarında İsveç'e gelmiştir. Osseointegre implantlar,

yabancı materyallerin klinik başarı açısından iyi bir etkiye sahip olmasından dolayı oral implantolojide bir atılım oluşturmuştur (22).

1982 Toronto konferansı, implant diş hekimliği için son derece önemli bir adım olmuştur. Zarb, Kuzey Amerika'daki tüm önemli dişhekimliği fakültesi temsilcilerini osseointegrasyon konulu bir konferansa davet etme girişiminde bulunmuştur (31). Osseointegrasyonun nihai kabulüne doğru diğer önemli bir adım, doku-entegre Protezler: Klinik Diş Hekimliğinde Osseointegrasyon 1985 yılında yayınlandı (32). Özellikle ilgi çeken bir başka konu, farklı hasta kategorilerinde klinik sonuçlar, örneğin yaşlı hastalar. Açıkçası, yaşlı hastalar genç hastalara göre osseointegre implantlarla daha sık tedavi edildi. Bununla birlikte, genç hastalarda olduğu gibi yaşlılarda da klinik sonuçların iyi olup olmadığı genel olarak bilinmemekteydi. Zarb ve Schmitt, 1990'da geriatric hastalarda osseointegre implantların uzun vadeli etkililiğini belgeleyen literatürün gerçekten sınırlı olduğu sonucuna varmıştır (33).

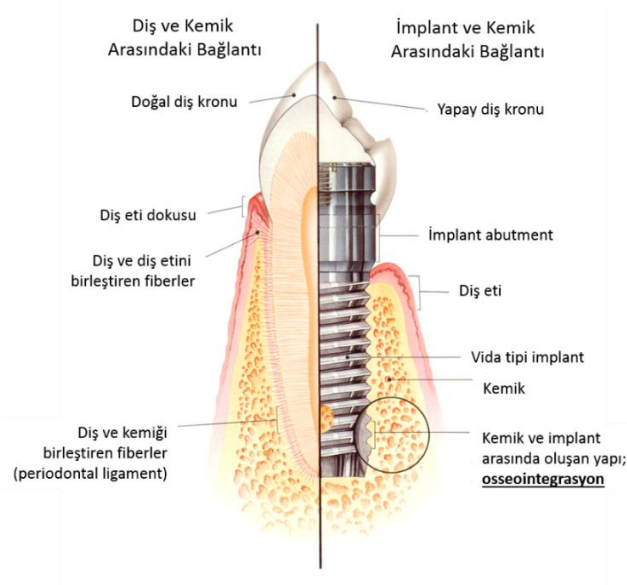
### **2.3. Osseointegrasyon**

#### **2.3.1. Osseointegrasyon Nedir?**

Osseointegrasyon terimi ilk olarak Brånemark ve meslektaşları tarafından tanımlandı (24). Canlı bir kemik ve implant arasındaki doğrudan temas (ışık mikroskobu seviyesinde) olarak Albrektsson ve arkadaşlarının bir makalesinde yayınlandı (34). Osseointegrasyon histolojik olarak Dorland'ın resimli medikal sözlüğünde, kemik-implant arayüzünde fibröz doku büyümesi olmadan kemikli doku oluşumuyla birlikte bir bağlanma olması olarak gösterilmektedir. Histolojik tanımların kısıtlı bir klinik uygulamaya sahip olması nedeniyle bazı kusurları olduğu için osseointegrasyonun biyomekanik açıdan daha iyi bir tanımlaması önerilmiştir: "Klinik olarak asemptomatik olan alloplastik materyallerin sabit fiksasyonuna olanak sağlayan ve fonksiyonel yükleme esnasında kemiğin içinde tutulan bir süreç " olduğu belirtilmiştir (35).

Endosseous implantların kemik içine cerrahi olarak yerleştirilmesinden sonra, osseointegrasyon süreci başlar. Bu süreçte canlı kemik dokusuyla titanyum yüzey arasında yapısal ve fonksiyonel bir bağ oluşur (23).





**Şekil 2.1.** Osseointegrasyon yapısı (36)

Titanyum yüzeyinde oluşan oksit tabakası biyolojik olarak uyumludur, reaktiftir ve spontan olarak kalsiyum-fosfat apatiti oluşturmaktadır (37). Ayrıca implant yüzeyinde oluşan titanyum oksit tabakası gingivadan içeriye oral mikroorganizmaların girmesini kısıtlar. Sonuç olarak implant/yumuşak doku arayüzü bu özelliğiyle diş ve diş eti ara yüzüne benzerlik gösterir (34).

### 2.3.2. Osseointegrasyonda Başarı ve Başarısızlık

Dental implantın başarılı osseointegrasyon kriterleri verilmiştir (34). Bunların arasından, olduğundan fazla mobilite 'gevşeklik' çok büyük bir öneme sahiptir. İmplantın çıkarılması için en çok belirtilen nedendir (38). Adell 895 implantın yerleştirilmesinden sonra 5-9 yıl boyunca oluşan başarı oranını gözlemlemiştir. Çalışmanın sonucunda maksillada %81 oranında ve mandibulada %91 oranında sağ kalım oranı gözlemlemiştir (39).

Yüksek başarı oranlarına rağmen, implant bağlantı başarısızlığı oluşabilir ve 'Osseointegrasyon oluşturmak veya sürdürmek için konak dokunun yetersizliği' olarak tanımlanır (40). Yapılan bir çalışmaya göre implantların yerleştirilmesinin ardından yaklaşık %2'sinin osseointegre olamadan başarısızlığa uğradığı

gözlemlenmiştir. Yapılan bir meta-analize göre, Branemark dental implantların 5 yıl içindeki başarısızlık oranını %7.7 olarak belirtmiştir (kemik greftleri hariç). Tam dişsiz hastalardaki başarısızlık oranları, bölümlü dişsizliği olan hastalara oranlara neredeyse iki kat daha fazla bulunmuştur (%7.6'ya karşı %3.8). Buna ek olarak, dişsiz maksilladaki başarısızlık, dişsiz mandibuladaki başarısızlığa kıyasla 3 kat daha fazla bulunmuştur (41).

Peri-implantitis, fonksiyonel olarak osseointegre bir implant etrafındaki dokuları etkileyen, destekleyici kemiğin kaybına neden olan enflamatuar bir süreç olarak betimlenmiştir. Dental implantların başarısızlık belirtileri klinik ve radyolojik olarak periodontitise benzer olarak tesbit edilir (42). Bu, implant çevresi gingival bağlantı kaybı, sondalamada kanama, plak / diş eti indeksi, süpürasyon ve mobilite gibi klinik parametlerin ölçülmesini içerir. Diğer ilgili değerlendirmeler arasında peri-implant bölgenin radyografik muayenesi ve mikrobiyolojik örnekleme yer alır. Seçilen implant sistemleri içinde olguların % 5-8'inde periimplantitis bildirilmiştir (43).

### **2.3.3. İmplant Başarısızlıklarının Sınıflandırılması**

İmplant başarısızlığı 2 şekilde tarif edilebilir. İlkinde destek kemik progresif olarak kaybolmuştur, ancak implant klinik olarak hareketsizdir. Diğerinde ise implant klinik olarak mobil durumdadır (44). İmplant mobil olduğunda çıkarılması önerilmektedir buna karşın başarısız ama mobil olmayan bir implant erken teşhis edilip uygun bir tedavi uygulandığında kurtarılabilir (45, 46).

İmplant başarısızlıkları erken veya geç olarak kategorize edilebilir. Erken başarısızlık implant osseointegrasyonu oluşmadan ve protetik rehabilitasyon yapılmadan önce, geç başarısızlık ise daha sonrasında oluşur. Dental implantların erken başarısızlığını etkileyen faktörler genel olarak; implant, hasta ve cerrahi teknik / çevre ile ilişkili olarak sınıflandırılabilir (Tablo 2.1.). Geç dönem başarısızlıklarının etyolojisi daha karmaşıktır ve daha az hastada görülür (47). Bu durum daha çok yükleme koşullarının kemiğin kalitesi ve hacmiyle olan ilişkisine ve peri-implantitise bağlı olarak değişir (48).

**Tablo 2.1.** Dental implantın başarılığına sebep olan faktörler(48-53)

<b>Faktör</b>	<b>Sebeup</b>
İmplant	Önceki başarısızlık Yüzey pürüzlülüğü Yüzey saflığı ve steriliti Uyum bozukluğu Ağız içinde maruz kalma süresi Yükleme ile ilgili değişkenler
Mekanik olarak aşırı yüklenme	Yetersiz restorasyonlara bağlı oklüzal travma
Hasta(lokal faktörler)	Oral hijyen Gingivitis Kemik miktarı ve kalitesi Çevre dokuda enfeksiyon / enflamasyon Doğal dişlerin varlığı Doğal dişlerin periodontal durumu İmplant oluğunda yabancı cisimlerin (cerrahi prosedür sırasındaki kalıntılar dahil) kalması Yumuşak doku varlığı Damarlanma miktarı
Hasta(sistemik faktörler)	Sigara kullanımı Alkolizm Enfeksiyona yatkınlık, yaş, obezite, steroid tedavisi, beslenme bozukluğu, metabolik hastalık (diabet) Sistemik rahatsızlıklar Kemoterapi / Radyoterapi İmplant bileşenlerine karşı aşırı duyarlılık
Cerrahi teknik/ Çevre koşulları	Cerrahi travma Aşırı ısınma Perioperatif bakteriyel kontaminyasyon, örnek: tükürük, perioral doku, aletler, eldivenler, ameliyathanede bulunan hava, hasta tarafından solunan hava

Yukarıda belirtilen faktörler, implantların kemiğe bağlanma başarısızlığıyla ilgili olsa da bazen enfeksiyöz süreç implantın üzerini örten yumuşak dokuda oluşabilir ve bunun sonucunda peri-implant mukozit görülebilir (46). Yumuşak doku

problemleri olan bir implant, kemik kaybı olan bir implanta göre daha iyi bir prognoza sahiptir (54). Bununla birlikte, yumuşak dokulardan kaynaklanan enfeksiyon problemi potansiyel olarak kemiğe daha da ilerleyebilir ve osseointegrasyon sürecini zayıflatabilir. İyileşme sürecinde yumuşak dokuda görülen enfeksiyon probleminin en önemli sebepleri arasında; zayıf oturan vida kapakları, rezidüel sütün materyali, karşıt dişe bağlı okluzal travma ve yetersiz rahatlatılmış hareketli protezlerden meydana gelen travma söylenebilir (45).

#### **2.4. Dental İmplant Başarı Kriterleri**

İmplant tedavilerinde başarıyı tanımlamak üzere ilk araştırmalar Amerika Sağlık Enstitüsü'nün eşliğinde başlamış ve 1978'de toplanan Harvard Üniversitesi Konsensus Konferansı'nda implant tedavilerinin avantajları ve riskleri incelenmiştir. Bu toplantıda implant tedavilerinin başarısı subjektif ve objektif kriterler açısından ele alınmıştır (55).

##### **1.Objektif Kriterler**

- Kemik kaybının vertikal boyutun 1/3'ünden daha fazla olmaması
- Tedavi edilebilir gingival enflamasyon
- Enfeksiyon semptomlarının olmaması
- Uygun oklüzal denge ve vertikal boyut
- Komşu dişlere zarar verilmemesi
- İmplantın herhangi bir yöndeki mobilitesinin 1mm'den az olması
- Kollajen dokuların sağlıklı olması
- Anestezi, parestezi gibi durumların veya maksiler sinüs, burun tabanı veya mandibular kanalda herhangi bir komplikasyon vakasının olmaması

##### **2.Subjektif Kriterler**

- Rahatsızlık hissinin olmaması
- Estetiğin daha iyi hale gelmesi
- Yeterli fonksiyon
- Psikolojik ve duygusal olarak hastanın daha iyi bir hale gelmesi

**3. 5 yılda %75 oranında fonksiyonel olarak kullanım sağlanmalıdır.**

Albrektsson ve arkadaşları (47) 1986 tarihinde implant çevresindeki kemik miktarını ve implant mobilitesini esas alan yeni kriterler önermişlerdir.

- ✓ Klinik olarak kontrol edildiğinde implantta tek başına hareketlilik olmamalıdır.
- ✓ İmplant çevresinde radyografik olarak herhangi bir radyolüsent bölge görülmemelidir.
- ✓ Geri dönüşü olmayan enfeksiyon, parestezi, ağrı, mandibular kanal perforasyonu veya nöropati gibi belirtiler olmamalıdır.
- ✓ İmplantın yüklenmesinin 1. yılı sonunda implant bölgesindeki vertikal kemik kaybı 0.2mm'yi geçmemelidir. (yüklemenin yapıldığı ilk yıl marjinal kemik kaybı 1.5 mm'den az olmalıdır.)
- ✓ 5 yıllık gözlem sonucunda %85, 10 yıllık gözlem sonucunda ise %80 oranında yukarıdaki kriterleri yerine getirmelidir.

2007 yılında İtalya'da gerçekleştirilen bir konferansta James-Misch sağlık skalası modifiye edilmiş ve sağkalım, başarı ve başarısızlık koşullarını içeren 4 klinik kategori belirlemiştir. İdeal klinik şartları tanımlamak için implant başarı terimi kullanılmaktadır ve aynı zamanda implantlar için 12 aylık dönemi kapsamaktadır. 1-3 yıl arası dönem için erken implant başarı terimini, 3-7 yıl arası dönem için orta dereceli implant başarı terimini ve 7 yıldan fazla olan dönem için ise uzun dönem implant başarı teriminin kullanılması önerilmiştir. İmplant başarı oranının aynı zamanda protetik sağkalım oranını da içermesi gerektiği belirtilmiştir (56).

## **2.5. Dental İmplantların Sınıflandırılması**

### **2.5.1. Kullanılan Materyal Tipine Göre**

İmplant materyalleri, kullanılan materyalin türüne ve implante edildiklerinde ortaya çıkardıkları biyolojik tepkiye göre sınıflandırılabilir (57).

**a) Metaller**

- Altın
- Kobalt-Krom alaşımları(Co-Cr)
- Paslanmaz çelik
- Niobyum
- Ticari Saf Titanyum
- Titanyum Alaşımları (Ti-6Al-4V)

**b)Seramikler**

- Alüminyum Oksit
- Zirkonyum Oksit
- Hidroksilapatit
- Trikalsiyum Fosfat
- Karbon-silikon
- Biyo cam

**a) Polimerler**

- Polietilen(PE)
- Poliamid
- Polimetilmetakrilat(PMMA)
- Polietrafloroetilen(PTFE)
- Poliüretan

Eksik bir dişin yerini almak için birçok materyal implant olarak denenmiştir. Bilim ve Teknolojideki gelişmelerle birlikte diş implantları için mevcut olan materyallerde gelişmiştir (58).

1970'lerden beri nikel-krom (Ni-Cr) ve kobalt-krom (Co-Cr) alaşımları, sabit ve hareketli kısmi protez alt yapılarının üretiminde popüler tercih olmuşlardır (59, 60). Bununla birlikte, nikel ve berilyum içeren alaşımların araştırılması, biyolojik güvenlik konusundaki şüpheler nedeniyle sınırlı kalmıştır (61, 62).

1970'lerde titanyum diş hekimliğinde döküm uygulamaları için tanıtılmıştır. 1980'lerde ise kron ve çıkarılabilir kısmi protez uygulamalarında popüler olmuştur (63). Titanyum'un yüksek erime noktası ( $\pm 1700^{\circ}\text{C}$ ), reaktivite özelliği ve düşük

yoğunluğa sahip olması klasik santrifüj döküm makineleri ile döküm yapmayı zorlaştırır (64). Titanyumun artan kullanımı, eritilmiş alaşımın vakum enjeksiyonuna izin veren döküm makinelerinin gelişimini sağlamış olduğu söylenebilir (64, 65).

Buna ek olarak, bu metalin yüksek kuvveti ve düşük ağırlığı, Tip IV altın alaşımlarına benzer mekanik performansa sebep olur. Birçok titanyum alaşım çeşidi mevcut olmasına rağmen, titanyum-alüminyum-vanadyum alaşımı (Ti-6Al-4V), fiziksel ve mekanik özellikleri, ticari olarak saf titanyumunkinden daha üstün olduğu için en yaygın olarak kullanılan türüdür. (CP Ti, 99.8% titanium). CP Ti'ye kıyasla, Ti-6Al-4V, daha fazla bükülme kuvvetine, üstün sertliğe ve biraz daha yüksek termal genişleme katsayısına sahiptir. Sonuç olarak, Ti-6Al-4V'nin mekanik özellikleri Ni-Cr ve Co-Cr alaşımlarının mekanik özelliklerine benzerdir (65).

Titanyum, hem sert hem de yumuşak dokularla iyi etkileşime girerek mükemmel biyouyumluluk sağlar ve Co-Cr ve Ni-Cr alaşımlarına biyolojik olarak en uyumlu alternatif olarak gözlenir (66-69). Yüzeyinde anlık ve kendiliğinden oluşan oksit tabakası nedeniyle, titanyum statik koşullar altında korozyona karşı oldukça dayanıklıdır (70).

### **2.5.2. Yerleştirildikleri Yere ve Destek Dokulara Göre (71)**

- Endosseöz (Kemikiçi) implantlar
- İntramukozal implantlar
- Endodontik implantlar
- Transosseöz(Transmandibular) implantlar
- Subperiostal implantlar

### **2.5.3. Gövde Tasarımlarına Göre**

- Vida tipi implantlar
- Silindirik implantlar
- Sıkıştırılarak yerleştirilen implantlar
- Bu özelliklerin kombinasyonunu içeren implantlar

#### 2.5.4. Yüzey Özelliklerine Göre İmplantların Sınıflandırılması

- a) İşlenmemiş yüzeyli implantlar
- b) İşlenmiş yüzeyli implantlar
  - Parlatılmış yüzeyli implantlar
  - Kumlanarak pürüzlendirilmiş yüzeyli implantlar
  - Asitle pürüzlendirilmiş yüzeyli implantlar
  - Kumlanmış ve asitle pürüzlendirilmiş (SLA) yüzeyli implantlar
  - Lazerle pürüzlendirilmiş yüzeyli implantlar
  - Pöröz yüzeyli implantlar
- c) Kaplanmış Yüzeyli İmplantlar
  - Titanyum plazma sprej (TPS) kaplı implantlar
  - Seramik kaplı implantlar
- d) Kombine İmplantlar

#### 2.6. Dental İmplant Tasarımı

Dental implantın tasarım özellikleri, diş implantının kritik özelliklerinden biridir. Primer stabilite ve implantın osseointegrasyonu sonrası yüklemeyi sürdürme kabiliyeti üzerinde çok büyük bir etkiye sahiptir. Kemik-implant ara yüzeyinin genel stabilitesi, implantın ömrünün korunması açısından önemlidir. Kemik- implant arayüzeyinin stabilitesi için en önemli ölçütleri arasında, ara yüzde farklı uzunluklar, çap ve yüzey malzemeleri kullanarak yük aktarımı sağlanmasıdır. Çeşitli implant tasarımlarının biyomekanik özelliklerini değerlendirirken, implant ve implantı çevreleyen kemik arasındaki stres iletimi, implantın başarısını veya başarısızlığını belirlemek açısından büyük önem taşır. Kemik-implant arayüzünde yük transferini etkileyen faktörler arasında; yükleme türü, implant ve protezin malzeme özellikleri, implantın geometrik uzunluğu, çapı ve şekli, implantın yüzey yapısı, kemik implant arayüzünün yapısı ve çevresindeki kemiğin kalitesi ve miktarı söylenebilir (72).

Kemik-implant arayüzünde yük transferini etkileyen en önemli biyomekanik faktörler uzunluk, çap ve gövde şeklidir. Uzun vadeli implantasyon başarısı için



gerekli optimum uzunluk ve çap, kemik desteğinin kalitesine bağlıdır. Tip 1 ve 2 kemikte, uzunluk ve çap implant başarısı için önemli faktörler gibi görünmemektedir. Tip 3 ve 4 kemikte ise büyük çaplı implant önerilir ve kısa implantlardan kaçınılmalıdır (73).

İmplant çapındaki bir artış, kortikal kemikteki stres tepe değerlerinde belirgin bir düşüşe neden olurken, implantın uzunluğundaki bir varyasyon, yalnızca kansellöz kemik / implant arayüzünde oluşan stres üzerine etki eder (74).

Uzunluk ve genişliğe ek olarak, yiv şekli ve yiv detayları, kemik implant arayüzünde yerel stres modelleri üzerinde baskın bir rol oynar. Yiv tasarımının nihai amacı yüklemeye esnasında stress tepe noktalarını önlemek veya en aza indirmek olmalıdır. Bu bağlamda, yiv derinliği (yivin büyük ve küçük çapları arasındaki mesafe) hem trabeküler hem de kortikal kemikte implant stabilitesi üzerinde çok önemli bir role sahip olduğu görülmektedir (75).

## 2.7. Dental İmplant Formu

Diş implantlarının şekilleri geleneksel kök formlarından bıçak ve subperiosteal tasarımlara kadar çeşitlilik göstermektedir (76). Diş implantlarının şekli, endosseöz sistemler arasında tasarımın en çok tartışılan yönlerinden biridir ve implant biyomekaniğinde etkili olabilir (77). Çoğu mevcut implant sistemi genellikle 3 farklı kategori ile ilişkilidir. Silindir implantlar, vida tasarımlı implantlar ve genellikle konumlarına itilerek yerleştirilen tek parça implantlar. Vidalı tasarımlar arasında, implantın kret ve apikal kısmında kendinden kılavuzlamayı artırmak ve ısı oluşumunu azaltmak için önemli değişiklikler yapılmıştır. Diğer tasarımlarda kök anatomisini taklit etmek ve servikal ve apikal kısımlarda kademeli silindirik tasarımlar geliştirilmiştir. Bu kademeli silindirik implantlar, silindirik veya konik implantlara kıyasla daha stresli bir dağılım gösterir (73).

Yüzey değişiklikleri ve implant şekli, implant / kemik arayüzündeki cevabi değiştirebilecek bağımsız koşullardır. Arayüzde üç tip yük oluşur: sıkıştırma, gerilme ve kesme kuvveti. Sıkıştırma kuvveti, kemik yoğunluğunu artırma eğilimi gösterir buna kıyasla çekme ve makaslama kuvveti daha kötü bir ara yüze sebep olur buna

ek olarak makaslama kuvveti en kötüsüdür (78). Oluşan kuvvetin tipi, implantın şekline ve yerleşim yerine bağlıdır. Dolayısıyla ideal bir implant tasarımı, kesme kuvvetlerinin başlatılmasını en aza indirirken basınç ve gerilme kuvveti arasında bir denge sağlamalıdır.

Yapılan bir çalışma, vida tasarımı implantların yerleştirilmesinden hemen sonra en fazla bağlanmaya sahip olduğunu göstermiştir (79). Başlangıç stabilitesini ve yüzey temasını arttırmak için, çoğu implant formu yivli bir yapı olarak geliştirilmiştir. İmplant biyomekaniğinde yivli yapının çok önemli ve pozitif bir etkiye sahip olduğuna inanılmaktadır (77, 80). Vida adımı, birim uzunluğa göre yiv sayısı, implant tasarımında önemli bir faktördür. Yivler arasında ki artan adım ve derinlik, kemik ve implant arasında gelişmiş temas alanı sağlar ve vida şeklindeki implantların biyomekanik özelliklerini değiştirebilir (81).

## **2.8. Dental İmplantların Yüzey Özellikleri**

Yüzey işlemleri genellikle, dental implant endüstrisinde özellikle alt tabakada yer alan malzemenin arzu edilen özelliklerini değiştirmek üzere gerçekleştirilir. Yüzey alanı, bir takım prosedürler ve uygun modifikasyon teknikleri uygulanarak kayda değer bir şekilde arttırılabilir (82, 83). Yüzey işlemleri, mekanik, kimyasal ve fiziksel olarak sınıflandırılabilir. Dental implantta, yüzey topografisini ve yüzey enerjisini değiştirmek için yüzey işlemleri uygulanır ve dolayısıyla ıslanabilirliği, hücre proliferasyonunu, büyümeyi, (84-86) ve osseointegrasyon prosesini hızlandırır (87). Dental implantın kalitesi yüzey özelliklerine bağlıdır. Doku ve osseointegrasyon arasında iyi etkileşim sağlamak için, materyallerin biyouyumluluk özelliği ve yüzey pürüzlülüğü önemli rol oynar. Goyal ve arkadaşları (88) , artan pürüzlülüğün aynı zamanda implant yüzey alanını arttırabildiğini, hücre göçünü ve implanta bağlanmayı iyileştirebildiğini böylece osseointegrasyon sürecini geliştirdiğini gözlemlemiştir.

## **2.9. İmplant Yüzeylerinin Yüzey İşleme Yöntemleri**

Modern başarılı osseointegre dental implantlar, fibröz doku araya girmeden yeniden şekillendirilmiş kemik dokusu ve implante materyal yüzeyi arasında sıkı temas sağlamalıdır (89). İmplant tasarımı, cerrahi teknik, implantın yüzey topografisi ve kimyasal bileşimi implant stabilitesinde zaman içerisinde hızlı bir osseointegrasyon elde edebilmek için anahtar faktörlerdir (90). İmplantların osseointegrasyon özelliklerini geliştirebilmek için yeni mekanik, kimyasal ve fiziksel yüzey modifikasyon yöntemlerinin ilerletilebilmesi, günümüzde dental, maksillofasiyal ve ortopedik alanlarda büyük ilgi konusu haline gelmiştir (91).

### **2.9.1. Mekaniksel Metodlar**

Aşındırma, işleme ve parlatma işlemleri genellikle hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırabilen pürüzlü veya pürüzsüz yüzeylere sebep olurlar (92).

### **2.9.2. Kimyasal Metodlar**

Asit veya alkali ile kimyasal işlem, sol jel, hidrojen peroksit işlemi, anodizasyon ve kimyasal buhar tortusu, yüzey pürüzlülüğünü ve kompozisyonunu değiştirmek ve yüzey enerjisini arttırmak için uygulanan kimyasal yüzey işleme yöntemleridir (93).

### **2.9.3. Fiziksel Metodlar**

Plazma sprej, iyon birikimi ve püskürtme, implant yüzey değişikliği için kullanılan fiziksel yöntemlerden bazılarıdır. Plazma sprej metodu, vakumlu plazma sprej ve atmosferik plazma sprej metodlarını da içerir. İmplant yüzeyinde püskürtülerek oluşturulan ince katmanların biyolojik aktiviteyi ve mekanik özellikleri iyileştirdiği düşünülmektedir (94).

## 2.10. Dental İmplantların Yüzey Modifikasyon Tipleri

### 2.10.1. Tornalanmış Yüzeyler

Orjinali Branemark (95) tarafından tarif edilen tornalanmış yüzeyler dental implantların ilk neslidir. Yüzeyleri nispeten pürüzsüz görünse de, elektron tarama mikroskobu analizi, üretim sürecinde oluklar ve sırtlar oluştuğunu göstermektedir. Tornalanmış yüzeylerin dezavantajı yüzeyde bulunan defektlerin kemiğin bağlanmasına direnç göstermesidir, bunun sonucunda osseointegrasyon süreci yavaşlamaktadır. Branemark tarafından tarif edilen, implantın yerleştirilmesinin ardından yüklemeye önce altı aylık iyileşme periyodu uygulanan teknikler, bu tip implantlarda klinik olarak iyi sonuç verdiği gösterilmiştir (96).

### 2.10.2. Asitlenmiş Yüzeyler (Etched Surfaces):

Titanyum implantların yüzeyini sertleştirmek için güçlü asitler kullanılır. Buna ek olarak asit ile aşındırma titanyum implantların oksit tabakasını uzaklaştırır (97). Asit konsantrasyonu, sıcaklık ve işleme zamanı ne kadar yüksek olursa materyal yüzeyi o kadar fazla arındırılmış olur.  $\text{HNO}_3$  ve HF karışımı veya HCl ve  $\text{H}_2\text{SO}_4$  karışımı titanyum implant yüzeylerinin asit ile aşındırılması için kullanılan en yaygın çözeltilerdir (98). Yüzeyle asit uygulanması, homojen düzensizlikler, artan yüzey alanı ve artırılmış adezyon sağlar (99). Daha düşük yüzey enerjisi ve daha düşük kontaminasyon olasılığı, bu tekniğin bir takım avantajlarındandır, çünkü yüzeyde hiçbir partikül bulunmaz. Bu sayede osteoblastik tutunma kolaylaşır ve hücrelerin implant yüzeyine doğru göç etmeleri sağlanır. Titanyum yüzeyi asit ile pürüzlendirildiğinde uzun vadeli başarılı ve hızlı osseointegrasyon bildirilmiştir (100).

### 2.10.3. İki Defa Asit Uygulanmış Yüzeyler (Dual - etched Surfaces)

Bu teknikte, titanyum implantları  $100^\circ\text{C}$ 'nin üzerinde ısıtılan konsantre bir HCl ve  $\text{H}_2\text{SO}_4$  karışımı içine birkaç dakika batırılarak implant yüzeyini pürüzlendirmek

amaçlanmaktadır. Bu yöntem kullanılarak, osteojenik hücrelerin ve fibrinin tutunması yoluyla osteokondüktif işlem arttırılır bu da doğrudan kemik oluşumuna neden olur (101). Osteojenik hücrelerin adezyonunu arttırmak ve böylece kemik tutunmasını teşvik etmek için fibrin yapısına adezyonu sağlayan implantların ikili asit tekniği ile aşındırılmasıyla belirli bir topografinin elde edildiği hipotezi ileri sürülmüştür (102). Bu fibrin adezyonu, yüzey boyunca osteoblastik göçü yönlendirir (103). Cochran ve arkadaşları (104), çift asit uygulanmış yüzeylerde daha yüksek kemik / implant teması ve daha az kemik rezorpsiyonu bildirmiştir.

#### **2.10.4. Hidroksiapatit Kaplı Yüzeyler**

İmplant kemik arayüzünde, hidroksiapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) içeren bir kaplama, biyoaktif olarak düşünülebilir çünkü yüzey üzerinde kalsiyum fosfat zengini bir tabakanın oluşumuyla birlikte iyon değişimine izin veren bir tabaka oluşur. Bu kalsiyum fosfat tabakası oktakalsiyum fosfat ile gelişmektedir. Oktakalsiyum fosfatın biyolojik eşdeğeri olan hidroksiapatit kemiğin gelişmesine katkıda bulunmaktadır. (105) Biesbrock ve Edgerton'a göre, (106) hidroksiapatit kaplı implantlarla ilgili olarak, mikrobiyal adezyon, kemiksi yapıda bozulma ve kaplama başarısızlığı gibi bazı endişeler bulunmaktadır, ancak bununla birlikte yazarlar bu implantların tip IV kemikte ve greftlenmiş kemik gibi daha hızlı kemik / implant kontaklarının olması gereken durumlarda daha faydalı olabileceğini önermişlerdir. Ayrıca kısa implantlarda bir takım durumlarda hidroksiapatit kaplaması faydalı olabilir.

Vercaigne ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; (107) kemik reaksiyonunun hidroksiapatit kaplı implantların kimyasal yapısına, implantın yüzey pürüzlülüğünden daha fazla etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak bozulma belirtileri de gözlemlenmiştir.

#### **2.10.5. Sol - Jel Kaplı İmplantlar**

Bu düşük maliyetli ve basit prosedür, homojen kimyasal bileşimleri büyük boyutlu ve karmaşık tasarımlı yüzeylerde biriktirmek için kullanılır (108). Sol-jel

yöntemi, yüksek seviyedeki hidroksiapatit kaplamaların üretiminde, kimyasal homojenliği artırabilir (109).

Gan ve arkadaşlarının (110) kısa süreli yaptıkları bir in vivo laboratuvar çalışmasında, sol – jel takniği kullanılarak kemik ve doku arasında bulunan implant yüzeyi incelenmiştir. Bu çalışmada daha iyi bir osseointegrasyon görülmüş ve herhangi bir yan etki gözlemlenmemiştir.

#### **2.10.6. Kumlanmış ve Asit Uygulanmış Yüzeyler (SLA ve Modifiye SLA)**

SLA implant yüzeyi 250-500 µm boyutlarındaki büyük kum parçacıkları ile kumlama yapılmasının ardından, asit işlemi uygulanarak üretilir. Kumlama ile makro düzensizlikler oluşurken buna ek olarak asit uygulaması ile mikro düzensizlikler elde edilir (111).

Bornstein ve arkadaşları (112) tarafından yapılan histomorfometrik bir çalışma, modifiye SLA yüzeylerinin iki hafta iyileştikten sonra standart SLA yüzeylerine göre belirgin şekilde daha fazla kemik appozisyonu gösterdiğini, ancak her iki yüzey tipinde de dört haftadan sonra benzer appozisyon gözlemlendiği belirtilmiştir. Buna ek olarak iki ile dört hafta arasında kemik appozisyonu açısından her iki yüzey tipinde de bir artış gözlemlenmiştir. Asit uygulanmış modifiye implantların erken yükleme teknikleri kullanılacak hastalarda başarılı olabileceği öne sürülmüştür.

#### **2.10.7. Kumlanmış Yüzeyler (Grit-blasted Surfaces)**

0.25-0.50 µm ebatlarında titanyum dioksit parçacıkları, tormalanmış implantın daha pürüzlü bir yüzeye sahip olabilmesi için implant yüzeyine uygulanır.

Ivanov ve arkadaşlarının (113) yaptığı bir insan çalışmasında mikro implantlar kullanılarak mandibulda güçlü bir osseointegrasyon göstermişlerdir. Bu sonuçlar daha önceki hayvan çalışmaları ile karşılaştırılmıştır (114).

TiO<sub>2</sub> kumla püskürtülmüş implantların, Rasmusson ve arkadaşları (115) tarafından yapılan, on yıllık prospektif bir çalışmada, %96,9'luk başarı oranı

bildirilmiş ve bu implantlarda kumlanmamış tornalanmış implantlara göre daha yüksek bir başarı oranı gözlemlenmiştir. Tornalanmış yüzeyleri olan implantlara kıyasla, kumla püskürtülmüş pürüzlü implant yüzeylerine sahip implantların daha öngörülebilir klinik sonuçlara eğilimi olduğu gözlemlenmiştir.

#### **2.10.8. Oksitlenmiş Yüzeyler**

Sul ve arkadaşları (116), titanyum oksit tabakasının kalınlığını, pürüzlülüğünü ve yüzey alanını arttırarak yüzeyin topografisini ve kompozisyonunu değiştirmek için kullanılan bir işlem olarak anodizasyonu tarif etmişlerdir. Bu orta derecede pürüzlü yüzeyin osteoblast hücrelerinin titanyum implantlara tutunmasını arttırdığı bildirilmiştir. Ivanov ve arkadaşları (117), anotlanmış tasarımın osteokondüktif özelliklerinin bir sonucu olarak implantın kemiğe daha hızlı bir şekilde entegre olabileceğini göstermiştir.

10 yıllık bir takip sonucunda gözenekli ve anodize yüzeye sahip olan implantların % 65.26 başarı oranına ve % 97.96 hayatta kalma oranına sahip olduğu yapılan bir çalışma ile bildirilmiştir (118). Yapılmış bir klinik araştırmada, anodize implant sağkalım oranlarının tornalanmış implantlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (sırasıyla % 95,5 ve % 85,5) (119).

#### **2.10.9. Florür Uygulanmış Yüzeyler**

Ellingsen (120), yaptığı bir hayvan çalışmasında, florid uygulanarak yapılan yüzey modifikasyonunun, dört ve sekiz haftalık iyileşme sürecinden sonra titanyum implantların tutulmasını önemli ölçüde arttırdığını bildirmiştir. Ayrıca titanyumun florüre karşı çok reaktif olduğunu ve  $TiF_4$ 'ü oluşturduğunu söylemiştir. Kısa bir iyileşme süresine sahip olduğunda kumlama yapılarak pürüzlendirilmiş implantlarla kıyaslandığında implant teması için daha sağlam bir kemik yapısına ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir. Yüzeyi modifiye edilmiş implant yüzeylerine florür

uygulandıktan sonra kumlanmış yüzeyli implantlara oranla daha yüksek oranda çıkarma torkuna karşı direnmişlerdir.

Cooper ve arkadaşlarının (121), (in vitro insan mezenşimal hücreleri ve in vivo sıçan tibia modeli) TiO<sub>2</sub> kum püskürtülmüş titanyum implantları kullanarak yaptığı paralel bir in vitro in vivo çalışma sonucunda, TiO<sub>2</sub> kumla püskürtülmüş titanyum yüzeylere florür iyonu uygulanmıştır. In vitro insan mezenşimal kök hücrelerinin osteoblastik farklılaşması ve in vivo kemik-implant temasının önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir.

Lamolle ve arkadaşları (122), florür ile modifiye edilmiş titanyum yüzeylerin, implant yüzeylerinin biyouyumluluklarını geliştirdiğini göstermiştir.

#### **2.10.10. Lazerle Pürüzlendirilmiş Yüzeyler**

Lazer uygulaması, dental implantların yüzey modifikasyonu için kullanılan başka bir yöntemdir. Yüksek sertlik, korozyon direnci, standart pürüzlülük ve daha kalın bir oksit tabakası ile yüksek saflık derecesine sahip mikroyapıların titanyum implant yüzeylerini zenginleştirdiği bildirilmiştir (123).

İki yıllık retrospektif bir çalışmada Guarnieri ve arkadaşları, anterior maksillada taze ekstraksiyon soketlerine yerleştirilen hemen yüklenmiş implant yüzeylerine lazer ile pürüzlendirme uygulamıştır. Bunun sonucunda implantların sağ kalım oranı %95,6 olduğu bildirmiştir (124).

Schade ve arkadaşları, lazer ablasyon uygulanarak yüzey modifikasyonu uygulanmış saf titanyum implantlara florür uyguladıktan sonra tavşan modellerine bakmışlardır ve kemikte çok büyük bir retansiyon gösterdiği gözlemlenmiştir (125).

#### **2.10.11. Antibiyotik Kaplama**

Herr ve arkadaşları (126), implant yüzeyleri üzerindeki tetrasiklin etkisini araştırmış ve implant yüzeylerini kontamine eden mikroorganizmaların ölümünü gözlemlenmiştir. Buna ilaveten smear katmanını etkin bir şekilde kaldırdığı, hücre proliferasyonunu artırabileceğini ve kolajenaz aktivitesini inhibe



edebileceğini, dolayısıyla artmış bağlanma ve kemik iyileşmesini desteklediğini bulmuşlardır.

#### **2.10.12. Sentetik Peptid Kaplama**

Petzold ve arkadaşları (127), prolin açısından zengin sentetik peptid kaplı titanyum implantların tavşan modellerinde osseointegrasyon ve kemik iyileşmesini artırma potansiyeline sahip olduğunu bulmuşlardır.

#### **2.10.13. Plazma Sprey Kaplı Yüzeyler**

Plazma spreyleme tekniği genelde hidroksiapatit (HA) ve titanyum (Ti) gibi yoğun bir katman tabakasını içerir. Kaplama işlemi termal olarak eritilen materyallerin implant alt yapısına püskürtmeyi içerir. Titanyum alaşımların alt yapısı üzerine yapılan HA kaplama gösterdiği iyi biyouyumluluk ve mekanik özellikleri dolayısıyla pek çok dikkat çekmiştir (128). Plazma spre yöntemi, yüzey pürüzlülüğünü arttırarak implantların yüzey alanını önemli ölçüde arttırır (129).

Fouda ve arkadaşları (130) HA kaplı titanyum implantın, kaplanmamış implantlarla karşılaştırıldığında iyileşme süresini artıracığını bildirmişlerdir.

#### **2.11. Lazer**

Teknolojideki ilerlemeler artmakta ve hastaların dişhekimliğinde tedavi yöntemlerini geliştirmektedir. Teknoloji, tedavi süresini azaltmaya yardımcı olur ve hastanın tedavisini daha rahat hale getirir. Bu teknolojik gelişmelerden biride diş hekimliğinde lazer kullanımıdır. Lazerler, hastalar için daha etkili, daha konforlu ve daha öngörülebilir sonuçlar sunmaktadır. Lazerler diş hekimliğinde birçok alanda kullanılmaktadırlar. Lazerler sert ve yumuşak dokularda ki patolojik koşulların giderilmesinde ve estetik prosedürler de etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar (131).

### 2.11.1. Lazer Nedir?

Lazer, enerji verilen atomların fotonları serbest bırakma şeklini kontrol eden bir cihazdır. Lazer terimi "light amplification by stimulated emission of radiation" kelimelerinin kısaltması olarak günümüze gelmiştir (132).

### 2.11.2. Lazerin Tarihsel Gelişimi

Einstein, uyarılmış emisyon kavramını getirerek lazer teorisinin temellerini kurdu. 1917'de yayınlanan bir makalede (133), daha sonrasında Einstein katsayıları olarak adlandırılan olasılık katsayılarını kullanarak Planck radyasyon kanununu türetmiştir. 1928'de yayınlanan bir raporda, Ladenburg, Kopfermann (134), uyarılan emisyonun bir sonucu olarak deneysel olarak "negatif dağılım" teyit etti. O sırada birçok kavramsal fikir, uyarılmış emisyonun daha ileri araştırılmasının yolunu engelledi. Temel engel, termodinamik dengede bulunan Boltzmann dağılımlarına bağlıydı ve bu sapmanın kabul edilemez olduğu düşünülen "negatif sıcaklıklara" yol açacağı idi.

1950'lerin başında Townes, Zeiger ve lisansüstü öğrencisi Gordon, (microwave amplification by stimulated emission of radiation veya MASER), denilen bir mikrodalga amplifikatörü ürettiler ancak yalnızca iki seviyede kullanılabildiği için düzenli olarak çalışmıyordu. Bu amonyak maser'in dalga boyu yaklaşık 1 cm idi ve 10 nW'luk bir güce sahipti (135).

1958 yılında Shawlow ve Townes (136), maser fikirlerinin optik frekanslara yayılımını yayınladı. 1960 yılının mayıs ayında Maiman (137) aktif ortam olarak yakut silindiri kullanarak ilk çalışma lazerini kurmuştur. 1960 yılının kasım ayında, Sorokin ve Stevenson (138) düşük sıcaklıkta uranyum katkılı kalsiyum florür kristalleri kullanarak dört aşamalı bir sistemde lazer kazanımını elde ettiklerini yayınlamışlardır.

Javan, Bennett ve Herriott, 1961'de düşük gaz basıncında helyum ve neon karışımı olan ilk gaz lazerini geliştirmişlerdir (139). Javan'ın cihazı kızıl ötesinde 1.15  $\mu\text{m}$ 'de çalışıyordu. Bir yıl sonra, White ve Rigden (140), 632.8 nm.'de tanıtık kırmızı

çizgide He-Ne lazer konusunda yayınladı. Yirmi yıl boyunca en yaygın gaz lazer tipi idi. Barkod okuyuculuğundan, inşaat aletlerinin eğitimsel kullanıma uygun hale getirilmesine kadar geniş bir uygulama yelpazesine sahipti.

Neodimyum katkılı farklı bir katı hal lazeri 1961'de piyasaya sürüldü. 1964 yılında Geusic, Marcos ve Van Uitert'in yayınladığı bir makalede günümüzde çok yaygın olarak kullanılan 1064 nm Nd: YAG lazer'in temelleri atıldı (141).

Bu ilk lazerler üzerinde geliştirmeler yapılarak daha fazla araştırma yapıldı. Bunları takiben, diğer sınıf lazerler avantajlarına ve dezavantajlarına göre icat edildi. Bunlara yarı iletkenler, karbon dioksit, excimer, kimyasal, diode ve serbest elektron olan lazerleme ortamları eklendi (142).

### **2.11.3. Lazerin Fiziği ve Doku ile Etkileşimi**

Lazerleri cerrahi prosedürler de kullanmadan önce işleyiş tarzını öğrenmek önemlidir. Lazerler enerjiyi bir elektrona aktarır ve daha sonra atom düşük enerji durumuna döndüğünde o enerji lazer enerjisi olarak yayılır. Bu, Einstein'ın radyasyon hipotezi hakkındaki kuantum teorisine dayanmaktadır. Bu teorinin temelinde, elektronlar genellikle atom çekirdeğine yakın düşük enerjili bir yörüngededir ve bu elektronlar harici enerjiyi emerek yüksek bir enerjiye geçebilirler. Elektronlar orijinal düşük enerji durumuna veya yörünge seviyesine döndüklerinde, bu emilen enerji spontan olarak ışık veya fotonlar olarak serbest bırakılır. Bu sebeple lazer, bir atomun elektronuna enerji aktararak gerçekleştirilen bir emisyon enerjisidir. Düşük enerjili elektron, atoma çarpan bir foton tarafından uyarılır; Bir elektron bu enerjiyi emer ve elektronu bir dış elektron halkasına gönderir. Bu hareket elektronu atomun çekirdeğinden uzaklaştırır. Elektron atomdan uzaklaştıkça daha kararsız bir hale gelir. Bu daha yüksek enerjili ve daha kararsız haldeki elektron, temel durumuna dönerek daha kararlı olmak ister (143). Elektron bu orijinal temel durumuna döndüğünde, spontan olarak emisyon ettiği fotonları ve ışığı elektromanyetik enerji olarak serbest bırakır. Lazer ışınındaki enerji, atomdan foton emisyonu başlatmak için elektriksel, kimyasal veya optik kaynak kullanılarak üretilir.

#### 2.11.4. Lazer Sisteminin Bileşenleri

Lazer ışığını üretmek için çeşitli bileşenler kullanılmaktadır. Bu bileşenler, bir enerji kaynağından, aktif bir ortamdan ve rezonant odadan oluşur. Lazerlerin enerji kaynaklarının çoğu elektrikseldir. Bu enerji kaynağı lazer ortamı boyunca akar ve elektronları daha yüksek enerjili bir hale getirir. Dış hekimliği alanında yaygın olarak üç tip lazer kullanılır. Bunlara Nd: YAG lazer, CO<sub>2</sub> lazer ve Diode lazer dahildir. Nd: YAG lazeri, neodimiyum iyonlarından ve itriyum-alüminyum-granat kristalinden oluşur. CO<sub>2</sub> lazeri karbondioksit, azot ve helyum içeren bir gaz lazeridir. Diode lazerleri ise, bir tüpe enjekte edilen fluoresan organik boyalar içeren sıvı lazerlerdir (144). Son bileşeni rezonant kutusudur, bu kısımda lazer medyumunu ve yansıtıcı aynalar bulunur. Genellikle bir tane yüksek yansıtıcı, bir tane kısmen yansıtıcı olan bir ayna bulunur. Bu aynalar lazer ışınının çıkmasına izin verir (145).

#### 2.11.5. Lazer Işığının Özellikleri

Lazerler normal ışıklardan farklıdır. Bir lazer ışığının ayırt edici üç özelliği vardır. Birincisi, bırakılan ışığın tek renkli olmasıdır. Lazer, belirli bir dalga boyu ışık içerir. Lazer genellikle bu dalga boyuyla karakterize edilir ve dalga boyu, elektron başlangıç durumuna döndüğünde salınan enerji miktarı ile belirlenir. Lazerin dalga boyu ve absorpsiyonu lazerin doku ile olan etkileşimini belirler. İkinci özellik, lazerin tutarlı veya düzenli olmasıdır. Fotonlar diğerleriyle birlikte hareket edip birleşirler. Üçüncü özellik ışığın yönlü olmasıdır. Lazer çok sıkı ve yoğun bir ışına sahiptir. Bu, lazer ışığının her yönden gitmesine izin veren bir ampul yerine, uzun bir mesafe boyunca dağılmamasını ve tutarlı olmasını sağlar. Foton serbest bırakıldığında elektronun enerjisinin durumuna bağlı olan çok spesifik bir dalga boyuna sahiptir. Lazerin dalga boyu dağılım derecesini, doku penetrasyonunu ve dokular tarafından emilen enerji miktarını belirler (144).

### 2.11.6. Lazer Sinterleme Nedir?

Titanyum ve alaşımları mükemmel korozyon direnci, biyouyumluluk, mekanik özellikler ve yüksek kuvvet / ağırlık oranı nedeniyle dental ve ortopedik implantlar için arzu edilen materyaller olarak kullanılmışlardır (63, 146). Bununla birlikte, tıbbi veya dental uygulamalarda titanyum implantların önemli bir endişesi, Young'un kemik modülü (10 - 30 GPa) ve titanyum (110 GPa) arasındaki uyumsuzluktur (147, 148). Bu uyumsuzluk nedeniyle, kemik yetersiz yüklenir ve stres korumalı hale gelir ve daha fazla rezorpsiyona yol açar. Young modülünün bu uyumsuzluğu, kemiğin stres korumasını takiben implant gevşemesinde önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır ve zararlı rezorptif kemik remodelingine neden olabilir (149, 150). Titanyum ve alaşımlarının gözenekliliğinin sağlanması, titanyumun Young modülünü azaltmak için önerilmiştir (151).

Hızlı prototipleme veya additive manufacturing (AM), sanal üç boyutlu (3D) model veriler temelinde tanımlanan yapı ve şekli doğrudan fiziksel nesnelere üretmek için kullanan bir işlemdir (152).

Metaller için additive manufacturing yöntemleri 2 ana grupta toplanabilir;

- a) Selektif Lazer Sinterleme (SLS) veya Doğrudan Metal Lazer Sinterleme (DLMS): SLS teknolojisinde metal parçacıkları kısmen eritilerek poröz bir yapı oluşturacak şekilde birbirine bağlanması sağlanır.
- b) Selektif Lazer Ergitme (SLM): SLM teknolojisinde ise metal partikülleri tamamen eritilir ve yerel olarak üretilen sıvı metal hacimlerinden daha yoğun bir metal meydana getirilir.

Bu zamana kadar sadece SLS ve DMLS teknolojileriyle üretilen dental implantlar rapor edilmiştir (14, 153). Ancak bu yollarla üretilen dental implantlarda belirgin kusurlar gözlenmiştir. SLS prosedürünün doğası gereği olan metal tozlarının kısmi eritilmesi veya yüzeysel olarak eritilmesinden ötürü oluşan gözenekler, çatlaklar ve distorsiyonlar bu kusurların oluşmasına sebep olmuştur. Uzun vadeli yüklemeler altında materyalde bulunan çatlakların başlangıç noktası olan gözenekler ve çatlaklar dental implantların mekanik özelliklerini uzun vadede olumsuz yönde etkileyebilir (154). SLM döküm materyallerine yakın mekanik özelliklere sahip

malzemeleri üretebilmek için metal tozunu tamamen eriterek yoğun materyalleri üretebilen gelişmiş bir additive manufacturing tekniğidir (155, 156).

Modern dental implantların çoğu sağlam titanyum çubukların işlenmesi ile üretilir; bunu takiben stabilitesini arttırmak ve osseointegrasyonunu geliştirmek için çeşitli yüzey işlemleri uygulanır. Bununla birlikte, geleneksel yöntemlerle üretilen dental implantların hiçbiri tamamen kusursuz bir geometriye ve dış yüzey özelliğine sahip bir implantı tek seferde üretme yeteneğine sahip değildir (152, 157, 158).

Gelişmekte olan additive manufacturing uygulamaları, implantların geleneksel tekniklerden daha ekonomik bir şekilde üretilmesini sağlamak için potansiyele sahiptir. Sözü edilen additive manufacturing teknolojileri arasında selektif lazer sinterleme süreci ilk olarak Deckard ve Beaman tarafından tanıtılmıştır (158). Selektif tabaka lazerle sinterlemenin, farklı üretim parametrelerinin kullanılmasıyla, hem titanyum hem de alaşımlarından tamamen sinterlenmiş (katı, sert) ve kısmen sinterlenmiş (daha gözenekli) yapılar üretebileceği gösterilmiştir (159, 160). Bu işlemi geleneksel metodlara yapılamayan karmaşık geometriye ve kontrollü bir şekilde oluşturulan eğimli gözeneklere sahip ortopedik ve dental implantların üretilmesi için kullanmak mümkündür. Selektif tabaka lazer sinterleme, potansiyel olarak kemik dokuya benzer bir Young modülüne sahip olabilen ve aynı zamanda işlevsel olarak derecelendirilmiş dental veya ortopedik titanyum implant üretimine izin verir. Bu gözenekli materyaller sayesinde, Young modülündeki uyumsuzluğu azaltabilir ve uzun vadeli, stabil osseointegrasyona erişilebilir (100, 149, 161, 162).

### **2.12. Yüzey Pürüzlülüğü**

Yüzeyleri basitçe "kaba" veya "düz" olarak tanımlamak yeterli değildir. Niceliksel değerlendirme, farklı yöntemler kullanılarak hazırlanan yüzeylerin karşılaştırılması için önemlidir. Wennerberg ve Albrektsson tarafından belirtildiği üzere, yüzey pürüzlülüğünü ölçmek için çeşitli yöntemler mevcuttur ve yüzey topografyasını karakterize etmek için 150'den fazla parametre hesaplanabilir. Parametreler, yüzey özelliklerinin dikey yüksekliğini, yatay boşlukları veya yükseklik

ile birlikte uzaysal konumunun bir kombinasyonunu (yani, hibrid parametreleri) yansıtabilir (163).

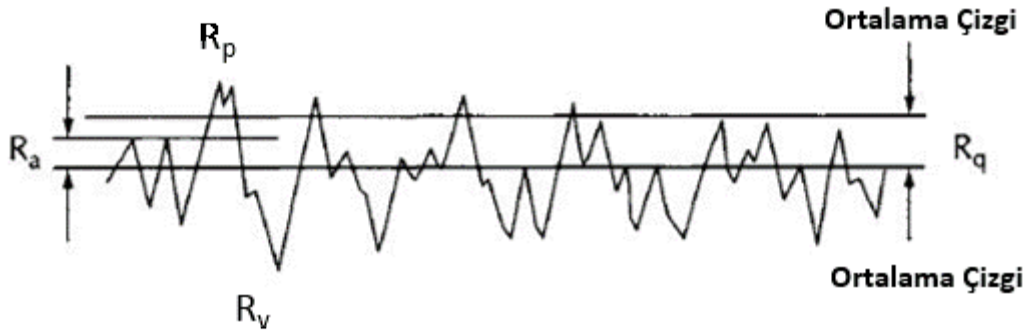
### 2.12.1. Yüzey Pürüzlülüğünün Ölçümünde Kullanılan Parametreler

#### Ra (Ortalama Pürüzlülük) Değeri

Ra değeri, pürüzlülüğün evrensel olarak kabul gören ve en çok kullanılan parametresidir. Profilin ortalama çizgiden sapma büyüklüğünün aritmetik ortalamasıdır. Ra nispeten yeni bir semboldür. Eskiden İngiltere'de CLA (merkez hat ortalaması) ve ABD'de AA (aritmetik ortalama) olarak anılırdı.

#### Rq Değeri

Rq, Ra'ya karşılık gelen rms parametresidir ve aritmetik ortalama sapmaların karakökü anlamındadır. Fonksiyonel performans ile daha kolay ilişkili olduğu için yavaş yavaş Ra'nın yerini almaktadır.



Şekil 2.2. Pürüzlülük diyagramı (164)

#### Rv Değeri

Rv, profilin örneklem uzunluğu dahilinde ortalama çizginin altında ki maksimum derinliktir.

#### Rp Değeri

Rp, örneklem uzunluğu boyunca profilin ortalama çizginin üstündeki maksimum yüksekliğidir.

#### Rz Değeri

Rz, ölçülecek yüzey üzerindeki örnek bir rota içindeki profilin en yüksek ve en düşük beş noktası arasındaki farkların aritmetik ortalamasıdır. Ayrıca  $Rz = Rv + Rp'$  dir.





eklenir. Y yönündeki basamak 1 ile birkaç  $\mu\text{m}$  arasında ayarlanabilir. Temas profilometreleri implant çalışmalarında, dişhekimliği ile ilgili araştırmalarda silindir ve düz numune incelemeleri için ve deneysel alınmış ortopedik implantların pürüzlülüğünün değerlendirilmesi için neredeyse tamamen kullanılmaktadırlar (165-169).

**Avantajları:** Bu aletlerin geniş yatay ölçme aralığı (tipik  $100 \times 100 \text{ mm}$ ) ve 8 mm'ye kadar dikey aralıkları vardır. Büyük, kaba alanları, örneğin bıçak tipi implantları değerlendirmede ve aşınma ile ilgili olarak sapma ölçümleri için uygundur.

**Dezavantajları:** Vidalı dental implantların muayeneleri için mekanik kontak profilometreleri kullanılamaz çünkü ucu dişli parçaları değerlendirmez. Bir implantın yüzey pürüzlülüğü farklı yerlerinde önemli derecede farklılık gösterebilir (163).

#### **Optik Profilometre Cihazları**

Geniş bir yelpazede farklı optik aletler mevcuttur. Temassız oldukları için, biyolojik materyal araştırmalarında bu yöntemler caziptir çünkü birçok biyomalzemede yumuşak ve savunmasız yüzeyler bulunmaktadır. Optik aletler genellikle daha hızlıdır ve mekanik kontak aletlerinden daha iyi bir çözünürlüğe sahiptir. Mekanik temas profilometrelerinde olduğu gibi, optik aletler de esas olarak diskleri veya silindirleri değerlendiren deneysel çalışmalarda kullanılmaktadırlar (170-172).

Oral implantların topografik karakterizasyonu için en uygulanabilir yöntem aşağıda belirtilen üç cihazdır.

- Odak Algılama Sistemleri (Focus Detection Systems)
- Konfokal Lazer Taramalı Mikroskopi (Confocal Laser Scanning Microscopy)
- Beyaz Işık Interferometre (White Light Interferometer)

#### **Taramalı Prob Mikroskopları**

Taramalı prob mikroskopları (SPM) keskin bir uç ve numune yüzeyi arasındaki etkileşimi ölçer. Uç bir konsola bağlanır ve yüzey taramasında konsolun dikey hareketi kaydedilir. Bu araç grubunda tarama tünel mikroskopisi ve atomik kuvvet mikroskobu en sık kullanılan tekniklerdir ve benzer şekilde topografik

değerlendirmeler için de uygundur. İletken olmayan yüzeyler için atomik kuvvet mikroskobu tek seçenektir. Yöntem, sabit hızda ve basınçta yüzey üzerinde çizilen çok ince bir ucu (6 - 60 nm yarıçapı) kullanır. Hafifçe vurma moduda mevcuttur bu modda uç yüzeyin üzerinde salınım hareketi yapar ve salınımın altında ki yüzeye hafif dokunuşlar yapar. Ucun pozisyonu bir tespit sistemi ile izlenir ve kaydedilir. Tipik ölçüm aralığı 100× 100 µm ve maksimum dikey aralık yaklaşık 6 µm'dir. Dikey çözünürlük çok iyidir ve pikometre seviyelerine kadar inmektedir. Yatay çözünürlük ise 100pm civarındadır (163). Taborelli, (68) Sawase (173) ve Cooper ve arkadaşlarının (174) birlikte yaptığı çalışmalar, pürüzlülük değerlendirmesi için SPM'yi kullanan farklı implant materyalleri ve yüzey modifikasyonlarının incelenmesine örnektir.

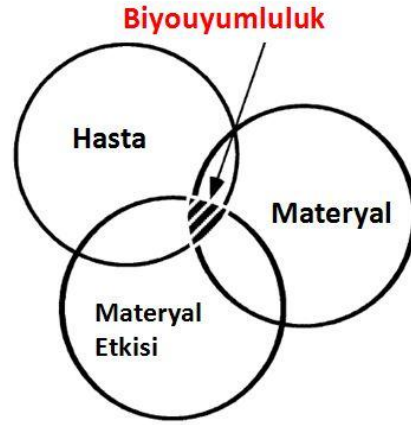
**Avantajları:** Bu tekniğin çok yüksek çözünürlüğü nedeniyle bir protein molekülü kadar ince yapılar görselleştirilebilir ve karakterize edilebilir. Yüzey pürüzlülüğü ile biyolojik süreçler arasındaki ilişki incelenebilir. Ölçümler hava bulunan bir ortamda veya sıvı bir ortamda yapılabilir.

**Dezavantajları:** Ölçüm alanı ve özellikle dikey yöndeki maksimum ölçüm aralığı birçok implant yüzeyi için çok küçüktür. Bu, ölçümlerin her zaman mümkün olmadığı veya en azından ölçülen alanın çok seçici olması gerektiği anlamına gelir ve ölçümün tüm yüzey pürüzlülüğünü temsil etmeyeceğini ima eder (163).

## 2.13. Biyouyumluluk

### 2.13.1. Biyouyumluluk Nedir?

Biyoyumluluk konusunun kabul gören yaygın bir tanımına göre "belirli bir uygulamada bir maddenin uygun bir biyolojik tepki verme kabiliyeti" dir (175). Bu tanım yakından incelendiğinde bir hasta, materyal ve materyalin beklenen etkisi arasında ki etkileşimden bahseder (Şekil 2.4.) (176). Malzemenin biyolojik olarak kabul edilebilmesi için, 3 faktöründe uyumlu olması gerekir.



**Şekil 2.4.** Biyouyumluluk diyagramı

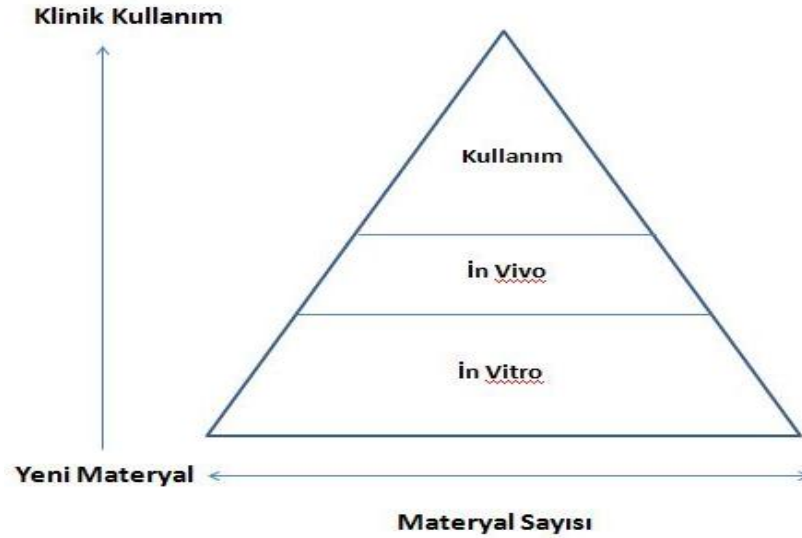
Uygulama yapan kişilerin materyallerin bir etkiye sahip olduğunu anlaması gerekmektedir. Bir malzeme canlı dokuya yerleştirildiğinde, çevresindeki kompleks biyolojik sistemler ile etkileşimler oluşur ve bu etkileşimler bir çeşit biyolojik tepki ile sonuçlanır. Etkileşimler; materyale, hastaya ve materyalin etkisine bağlıdır. Her ne olursa olsun materyal hastayı etkiler ve hastada materyali etkiler. Bugün bilim insanlarının çoğu materyalin vücut içerisinde bir etkiye sahip olduklarını düşünmektedir (177).

### 2.13.2. Biyouyumluluğun Dinamik Süreci

Biyouyumluluk; dinamik, devam eden ve statik olmayan bir süreçtir. Bugün osseointegre olan dental implantlar gelecekte osseointegre olabilir veya olmayabilir. Vücudun bir malzemeye tepkisi dinamiktir çünkü vücut hastalık veya yaşlanma yoluyla değişebilir ya da materyal korozyon veya yorgunluk yoluyla değişebilir. Bu değişikliklerden herhangi biri başlangıçta uygun ve istenen bir biyolojik tepkiye sahip olan koşulları değiştirebilir. Hasta, materyal ve etkisi arasında ki etkileşimler zamanla devam eder. Dolayısıyla materyale olan biyolojik müdahale devam eden bir süreçtir (176).

### 2.13.3. Biyouyumluluk Test Tipleri

Biyoyumluluk 3 tip biyolojik test ile ölçülür: in vitro testler, hayvan testleri ve kullanım testleri (178, 179). Şekil 2.5. (180).



**Şekil 2.5.** Yeni materyallerin biyouyumluluk değerlendirmesi için klasik paradigma

Orijinal olarak 1970 yılında Autian (181) tarafından önerilmiş olan bu şablon, hasta bakımına yönelik yeni biyomalzemelerin güvenli bir şekilde sunulmasını sağlamak için benimsenmiştir; bu arada verimli, etik açıdan sağlıklı ve mali olarak uygulanabilir bir değerlendirme süreci ihtiyacını da karşılamıştır.

#### **In Vitro Çalışmalar**

Materyallerin in vitro biyoyumluluk analizleri, canlı organizma dışında, hücre kültüründe veya taşıyıcı kaplarda yapılır. Bu testler, klinik uygulamaya olan yakınlığı arttırabilmek için, stratejiler üretmeye izin verir. Bu metodolojilerin gelişimi, hücre işlevinin ve yaşayabilirliğin, gen ekspresyonunun, proteinlerin ve enflamatuar mediatörlerin ekspresyonunun, reaktif oksijen türlerinin, hücre ölümü tipinin ve hücre morfolojisinin değerlendirilmesini sağlar (182, 183). Bunlara ek olarak, in vitro çalışmalar, kontrol grubunun belirlenebilmesinde kolaylıkla tekrarlanabilirlik, hız, düşük maliyet ve kolaylık sağlar ayrıca hayvanları ve insanları ağrıya, acıya ve genel olarak olası risklere tabi tutmak gibi yasal ve etik olmayan çalışmalardan kaçınır (184).

Genel olarak, in vitro araştırmalarda elde edilen bilimsel verilerin sınırlı klinik önemine rağmen, dikkatli ve titizlikle değerlendirildiğinde laboratuvar çalışmalarının sonuçlarının hayvanlarda yapılacak gelecekteki in vivo araştırmalara yön verebileceğini belirtmek önemlidir. Bununla birlikte klinik çalışmalarda gözlemlenen verilerin anlaşılmasına önemli katkıda bulunur (180).

### **İn Vivo Çalışmalar**

Hayvanların araştırma için kullanımı tartışmalı bir konudur ve ağırlıklı olarak etik bir nitelik taşıyan geniş tartışmaların hedefi olmuştur (185, 186). Bununla birlikte, bu çalışmalar in vitro gözlemlenenden daha fazla bilimsel veri sağlayabilir ve malzemenin kanla etkileşimi, kronik ateşlenme tepkimeleri ve kemik rejenerasyonu gibi önemli parametrelerin değerlendirilmesini sağlar (187). Laboratuvar hayvanlarını kullanan araştırmalar, klinik çalışmalardan daha düşük maliyetler sunar ve tatminkâr bir şekilde kontrol edilebilir. Bununla birlikte, bu testlerde elde edilen sonuçlar, araştırmalarda kullanılan hayvanın türü, yaşı ve cinsiyetinden etkilenebilir ve insanlarda göstereceği klinik tablo tahmin edilemeyebilir (187, 188). Ayrıca, gözlenen tepkilerin yorumlanması karmaşıktır, çünkü çeşitli olaylar aynı anda meydana gelebilir, örneğin test materyalinin hayvanın dokularıyla temas etmesiyle oluşan travma ve muhtemel lokal enfeksiyonlar gibi. Hayvanlar üzerindeki çalışmalar önceden test edilerek materyali kullanmanın güvenliğini belirleyebilir ve belirli bir fonksiyonda klinik başarısını öngörebilir (180).

### **Kullanım Testleri**

Klinik çalışmalar deney materyallerini gönüllü insanlara uygulayarak karakterize edilir ve dental malzemelerinin özelliklerini ve performansını değerlendirmek için "altın standart" olarak kabul edilir (189). Bu tür çalışmalar maliyet ve onları yürütmenin zorluğu bakımından değişen çeşitli deney protokolleri sunabilir (190). Bununla birlikte, klinik çalışmaların büyük bir çoğunluğu, materyallerin mekanik özelliklerini değerlendirmeye çalışmaktadır; böylece biyouyumluluk esas odak noktası olmaz (191). Genel olarak klinik çalışmalar, in vivo ve invitro testlere kıyasla daha pahalı, daha uzun süren, sonuçları kontrol etmesi ve

yorumlaması daha zor olan çalışmalardır. Bütün bunlara ek olarak insanları kullanan bu çalışmalar güçlü etik engellerle karşı karşıyadır (176).

Farklı klinik çalışma türleri arasında retrospektif, kesitsel ve prospektif çalışmalar bulunmaktadır. Uzun vadeli ve prospektif çalışmalar, bir materyalin biyolojik performansının belirlenmesinde daha önemlidir ayrıca randomize ve plasebo gibi grupların ön yargılarını en aza indirmek ve güvenilirliklerini arttırmak için kullanılacak stratejiler sunmaktadırlar (192). Tedaviden sonra, hastalar veri toplama imkânı veren, zaman dilimi içerisinde izlenir. Bununla birlikte, genel olarak, bu tür çalışmalar pahalıdır, sonuçlandırılması için uzun bir süre gerektirir ve operatörün becerisinden etkilenebilir (189, 190).

#### **2.13.4. Biyouyumluluk Testleri Arasındaki Korelasyon**

Ne yazık ki, kısa veya uzun vadede laboratuvar ile klinik gözlemler arasında güçlü bir korelasyon elde etmek sıklıkla mümkün değildir (193). Bunun en büyük nedeni laboratuvar testlerinin statik, klinik incelemelerin ise in vitro ortamda yapılmış olsa bile malzemenin zaman içinde değişimi gibi dinamik gözlemler göstermesidir (187).

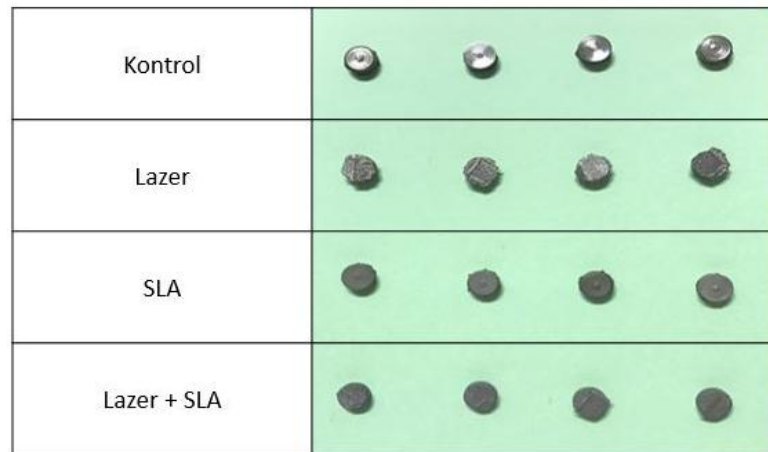
Hayvanlardaki ve klinik araştırmalardaki in vitro çalışmalarla ilişkilendirilen zorluklara rağmen düzenleyici kurumlar, dış hekimliğinin biyolojik uyumluluğunun değerlendirilmesinde laboratuvar çalışmalarının önemini kabul ederler (175). Bu testler, fiziksel bariyerlerin kullanılmasından, kullanılacak hücre türünün seçilmesine ve test edilen ürünlere maruz kalma koşullarına kadar değişen klinik şartlara olabildiğince yakın olmalıdır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için tür seçimi, deney materyalinin uygulama yeri ve değerlendirme zaman aralıkları da dikkate alınmalıdır (178, 179). Bir maddenin biyolojik uyumluluğunu değerlendirmenin etkili yönteminin, in vitro testlerin sonuçlarını hayvanlarda elde edilen sonuçlarla ve klinik testlerle ilişkilendirmesi yoluyla olduğu bilinmektedir (194).

#### **2.14. Hücre Canlılığı Belirleme ve Sitotoksosite Testleri**

Canlı hücreler farklı modifikasyonlara maruz kalan titanyum ile temas ettikten ve yüzeylere adhere olup büyüdükten sonra hücre sayısı ve sitotoksosite testleri kullanılarak hücre canlılığının yüzdesi hesaplanır. Kültür kaplarına ekimi gerçekleştirilen hücreler belirli bir süre sonra hücre kaplarına tutunur ve çoğalarak büyümeye başlar. Titanyum diskler süspansiyon halindeki hücrelerle karıştırılır ve etkileşmeleri sağlanır. Böylelikle farklı uygulamalara maruz kalan titanyum yüzeylerin hücrelerle etkileşiminin farklı düzeyde olması beklenir. Titanyum diskler sitotoksik bir cevaba sebep olmadığı sürece hücreler kültür kaplarına tutunacak ve proliferere olmaya devam edecektir. Ancak disklerin sitotoksik olması durumunda hücreler çoğalmayacak ya da sitopatik oluşumlar sergileyip yüzeye adhere olamayacaklardır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, hazırlanmış olduğumuz 6mm çapa ve 2mm kalınlığa sahip olan 48 adet grade 5 titanyum diskten yarısının yüzeyi grade 23 kaplanmıştır. Toplamda 4 ayrı grup oluşturuldu. 1. grupta disklerin yüzeylerine herhangi bir yüzey işlemi uygulanmadı. 2. grupta ki diskler sadece selektif lazer ergitme işlemi uygulandı. 3. grupta ki diskler SLA prosedürü ASTM ( American Society for Testing and Materials) kriterlerine uygun bir şekilde uygulandı. 4. gruba ise selektif lazer ergitme işlemi sonrasında SLA işlemi uygulandı (Şekil 3.1.). Bu işlemler sonucunda grup 1 ve grup 3 titanyum disklerin yüzeyi grade 5 titanyum özelliğe sahip olurken, grup 2 ve grup 4 de bulunan disklerin yüzeyinde grade 23 titanyum özellikleri görülecektir. Disklerin üzerine in vitro koşullar altında Saos-2 hücrelerini ekip adezyon kuvvetini ve proliferasyon derecesini, tornalanmış, sadece SLA, sadece lazer ve Lazer+SLA uygulanmış titanyum disk yüzeylerinin birbiri arasında karşılaştırılması hedeflenmektedir. Buna ek olarak hazırlanmış olan titanyum disklerin yüzey karakterizasyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkisi incelenecektir. Aşağıda grade 5 ve grade 23 titanyumların özellikleri belirtilmektedir (Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.).



**Şekil 3.1.** 4 ayrı gruba ayırdığımız disklerin görüntüsü



Titanyum Grade 5 ( Ti-6Al-4V Alpha-beta alaşımı)

**Tablo 3.1.** Grade 5 titanyumun kimyasal bileşimi

Kimyasal bileşim (ağırlık %) (Aralık gösterilmezse görülen maksimum değerler)										
O	N	C	H	Fe	Al	V	Ni	Mo	Diğerleri	Artık
0,20	0,05	0,08	0,015	0,40	5,5-6,75	3,5-4,5				0,4

En çok kullanılan titanyum alaşımıdır. Çok kuvvetli bir yapıya bununla birlikte düşük bir esnekliğe sahiptir.

Titanyum grade 23 Ti-6Al-4V ELI (extra low interstitials)

**Tablo 3.2.** Grade 23 titanyumun kimyasal bileşimi

Kimyasal bileşim (ağırlık %) (Aralık gösterilmezse görülen maksimum değerler)										
O	N	C	H	Fe	Al	V	Ni	Mo	Diğerleri	Artık
0,13	0,03	0,08	0,0125	0,25	5,5-6,5	3,5-4,5				0,4

Grade 5'e dayalı bir alfa-beta alaşımıdır. Grade 5'te yer alan oksijen, azot ve demir elementlerinin miktarı azaltılmıştır. Grade 5'e kıyasla stres korozyon özelliği arttırılmıştır.

Tablolara bakıldığında grade 5 titanyum ve grade 23 titanyum arasındaki elementel içerik farkını görebilmekteyiz. Grade 5 titanyum 1000 MPa'ya kadar dayanırken grade 23 titanyum 895 MPa'ya kadar dayanabilmektedir. Bunun sebebi grade 23 titanyumun daha esnek bir yapıya sahip olmasıdır. Bu sayede iç yapısı daha dayanıklı ve dış yapısı kemiğin elastisite modülüne daha yakın bir yüzey elde etmiş oluyoruz. Buda bize uzun süreli stabil bir fiksasyon sağlayabilir.

### 3.1. Titanyum Disklerin Yüzey zelliklerinin Belirlenmesi

6mm çapa sahip grade 5 titanyum ubuk, CNC torna tezgahı kullanılarak (Hanwha, XP16S, South Korea) (şekil 3.2.) 10000 devir/dk hızda işlenip, 2mm kalınlıkta olacak şekilde 48 adet disk elde edildi.



**Şekil 3.2.** CNC torna tezgahı (Hanwha, XP16S, South Korea)

Hazırlanan diskler, yüzeylerinin arındırılması amacıyla distile su kullanılarak basınçlı buhar cihazında (Gazella Goldental Stream Clening Robot 2035, Silter Türkiye) temizlendi.

### 3.1.1. Selektif Lazer Ergitme İşlemi

2. ve 4. gruptaki örneklere selektif lazer ergitme işlemi yapılmasından önce paslanmaz çelik bir tabla hazırlandı. Bu tabla hazırlanırken, lazer ergitme cihazının (LaserCUSING<sup>®</sup>, Concept Laser, Hofmann Innovation Group, Germany) tablasının orijinal boyutlarında üretilmesine özen gösterildi.

Titanyum disk örneklerin çapı 6mm ve kalınlığı 2mm olacak şekilde tabla üzerinde yuvalar hazırlandı. Tarama hızı 7m/sa olacak şekilde ve 2-20 cm<sup>3</sup>/sa üretim hızıyla titanyum disk örneklerin yüzeyi yaklaşık 60 mikron kalınlığında grade 23 titanyum alaşımı kullanılarak kaplandı.

Yüzey artıklarının temizlenmesi amacıyla sinterizasyon sonrasında örnekler 5 dakika boyunca 25°C'deki distile suda bekletildi. Bu işlemin ardından NaOH (20 g/L) ve hidrojen peroksitte (20 g/L) 80 °C'de 30 dakika yıkandı. Son olarak tekrar 5 dakika boyunca distile suda bekletildi.

### 3.1.2. SLA Uygulaması

SLA yüzey işlemi tornalanmış grade 5 (3. grup) ve selektif lazer ergitme işlemi uygulanmış grade 23 (4. grup) örnekler olmak üzere toplam 2 grup üzerinde uygulandı. İşlem basamakları için aşağıdaki prosedür uygulandı.

1) Titanyum örnek yüzeyleri 30 µm büyüklüğündeki Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> partikülleri kullanılarak (F240, Kuhmichel Abrasiv GmbH, Germany) ve 6 bar basınçta 20 sn boyunca kumlandı.

2) Ön yıkama işlemi ultrasonik temizleme cihazı (Wattson Yıkama Sistemleri, Türkiye) kullanılarak yapıldı (Şekil 3.3.). Titanyum örnekler ilk olarak saf aseton (Acetone EMPROVE®, Merck, US) ile sonrasında %96'lık etanol konsantrasyonu (Ethanol Extra Pure, Merck, US) ve distile su ile 80°C 'de 15'er dakika olacak şekilde yıkandı.



**Şekil 3.3.** Wattson ultrasonik yıkama cihazı

3) Asitleme

1. aşama: 80 °C'de %48'lik konsantrasyondaki H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, US) ile 20 dakika asitleme
2. aşama: 80 °C'de %18'lik konsantrasyondaki HCl (Merck,US) ile 20 dakika asitleme

3. aşama: %27'lik konsantrasyondaki  $\text{NaHCO}_3$  (Merck, US) ile 10 dakika nötralizasyon

4. aşama: 10'ar dakika boyunca distile su ile 5 defa yıkama

5. aşama: 80 °C'de %8'lik konsantrasyondaki  $\text{HNO}_3$  (Merck, US) ile 20 dakika asitleme

6. aşama: %27'lik konsantrasyondaki  $\text{NaHCO}_3$  (Merck, US) ile 10 dakika nötralizasyon

7. aşama: Distile su ile 10'ar dakika boyunca 5 defa yıkama işlemi ultrasonik cihazlar (Wattson Yıkama Sistemleri, Türkiye) kullanılarak yapıldı.

### 3.2. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Ölçümü

AFM çok keskin bir ölçüm ucu (<10 nm) yardımıyla, uç ve yüzey arasında ki (0,2 - 10 nm) kuvvetleri ölçerek, nanometre düzeyinde yüzeyin 3 boyutlu profilinin görüntülenmesini sağlar. Ölçüm ucu esnek bir konsol ile desteklenmektedir. AFM ucu hafifçe yüzeye dokunur ve ölçüm ucu ile yüzey arasında ki küçük kuvveti kaydeder. Ölçüm ucu ile yüzey arasında ki kuvvet, yay sabiti ve uç ile yüzey arasında ki mesafeye bağlıdır. Bu kuvvet Hooke Yasası kullanılarak ölçülür.

$$F = -k \cdot x$$

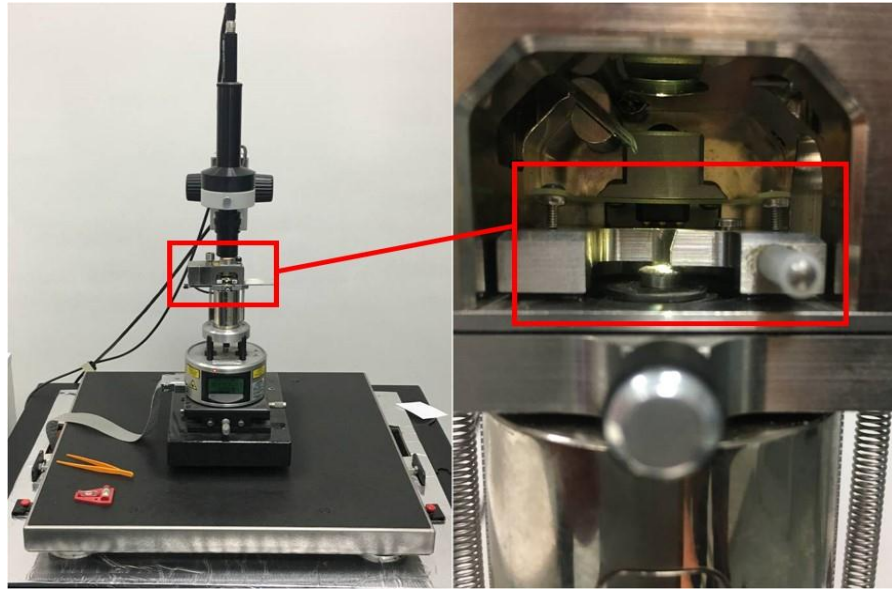
$$F = \text{kuvvet}$$

$$k = \text{yay sabiti}$$

$$x = \text{konsol sapma miktarı}$$

ODTÜ'nün merkez laboratuvarında atomik kuvvet mikroskobu (AFM, Veeco MultiMode V) kullanarak çalışmamızı gerçekleştirdik. Çalışmamızda her gruptan birer örnek kullanıldı. Örnekler metal tablalar üzerine çift taraflı yapışkan bant kullanılarak sabitlendi. Daha sonra yüzeyin yüksek çözünürlükte 3 boyutlu görüntüsü atomik kuvvet mikroskobu (Veeco MultiMode V) kullanılarak belirlendi. Her gruptan seçilen birer adet numune için sırasıyla 40  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  ve 1  $\mu\text{m}$ 'lik alanların görüntüleri kaydedildi. Ölçümler gerçekleştirilirken temassız yöntem

kullanıldı. İğnenin yüzeye hiç temas etmediği bu teknikte prob ve örnek arasındaki mesafe 0,5 - 2 nm. olarak ayarlandı (Şekil 3.4.).



**Şekil 3.4.** Titanyum diskin AFM cihazındaki görüntüsü (Veeco MultiMode V)

#### **Probların yapım materyalleri**

Problar genellikle  $\text{Si}_3\text{N}_4$  veya Si'den yapılır. Farklı konsol uzunlukları, materyaller ve şekiller değişik yay sabitleri ve rezonans frekanslarına izin verir. Problar, kimyasal kuvvet mikroskobu (CFM) ve manyetik kuvvet mikroskopisi (MFM) gibi ilave SPM ( Scanning Probe Microscopy) uygulamaları için başka malzemelerle kaplanabilir.

#### **Probun ölçüm mekanizması**

Probun yüzey boyunca hareketi, geri bildirim mekanizması ve piezoelektrik tarayıcılar kullanılarak Scanning Tunneling Microscopy (Tarama Tünel Mikroskopisi'ne) benzer şekilde kontrol edilir. Materyal tasarımında ki birincil farklılık prob ve numune yüzeyi arasındaki kuvvetlerin nasıl izlendiğidir. Probun sapması ışın yansımaları metodu ile ölçülür. Konsolun arkasında bulunan yarı iletken diyot lazeri, konumu hassas bir şekilde fotodiyot dedektörüne aktarır. Bu dedektör, ölçüm ucunun numuneyi taraması esnasında ki bükülme miktarını ölçer. Ölçülen konsol sapmaları, yüzey topoğrafyasının bir haritasını oluşturmak için kullanılır.

AFM'deki prob ve örnek arasındaki kısa mesafelerde etkileşim tipi Van der Waals (vdW) etkileşimleridir. Bununla birlikte, uzun mesafeli etkileşimler (ör. kılcal,

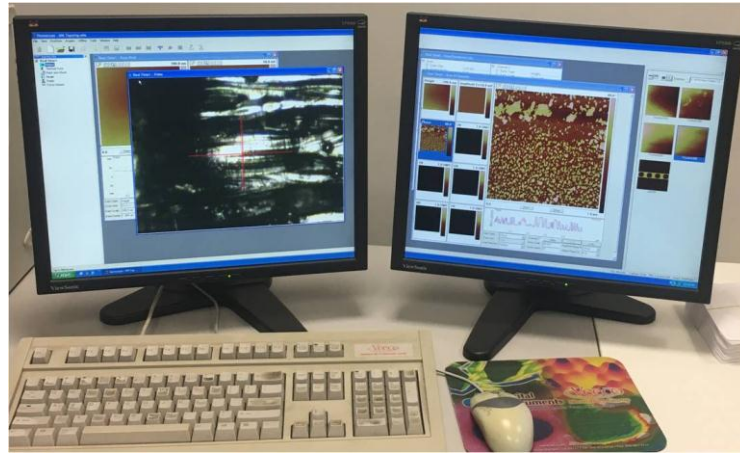
elektrostatik, manyetik) yüzeyden daha da uzaktadır. Bunlar, diğer SPM analiz yöntemlerinde önemlidir.

Numune ile temas sırasında, prob çoğunlukla itici Van der Waals kuvvetlerine (temas modu) maruz kalır. Buna, daha önce açıklanan sapma neden olur. Uç yüzeyden uzaklaştıkça çekici Van der Waals kuvvetleri hakim duruma geçer (temassız mod).

#### **Atomik kuvvet mikroskobunun kullanımı**

3 farklı teknik ile gerçekleştirilmektedir.

- Temas yöntemi: iğnenin yüzeye temas ederek kullanıldığı teknik (prob ve örnek arasında ki mesafe  $< 0.5$  nm).
- Temassız yöntem: iğnenin yüzeye hiç temas etmeden kullanıldığı teknik (prob ve örnek arasında ki mesafe 0.5-2 nm).
- Vurma yöntemi: iğnenin yüzeye vurarak uygulandığı teknik (prob ve örnek arasında ki mesafe 0.1-10 nm).



**Şekil 3.5.** Titanyum disklerin AFM ile yüzey topografisinin belirlenmesi

### **3.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Ölçümü**

SEM enstrümanı, elektronik konsol ve elektron sütunu olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Elektronik konsol, filament akımı, hızlanan gerilim, odak, büyütme, parlaklık ve kontrast gibi alet ayarlarını yapmaya izin veren kontrol düğmeleri ve anahtarları sağlar. Tüm birincil kontrollere, bilgisayar sistemi aracılığıyla fare ve klavye kullanılarak erişilir. SEM tarafından üretilen görüntü

genellikle elektronik konsoldaki Cathode Ray Tube (CRT, Katot Işın Tüpü)'lerde görüntülenir ya da bunun yerine FEI ile görüntü bilgisayar monitöründe görülebilir. Yakalanan görüntüler dijital formatta kaydedilebilir veya doğrudan basılabilir.

Yüzey topografisini inceleyebilmek için her gruptan birer örnek alınarak ODTÜ'nün merkez laboratuvarında bulunan SEM yardımıyla görüntüler alındı. Örneklerin yüzeyleri 100 Angstrom kalınlıkta altın-palladyum karışımı ile kaplandı. Desikatörde kısa süreli inkübasyonun ardından 1,2 nm. yüksek çözünürlükteki taramalı elektron mikroskobu (QUANTA 400F Field Emission) kullanılarak yüzeyler sırasıyla 200, 500, 1000 ve 5000 kez büyütülerek fotoğrafları alındı.

### 3.3.1. Enerji Ayrımlı X – Işını Spektroskopisi (EDX Dedektörü)

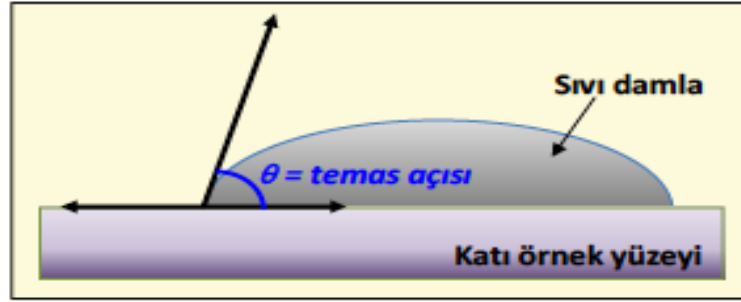
EDX, tanımlanmak istenen bir yüzeyin kimyasal içeriğinin belirlenmesi ve kantitatif değerlendirilmesinde SEM yöntemi ile beraber kullanılan bir analiz aracıdır. SEM belirli bir yüzeyin morfolojik değerlendirmesini yapmaya yardımcı olurken onu tamamlayan EDX altbirimi aynı mikro ve/veya nano yüzeyin kimyasal haritalamasını tanımlar. SEM cihazının bir parçası olan EDX dedektörü kullanılarak her gruptan birer örneğin elementel içeriği nitel ve nicel olarak belirlendi ve haritalandırma ile resim üzerinde elementlerin dağılımı kaydedildi (Şekil 3.6.).



**Şekil 3.6.** Titanyum diskin SEM ve EDX görüntüsü (QUANTA 400F Field Emission)

### 3.4. Temas Açısı Ölçümü

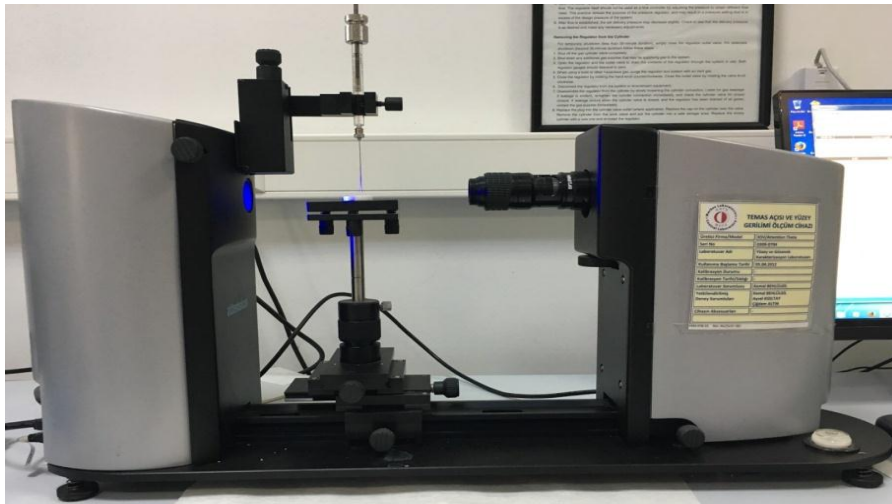
Temas açısını ölçebilmek için ODTÜ'nün merkez laboratuvarında bulunan optik temas açısı-yüzey gerilimi ölçme cihazı (Attension Theta) kullanıldı (Şekil 3.8.). Bu cihaz kullanılarak sıvıların katı yüzeylere ıslatım özellikleri incelendi.



Şekil 3.7. Temas açısı ( $\theta$ )

Temas açısı ( $\theta$ ) : Bir sıvının katı bir yüzeyi ıslatma miktarının nicel ölçümüdür (Şekil 3.7.). Sıvı, katı ve gazın kesiştiği 3 faz sınırında sıvı damlasının oluşturduğu açı ile tanımlanır. Kesişim bölgesinde, katı ile sıvı arasındaki açıdır.  $\theta$  değerinin  $90^\circ$  den küçük olması sıvının yüzeyi ıslattığını veya sıvının yüzeye yayıldığını gösterir.

Serbest yüzey enerjisi: Sıvı yüzeyinde birim uzunluğu gergin tutan kuvvet olarak tanımlanır. En az iki sıvının temas açıları ( $\theta$ ) kullanılır ve dyne/cm cinsinden hesaplanır.

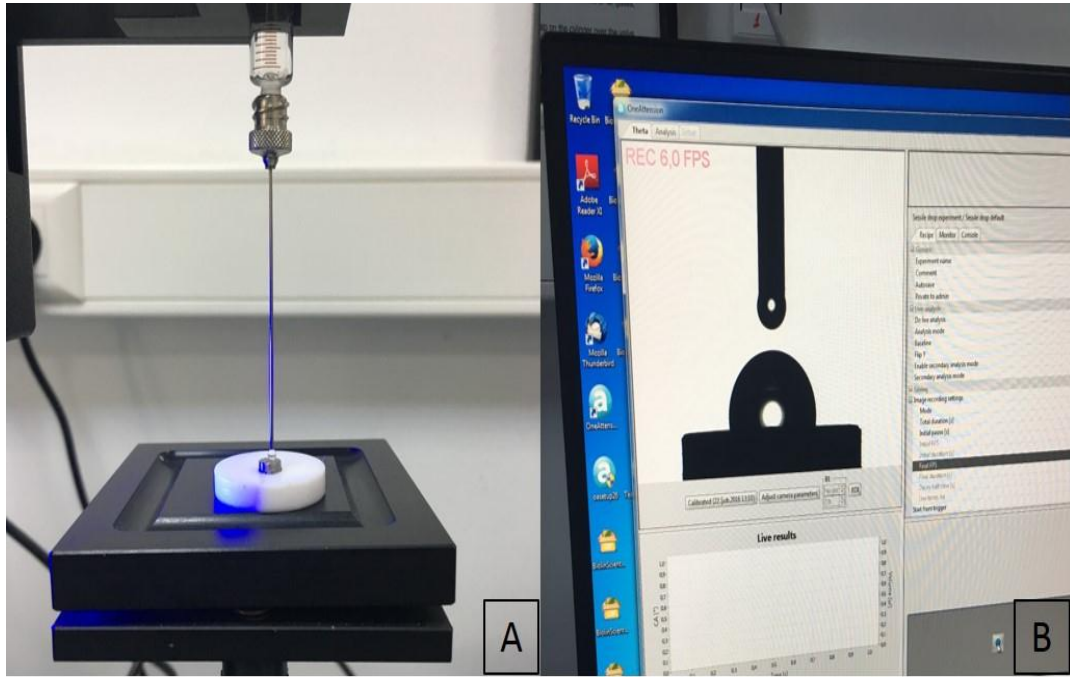


Şekil 3.8. Temas açısı ölçüm cihazı (Attension Theta)



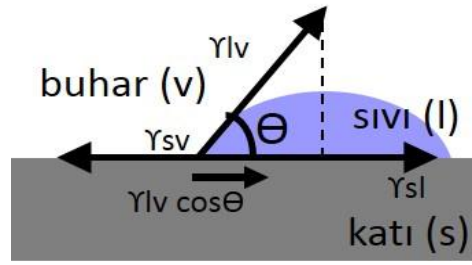
Temas açısı ölçüm cihazı damla görüntülerini zamana bağlı olarak kayıt eder ve bunun doğrultusunda damlanın şeklini analiz eder. Oluşan damla şekli, sıvının yüzey geriliminin ve sıvı ile sıvıyı çevreleyen bölge arasında ki yoğunluk farkının fonksiyonudur. Katı yüzeylerde, temas açısı ve damlanın şekli katının sahip olduğu serbest yüzey enerjisine bağlı olarak değişir.

Dört gruba ayırdığımız titanyum disklerden her gruptan birer örnek seçilerek, ODTÜ'nün merkez laboratuvarında deney gerçekleştirildi. Deneyde durağan damla yöntemi kullanılarak temas açısı ölçümü yapıldı. Her numune üzerinde en az 5 damla kullanılarak 5 sn boyunca ölçüm alındı (Şekil 3.9.).



**Şekil 3.9. (A)** Su damlasının disk yüzeyine temas ettiği an, **(B)** Bilgisayar ekranındaki görüntüsü görülmektedir.

(a)



(b)

Enerjetik etkileşim	Temas açısı etkileşimi	Optik Gösterimi	Makroskopik Etki
$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} > 0$	$0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$		Yüksek ıslanabilirlik (Hidrofiliklik)
$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} > \gamma_{lv}$	$\theta = 0^\circ$		Tamamen ıslanabilirlik (yayılma)
$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} < 0$	$90^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$		Düşük ıslanabilirlik (yayılmama)
$\gamma_{sl} - \gamma_{sv} > \gamma_{lv}$	$\theta = 180^\circ$		Islanmazlık

**Şekil 3.10.** Temas açısı etkileşim diyagramı

(a) İdeal bir katı yüzey üzerindeki sıvı damlacıkla statik temas açısını gösteren şematik diyagram ve Young denkleminin grafik türevi. (b) İslatma gerilimi ve katı bir cismin ıslanması arasındaki ilişki. İslanmanın artması için, ıslanan sıvının yüzey gerilimi, katı cismin yüzey geriliminden daha düşük olmalıdır (195).

### **3.5. Saos-2 Hücrelerinin Titanyum Diskler Üzerindeki Biyokimyasal Değerlendirmesi**

#### **3.5.1. Sterilizasyon Koşulları**

Farklı modifikasyonlara maruz kalan titanyum disklerin yüzeyine Saos-2 hücrelerinin ekilmesinden önce birkaç aşamadan oluşan sterilizasyon sağlanmıştır. İlk aşamada tüm titanyum diskler %96'lık etanol (Ethanol Extra Pure, Merck, US) içerisinde ultrasonik banyoya yerleştirildi ve 30 dakika boyunca sonike edildi. Böylelikle titanyum disklerin üzerine yerleşmiş olabilecek her türlü organik kalıntının ultrasonik ses dalgalarıyla parçalanarak uzaklaştırılması sağlandı. İkinci aşamada titanyum diskler yine %96'lık derişimdeki etanol (Ethanol Extra Pure, Merck, US) içerisinde 40 dakika UV ışığına maruz bırakıldı. (Ultraviyole Sterilizasyon Kabini, Biosan, Ukrayna). Daha sonra 2 kez otoklavlanmış distile suyla ve 2 kez steril PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.0, 10 mM ) tampon ile yıkanarak hücre ekimi için uygun hale getirildi.

#### **3.5.2. Saos-2 Hücrelerinin Ekimi ve Pasajlanması**

Titanyum disklerin kemik dokusu ile etkileşiminin belirlenmesi için insanlardan ticari olarak temin edilen kemikten saflaştırılmış epitelyal morfolojiye sahip Saos-2 (Human osteosarcoma, Saos-2, ATCC, HTB-85 2016, A.B.D.) hücre hattı kullanıldı. Hücreler yurtdışından kuru buz içerisinde getirildi ve deneyler başlayana kadar -86°C'de saklandı. Deney günü dondurulmuş hücreler 37°C su banyosunda (Mettert WNB, Germany) hızlı çözdürülmeye maruz bırakıldı. Deneylerin bu aşamadan sonraki bütün basamakları laminar akış kabini (CleanAir Techniek, Netherlands) içerisinde gerçekleştirildi.

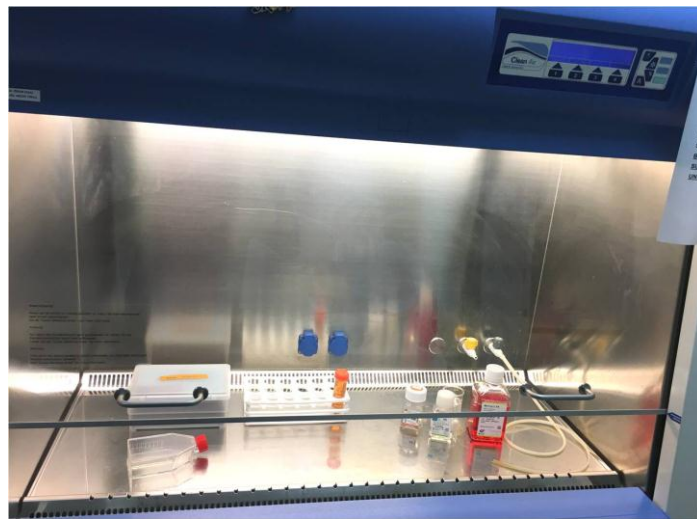
Su banyosunda çözülmüş hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik yüzey alanına sahip flasklar içerisinde %15 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren 15 ml McCoy's besiyerinde ortamına ekildi. Hücrelerin çoğalması her gün ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse TS100, USA) görüntülenip

fotoğraflandı ve 5 günde bir buldukları eski DMEM ortamı aspire edilerek 15 ml FBS'li DMEM eklendi.



**Şekil 3.11.** Saos-2 hücrelerinin T75 flaskta DMEM besiyeri içerisindeki görüntüsü

Hücreler kültür kabı içinde %90 doluluğa ulaştığı zaman eski DMEM ortamı aspire edildi. 2 ml % 0,25 Tripsin-EDTA eklenip % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik inkübatör (Sanyo MCO-18, Japonya) içerisinde üç dakika bekletildi ve hücrelerin tutundukları kültür kabının tabanından kaldırılması sağlandı. Hücrelerin üzerine 8 ml FBS içeren soğuk McCoy's eklendi ve hücreler Hettich Rotina 35R (Germany) isimli cihazda 250 x g' de 10 dakika süreyle santrifüjlendi. Oluşan supernatant aspire edilerek çöken pelette bulunan hücrenin üzerine 1 ml taze FBS içeren 37°C'lik McCoy's besiyeri eklendi. Hücreler pipet yardımıyla homojen hale getirildi ve 1/4 oranında pasajlanıp 15 ml FBS'li McCoy's besiyeri içeren petri kabına eklendi.



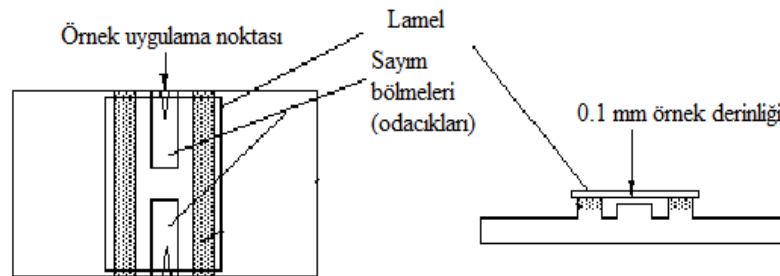
**Şekil 3.12.** Laminar akış kabini



**Şekil 3.13.** Sanyo MCO-18 model hücre kültür inkübatörü

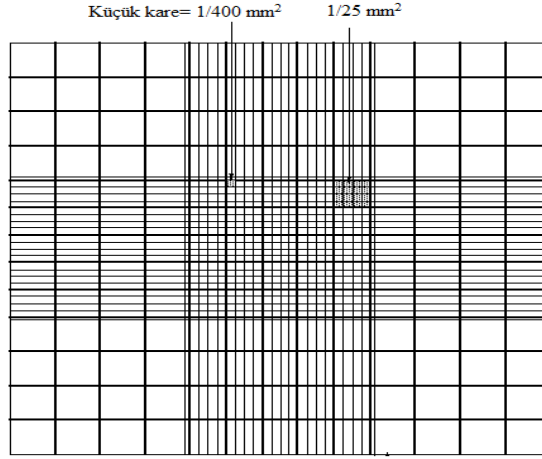
### 3.5.3. Thoma Kamarası Kullanarak Hücrelerin Sayılması

Sayım yapılacak petri/kültür kabı içindeki besiyeri aspire edilmiş ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml %0.25'lik Tripsin-EDTA eklenmiş 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletilmiştir. Tripsiniz edilmiş hücreler toplanarak falkon tüpe alınmış ve üzerine 9 ml PBS eklenmiştir. Böylelikle toplam hacim 10 ml olmuştur. Bir başka deyişle 10 kat seyreltme yapılmıştır. Hücre süspansiyonundan 10 µl hücre alınmış ve Thoma lamında sayım yapılmıştır. Thoma lamının sayım yapılabilir hacmi 0.1 mm<sup>3</sup>tür.



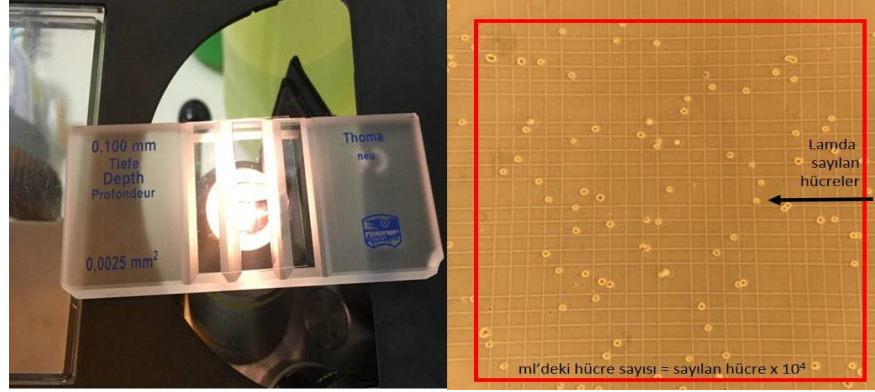
**Şekil 3.14.** Thoma lamının üst ve yan kesiti

Sayım yapılacak alan üzerine lamel kapatılmıştır. Thoma lamı ve lamel arasında kalan örnek uygulama noktasına 10 µl örnek pipetlenmiştir. Hücrelerin sayım bölmelerinin arasına dağılması için kısa bir süre beklenmiştir. (Şekil 3.14.).



**Şekil 3.15.** Thoma lamının sayım bölmelerinin milimetrik gösterimi

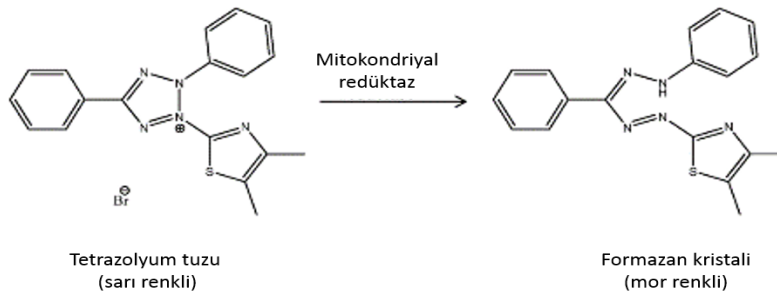
Thoma lamında bulunan sayım bölmeleri üç farklı ölçekte kareler içermektedir. 9 adet büyük bölme kendi aralarında orta ve küçük alt bölmelere ayrılmıştır. Her büyük kare, 16 adet küçük kare barındırmaktadır. Yüzey alanları karşılaştırıldığında, Her bir büyük karenin yüzey alanının  $1\text{mm}^2$  olduğu hesaplanmıştır. Bunun yanında ölçüm bölmelerinin derinliği ise 0.1 mm yüksekliğindedir. Ayrıca her orta boylu karenin içinde ilaveten 25 adet küçük kare yer almaktadır. Sayım yapılacak her alan toplam olarak  $16 \times 25 = 400$  küçük karecik içermektedir (Şekil 3.15.). Küçük kareciklerin kenar uzunluklarının  $1/20$  mm ve derinliklerinin  $1/10$  mm olduğu göz önünde bulundurulduğunda bir adet küçük kareciğin hacmi ( $1/10 \times 1/20 \times 1/20$  eşitliğinden yola çıkılarak)  $1/4.000 \text{ mm}^3$  tür. Bir sayım alanında 400 adet karecik bulunduğuna göre sayımın yapılacağı hacim ( $400 \times 1/4000$  eşitliğinden yola çıkılarak)  $0.1 \text{ mm}^3$  olarak hesaplanmaktadır. Sayım sonucu elde edilen veriler  $\text{cm}^3$  (ml) olarak verileceği için mikroskop altında görülen hücrelerin sayısı ayrıca  $10^4$  ile çarpılmıştır ( $1000 \times 10 = 1000$ , ml çevirmesi ve 10 dilüsyon faktörüdür).



**Şekil 3.16.** Lamda sayılan hücrelerin görüntüsü

### 3.5.4. MTT Canlılık Deneyi

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sitotoksosite deneyi, sarı renkli MTT solüsyonunun hücre sel enzim aktivitesi ile mor renkli formazana indirgenmesi esasına dayanan, hücre büyümesinin veya hücre ölümünün indirekt olarak değerlendirilmesini amaçlayan bir deneydir. Bunun için Saos-2 hücrelerinin titanyum diskler üzerinde günler içerisinde gösterdikleri büyüme davranışının ve dolayısıyla hücre canlılıklarının belirlemek üzere spektrofotometrik temelli MTT deneyine başvurulmuştur.



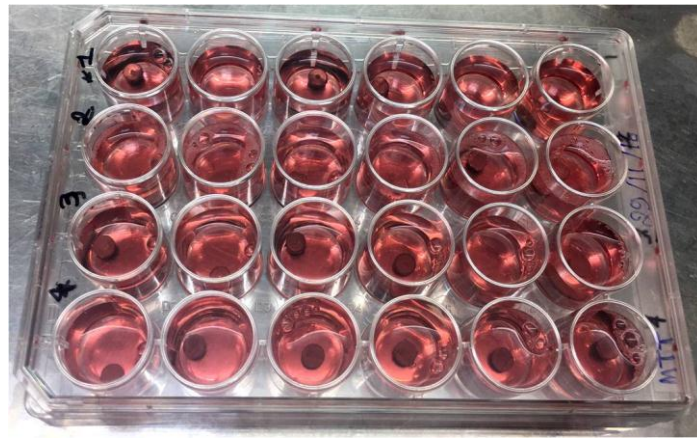
**Şekil 3.17.** Formazan kristallerinin oluşum tepkimesi

Bu yöntemde farklı yüzey uygulamalarına sahip titanyum disklerin üzerindeki hücreler, farklı topografik yapılanmalardan ötürü canlılık yüzdelerinde değişiklikler göstereceklerdir. Bunu belirlemek amacıyla canlı hücrelerin içeriğinde var olan mitokondriyal redüktaz enzimi sarı renkli bir çözelti olan tetrazolyum tuzu ile tepkimeye girecektir. Canlılık belirtisi göstermeyen hücrelerde bu tepkime gerçekleşmeyecektir. Tepkime sonrasında tuz, formazan kristalleri oluşturmak



suretiyle canlı hücrelerdeki enzim tarafından indirgenecek ve rengi değişerek mor renkli kristaller meydana getirecektir. Oluşan kristaller MTT çözücü solüsyonu yardımıyla çözülecek ve spektrofotometrede ölçülecektir. Oluşan rengin yoğunluğu, mitokondriyal redüktaz enziminin aktivitesiyle, dolayısıyla hücre canlılığıyla doğru orantılıdır.

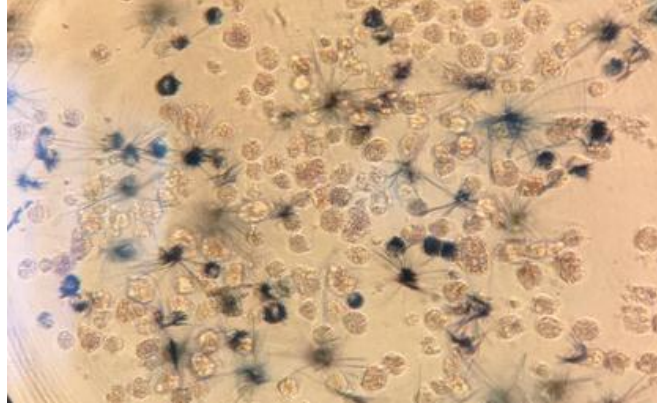
Deneyin gerçekleştirileceği gün Saos-2 hücreleri 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her bir kuyucukta 50000 hücre içerecek şekilde bir süspansiyon halinde titanyum disklerin üzerine ekildi. Hücreler 37°C 'de %5 CO<sub>2</sub>'lik ortamda inkübasyona bırakıldı (n=6).



**Şekil 3.17.** 24 kuyucuklu plakalarda hücre ekimi

Örnekler 2. günde, 3. günde ve 7. günde MTT deneyi için 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Belirlenen kuyucuklara FBS içermeyen DMEM eklendi. Üzerine 5 mg/ml'lik stok çözeltiden 20 µl MTT solüsyonu eklendi. Hücreler 4 saat boyunca 37°C'de inkübatörde MTT solüsyonu ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında formazan kristallerinin varlığı mikroskopta teyit edildi (Şekil 3.18.). Ardından kuyucuklara %23 Sodyum dodesilsülfat (SDS) ve %45 dimetilformamid (DMF) içeren MTT çözücü solüsyonu eklendi.





**Şekil 3.18.** Formazan kristallerinin görüntüsü

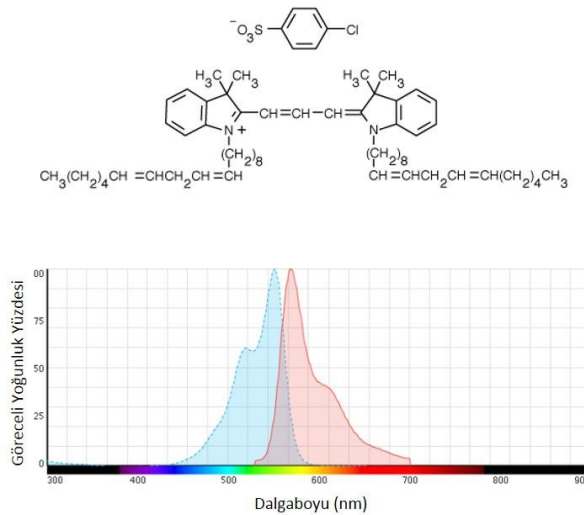
Kristaller çözüldükten sonra örnekler ELISA plaka okuyucuda (Biotek, PowerWave XS, US) (Şekil 3.19.) 590 nm. dalga boyunda ölçüldü. Absorbans değerleri kaydedildi.



**Şekil 3.19.** ELISA plak okuyucu

### 3.5.5. Hücrelerin Floresan Mikroskopta Görüntülenmesi

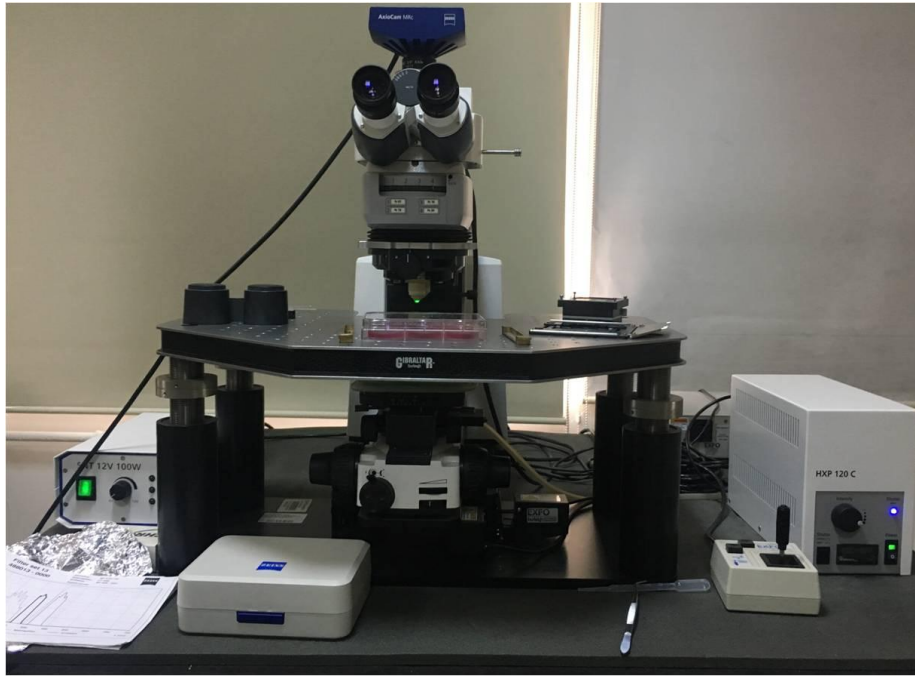
Bu çalışmada oldukça yüksek lipofilik özellikleri ile bilinen karbosiyanin Dil boyası hücrelerin floresan görüntülenmesinde kullanıldı. Türevleri olan benzer özellikteki DiO ve DiD gibi Dil boyası da hücre-hücre füzyonunun, hücre göçünün, hücresel yapışmanın izlenmesi için tasarlanmış düşük sitotoksik etkiye sahip bir floresan boyadır. Dil boyası Saos-2 gibi adherent özelliğe sahip hücrelerin görüntülenmesinde tercih edilen yeni nesil bir belirteçtir. Dil belirteci hücre ve çekirdek membranından geçer, çok düşük oranda da sitoplazmaya nüfuz eder. Böylelikle çoğalan hücrelerin membranlarının yüksek özgüllükle görüntülenmesine olanak tanır. Şekil 3.20. 'de Dil boyasının kimyasal yapısı ve eksitasyon/emisyon ölçüm değerlerini gösteren spektrum grafiği verilmiştir.



**Şekil 3.20.** Dil boyasının yapısı ve eksitasyon/emisyon değerleri

%90 doygunluğa ulaşan hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırıldı ve 250 g'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet DMEM besiyerinde çözüldü. Çözünmüş hücre süspansiyonuna 15 µl floresan Dil boyası eklendi. Hücreler 60 dakika süresince 37°C'de inkübe edildi. Hücreler kuyucuk başına 50000 hücre olacak şekilde 6'lık plakalara ekildi. Sırasıyla Kontrol, Lazer, SLA ve Lazer+SLA olarak modifiye edilmiş yüzeylere sahip titanyum örnek grupları, her gruptan üçer adet olacak şekilde 6'lık plaklara yerleştirildi. Hücrelerin üzerine 4 ml

DMEM besiyeri eklendi ve 37 °C'de %5'lik CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırılıp 48 saat süresince inkübe edildi. 48 saatin sonunda tüm örnek grupları fluoresan görüntülenmesi gerçekleştirilmek üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalına götürüldü. Her bir gruptan birer adet örnek rastgele seçildi. Zeiss Examiner A1 marka fluroesans mikroskobu (Şekil 3.21.) kullanılarak hücreler görüntülendi. Örneklerin yüzeyinden 10 X ve 40 X büyütme altında alınan görüntüler kaydedildi.

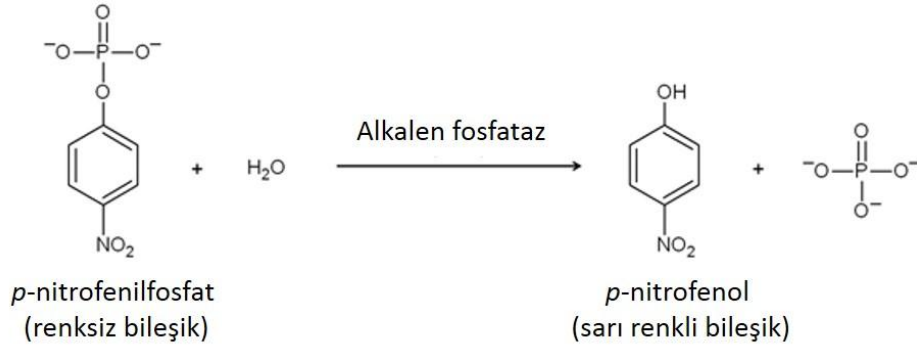


**Şekil 3.21.** Zeiss Examiner A1 floresan mikroskobu

### 3.5.6. Saos-2 Hücrelerinde Alkalen Fosfataz Aktivitesi Ölçümü

Alkalen fosfataz (ALP, EC 3.1.3.1.) bazik ortamda fosfat monoesterlerin hidrolizini katalizleyen ve aktivitesi için magnezyum ve çinkoya ihtiyaç duyan glikoprotein yapıda membran bağlı bir metalloenzimdir (196). Aktif formu dimeriktir. Eksprese olduğu dokuya bağlı olarak 4 farklı izoenzimi bulunmaktadır; intestinal ALP, plasental ALP, germ hücre ALP ile karaciğer, kemik ve böbrekte bulunan doku nonspesifik ALP. Kemikte bulunan ALP'nin kemik kalsifikasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (197). Bu sebeple Enzimatik ALP ölçümleri osteojenik aktivitenin bir göstergesidir. Kemik hücrelerinin fonksiyonel başkalaşımında

osteojenik aktivite önemli yer tutmaktadır. Diğer hücre hatlarından farklı olarak Saos-2 hücrelerinin modifiye edilmiş titanyum yüzeyler üzerindeki davranışını bu anlamda sadece hücre canlılığı üzerinden değerlendirmek kısmen yetersiz kalmaktadır. Bu amaçla bu tez çalışması kapsamında osteojenik aktiviteyi belirlemek amacıyla ALP deneyi gerçekleştirilmiş ve sonuçları hücre canlılığı deneyleri ile beraber değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.22.** Enzimatik ALP aktivitesinin spektrofotometrik prensibi

Alkalen fosfataz deneyi renksiz bir bileşik olan p-nitrofenilfosfatın (pNPP) osteojenik aktivite gösteren canlı hücrelerin içeriğinde yer alan alkalen fosfataz tarafından sarı renkli bir bileşik olan p-nitrofenole dönüştürülmesi ve bu renk değişiminin spektrofotometrik olarak izlenmesi temeline dayanmaktadır. 96'lık kuyucuklara kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde Saos-2 hücreleri eklenmiştir. Örnekler n=6 tekrarlı çalışılmıştır. Kuyucukların içerisine modifiye edilmiş titanyum yüzeylere sahip Kontrol, Lazer, SLA ve Lazer+SLA gruplarından örnekler eklenmiştir. Kuyucuklara 100 µl DMEM besiyeri eklenmiştir ve hücreler 37 °C'de %5'lik CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletilmiştir. Deneyi takiben 2., 3. ve 7. günde ALP deneyi yapılmıştır. Deneyin belirlenen günlerinde her kuyucuğa 98 µl magnezyum içeren dietanolamin çözeltisi eklenmiştir. Ardından 2 µl 0,67 M pNPP, önceden 37 °C'de ısıtılmış 96'lık plaklara eklenmiştir. 2 µl alkalen fosfataz substratının eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Enzimatik tepkime 405 nm.'de spektrofotometre kullanılarak 30 dakika boyunca izlenmiş ve değerler her dakika kaydedilmiştir. Açığa çıkan renk alkalen fosfataz enziminin aktivitesiyle doğru orantılıdır.

Her örnek grubundaki ALP aktivitesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\frac{(\Delta A_{405\text{nm}}/\text{dakika Örnek} - \Delta A_{405\text{nm}}/\text{dakika Kör}) (df) (\text{ml toplam hacim})}{(18,5) (\text{örnek hacmi})}$$

df = dilüsyon faktörü

18,5 = pNPP'nin 405 nm'deki milimolar ekstinksiyon kofaktörü

1 ünite enzim, 1 dakikada 1 mikromol pNPP'yi 37 °C'de hidrolize eden miktar olarak tanımlanmaktadır.

### 3.5.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizleri

Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi SPSS (Version 22.0, Statistical Packages for the Social Sciences, SPSS Inc., US) istatistiksel yazılım programı kullanılarak yapıldı. 48. saatte 4 grubun (Kontrol, SLA, Lazer, Lazer+SLA) birbiri arasındaki farklılıkları tek yönlü varyans analizi ve ikili karşılaştırma Duncan testiyle saptanmıştır. 72 saatte varyanslar homojen olmadığından gruplar arası karşılaştırma Welch varyans analizi ve ikili karşılaştırma Tamhane testiyle yapılmıştır. İstatistiksel p değerinin 0,005'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

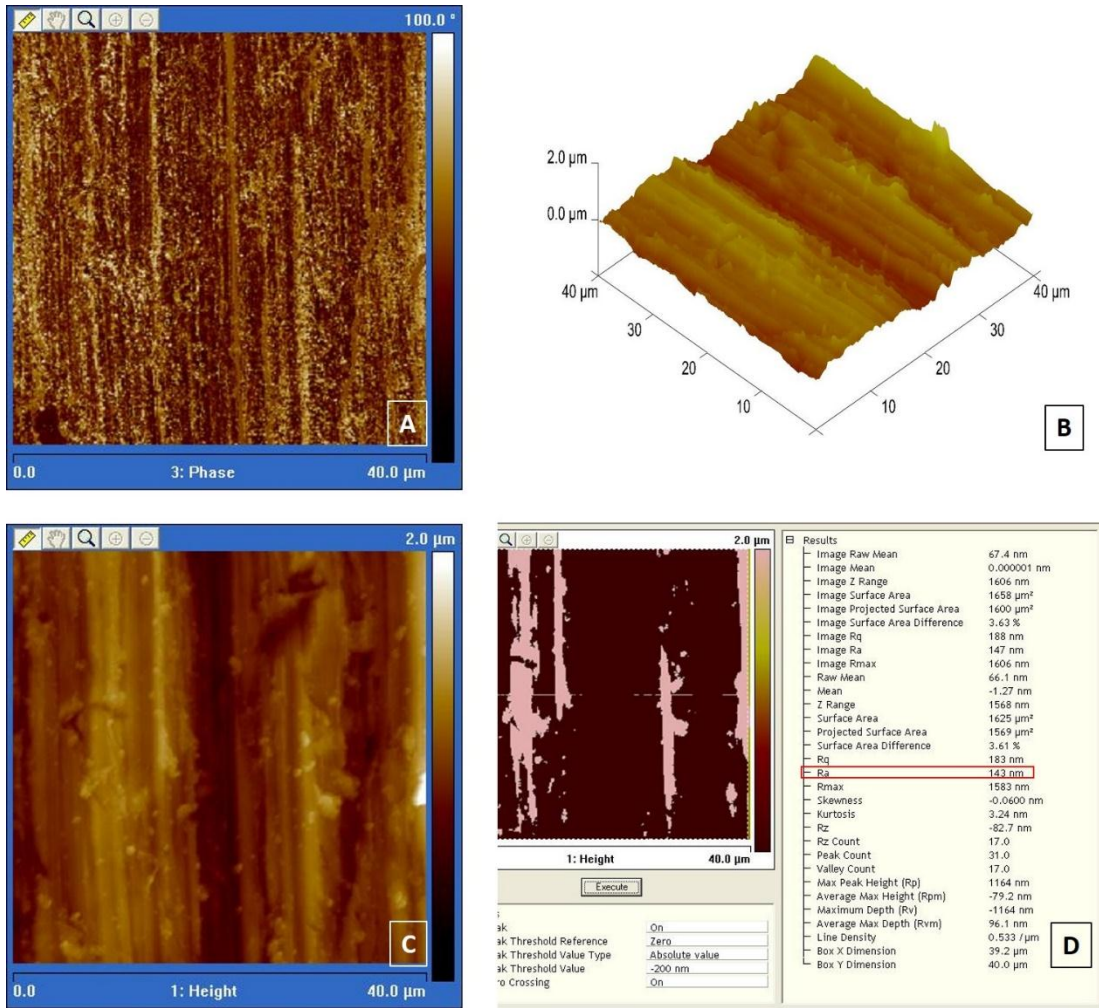
### 4.1. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Ölçümü Bulguları

AFM farklı işlemlere maruz bırakılmış titanyum yüzeylerin topografilerinin çeşitliliğini birbirinden ayırmakta kullanılan yüksek çözünürlüklü bir referans yöntemidir. Her gruptan birer adet örnek rastgele seçilerek AFM ile 2 boyutlu, 3 boyutlu, faz kontrast görüntüsü ve yükseklik ölçümünün görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda görüntülenmesi gerçekleştirilen tüm örneklerde cihazın programı kullanılarak kantitatif olarak Ra ölçümü yapılmıştır ve örnekler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. AFM’de her bir örneğin sırasıyla 1, 5, 20 ve 40  $\mu\text{m}$ ’lik büyütmelemlerde görüntüleri elde edilmiştir. AFM cihazı ile alınan görüntüler CSM ImagePlus programı kullanılarak kaydedilmiştir. Faz ve yükseklik ekranlarında gözlemlenen koyu renkli alanlar yüzey işleme sonrasında meydana gelen çukurlara karşılık gelirken aydınlık alanlar yükselteleri işaret etmektedir. Faz ekranından türetilen 3 boyutlu grafikleme gerçek zamanlı olarak yüzeylerin uzaysal konumlanımını göstermektedir. Böylelikle SEM ile desteklenecek yüzey görüntüleri biyolojik materyellerin uyumlanmasına yönelik bilgi verebilecektir. Yükseklik ekranından elde edilen kantitatif veriler işlenmiş yüzeylerin pürüzlülükleri (Ra, Rp, Rv, Rq, Rz), yüzey alanları, maksimum yükseklik ve derinlikleri ile bu bulgulara ait ortalama değerleri göstermektedir. Her bir örnek grubu için elde edilmiş bulgular doğrultusunda 4 ayrı kalitatif ve kantitatif grafik, bulgularda şekil olarak sunulmuştur. Ayrıca her bir örnek grubuna ait Ra verilerinin bulunduğu bir tablo hazırlanarak Tablo 4.1.’de sunulmuştur.

**Tablo 4.1.** AFM kullanılarak elde edilen Ra ölçümleri tablosu

Örnek Grubu	Ra, nm
Kontrol	143
Lazer	235
SLA	415
Lazer + SLA	477

Şekil 4.1.'de kontrol grubu örneğinin su zımparasıyla pürüzsüzleştirilmiş yüzeyine ait AFM görüntülenmesi verileri toplu halde sunulmuştur. AFM ölçümü sonrasında yükseklik ekranından elde edilen değerlendirmeye göre kontrol grubu için Ra değeri 143 nm. olarak bulunmuştur ve kaydedilmiştir.

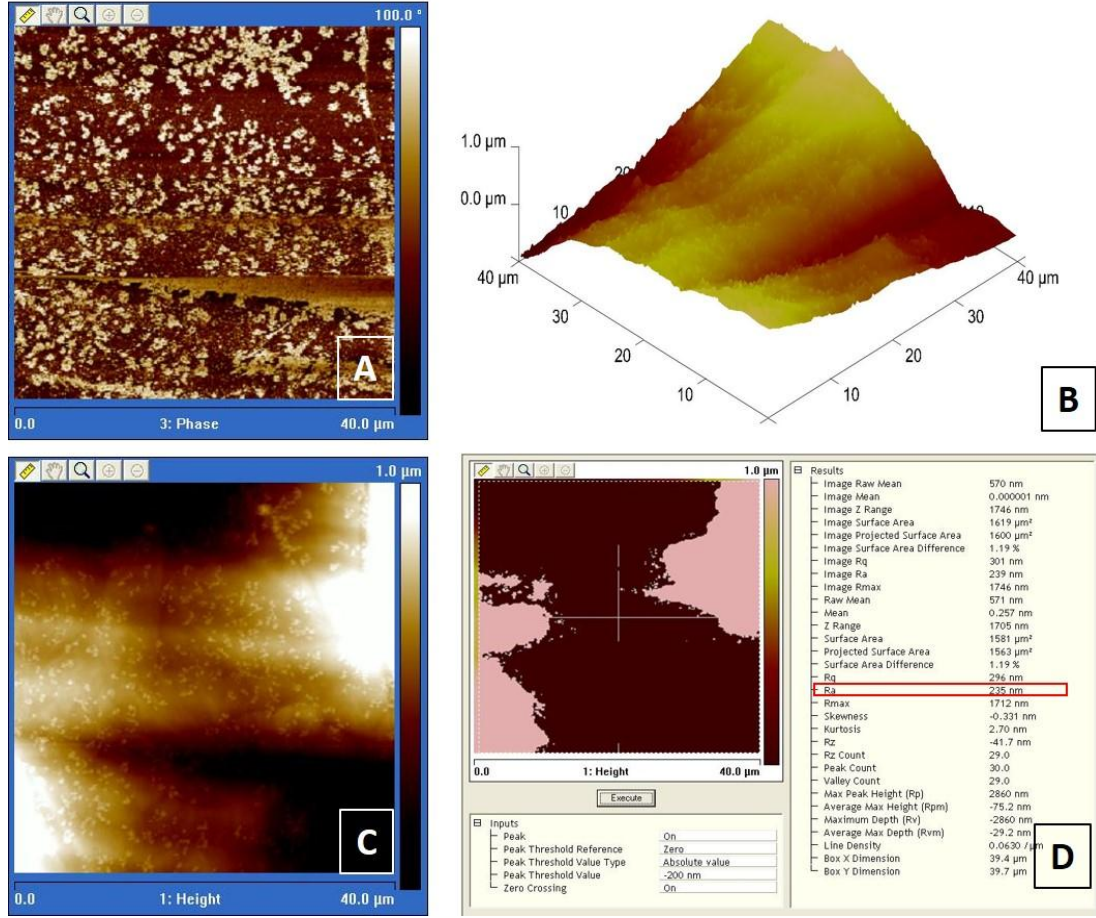


Şekil 4.1. Titanyum kontrol disklerinin AFM görüntüleri.

- A) Faz ekranı, B) 3 boyutlu grafik gösterim, C) 2 boyutlu yükseklik ekranı,  
D) yükseklik ölçümü değerleri ekranı.



Şekil 4.2.'de Lazer ile işlenmiş titanyum grubu örneğinin yüzeyine ait AFM görüntülenmesi verileri toplu halde sunulmuştur. AFM ölçümü sonrasında yükseklik ekranından elde edilen değerlendirmeye göre lazer grubu için Ra değeri 235 nm olarak bulunmuştur ve kaydedilmiştir. Lazer grubunda kontrol grubuna kıyasla pürüzlülük %64 oranında artmıştır.



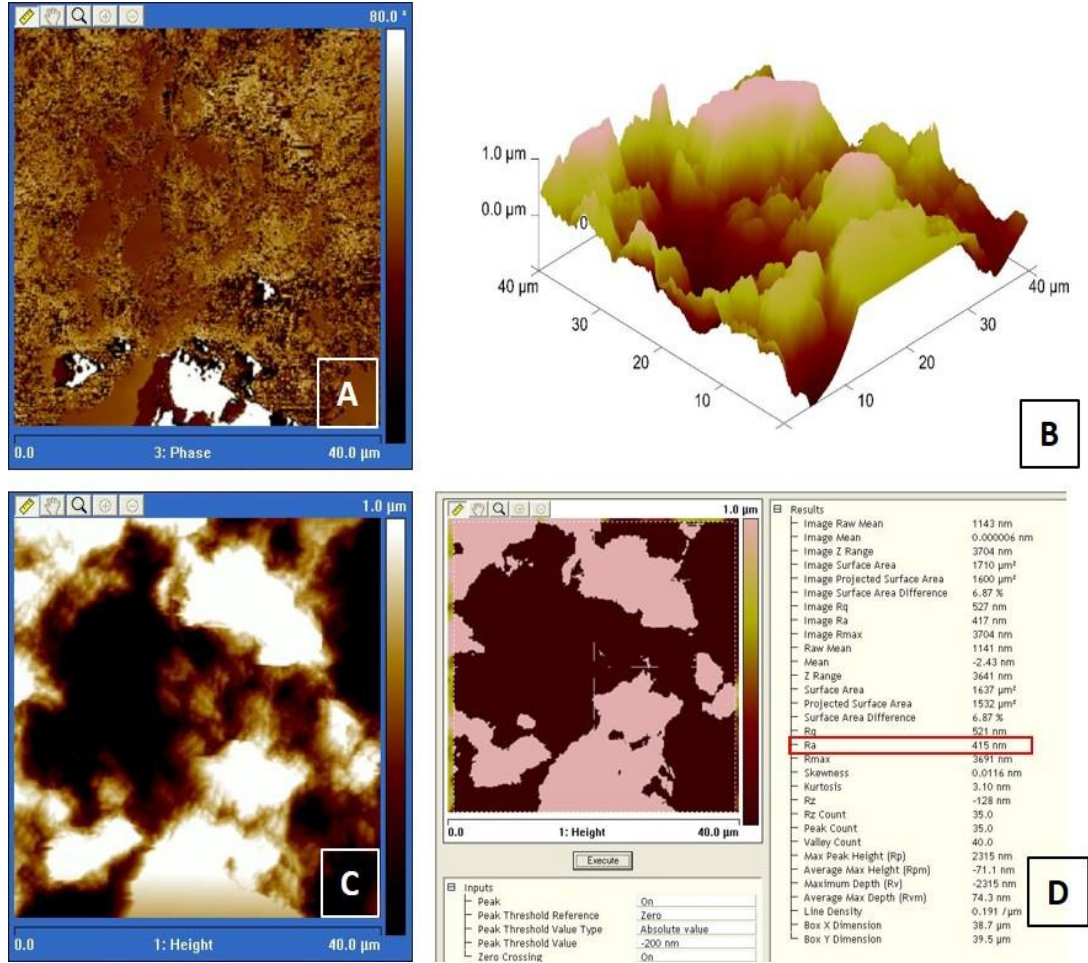
Şekil 4.2. Lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin AFM görüntüleri.

A) Faz ekranı, B) 3 boyutlu grafik gösterim, C) 2 boyutlu yükseklik ekranı,

D) yükseklik ölçümü değerleri ekranı.



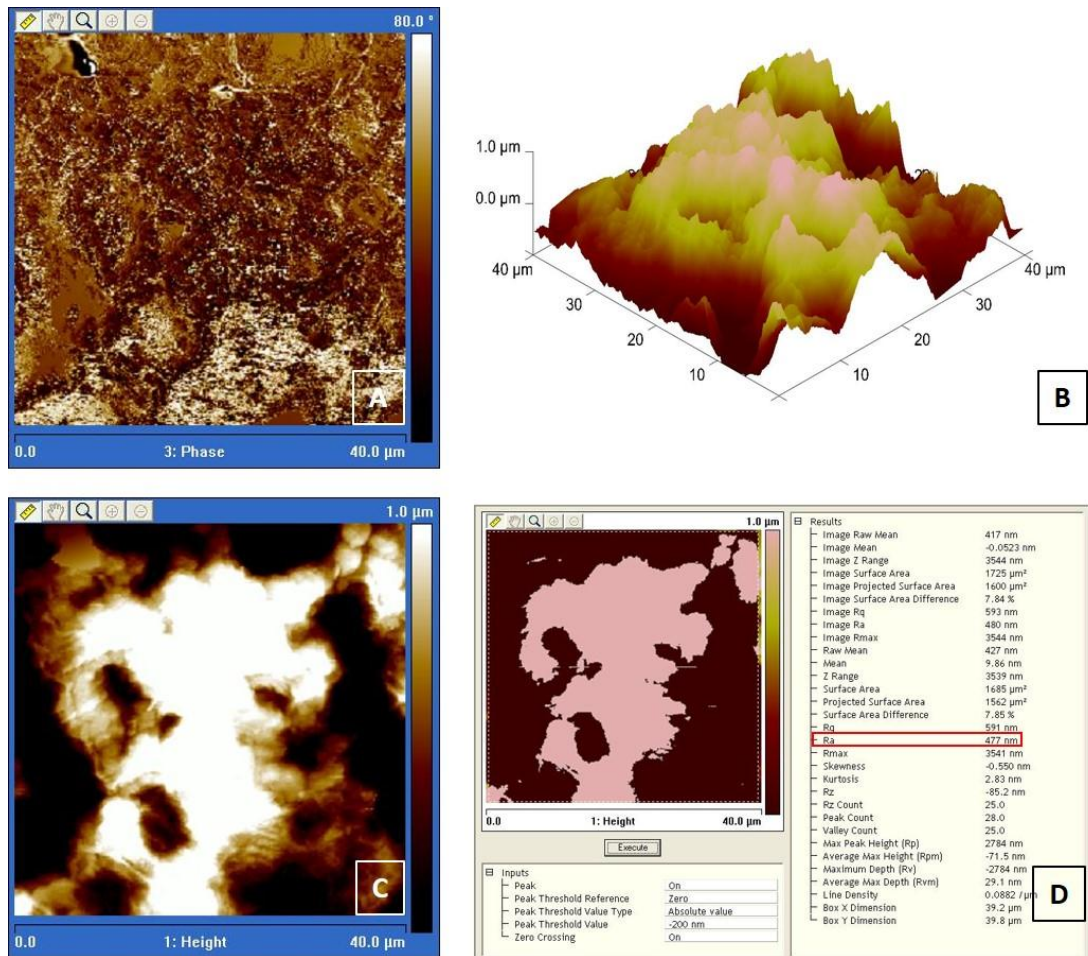
Şekil 4.3.'de SLA ile işlenmiş titanyum grubu örneğinin yüzeyine ait AFM görüntülenmesi verileri toplu halde sunulmuştur. AFM ölçümü sonrasında yükseklik ekranından elde edilen değerlendirmeye göre SLA grubu için Ra değeri 415 nm. olarak bulunmuştur ve kaydedilmiştir. SLA grubunda kontrol grubuna kıyasla pürüzlülük %290, lazer grubuna kıyasla %176 oranında artmıştır.



Şekil 4.3. SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin AFM görüntüleri.

- A) Faz ekranı, B) 3 boyutlu grafik gösterim, C) 2 boyutlu yükseklik ekranı,  
D) yükseklik ölçümü değerleri ekranı.

Şekil 4.4.'de Lazer + SLA ile işlenmiş titanyum grubu örneğinin yüzeyine ait AFM görüntülenmesi verileri toplu halde sunulmuştur. AFM ölçümü sonrasında yükseklik ekranından elde edilen değerlendirmeye göre Lazer + SLA grubunda Ra değeri 477 nm. olarak bulunmuştur ve kaydedilmiştir. Lazer + SLA grubunda kontrol grubuna kıyasla pürüzlülük %330, lazer ile işlemeye kıyasla %202, SLA ile işlemeye kıyasla %14 oranında artmıştır. Elde edilen bulgulara göre en yüksek pürüzlülük Lazer ve SLA işlemlerinin beraber uygulandığı titanyum örneklerinde elde edilmiştir.



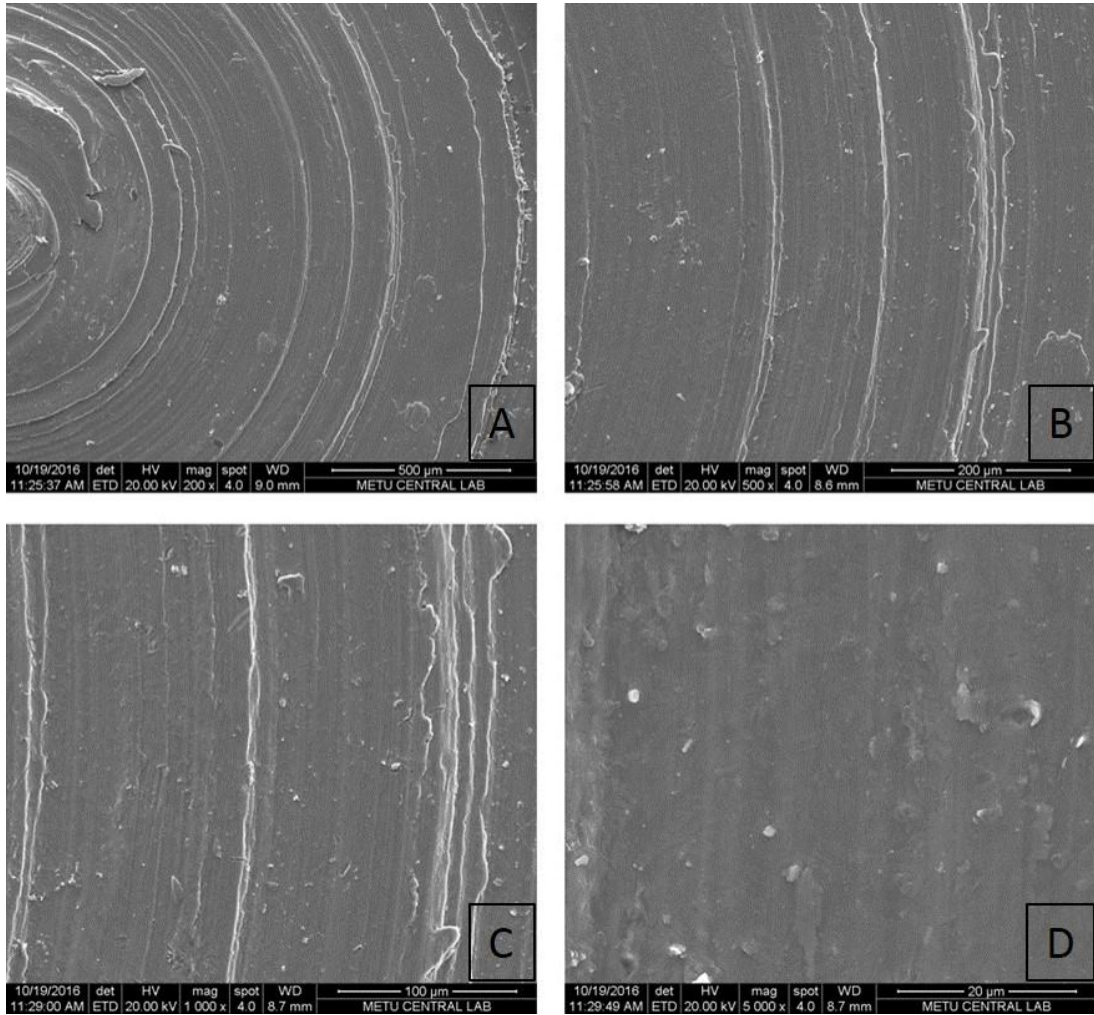
**Şekil 4.4.** Lazer + SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin AFM görüntüleri.

- A) Faz ekranı, B) 3 boyutlu grafik gösterim, C) 2 boyutlu yükseklik ekranı,  
D) yükseklik ölçümü değerleri ekranı.

## 4.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleri

Her gruptan birer adet örnek rastgele seçilerek SEM görüntüleri ve EDX ölçümü gerçekleştirilmiştir. SEM’de her bir örneğin sırasıyla 200, 500, 1000 ve 5000 büyütmelerde görüntüleri kaydedilmiştir.

Şekil 4.5.’de kontrol grubu örneğinin yüzeyine ait 200 X (A), 500 X (B), 1000 X (C) ve 5000 X (D) büyütmelerinin görüntüleri sunulmuştur. Yüzeyle ilgili büyütme artmasına rağmen görece olarak pürüzsüzlüğün korunduğu gözlenmektedir. Bu nitelik özellikle 5000 X büyütmede öne çıkmaktadır.

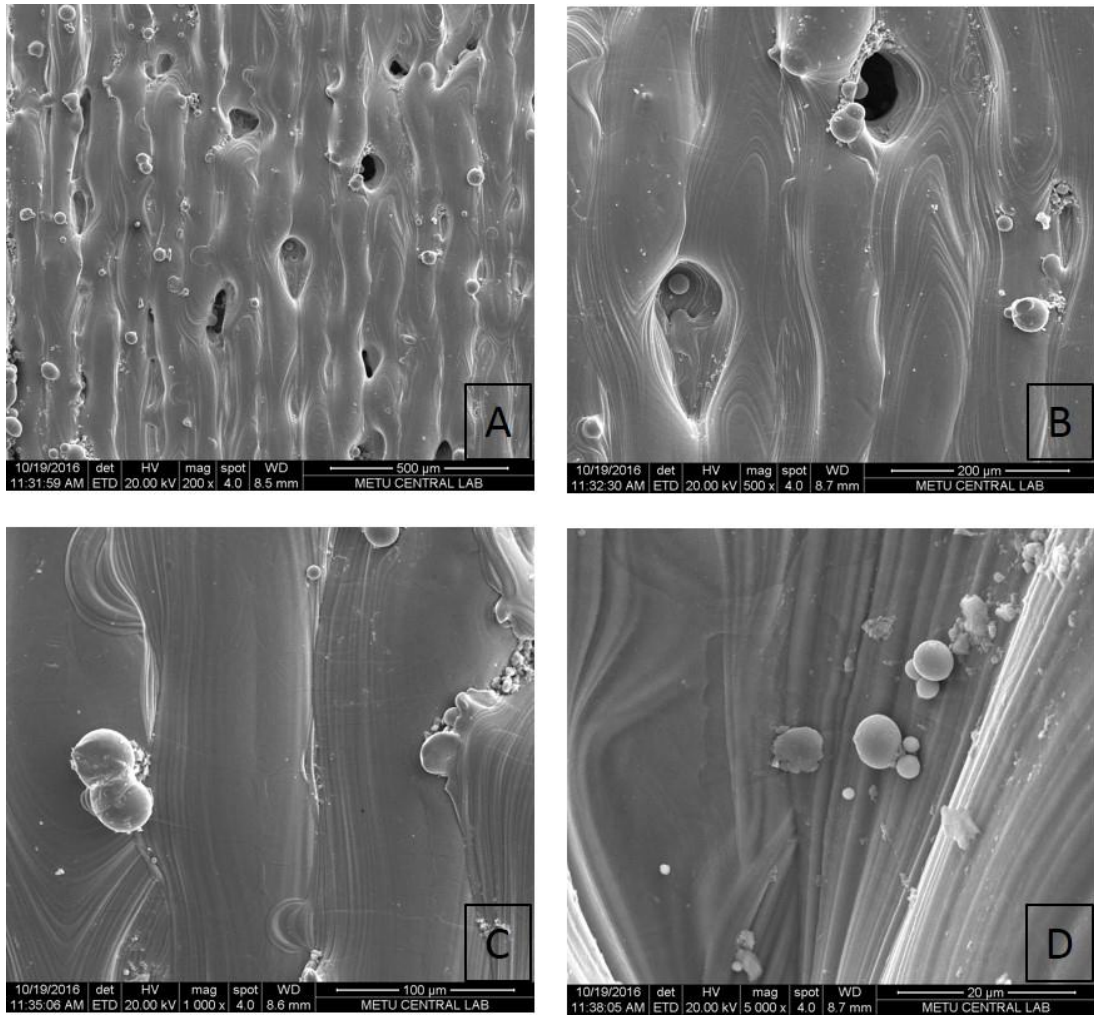


Şekil 4.5. Titanyum kontrol disklerinin SEM görüntüleri.

A) 200 X, B) 500 X, C) 1000 X, D) 5000 X büyütme.



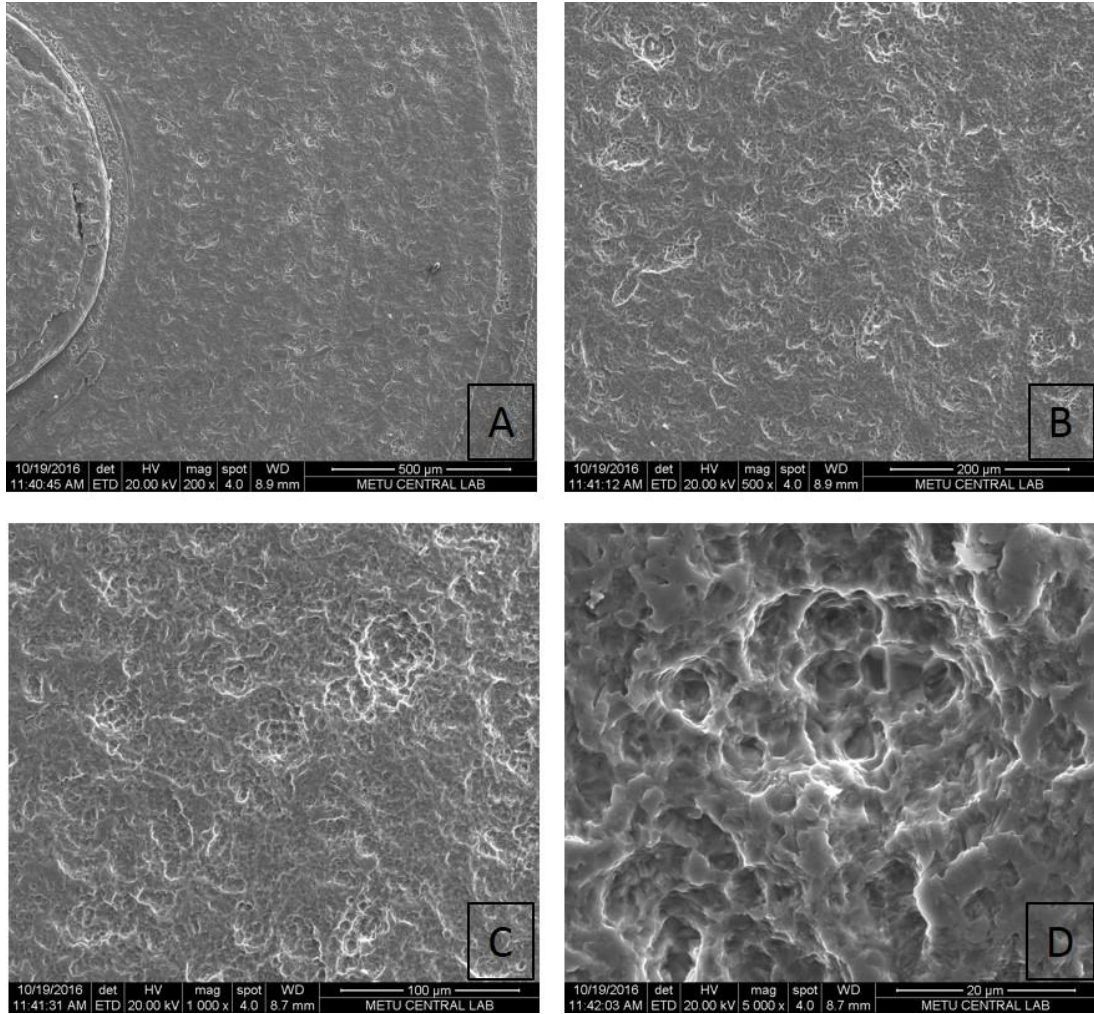
Şekil 4.6.'da selektif lazer ergitme ile işlem görmüş titanyum grubu örneğinin yüzeyine ait 200 X (A), 500 X (B), 1000 X (C) ve 5000 X (D) büyütmelerinin görüntüleri sunulmuştur. Özellikle 200 X ve 500 X büyütmelerde daha belirgin olmakla beraber ergitme işlemi sonrasında kontrol grubuna kıyasla yüzeyde pürüzlülüğün artması ile beraber yatay düzenlenimler ortaya çıkmıştır. 1000 X ve 5000 X büyütmede gözlemlenen mikrokürecikler ise (sırasıyla 100 ve 20  $\mu\text{m}$  skalada görüldüğü şekliyle) silisyum ve titanyum alaşımlarının ergitme işlemini takiben oksitlenmesiyle ortaya çıkan görüntüsüdür.



**Şekil 4.6.** Lazer ile işlenmiş titanyum disklerin SEM görüntüleri

A) 200 X, B) 500 X, C) 1000 X, D) 5000 X büyütme.

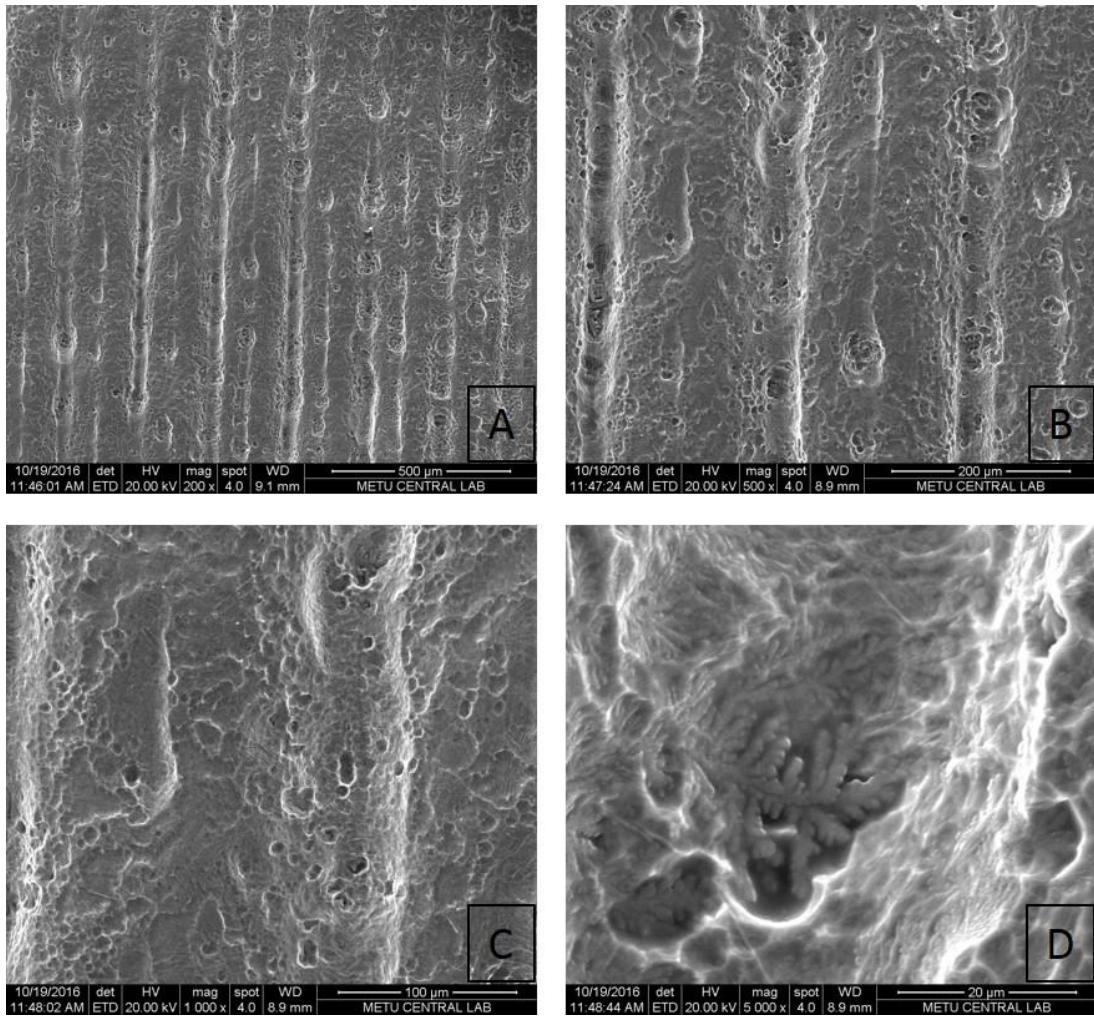
Şekil 4.7.'de SLA grubu örneğinin yüzeyine ait 200 X (A), 500 X (B), 1000 X (C) ve 5000 X (D) büyütmelerinin görüntüleri sunulmuştur. Kontrol grubuna kıyasla SLA uygulaması sonrasında yoğun şekilde tüm örnek yüzeyi boyunca pürüzlülüğün arttığı görülmektedir. Yüzeğe ait büyütme arttıkça pürüzlülüğün üç boyutlu konumlanımı belirginleşmektedir.



Şekil 4.7. SLA ile işlenmiş titanyum disklerin SEM görüntüleri

A) 200 X, B) 500 X, C) 1000 X, D) 5000 X büyütme.

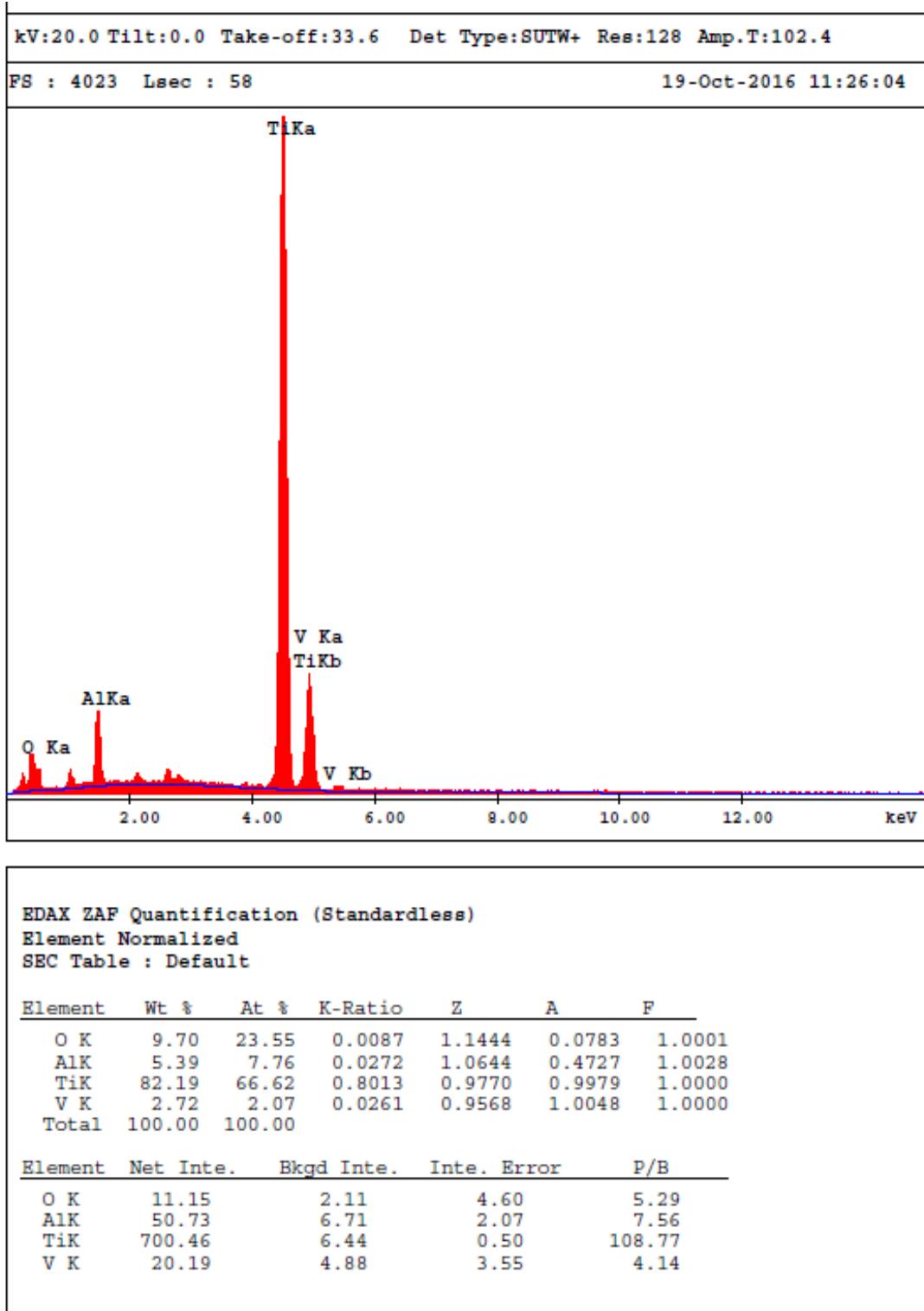
Şekil 4.8.'de Lazer+SLA grubu örneğinin yüzeyine ait 200 X (A), 500 X (B), 1000 X (C) ve 5000 X (D) büyütmelerinin görüntüleri sunulmuştur. Kontrol grubuna kıyasla yüzey üzerinde hem yatay düzlenimlerin hem de yoğun pürüzlülüğün belirginleştiği görülmektedir. Bu gözlem yüzeyin büyütmesi arttıkça ortaya daha belirgin şekilde çıkmaktadır. Bu birleşik etki bir anlamda sadece kontrol grubuna kıyasla değil, hem Lazer hem de SLA grubuna kıyasla da daha belirgin bir pürüzlülüğün oluştuğunu göstermektedir.



**Şekil 4.8.** Lazer+SLA ile işlenmiş titanyum disklerin SEM görüntüleri

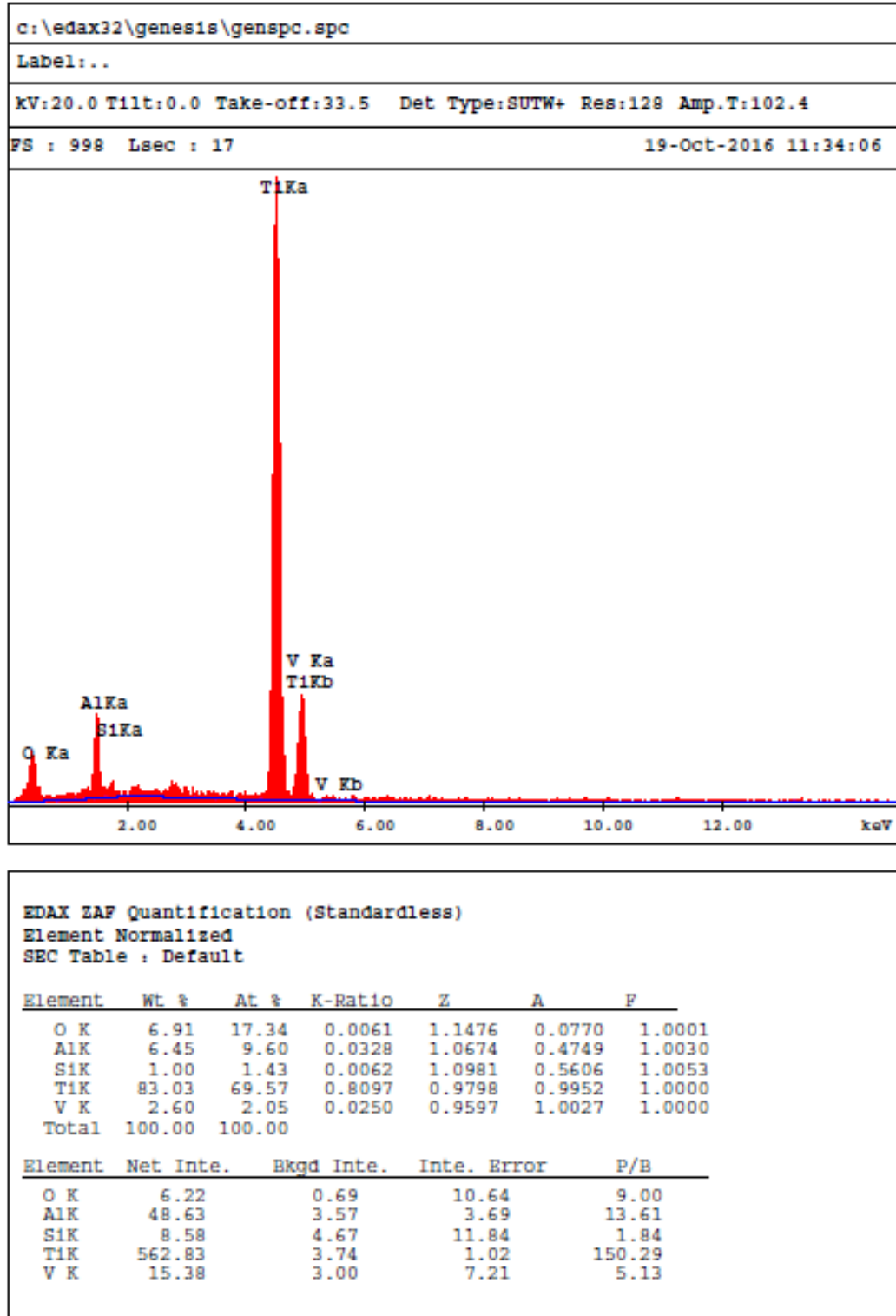
A) 200 X, B) 500 X, C) 1000 X, D) 5000 X büyütme.

### 4.3. Enerji Ayırmalı X- Işını Spektroskopisi (EDX) Ölçümleri



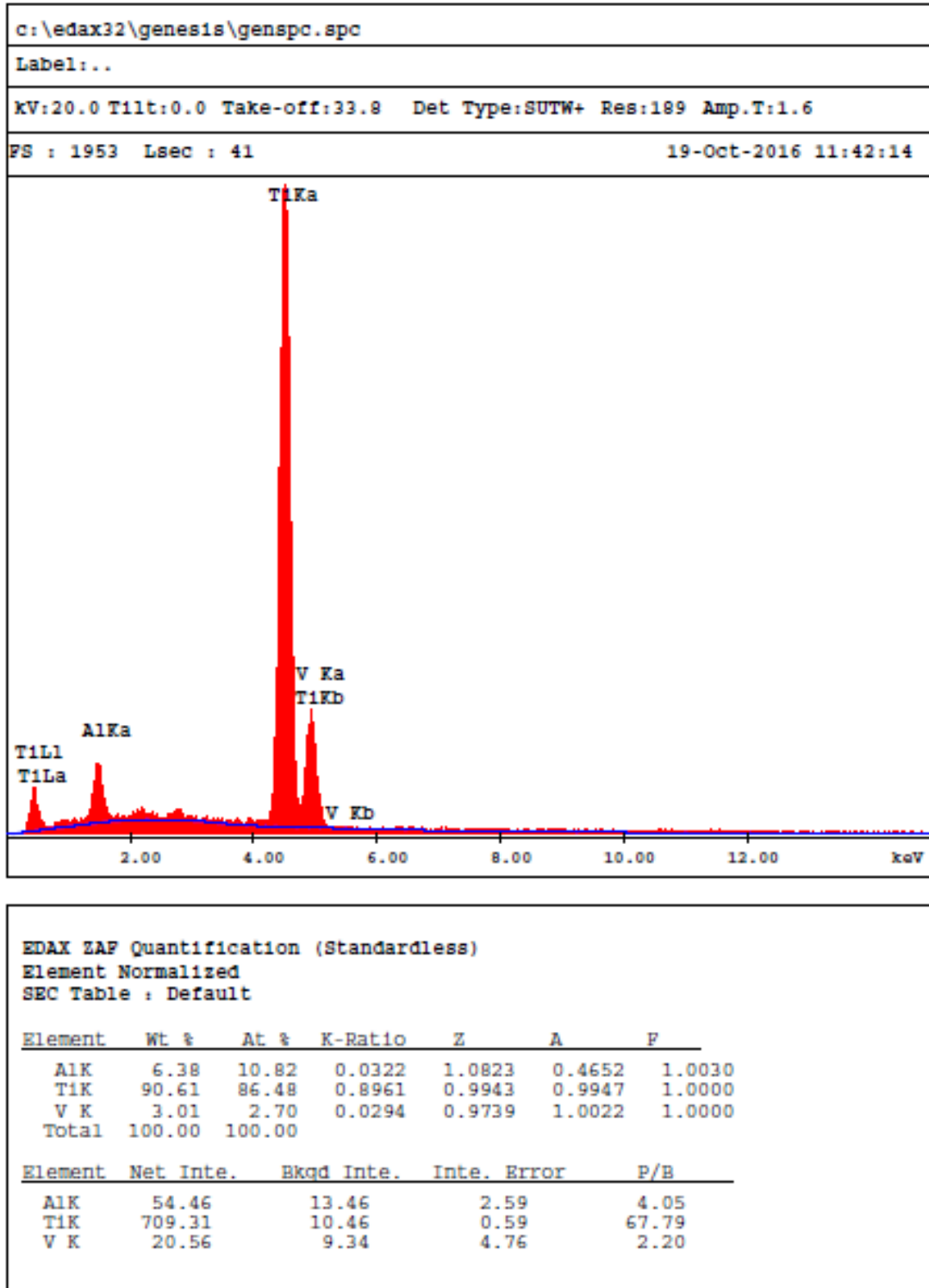
Şekil 4.9. Titanyum kontrol disklerinin EDX sonuçları



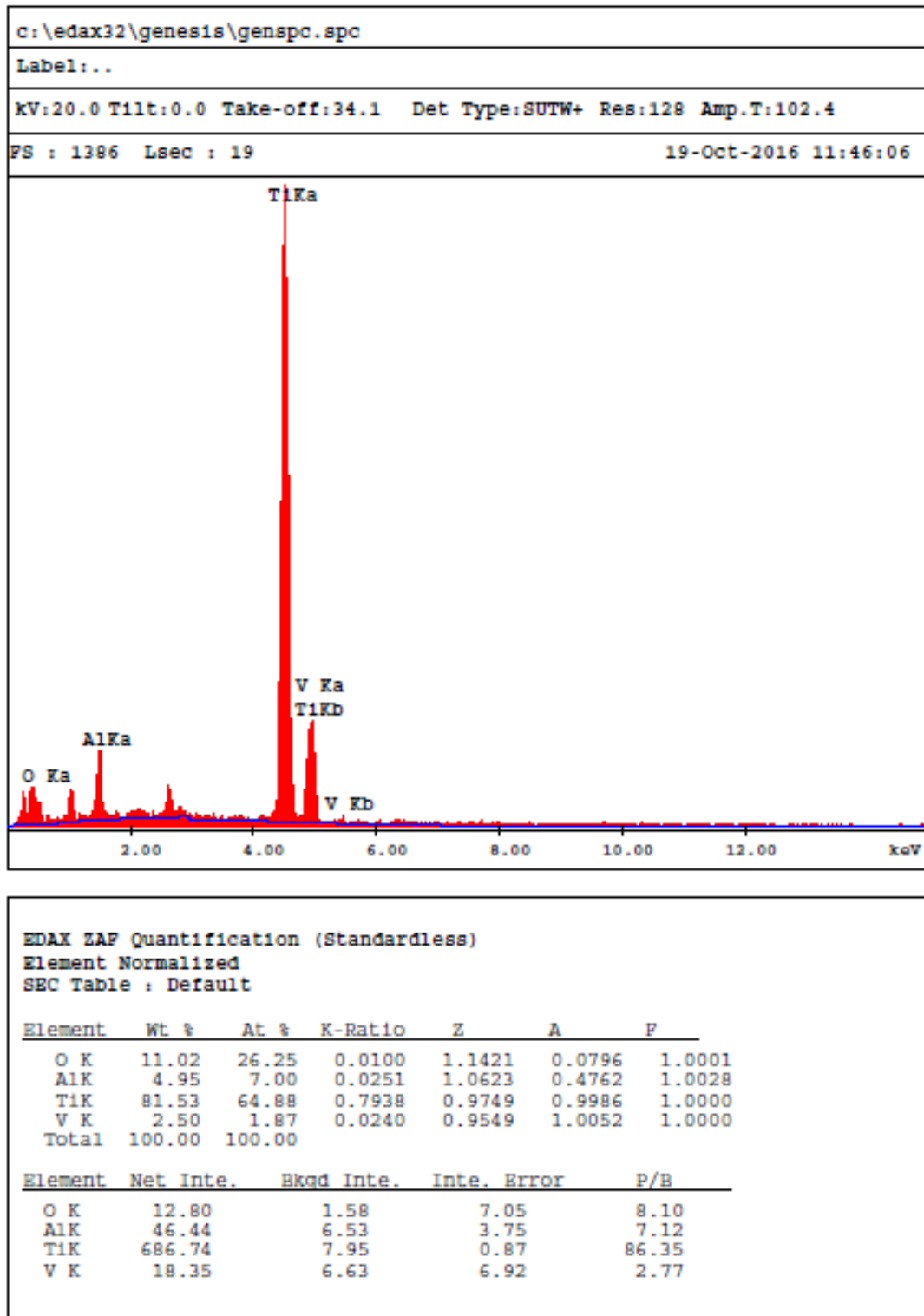


Şekil 4.10. Lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin EDX sonuçları





Şekil 4.11. SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin EDX sonuçları



Şekil 4.12. Lazer+SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin EDX sonuçları

**Tablo 4.2.** Örneklerin EDX sonuçlarının tablo halinde gösterimi

Örnek	Ti (%)	V (%)	Al (%)	O (%)
Kontrol	82,19	2,72	5,39	9,70
Lazer	83,03	2,63	6,45	6,91
SLA	90,61	3,01	6,38	-
Lazer+SLA	81,53	2,5	4,95	11,02

Tablo 4.2.'de verilen Enerji Ayrımlı X- Işını Spektroskopisi ölçüm sonuçları görülmektedir. Lazer + SLA grubunda V ve Al değerlerinin kontrol grubuna göre azaldığı buna karşılık O miktarının arttığı görülmüştür.

Lazer grubunda V ve O değerlerinin kontrol grubuna göre azaldığı buna karşılık Al miktarının arttığı görülmüştür.

SLA grubunda kontrol grubuna göre V ve Al değerlerinin arttığı buna karşılık O değerinin azaldığı görülmektedir.

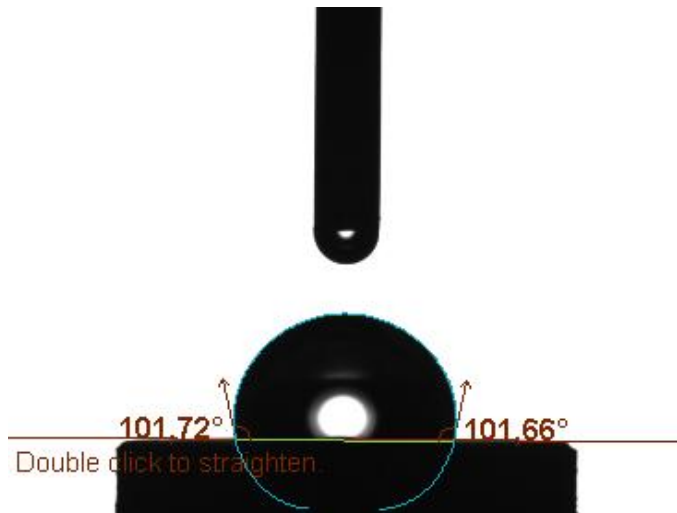
#### 4.4. Yüzey Temas Açısının Ölçümü

Temas açısının ölçümü ODTÜ'nün merkez laboratuvarında bulunan optik temas açısı-yüzey gerilimi ölçme cihazı (Attension Theta) kullanılarak gerçekleştirildi ve her bir deney grubu için sonuçlar kaydedildi. 5 saniye süresince 30 adet kayıt alan cihaz elde edilen ölçümlerin ortalamasını hesaplayarak serbest yüzey enerjisinin bir göstergesi olan  $\theta$  değerini vermektedir. Bir sıvı damlasının belirli bir katı yüzey üzerindeki yayılımı, katı-sıvı interfazındaki moleküller arası etkileşimlere bağlıdır. Bu olgu sıvıyı çevreleyen likid buharının yarattığı gerilim ile olduğundan çok daha fazla üzerinde bulunduğu katı yüzeyin topografisinden etkilenmektedir. Bu da göstermektedir ki söz konusu katı yüzeyin pürüzlülüğü üzerindeki sıvının yayılımını doğrudan belirlemektedir.

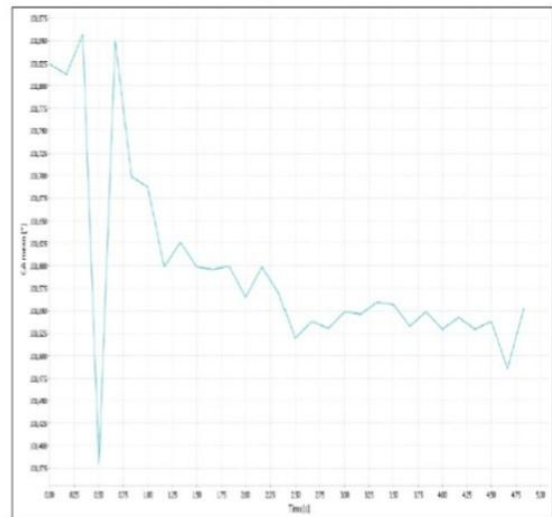
**Tablo 4.3.** Temas açısı  $\theta$  değerleri

<b>Örnek Grubu</b>	<b>Temas açısı, <math>\theta</math></b>
<b>Kontrol</b>	<b>101,72</b>
<b>Lazer</b>	<b>75,24</b>
<b>SLA</b>	<b>74,51</b>
<b>Lazer + SLA</b>	<b>62,31</b>

Yapılan ölçümler sonucunda temas açıları yani  $\theta$  değerleri Kontrol için  $101,72^\circ$  (Şekil 4.13.), Lazer için  $75,24^\circ$  (Şekil 4.14.), SLA için  $74,51^\circ$  (Şekil 4.15.) ve Lazer + SLA için  $62,31^\circ$  (Şekil 4.16.) olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında yüzeyin pürüzlülüğü arttıkça temas açıları yani  $\theta$  değerleri azalmıştır (Tablo 4.3.). Bu açının pürüzlülüğe paralel olarak küçülmesi sıvı yüzeyin yayılmasının arttığına işaret etmektedir. Bir başka deyişle yüzeyin sıvıyla etkileşime girmeye daha meyilli, yani hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Metal yüzeylerde hidrofiliklik hücre canlılığını olumlu yönde doğrudan etkilemektedir. Pürüzlendirilmiş yüzeyin hidrofilik karakterde olması üzerinde büyüyecek biyolojik materyelin yapışma yeteneğini doğrudan etkileyecek bir parametre olduğundan bu bulgular önem arz etmektedir. Zira daha hidrofilik pürüzlendirilmiş bir yüzey artmış hidroksilasyon ve/veya hidratasyon kapasitesine işaret ettiğinden artmış hücre tutunmasına, akabinde kolaylaştırılmış ve artmış hücre proliferasyonuna yol açması beklenmektedir. Bu biyoyumluluk sonuçlarını takiben öngörülebileceği gibi implant mikroçevresinde meydana gelecek yara ve doku iyileşmesi de yine bu parametrelerle doğru orantılıdır.

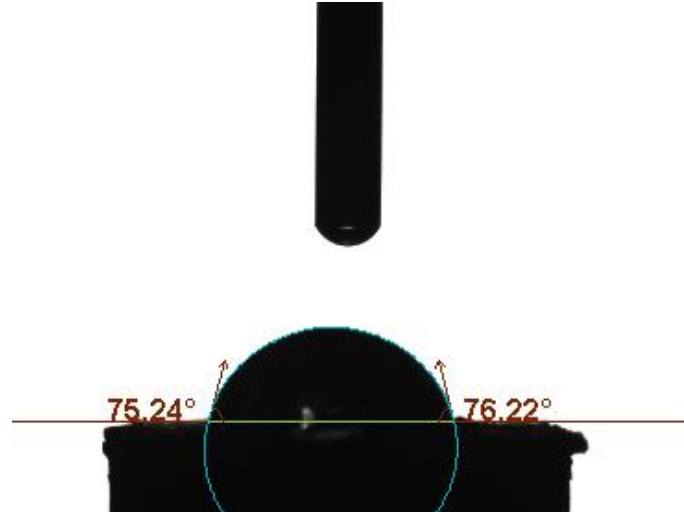


Experiment info	
Name	18443-01_1
Type	Contact angle
Date	30.Eyl.2016 09:55
Solid	
Name	
$\gamma_{tot}$ [mN/m]	
$\gamma_d$ [mN/m]	
$\gamma_+$ [mN/m]	
$\gamma_-$ [mN/m]	
$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	
Heavy phase	
Name	Water
$\gamma_{tot}$ [mN/m]	72,800
$\gamma_d$ [mN/m]	21,800
$\gamma_+$ [mN/m]	25,500
$\gamma_-$ [mN/m]	25,500
$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	0,9980
$\eta$ [mPa.s]	1,002
Temperature [°C]	20,000
Molecular weight [g/mol]	18,010
Light phase	
Name	Air
$\gamma_{tot}$ [mN/m]	
$\gamma_d$ [mN/m]	
$\gamma_+$ [mN/m]	
$\gamma_-$ [mN/m]	
$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	0,0012
$\eta$ [mPa.s]	
Temperature [°C]	20,000
Molecular weight [g/mol]	0,029



Detailed results						
Time [s]	CA left [°]	CA right [°]	CA mean [°]	Volume [μl]	Baseline [mm]	
0,00	102,29	101,36	101,82	4,35	2,33	
0,17	102,26	101,37	101,81	4,35	2,33	
0,33	102,29	101,43	101,86	4,35	2,33	
0,50	101,30	101,46	101,38	4,32	2,34	
0,67	101,86	101,84	101,85	4,32	2,34	
0,83	101,74	101,66	101,70	4,32	2,34	
1,00	101,72	101,66	101,69	4,32	2,34	
1,17	101,66	101,53	101,60	4,32	2,34	
1,33	101,69	101,57	101,63	4,32	2,34	
1,50	101,66	101,54	101,60	4,32	2,34	
1,67	101,63	101,56	101,60	4,32	2,34	
1,83	101,66	101,54	101,60	4,32	2,34	
2,00	101,62	101,51	101,57	4,32	2,34	
2,17	101,71	101,49	101,60	4,32	2,34	
2,33	101,62	101,52	101,57	4,32	2,34	
2,50	101,59	101,45	101,52	4,32	2,34	
2,67	101,63	101,44	101,54	4,32	2,34	
2,83	101,61	101,45	101,53	4,32	2,34	
3,00	101,61	101,49	101,55	4,32	2,34	
3,17	101,59	101,50	101,55	4,32	2,34	
3,33	101,65	101,47	101,56	4,32	2,34	
3,50	101,62	101,50	101,56	4,32	2,34	
3,67	101,58	101,49	101,53	4,32	2,34	
3,83	101,59	101,51	101,55	4,31	2,34	
4,00	101,63	101,42	101,53	4,31	2,34	
4,17	101,62	101,46	101,54	4,31	2,34	
4,33	101,57	101,49	101,53	4,31	2,34	
4,50	101,60	101,48	101,54	4,31	2,34	
4,67	101,58	101,39	101,49	4,31	2,34	
4,83	101,62	101,48	101,55	4,31	2,34	

Şekil 4.13. Titanyum kontrol disklerinin yüzey temas açısı ölçümü



## Experiment info

Name	18443-02_2
Type	Contact angle
Date	26.Eyl.2016 16:05

## Solid

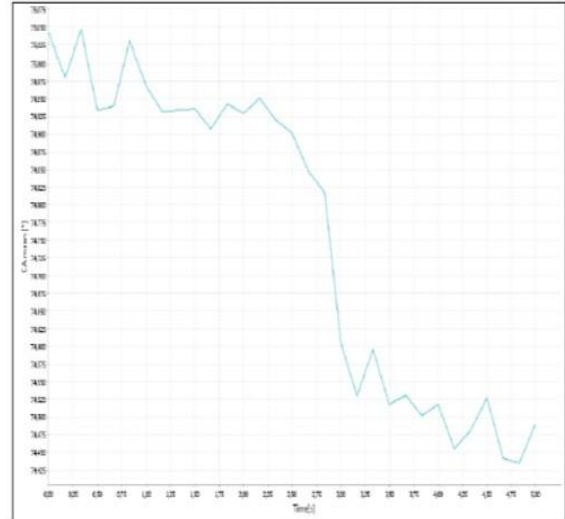
Name	
$\gamma_{tot}$ [mN/m]	
$\gamma_d$ [mN/m]	
$\gamma_+$ [mN/m]	
$\gamma_-$ [mN/m]	
$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	

## Heavy phase

Name	Water
$\gamma_{tot}$ [mN/m]	72,800
$\gamma_d$ [mN/m]	21,800
$\gamma_+$ [mN/m]	25,500
$\gamma_-$ [mN/m]	25,500
$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	0,9980
$\eta$ [mPa.s]	1,002
Temperature [°C]	20,000
Molecular weight [g/mol]	18,010

## Light phase

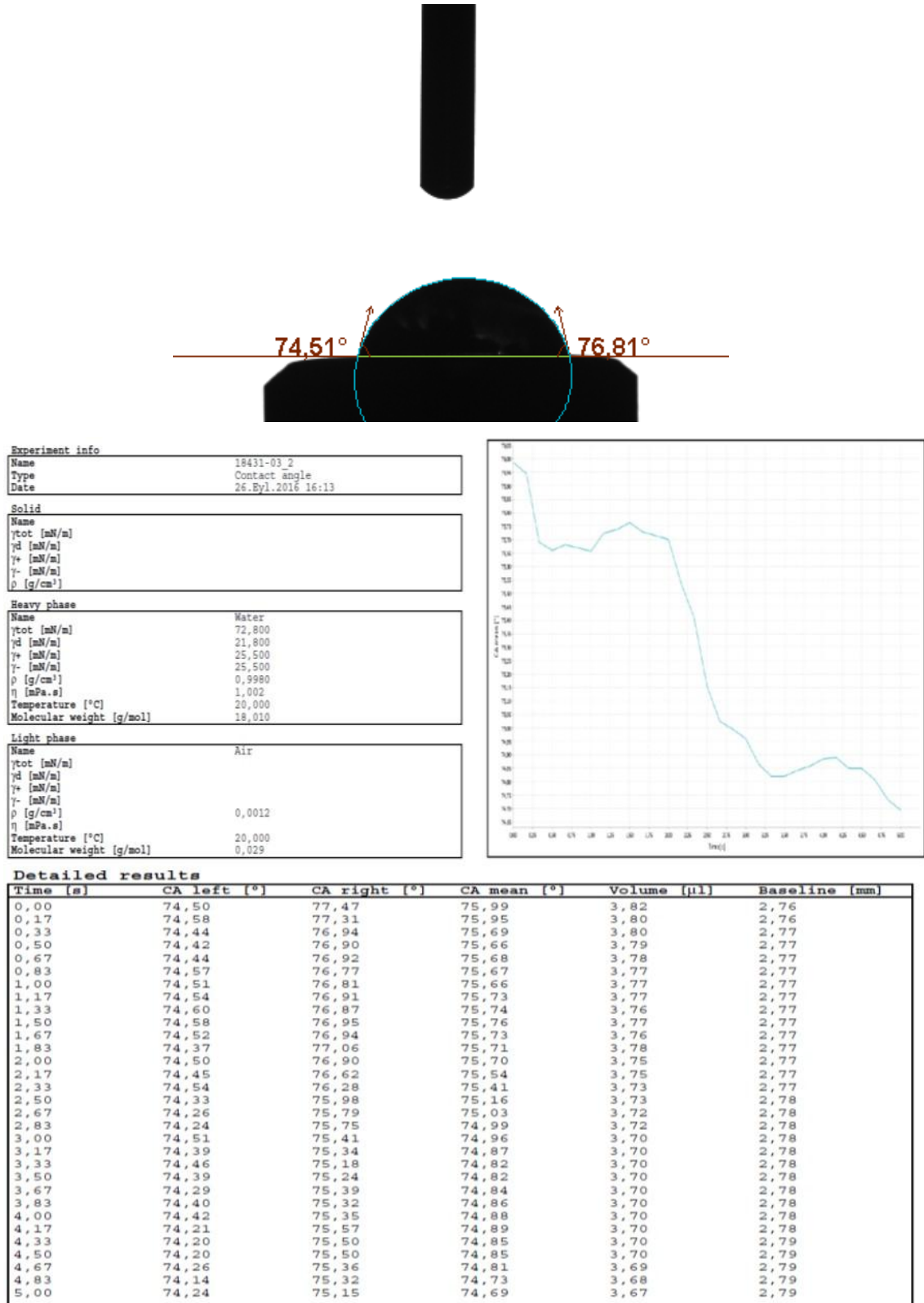
Name	Air
$\gamma_{tot}$ [mN/m]	
$\gamma_d$ [mN/m]	
$\gamma_+$ [mN/m]	
$\gamma_-$ [mN/m]	
$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	0,0012
$\eta$ [mPa.s]	
Temperature [°C]	20,000
Molecular weight [g/mol]	0,029



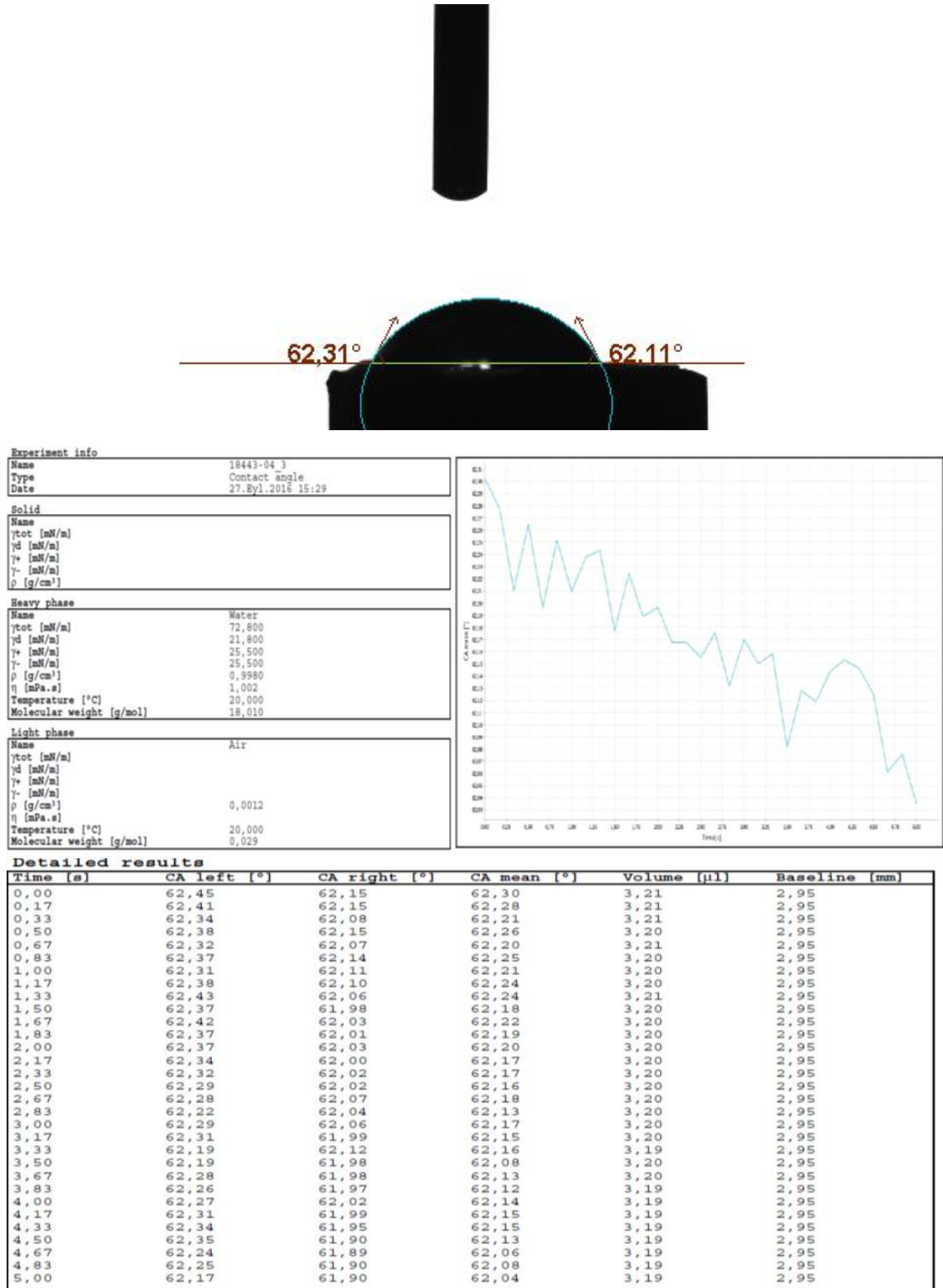
## Detailed results

Time [s]	CA left [°]	CA right [°]	CA mean [°]	Volume [μl]	Baseline [mm]
0,00	74,55	75,54	75,04	3,29	2,63
0,17	74,53	75,44	74,98	3,28	2,63
0,33	74,55	75,54	75,05	3,28	2,63
0,50	74,50	75,37	74,93	3,28	2,63
0,67	74,56	75,32	74,94	3,27	2,63
0,83	74,50	75,56	75,03	3,30	2,63
1,00	74,49	75,45	74,97	3,28	2,63
1,17	74,52	75,34	74,93	3,27	2,63
1,33	74,40	75,46	74,93	3,30	2,63
1,50	74,36	75,51	74,94	3,29	2,63
1,67	74,45	75,36	74,91	3,27	2,63
1,83	74,50	75,38	74,94	3,27	2,63
2,00	74,48	75,38	74,93	3,27	2,63
2,17	74,52	75,38	74,95	3,27	2,63
2,33	74,40	75,44	74,92	3,28	2,63
2,50	74,39	75,41	74,90	3,28	2,63
2,67	74,37	75,32	74,85	3,27	2,63
2,83	74,32	75,31	74,82	3,27	2,63
3,00	74,23	74,99	74,61	3,24	2,63
3,17	74,25	74,81	74,53	3,23	2,63
3,33	74,20	74,99	74,60	3,24	2,63
3,50	74,22	74,82	74,52	3,23	2,63
3,67	74,29	74,77	74,53	3,21	2,63
3,83	74,12	74,89	74,50	3,24	2,63
4,00	74,19	74,84	74,52	3,23	2,63
4,17	74,25	74,66	74,45	3,20	2,63
4,33	74,23	74,73	74,48	3,21	2,63
4,50	74,15	74,90	74,53	3,23	2,63
4,67	74,13	74,75	74,44	3,23	2,63
4,83	74,16	74,70	74,43	3,21	2,63
5,00	74,22	74,76	74,49	3,21	2,63

Şekil 4.14. Lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin yüzey temas açısı ölçümü



Şekil 4.15. SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin yüzey temas açısı ölçümü

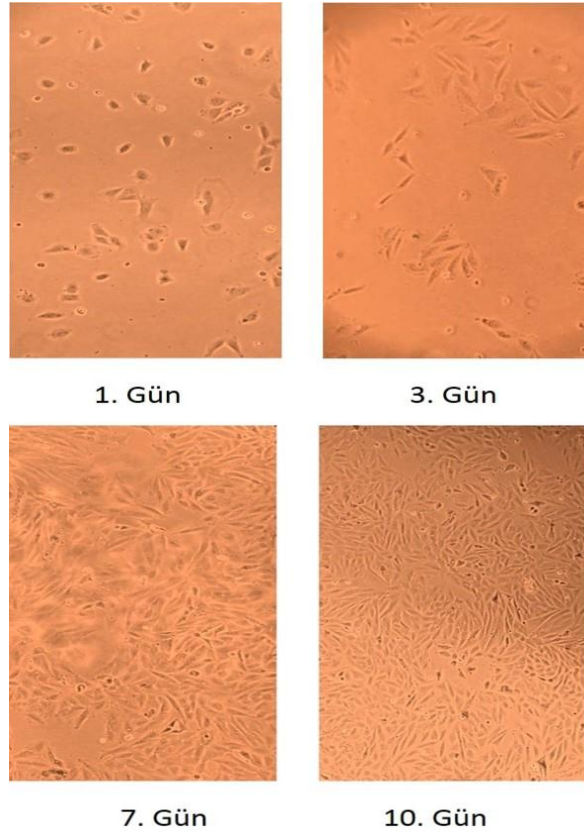


Şekil 4.16. Lazer+ SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin yüzey temas açısı ölçümü



#### 4.5. Saos-2 Hücrelerinin Çoğalma Davranışının İzlenmesi

Saos-2 hücreleri proliferasyon davranışlarının belirlenmesi amacıyla T-75 flaska ekilmiş ve McCoy's besiyeri içerisinde büyütülmüştür. Hücreler 1., 3., 7. ve 10. günde ışık mikroskobu altında izlenmiştir (Şekil 4.17.). Epitelyal morfolojiye sahip adherent (yapışkan) özellikli Saos-2 hücrelerinin düz polistiren hücre kültürü kabında histolojik kökenine sadık kalarak tek tabaka halinde çoğaldığı gözlenmiştir. Bu davranış ışık mikroskobunda belirli aralıklarla takip edilmiştir ve bu süre zarfında hücrelerin çoğalma yeteneklerinde azalma olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 4.17.'de görüldüğü üzere hücreler 1. gün tutunmaya başlamışlardır ve 2. günden yani 48. saatten itibaren morfolojilerini kazanmışlardır. Bu aşamadan sonraki deneylerde, Saos-2 hücrelerinin çoğalma davranışına uygun olarak canlılık, ALP ve flüoresans testleri 48. Saat ve sonrasındaki zaman aralıkları temel alınarak gerçekleştirilmiştir.

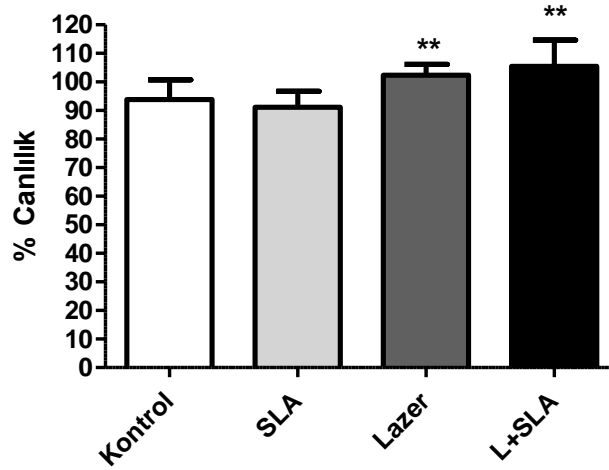


**Şekil 4.17.** Saos-2 hücrelerinin farklı günlerde (1, 3, 7 ve 10. günler) gösterdikleri büyüme davranışının ışık mikroskobu altında 10 X büyütme ile izlenmesi

#### 4.6. Titanyum Diskler Üzerindeki Saos-2 Hücrelerinin Canlılık Yüzdesi

24'lük kuyucuklara ekilip modifiye edilmiş farklı titanyum disk grupları üzerinde büyütülmüş olan Saos-2 hücreleri canlılık yüzdelerinin belirlenmesi amacıyla MTT deneyine tabi tutulmuştur. 590 nm.'de ölçülen absorbanslardan elde edilen değerler her seferinde kontrol grubu örneğine oranlanarak hesaplanmıştır ve grafikleri sunulmuştur. Şekil 4.17.'de gösterilen mikroskopik inceleme esas alınarak deneyler 2., 3. ve 7. günde gerçekleştirilmiştir.

#### MTT Deneyi ile Canlılık Değerlendirmesi



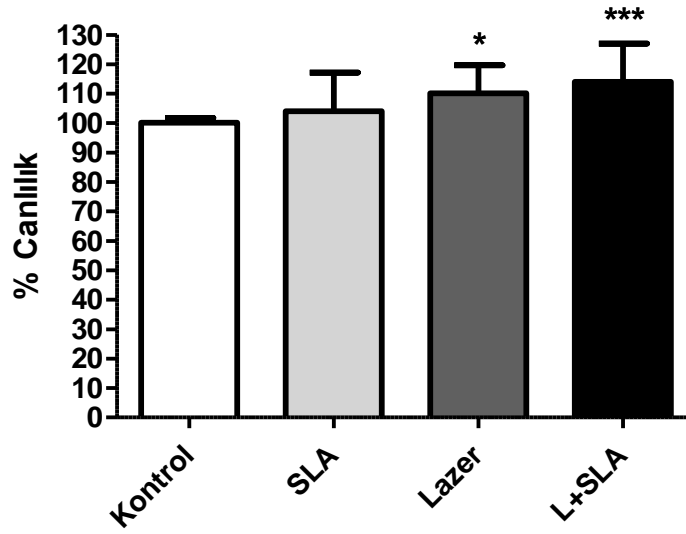
Şekil 4.18. Saos-2 hücrelerin 2. gündeki yüzde canlılık değerleri

Tablo 4.4. Saos-2 hücrelerin 2. gündeki yüzde canlılık tablosu

Kontrol	SLA	Lazer	L+SLA
100,378	92,308	105,422	98,865
97,856	88,272	101,892	108,953
95,839	90,794	101,395	103,256
100,465	88,272	106,512	100,465
93,023	99,07	100,465	99,07
93,953	97,209	98,476	114,419
80,194	86,011	108,864	102,632
93,075	88,089	98,476	125,485
99,746	96,365	104,48	107,523
83,855	95,689	97,041	93,66

2. günde gerçekleştirilen MTT deneyi sonucunda kontrol grubuna kıyasla her üç grubun üzerinde büyüyen Saos-2 hücrelerinin yüzde canlılığının artmış olduğu görülmektedir. Bu artış en belirgin olarak Lazer + SLA uygulamasının beraber yapıldığı gruplarda görülmektedir. Diğer iki grup olan Lazer ve SLA örneklerinde de yine bir artış bulunmaktadır (Şekil 4.18.).

### MTT Deneyi ile Canlılık Değerlendirmesi



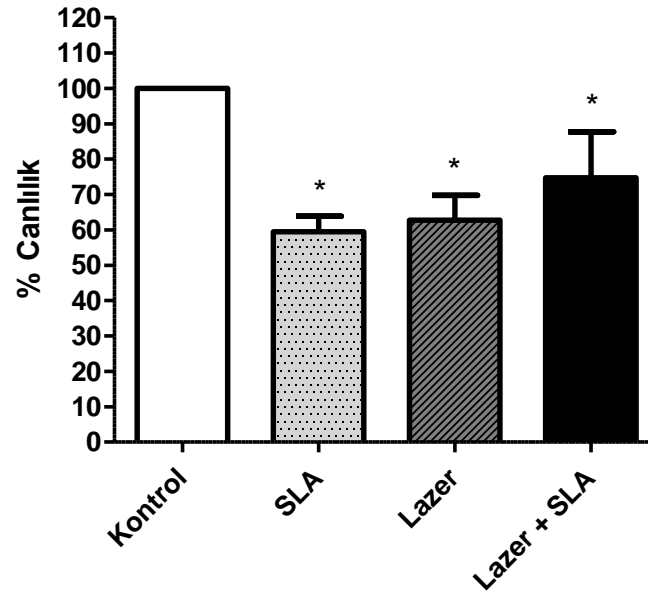
Şekil 4.19. Saos-2 hücrelerin 3. gündeki yüzde canlılık değerleri

Tablo 4.5. Saos-2 hücrelerin 3. gündeki yüzde canlılık tablosu

Kontrol	SLA	Lazer	Lazer + SLA
102,821	111,181	111,599	101,985
98,642	107,419	98,642	107,419
100,731	91,954	97,806	101,985
97,806	96,97	124,556	115,926
98,519	91,481	107,407	113,704
98,519	95,926	108,889	126,667
101,111	89,63	112,593	104,849
101,852	107,995	114,815	102,228
101,18	127,392	124,246	126,868

3. günde gerçekleştirilen MTT deneyi sonucunda, 2. gün deneylerinde olduğu gibi (Şekil 4.18.) kontrol grubuna kıyasla her üç grubun üzerinde büyüyen Saos-2 hücrelerinin yüzde canlılığının artmış olduğu görülmektedir. SLA grubundaki örnekler üzerindeki hücrelerde bir miktar kontrole kıyasla azalma kaydedilmiştir. Lazer ve SLA uygulamasının beraber yapıldığı titanyum diskleri üzerindeki Saos-2 hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla belirgin artışı öne çıkmaktadır (Şekil 4.19.). Bu bulgular literatür bulguları ile uyumludur. 72. saat uygulamasında modifiye edilmiş titanyum gruplarının artan pürüzlülüğüne bağlı olarak daha fazla sayıda hücrenin tutunması gerçekleşmiştir.

### MTT Deneyi ile Canlılık Değerlendirmesi



Şekil 4.20. Saos-2 hücrelerin 7. gündeki yüzde canlılık değerleri

Tablo 4.6. Saos-2 hücrelerin 7. gündeki yüzde canlılık tablosu

Kontrol	SLA	Lazer	Lazer + SLA
100	84,70783	89,01782	89,68089
100	64,48404	65,31289	65,47866
100	57,68753	54,86946	68,9598
100	56,19561	68,13096	101,1189

7. gün deneylerinde kontrol grubuna kıyasla hücrelerin canlılığında azalma kaydedilmiş olmasına rağmen diğer üç grup arasında kademeli artış göze çarpmaktadır. 2. ve 3. gün deneylerinde olduğu gibi SLA, Lazer, Lazer + SLA grupları arasında en yüksek canlılık yine Lazer + SLA grubundaki örneklerde kaydedilmiştir.

#### **4.7. MTT Deneyinin İstatistiksel Analizi**

Hücre canlılığının 48. ve 72. saatteki değerlerinin istatistik değşlendirmesi IBM SPSS Statistics ver. 22.0 ile yapılmıştır. Canlılık değşlerinin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro Wink ile, varyansların homojenliği ise Levene testiyle incelenmiştir. 48. saatte 4 grubun (Kontrol, SLA, Lazer, Lazer+SLA) birbiri arasındaki farklılıkları tek yönlü varyans analizi ve ikili karşılaştırma Duncan testiyle saptanmıştır. 72 saatte varyanslar homojen olmadığından gruplar arası karşılaştırma Welch varyans analizi ve ikili karşılaştırma Tamhane testiyle yapılmıştır.  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

İstatistik testlerinin değşlendimesi sonucuna göre 48. saatte Lazer ve Lazer+SLA gruplarındaki artış, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak ölçölüp kaydedilmiştir (Tablo 4.7., Tablo 4.8. ve Şekil 4.21.). 72. saatte ise kontrol grubuna kıyasla tüm örneklerde artış kaydedilmiş, bu artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur. Lazer ve Lazer+SLA grupları kendi aralarında benzerlik gösterirken, SLA grubu kontrol örneklerine benzerlik göstermiştir (Tablo 4.7., Tabo 4.9. ve Şekil 4.22.).

**Tablo 4.7.** Saos-2 Hücrelerinin 48. ve 72. saatteki canlılık yüzdelerine ait ortalama ve standart sapma verilerinin istatistik değerlendirme özet tablosu

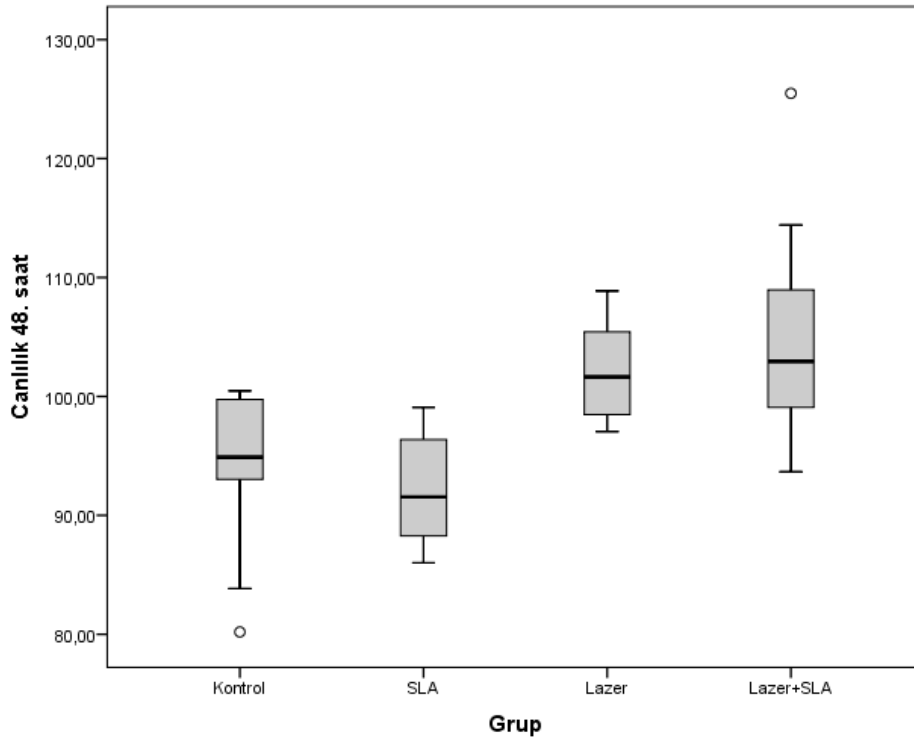
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum	
Canlılık48	Kontrol	10	93,8384	6,90266	2,18281	80,19	100,47
	SLA	10	92,2079	4,59296	1,45242	86,01	99,07
	Lazer	10	102,3023	3,89561	1,23190	97,04	108,86
	Lazer+SLA	10	105,4328	9,18383	2,90418	93,66	125,49
	Total	40	98,4454	8,40123	1,32835	80,19	125,49
Canlılık72	Kontrol	10	100,1312	1,68122	,53165	97,81	102,82
	SLA	10	104,1049	13,08806	4,13881	89,63	127,39
	Lazer	10	110,0684	9,60496	3,03735	97,81	124,56
	Lazer+SLA	10	114,0556	12,93321	4,08984	101,99	138,93
	Total	40	107,0900	11,37934	1,79923	89,63	138,93

**Tablo 4.8.** Saos-2 Hücrelerinin 48. saatteki canlılık yüzdelerinin gruplar arası anlamlılığının tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirmesi

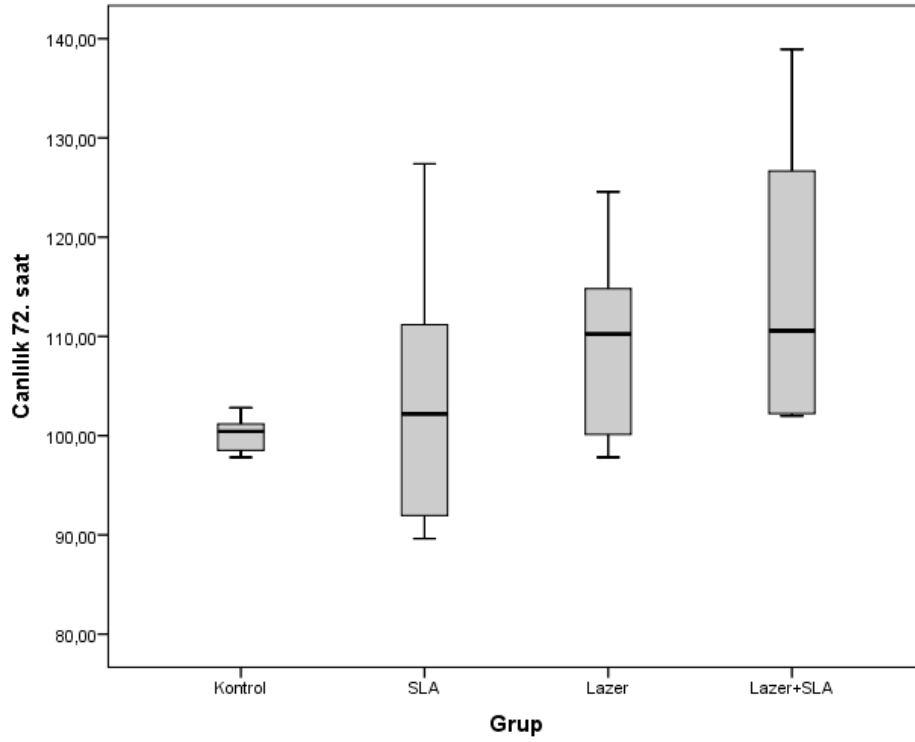
ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Canlılık48</b>	Between Groups	1238,303	3	412,768	9,813	,000
	Within Groups	1514,345	36	42,065		
	Total	2752,648	39			

**Tablo 4.9.** Saos-2 Hücrelerinin 72. saatteki canlılık yüzdelerinin gruplar arası anlamlılığının Welch testi ile değerlendirmesi

Dependent Variable	(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	
Canlılık72	Tamhane	Kontrol	SLA	-3,97370	4,17281	,934
		Lazer	-9,93720	3,08353	,057	
		Lazer+SLA	-13,92440	4,12425	,046	
	SLA	Kontrol	SLA	3,97370	4,17281	,934
		Lazer	-5,96350	5,13374	,838	
		Lazer+SLA	-9,95070	5,81863	,484	
	Lazer	Kontrol	Lazer	9,93720	3,08353	,057
		SLA	5,96350	5,13374	,838	
		Lazer+SLA	-3,98720	5,09434	,971	
	Lazer+SLA	Kontrol	Lazer+SLA	13,92440	4,12425	,046
		SLA	9,95070	5,81863	,484	
		Lazer	3,98720	5,09434	,971	



**Şekil 4.21.** Saos-2 hücrelerinde gruplar arası anlamlılığın kutu grafiği ile gösterimi

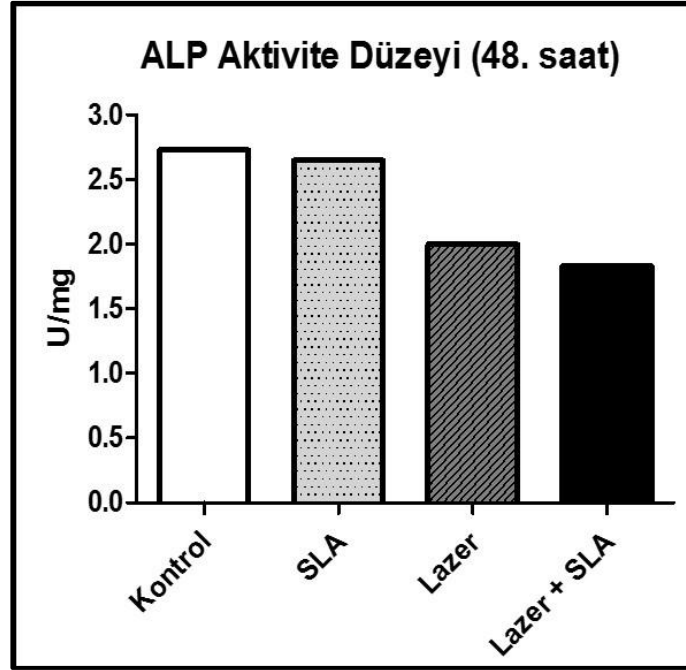


**Şekil 4.22.** Saos-2 hücrelerinde gruplar arası anlamlılığın kutu grafiği ile gösterimi

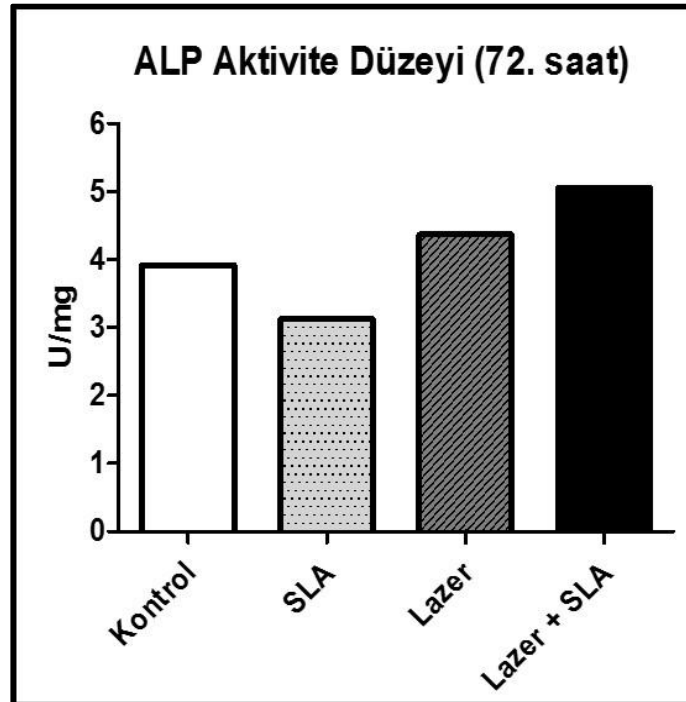
#### 4.8. Titanyum Diskler Üzerindeki Saos-2 Hücrelerinin Alkalin Fosfataz Aktivitesi

Saos-2 hücreleri osteojenik aktivitenin belirlenmesi amacıyla, hücre canlılığının test edildiği MTT deneyi ile aynı günlerde (2, 3 ve 7), alkalin fosfataz enzim aktivitesi deneyine tabi tutulmuştur. Buna göre alkalin fosfataz aktivitesi 2. gün ölçümlerinde (Şekil 4.23.) henüz kontrol grubuna kıyasla bir artış göstermemiştir. Bunun sebebi osteojenik aktivitenin ve başkalaşımın 48. saatte henüz gerçekleşmemiş olmasıdır.



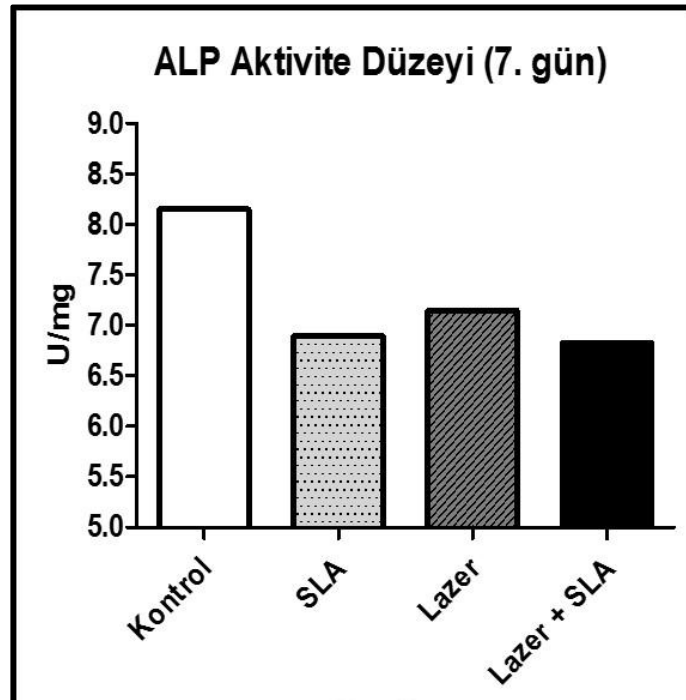


Şekil 4.23. Saos-2 hücrelerin 2. gündeki alkalen fosfataz aktivite değerleri



Şekil 4.24. Saos-2 hücrelerin 3. gündeki alkalen fosfataz aktivite değerleri

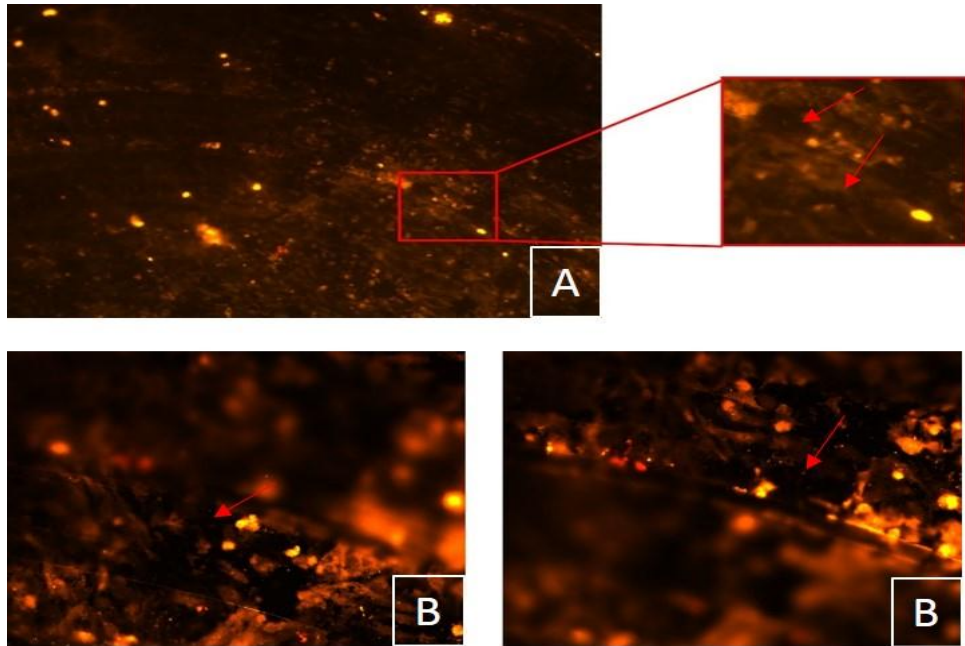
3. günde Lazer ve SLA'nın beraber uygulandığı titanyum yüzeylerde alkalen fosfataz aktivitesi belirgin bir artış göstermiştir (Şekil 4.24.). 7. gün ölçümlerinde ise kademeli olarak alkalen fosfataz aktivitesinin azalmaya başladığı göze çarpmaktadır (Şekil 4.25.). Alkalen fosfataz aktivitesindeki bu kademeli azalma, Şekil 4.20.'de aynı güne ait MTT yüzde canlılık grafiğine paralel şekilde gerçekleşmiştir. Bunun sebebi, literatürdeki verilerle uyumlu şekilde hücre başlangıç sayısına bağlı olarak hücre çoğalmasının doyumluğa ulaşması, buna bağlı olarak hem yüzde canlılığın hem alkalen fosfataz aktivitesinin göreceli azalışıdır. Elde etmiş olduğumuz aynı zaman dilimine ait yüzde canlılık değerleri, alkalen fosfataz aktivitesi ile uyumlu bulunmuştur. Osteojenik aktivitenin 3. gün ve sonrasında gözlemlendiği göz önünde bulundurularak, kontrol grubuna kıyasla en yüksek hücre canlılığı ve alkalen fosfataz aktivitesi Lazer ve SLA'nın beraber uygulandığı titanyum örneklerinde görülmüştür. 7. günde hücre canlılığı kontrole kıyasla daha düşük kaydedilmiş, alkalen fosfataz değerleri buna bağlı olarak aynı oranda düşmüştür.



Şekil 4.25. Saos-2 hücrelerin 7. gündeki alkalen fosfataz aktivite değerleri

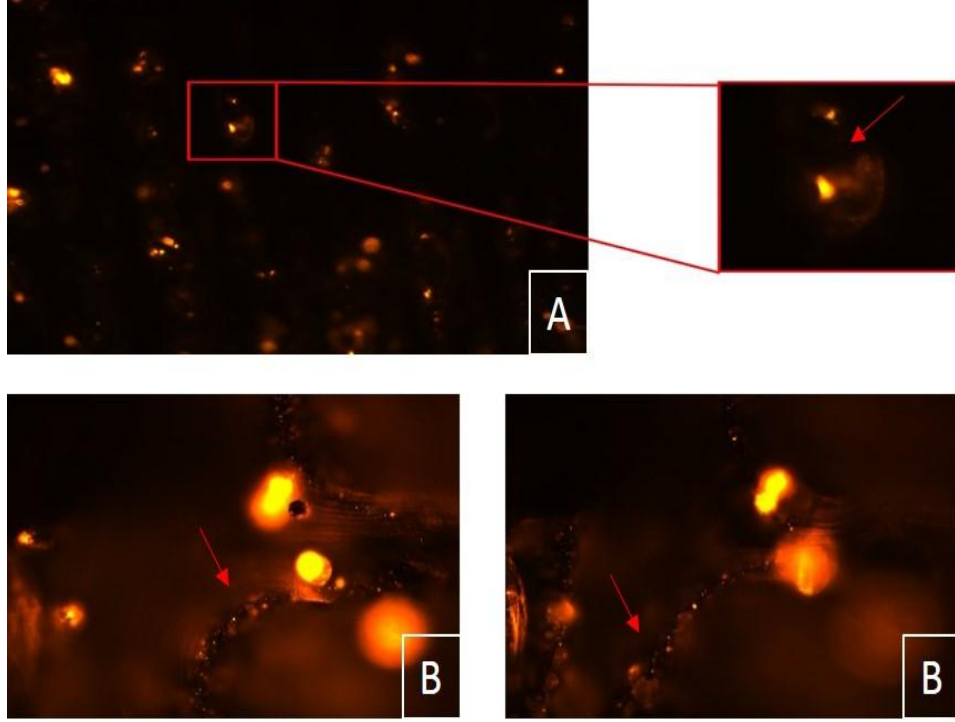
#### 4.9. Titanyum Diskler Üzerindeki Saos-2 Hücrelerinin Flüoresan Mikroskopi ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

Flüoresan Dil boyası ile işlenmiş Saos-2 hücreleri, her bir gruba ait titanyum disk örnekleri üzerinde 10 gün süresince büyütülmüş ve McCoy's besiyeri içerisinde tutulmuştur. Ölçüm yapılacak deney günü gruplardan birer adet örnek rastgele olarak seçilmiş ve fotoğraflama işlemi için hazırlanmıştır. Her bir gruba ait örneklerin 10 X ve 40 X büyütmedeki görüntüleri kaydedilmiştir. Dil boyası yapısı gereği hücrenin fosfolipid çift tabakasından penetre olmakta ve hücrenin membranında tutulmaktadır. Buna karşılık flüoresan boya sitoplazmayı veya çekirdeği boyama niteliğine sahip değildir. Yüzeylerin pürüzlülüğünden ötürü ve flüoresan mikroskobun odaklama prensiplerine bağlı olarak hücreler titanyum disklerin yatay düzenlenimleri arasında konumlanmıştır.



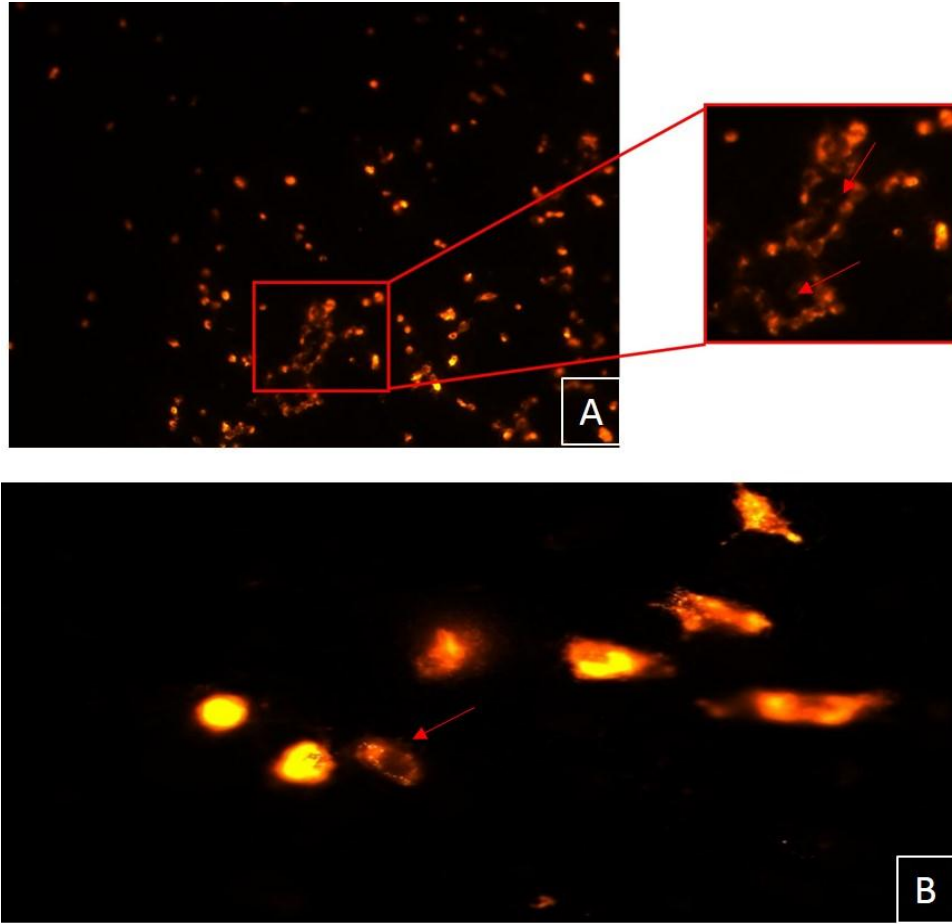
**Şekil 4.26.** Kontrol disklerinin üzerine ekilmiş Saos-2 hücrelerinin flüoresan mikroskobu altındaki A) 10X ve B) 40X büyütme görüntüleri.

Şekil 4.26'te 10X büyütmeye ait görüntüde kırmızı ile işaretlenmiş ve tekrar büyütülmüş kutucukta ortası kahverengi görülen alanlar Saos-2 hücreleridir. Kırmızı oklar hücre ve hücre kümelerine işaret etmektedir.



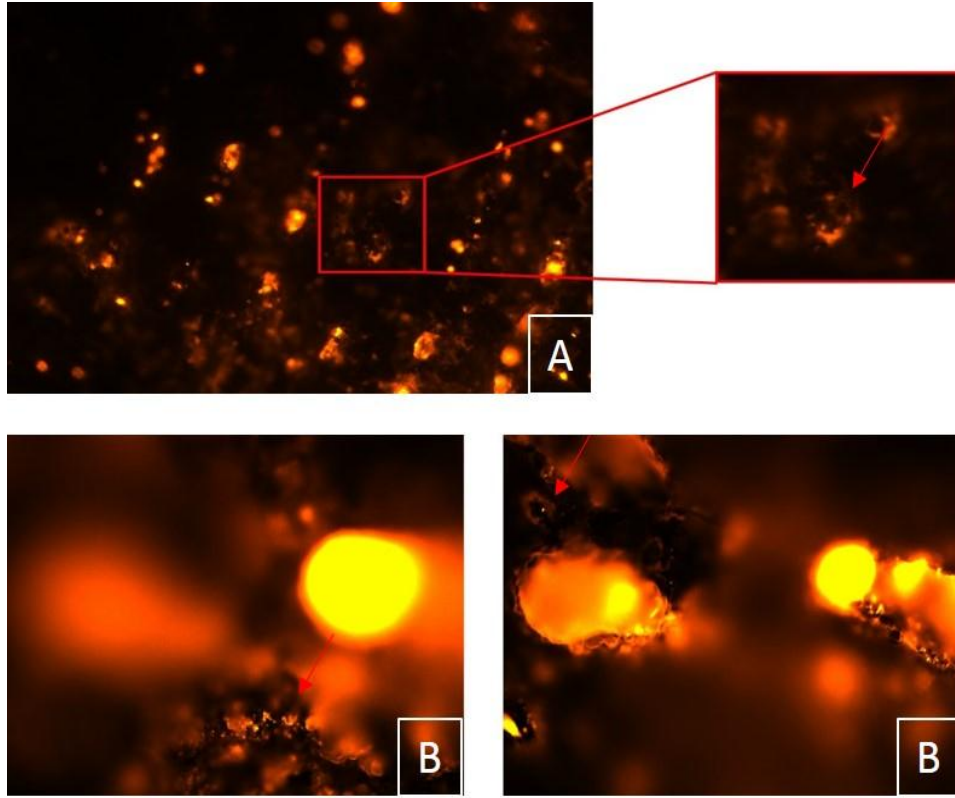
**Şekil 4.27.** Lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin üzerine ekilmiş Saos-2 hücrelerinin flüoresan mikroskobu altındaki A) 10X ve B) 40X büyütme görüntüleri.

SEM ile yapılan görüntüleme işlemleri sonrasında (Şekil 4.6.) lazer ile işlenmiş titanyum disklerinin yüzeylerinde çukurlanmış bölgeler olduğu gözlenmişti. Hücre canlılığı ve alkalen fosfataz deneyleri sonrasında kontrol grubuna kıyasla canlı hücre sayısında ve aktivitesinde artış gözlenmişti. Lazer ile işlenmiş yüzeyler üzerinde büyütülen Saos-2 hücreleri flüoresan mikroskop altında kontrol grubundaki hücreler kadar düzenli bir büyüme sergilememekle beraber yüzeye uyum sağlamış ve tutunmuştur. Lazer ile işlenmiş yüzeylerde görülen kopmalardan ötürü bu büyüme davranışı kontrol grubundaki hücrelerde olduğu gibi düzenli olmaktan ziyade daha dağınık olarak gözlenmiştir. Şekil 4.27.'deki flüoresan mikroskop görüntüleri bu olguya işaret etmektedir. Şekil 4.27.B'ye ait her iki görüntü yüzeydeki pürüzlülüğün flüoresan mikroskop tarafından odaklanamamasından dolayı aynı bölgeye ait 2 farklı odağın görüntüsü olarak kaydedilmiştir.



**Şekil 4.28.** SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin üzerine ekilmiş Saos-2 hücrelerinin flüoresan mikroskobu altındaki A) 10X ve B) 40X büyütme görüntüleri.

Şekil 4.3.'te AFM ile yapılan çalışma sonrasında Ra değeri 415 nm. olarak bulunmuştu. Şekil 4.7.'de SEM görüntüleri yüzeyin yoğun pürüzlülüğüne dikkat çekerek bu veriyi desteklemekteydi. Şekil 4.28.'de A ve B kutucuklarında görülen görüntülere göre SLA ile işlenmiş titanyum yüzeyler üzerindeki Saos-2 hücreleri pürüzlü yüzeylerde morfolojilerine uygun düzenlenerek yoğun bir büyüme profili sergilemişlerdir. Bu şekillerde özellikle Saos-2 hücre kümelerinin çokluğu dikkat çekmektedir.



**Şekil 4.29.** Lazer ve SLA ile işlenmiş titanyum disklerinin üzerine ekilmiş Saos-2 hücrelerinin flüoresan mikroskobu altındaki A) 10X ve B) 40X büyütme görüntüleri.

Hem AFM ve SEM görüntüleri, hem Ra değeri (477 nm.), hem de biyouyumluluk çalışmalarında gerçekleştirilen hücre canlılığı ve alkalin fosfataz deneylerini destekleyecek şekilde en yoğun Saos-2 hücre büyümesi Lazer ve SLA ile beraber işlenmiş titanyum yüzeylerde görülmüştür. Şekil 4.29.B'nin her iki görüntüsüne ait fotoğraflar aynı bölgenin iki ayrı odaklaması sonucunda çekilmiştir ve hücre kümelerinin pürüzlü ve yatay yüzelerde yoğun şekilde yerleştikleri görülmüştür.

## 5. TARTIŞMA

Bu Çalışmada, titanyum-6-alüminyum-4-vanadyum (Ti-6Al-4V) alaşımı olan Grade 5 tornalamış titanyum materyal yüzeyinin, SLM yöntemi kullanılarak Grade 23 titanyum alaşımı ile kaplanması sonrası oluşan pürüzlü yüzeyde, kemikten köken alan adherent özellikli osteoblast-benzeri insan Saos-2 hücrelerinin proliferasyonu değerlendirilmiştir.

Dental implantlar eksik dişlerin yerine konması için uygun bir alternatiftir. Kemik ve yumuşak doku ile temas eden bir dental implantın ana işlevi yapay dişin stabilitesini sağlamaktır. Dental implantın yüzeyi ile kemik arasındaki doğrudan yapısal ve fonksiyonel bağlantı, kemik oluşumundan sorumlu osteoblastların ana rol oynadığı osseointegrasyon süreci boyunca gelişir (198).

İmplantların tasarımında dikkate alınması gereken en önemli husus, implantlarla temas eden hücrelerde ve dokularda istenen tepkileri teşvik eden yüzeyler olmuştur. Adezyon, morfolojik değişim, fonksiyonel değişim ve proliferasyon gibi hücresel davranışlar, hidrofilitiklik, pürüzlülük, yapı ve morfoloji gibi yüzey özelliklerinden büyük ölçüde etkilenir (199). Titanyum malzemelerinin yüzey modifikasyonlarının kemik apozisyonu, doku adezyonunu ve hücre göçünü arttırdığı gösterilmiştir (168).

Dental implant yüzeylerinin iyileştirme çalışmalarının başlıca nedenlerinden biri, osseointegrasyon için iyileşme süresini azaltmaktır. Dental implantın yüzeyi biyolojik doku ile temasta olan kısımdır ve yüzeyin özelliği dokunun vereceği cevap açısından önemlidir. Bununla birlikte implant/doku ara yüzünün mekanik kuvvetini etkiler (200). Titanyum implantların çeşitli yüzey özellikleri, osseointegrasyonu geliştirmek için test edilmiştir. İmplant yüzeyine uygulanan işlemler implant-kemik arayüzünün fonksiyonel yüzey alanını arttırmak için gereklidir. Böylelikle stres efektif bir şekilde aktarılır. Buna ek olarak yüzey özellikleri kemik tutulumunu da artırır. Bu tedaviler arasında mekanik işlemler (tornalama, kumlama vb.), kimyasal işlemler (asit uygulama vb.), elektrokimyasal işlemler (anodik oksidasyon vb.), vakum muameleleri, ısı işlemler ve lazer işlemleri bulunmaktadır. Yapılan yüzey işlemlerinin osteoblastların büyüme ve metabolik etkilerine katkı sağladığı

gözlemlenmiştir. Yüzey pürüzlülüğünün osteoblastlar tarafından sitokin ve büyüme faktörü salınımını etkilediği gösterilmiştir; ayrıca artmış yüzey pürüzlülüğü, doğrudan osteoblast hücre yayılımını artıran, büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) üretimini de arttırdığı gözlenmiştir (201). Bir implantın yüzey pürüzlülüğü, hücre hareketi ve hücre büyümesi üzerinde geri döndürülemez bir etkiye sahiptir. Bu durum, implantın yapısının metal ile canlı doku arasındaki etkileşimi etkilediğini gösterir (202). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da yüzey işlemi uygulanmış titanyum disklerde yüzey işlemi uygulanmamış titanyum disklere (grup 1) kıyasla daha fazla miktarda hücre göçü olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle 4. grup olan SLA ve lazer işleminin birlikte uygulandığı titanyum yüzeyde hidrofilik ve pürüzlü yapısının uygun olmasından ötürü hücre büyümesi diğer titanyum disklere göre daha yüksek olarak kaydedilmiştir.

İmplant yüzey hazırlama yöntemlerinin, yüzeyin ortaya çıkan özelliklerini, biyolojik yanıtları ve yüzeyde oluşan hücre bağlanma oranlarını önemli ölçüde etkileyebileceği gösterilmiştir (203). Yakın tarihli çalışmalar, dental implantların başarı veya başarısızlığının sadece implant yüzeyinin kimyasal özellikleri ile ilgili değil aynı zamanda mikromorfolojik doğasıyla da ilgili olabileceğini göstermiştir (204). Yaptığımız çalışmada 4. grup olan Lazer + SLA uygulanmış titanyum diskte AFM sonucuna göre en yüksek Ra değerine (477 nm.) ulaşılmış ve bununla birlikte en fazla hücre bağlanması bu grupta gözlemlenmiştir.

Dental implantlarının klinik başarısı osseointegrasyona, canlı kemik ile implant yüzeyi arasındaki doğrudan yapısal ve fonksiyonel bağlantıya bağlıdır. Titanyum (Ti) mükemmel biyoyumluluğu, mekanik özellikleri ve korozyon direnci nedeniyle dental implantların üretimi için tercih edilen bir materyaldir. Alaşım elementlerinin ilavesi, Ti'nin yapısal ve yüzey özelliklerini değiştirmek ve geliştirmek için tercih edilmektedir. Özellikle Grade 5 olarak bilinen Ti-6Al-4V alaşımı, en yaygın kullanılan çeşitlerden biridir. İn vitro ve in vivo çalışmalarda pozitif osseointegrasyon sonuçları verdiği gösterilmiştir (205). Bu alaşımın içerisinde bulunan azot, oksijen ve karbon (N, O ve C) miktarı arttıkça alaşımın dayanıklılığı da artmaktadır ama bununla birlikte alaşımın biyoyumluluğu azalmaktadır. Bu sebepten ötürü daha az miktarda



azot, oksijen, karbon ve hidrojen içeren formu Grade 23 ELI (Extra low interstitials) üretilmiştir (206). Çalışmamızı yaparken disklerimizi Grade 5 titanyum kullanarak üretirken yüzey kaplamasını daha biyouyumlu bir materyal olan Grade 23 titanyum tercih ettik.

Sarcoma osteogenik (Saos-2) hücreler, 1973 yılında 11 yaşında beyaz ırka mensup bir çocuğun primer osteosarkomundan türetilen dönüştürülmemiş bir hücre dizisidir. Sonrasında Saos-2 hücrelerinin çeşitli osteoblastik özelliklere sahip oldukları, kalıcı insan osteoblast benzeri hücre hattına sahip olduğu ve kemik bağlantılı moleküller bir kaynağa sahip olması sebebiyle kullanışlı olabileceği ortaya çıkmıştır. Saos-2 hücreleri, alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi gibi osteoblastik özelliklerle karakterizedir (207). Bunlara ek olarak ALP, osteoblastların (karaciğer ve bağırsak) yüzeyinde bulunan bir glikoprotein plazma membran enzimidir ve kemik döngüsünün biyokimyasal göstergesi olarak kullanılır (208).

Saos-2 hücreleri diğer hücre hatları ile karşılaştırıldığında olgunlaşmamış osteoblast hücrelerinin implant biyomateryalleriyle etkileşimine büyük benzerlik gösterirler. Bu sebepten ötürü iyi bir in vitro model olarak kullanılırlar (209). Shapira ve Halabi'nin (210), yakın zamanlı yapmış oldukları araştırmaya göre hücre kültürü sırasında primer osteoblast hücrelerinin Saos-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında primer osteoblastların osteoblastik fenotipi kaybetme yönelimlerinden dolayı daha az tutarlı sonuç verme eğiliminde olduklarını gözlemlemişlerdir. Bu sebeplerden ötürü çalışmamızda Saos-2 hücre kültürü kullanılmış ve ALP aktivitesine bakılmıştır.

Avigdor ve arkadaşlarının (208), yaptığı bir çalışmada 6mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde olacak şekilde hazırlanan titanyum disklere farklı modifikasyonlar uygulanmasının ardından Saos-2 hücre proliferasyonunu incelemişlerdir. Yapılmış olan bu çalışma in vitro koşullar altında yüzey hazırlama işlemlerinin osteoblast benzeri hücrelerin biyolojik aktivitesine etki edilebileceğini ve osteoblastların fenotipik ekspresyonunun titanyum yüzeylerin topografisine ve topolojisine duyarlı olduğunu göstermişlerdir. ALP aktivitesi, osteoblastik fenotipe karşı hücre farklılaşması için kabul edilen bir belirteçtir. Çalışma sonucunda, daha pürüzlü

yüzeylerde ekilen hücrelerin karşılaştırılabilir zaman periyodları içinde pürüzsüz yüzeylerde ekilen hücrelere kıyasla daha belirgin osteoblast özellikleri yani hücre sayısını azalttığını ve artmış ALP etkinliği sergilediği gözlemlenmiştir. Kumlanmış ve asitle pürüzlendirilmiş yüzeyler üzerinde yetiştirilen Saos-2 hücrelerinin, tornalanmış yüzeylerde yetiştirilen hücrelere göre daha farklılaşmış bir fenotip gösterme eğiliminde olduğunu göstermiştir. Çalışma esnasında ALP aktivitesini ölçmek için ELISA plak okuyucusundan faydalanılmıştır. Bizde bu çalışmamızda yüzey pürüzlülüğünün ALP aktivitesi üzerindeki etkisini araştırırken ELISA plak okuyucusundan yararlandık. 3. günün sonunda 4. grup olan Lazer + SLA grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında, grup 2 ve grup 3 ve hiç işlem görmemiş kontrol grubuna kıyasla yüzey pürüzlülüğüyle orantılı olacak şekilde ALP aktivitesinin artmış olduğunu gördük (Şekil 4.24.).

Bunlara ek olarak hücreler farklı yüzeylerde büyütülüp SEM ile incelendiğinde, hücre morfolojideki farklılıklar gözlemlenmiştir. Pürüzlü yüzeylerde homojen olmayan hücre katmanları izlenirken, tornalanmış yüzeylerde hücreler tek katman halinde ve homojen bir görünüm sergiledi (208). Çalışmamızda flüoresan mikroskopi görüntülerine baktığımız zaman bu çalışmada gerçekleştirilen SEM testine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubu olan 1. grupta homojen bir dağılım ve hücre katmanı gözlemlerken (Şekil 4.26.) diğer gruplarımızda asit nedeniyle oluşan mikro çukurlar ve lazer uygulamasından dolayı meydana gelen kopmalar neticesinde hücrelerde homojen olmayan bir dağılım ve çok katmanlı bir yapı gözlemlenmiştir.

Veronika ve arkadaşlarının (211), yaptığı bir başka çalışmada ise 6mm çapındaki titanyum örneklerde farklı modifikasyonlar uygulanmasının ardından yine Saos-2 hücresinin proliferasyonuna bakılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre cilalanmamış ve kumlama ile birlikte asit uygulanmış titanyum yüzeylerde cilalı titanyum yüzeye kıyasla Saos-2 poliferasyonunun daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Shapira ve Halabi (210), 6mm çapında ve 2 mm kalınlığında tornalanmış titanyum diskler ile  $Al_2O_3$  partikülü kullanılarak kumlanmış ve ardından hidroklorik / sülfirik asit uygulanmış grade 5 titanyum diskler üzerindeki Saos-2 ve MG63 hücre

poliferasyonlarını karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda pürüzlü yüzeylerde ekimi gerçekleştirilen Saos-2 hücrelerinin tornalanmış yüzeylerde büyütülen Saos-2 hücrelerine kıyasla daha olgun bir fenotipe sahip olduklarını gözlemlemişlerdir. MG63 hücre dizisi Saos-2 hücreleri gibi insan osteosarkom hücrelerinden türetilmişlerdir. Bu hücre dizileri yüzeyin mikrotopografisinin osteoblast benzeri hücreler üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için kapsamlı bir in vitro model olarak kullanılmaktadır. Çalışmadan çıkan bir başka sonuca göre Saos-2 hücrelerinin MG63 hücre dizisine kıyasla daha olgun bir osteoblast hücre fenotipi sergilediği ve daha yüksek ALP aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu sebeple in vitro koşullar altında osseointegrasyonu gösterebilmek adına Saos-2 hücrelerinin MG63 hücrelerine kıyasla daha iyi bir aday olduğu görüşüne varılmıştır. Biz de bu çalışmalardan yola çıkarak çalışmamızdaki disk çaplarımızı 6mm genişliğinde ve 2mm kalınlığında olacak şekilde belirledik ve çalışmamızda Saos-2 hücre hattını kullanmayı tercih ettik.

In vitro biyouyumluluk testlerinin amacı, materyallerin vücuttaki dokuların üzerine veya dokulara yerleştirildiğinde biyolojik reaksiyonları taklit etmektir. Bu yöntemler, in vivo testler veya klinik denemeler yapıldığında sürprizlerin olma ihtimalini azaltarak yeni geliştirilen materyalleri araştırmak için daha ucuz yollar sunar. Materyalleri önceden laboratuvar ortamında test etmeden, hayvanlar üzerinde test etmek çok zaman alıcı ve pahalı olabilir (178). Bizim yapmış olduğumuz çalışmaya benzer bir in vivo çalışma olmamasından dolayı biz de araştırmamızı yaparken in vitro koşulları tercih etmeyi daha uygun bulduk.

3 boyutlu üretim teknikleri olan selektif lazer sinterleme, doğrudan metal lazer sinterleme ve selektif lazer ergitme yöntemlerinden dental implantların üretimi ve tasarımı alanında faydalanılmaktadır (212). Selektif Lazer Ergitme, kemiğin elastik özelliklerine daha iyi uyum sağlamış fonksiyonel titanyum implantları üretebilir. Bu sayede, SLM ile üretilen implantlar, stres etkilerini en aza indirebilir ve uzun süreli stabil bir fiksasyon sağlayabilir (14).

Kemik gelişiminde gözeneklilik ve gözenek boyutu kritik rol oynamaktadır. Gözenekli bir yapıya sahip olan implantlar kemiğe mekanik olarak kenetlenerek

fiksasyonu arttırdıkları için osseointegrasyonu avantajlı bir hale getirebilirler (213). DLMS yöntemi birbirine bağlı ve gözenekli implantları üretmek için kullanılabilir. Bu teknoloji, işlem sırasında metal tozunu kısmen eriterek gözenekli yapılar üretir. Bu metodda iki parçacık arasındaki füzyon tam olarak gerçekleşmeyebilir ve parçacıklar arası ayrılma olabilir. Bu nedenle, SLM tarafından gözenek yapısının tasarımı ve doğrudan üretimi umut verici bir alternatif olarak görülmektedir (214). Bizde çalışmamızı yaparken bu avantajları göz önünde bulundurarak SLM yönteminden yararlanmayı tercih ettik.

Wei ve arkadaşlarının (214), yaptığı bir in vitro çalışmada SLM teknolojisi kullanılarak üretilen çok köklü titanyum implantları hazırlanan tavşan modellerine yerleştirip osseointegrasyonunu incelemişlerdir. Çalışma sonucunda SLM ile üretilen titanyumun gözenekli yapısı sayesinde osseointegrasyonu arttırdığı gözlemlenmiştir. Algabri ve arkadaşlarının (215), yapmış olduğu bir in vitro çalışmada SLM teknolojisi kullanılarak üretilen 3 boyutlu implantların torna kullanılarak üretilen implantlarla osseointegrasyon açısından farkı incelenmiştir. Çalışma sonucunda SLM yöntemiyle üretilen implantların yüzeyleri pürüzlü ve düzensiz bir yapıya ulaşmıştır. Bunun sonucunda ıslanabilme kabiliyeti yüksek ve yüzey serbest enerjisi azalan bir yüzeye sahip olmuştur. Pürüzlü yüzeylerde kültüre edilen osteoblast hücrelerinin, daha pürüzsüz yüzeylerde kültüre edilen hücrelerden daha fazla diferansiye osteoblast özelliklere sahip olma eğiliminde olduğunu gözlemlemişlerdir. Hücre tutunması ve osteoblast farklılaşması SLM yüzeyinde torna kullanılarak üretilen yüzeylerden daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda Ra değeri 477 nm. olan, temas açısı 62.31° olan Lazer + SLA grubunun 72 saatte canlılık değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. ( $p < 0,05$ )

SEM altında incelendiğinde SLM implantların düzensiz gözenekli yapısı görülmektedir. Bu yapı, gözeneklerden daha fazla vücut sıvısının taşınmasına ve iyileşme süreçlerinin hızlanmasına neden olabilir. Bu gözenekler, dokuların implantların içinde büyümesine olanak tanır ve böylece biyolojik fiksasyonu geliştirir (216). Bizim yapmış olduğumuz SEM testlerinde de, 2. grupta lazer ergitme işleminin uygulandığı (Şekil 4.6.) ve 4. grupta Lazer ve SLA uygulamasının birlikte yapılmış

olduğu (Şekil 4.8.) disklerin görüntülerine baktığımızda 1. grupta bulunan disklerle kıyasla (Şekil 4.5.) gözenekli yapıyı daha iyi görebilmekteyiz.

İmplantların yüzey uyumluluğunun biyolojik etkisini arttırmak için en yaygın başvurulan yaklaşım implantın yüzey topografyasını geliştirmektir. Yüzey işlemleri arasında özel bir yeri olan SLA yüzey kumlamanın ve asitle aşındırmanın olumlu etkilerini bir araya getirerek mikro çukurlarla makroskobik olarak pürüzlü bir yüzey oluşturmaktadır. SLA uygulaması yapılmış yüzeylerin biyolojik aktivitesinin arttığı ve bu doğrultuda osteoblast hücrelerinin canlılığının yükseldiği gösterilmiştir. Yapılan in-vivo testler bu yüzeylere kemik bağlantısının arttığını ortaya koymuştur. Bunlara ek olarak SLA uygulanmış yüzeylerde kısa dönemli (15 ay, %98,7) ve uzun dönemli çalışmalarda (5 yıl %95,41) çok yüksek sağkalım oranları rapor edilmiştir (217).

Ramaglia ve arkadaşlarının (209), gerçekleştirmiş olduğu bir çalışmada pürüzsüz ve SLA yüzeye sahip disk gruplarındaki Saos-2 hücrelerinin adezyon, proliferasyon, kemik farklılaşma belirteçleri, ekstrasellüler matriks gibi biyolojik hareketlerini incelemişlerdir. Sonuçlar yüzey topografyasının in vitro koşullar altında insan osteoblast benzeri hücrelerinin fenotipik ekspresyonunu etkileyebileceğini göstermiştir. SLA yüzeye sahip titanyum implantların yüzey özelliklerinden ötürü kemik dokusunun iyileşmesi esnasında osteoblastların biyolojik davranışlarına etki edebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda SLA uygulanmış 3. ve 4. grupta yüzey topografileri incelendiğinde en fazla Ra değerleri bu iki grupta görülmektedir. Yine bu iki grupta Ra değerleri kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 4 kat artış göstermiştir. Bununla birlikte 48. saat MTT sonuçları incelendiğinde 4. grupta bulunan örneklerdeki üremenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ( $p < 0,005$ ).

Asit uygulanmış implant yüzeylerinde kan pıhtısı tutulumunun yüksek olması çevre dokulardan hücrelerin göç etmesini yönlendirmek ve osteokondüksiyonu teşvik etmek için önerilmiştir (218). İnsanlarda, yüksek kemik-implant kontakt oluşumunu gösteren yeni çalışmalar (başlangıç iyileşme periyotlarında % 70'den fazla kemik-implant teması olanlar), titanyum implantların modifiye topografyası ve kimyasının osteokondüktif davranışı olumlu etkileyebileceğini göstermektedir (219).

Giovanna ve arkadaşlarının (220), gerçekleştirmiş olduğu bir çalışmada osteoblast benzeri MG63 hücrelerinin tornalanmış ve SLA işlemi uygulanmış 10'ar adet implant yüzeyi üzerindeki bağlanma ve proliferasyon miktarı karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda kumlama ve asit uygulama işleminin güvenli ve uygulanabilir bir yöntem olduğunu bununla birlikte implant pürüzlülüğünü arttırarak hücre tutulumunu ve proliferasyonunu arttırıcı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da SLA işleminin yüzey pürüzlülüğünü arttırdığının atomik kuvvet mikroskobu sonuçlarını (Tablo 4.1.) görmüştük. Ra değerlerini incelediğimizde 3. ve 4. grupta en yüksek Ra değerlerini görmekteyiz. Bunlara ek olarak çalışmamızdan çıkan sonuca göre en yüksek hücre tutulumunun ve üremesinin gerçekleştiği grup Lazer+SLA işleminin birlikte uygulandığı disk grubu olan 4. grup bulunmuştur. 72. Saatteki MTT sonuçları incelendiğinde Lazer ve Lazer+SLA grupları kendi aralarında benzerlik göstermiştir ve bu benzerlik istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,005$ ).

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), yüzey topografisini atomik çözünürlük düzeyinde ölçmeye yardımcı bir metoddur. Aynı zamanda AFM, farklı nano dokulandırma derecelerine sahip yüzeyleri ayırt etmemize izin verir hassasiyettedir ve nitel bir yöntem olarak kullanıldığında değerlidir (163). SEM ise mikrometre seviyesinde morfoloji karakterizasyonu için kullanılan altın standarttır. Bu yöntem analitik çözünürlüğü arttırmak, nanoyapıların gözlemlenmesi ve karakterize edilmesi için gereklidir. İlave bir EDX dedektörüyle birleştirilen bu teknik, gözlemlenen yapıların temel bileşimini verimli bir şekilde tanımlamamızı sağlar. Bir ölçüm yazılımı ile bir araya getirilen bu araç, hem mikrometrede hem de nanometre seviyesinde morfolojik karakterizasyonu ve topografik incelemeyi yapmamızı sağlar (97).

Enrico ve arkadaşlarının (221), gerçekleştirmiş olduğu bir çalışmada, 6 farklı implanta farklı yüzey işlemleri uygulanmasının ardından Saos-2 hücre proliferasyonuna ve MTT ile birlikte ALP aktivitesine bakılmıştır. İmplant yüzeyleri SEM ve EDX yardımıyla incelenmiştir. SEM görüntülerinde tornadan çıkmış olan implant üretiminden ötürü uzunlamasına paralel oluklar ve sırtlara sahip pürüzsüz bir yüzey göstermiştir. Kumlanarak pürüzlendirilen implant yüzeylerinde kum

tanisinin çarpmasından dolayı meydana gelen mikro çukurcuklar gözlenmiştir. SLA uygulanmış yüzeylerde asit uygulama protokolüyle oluşan mikro yapıya ek olarak kum püskütme işlemi sebebiyle meydana gelen makro olukların olduğu gözlemlenmiştir. Anodize işlemi uygulanmış implant yüzeyinde mikron boyutunda gözenekler gözlemlenmiştir. EDX incelemesinde, tüm implant yüzeylerinde titanyum ve oksijen genel olarak gözlemlenmiş ancak kumlanan ve SLA işlemi uygulanan yüzeylerde kumlama prosedüründen ötürü yüksek miktarda alüminyum konsantrasyonu ve düşük oksijen miktarı görülmüştür. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmanın SEM görüntüleri ve EDX incelemesi bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. SEM görüntülerine baktığımız zaman kontrol grubunda bulunan titanyum disklerin görüntüsünden (Şekil 4.5.) yüzeyin pürüzsüz olduğu görülmektedir. SLA uygulanmış titanyum disklerin yüzeyinde ise (Şekil 4.7.) asit ve kumlama işlemlerinden ötürü pürüzlü yapı kendini göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz EDX sonuçlarını incelediğimizde (Tablo 4.2.) bizim disklerimizde titanyum ve oksijen konsantrasyonunun yüksekliği göze çarpmaktadır bununla birlikte SLA prosedürünün uygulandığı 3. grupta alüminyum konsantrasyonunun yüksek oluşu ve oksijen miktarının bulunmayışı göze çarpmaktadır.

Titanyumun biyouyumluluğunun iyi olması, titanyum yüzeyinde oluşan ince oksit katmanı (titanyum dioksit,  $TiO_2$ ) ile ilgilidir.  $TiO_2$  kendisini saran biyolojik çevreye etkisizdir ve canlı dokularla oldukça uyumludur. Bununla birlikte yükleme koşulu altında implant ve kemik doku arasındaki hareketler sırasında  $TiO_2$  tabakası tahrip edilebilir. Lokalize tahribat, küçük metal parçacıkların veya iyonların canlı dokulara sızmasına neden olabilir. Ayrıca kan akımı sırasında iyonların etkisiyle  $TiO_2$  tabakası zarar görebilir. Bu nedenle titanyumun klinik özelliklerinin geliştirilmesi gereklidir (222). Chih ve arkadaşlarının (223), yaptığı bir çalışmada saf titanyum disklerin üzerine değişik konsantrasyonlarda oksijen elementi eklenmiş ve disklerin korozyon direnci ve hücre tutulumları karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda oksijen tabakası kalınlaştıkça korozyon direncinin ve hücre tutulumunun arttığını gözlemlenmişlerdir. Çalışmamızın EDX sonuçlarına baktığımız zaman (Tablo 4.2.) en yüksek oksijen miktarını SLA ve Lazer işleminin birlikte uygulandığı 4. grubumuzda

bulunan disklerde görmekteyiz. Buna ek olarak hücre tutulumunun ve üremesinin en yüksek olduğu grup yine bu disk grubu olmuştur.

İmplant ile kemik arasındaki biyomekanik ilişkinin temelini oluşturan önemli bir etmen, implant ve destek kemik arasındaki temel makaslama streslerinin, implant yüzeyinde bulunan düzensizliklerde oluşan kemik miktarıyla belirlenmesidir. Daha önce de belirtildiği gibi, osseointegrasyon basit bir koheziv olgu olmadığından artan yüzey alanına atfedilen yüzey pürüzlülüğünün etkileri sınırlı olabilmektedir. Kemiklerin implant yüzeyindeki birbirine kenetlenme davranışı, implant yüzeyindeki yüzey topografik elemanların üç boyutlu veya volümetrik ölçümlerini dikkate almayı gerektirir. Biz de çalışmamızı gerçekleştirirken yüzey pürüzlülüğünün etkisini görebilmek adına atomik kuvvet mikroskopundan yararlandık. Lazer ve SLA işleminin birlikte uygulandığı 4. grupta diğer disk gruplarına kıyasla en yüksek pürüzlülük sonucuna ulaşılmıştır ve bunun bir sonucu olarak en yoğun Saos-2 hücre büyümesi bu grupta elde edilmiş, bu bulgu MTT ve ALP aktivite testleri ile de kanıtlanmıştır.

Sitotoksikite testleri göz önüne alındığında, en yaygın kullanılan yöntemler, özellikle materyallerin veya izole edilen bileşenlerin maruz kaldığı hücrelerin mitokondriyal aktivitesinin analizi yoluyla, hücre yaşayabilirliğini belirleyen yöntemlerdir. Diğer testler de hücre ölümünü ve bunun nekroz veya apoptozdan kaynaklanıp kaynaklanmadığını değerlendirir (183).

Nicel testlere ek olarak, dental materyallerin hücre kültürleri üzerindeki etkileri, taramalı elektron mikroskopisi ile hücrelerin tamamlayıcı analizlerinde olduğu gibi nitel bir şekilde de değerlendirilebilir. Bu yöntem vasıtasıyla, materyallerin veya izole bileşenlerinin neden olduğu morfolojik değişikliklerin doğruluğunun yanı sıra test edilen ürünlere maruz kaldıktan sonra bir substrata tutunmuş hücre popülasyonunda bir azalma veya artış olup olmadığını tespit etmek mümkündür.

Yüzey ıslanabilirliğinin analizi için yaygın olarak kullanılan birçok deneysel yaklaşım titanyum implant yüzeylerine de uyarlanmıştır. Belirli bir katı maddenin ıslanma davranışına ilişkin fikir edinmek için kullanılan en yaygın metod durağan damla yöntemidir. Bu yöntemde genellikle su olarak seçilen sıvı katı yüzey üzerine



eşit zaman aralıkları boyunca belirli bir süre bırakılır ve katı yüzey ile sıvı arasında oluşan açının tanjantı katı/sıvı/gaz fazları dahilinde hesaplanır (Şekil 3.10.). Buna ek olarak katının yüzeyinde oluşan sıvının yatay mesafesi belirlenir ve bu açı kontakt açısı olarak hesaplanır  $\theta$  veya CA olarak gösterilir.  $\theta$  açısı yüzeyin ıslanabilirliğini nicel olarak görmemizi sağlar.

Prensip olarak,  $\theta$ ,  $0^\circ$  ile  $180^\circ$  arasında değişebilir ve ıslatma sıvısının yüzeye doğru çekildiğini (yani damlanın yayıldığını) veya yüzey tarafından itildiğini (yani damla yayılmadığını) belirtir. Suyun  $\theta$  açısı  $90^\circ$  dan küçük ise yüzey hidrofilik,  $0^\circ$  ye yakın ise süper hidrofilik yüzey karakteristiğine sahip olarak tanımlanır.  $90^\circ$  den fazla ise yüzey hidrofobiktir. Suyun yüzey ile yaptığı açı  $150^\circ$  büyük ise yüzeyin ıslanmasına engel olduğu sonucu çıkar ve bu yüzeyler süper hidrofobik yüzey olarak adlandırılırlar (195). Bu bilgiler ışığında elde edilen veriler değerlendirildiğinde şu sonuca ulaşılmıştır; Kontrol grubundaki örneklerde  $\theta$  açısı  $101,72^\circ$  olarak kaydedilmiştir ve hesaplamalara göre yüzeyin hidrofobik olduğu görülmüştür. Yüzey modifikasyonlarına bağlı olarak hidrofobisite kademeli olarak azalmıştır. Azalan hidrofobisite sıralaması Kontrol>Lazer>SLA>Lazer+SLA olarak bulunmuştur (sırasıyla  $101,72^\circ > 75,24^\circ > 74,51^\circ > 62,31^\circ$ , Tablo 4.3.). Bir başka deyişle en hidrofilik yüzey lazer ve SLA uygulamalarının beraber yapılmış olduğu titanyum disk örneklerinde ölçülmüştür. Hidrofilik yüzeyler, biyolojik materyallerin öncelikle tutunması ardından çoğalması için uygun bir arayüz teşkil etmektedir. Yara iyileşmesi söz konusu olduğunda implantın mikro çevresinin hücre büyümesini destekler nitelikte olması bu anlamda önem taşımaktadır. AFM kullanılarak elde edilen yüzey pürüzlülüğü değerleri tablosu incelendiğinde benzer bir dizilim, ters orantılı olarak öne çıkmaktadır. Kontrol<Lazer<SLA<Lazer+SLA sıralamasına göre ( $143 \text{ nm} < 235 \text{ nm} < 415 \text{ nm} < 477 \text{ nm}$ , Tablo 4.1.) titanyum disklerinin yüzeyindeki pürüzlendirme arttıkça Ra değerleri doğal olarak artış göstermiş, buna karşılık hidrofilik özellik aynı sıralamayla artmıştır. Sonuç olarak yüzeyler pürüzlendirildikçe daha hidrofilik bir alan elde edilmiştir. Bu çalışmada bu anlamda hedeflenen sonuca ulaşılmıştır. Bulgularımız, birçok araştırma ve derleme makalesinde olduğu gibi Rupp'un (195) yapmış olduğu araştırmanın sonuçları ile tutarlılık göstermiştir.

Yüzey ıslanabilirliği, osteojenik hücre farklılaşmasının kontrolünü etkileyen önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır (195). Algabri ve arkadaşlarının (215), yapmış olduğu çalışmada SLM yüzey ıslanabilirlik ölçümü  $<90^\circ$  lik bir temas açısı göstermiştir. Bu tipik olarak yüzeyin ıslanmasının elverişli olduğunu ve sıvının yüzeyin geniş bir alanına yayılabileceğini gösteriyor. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada 2. gruba lazer ve 4. gruba lazer ve SLA işlemi uygulanmıştır. Islanabilirlik sonuçlarına baktığımız zaman 2. grup için (Şekil 4.14.) ve 4. grup için (Şekil 4.16.) göstermektedir ki bizim değerlerimizde de çıkan sonuç  $<90^\circ$  dir. 2.grup için  $75,24^\circ$  ve 4. grup için  $62,31^\circ$  bulunmuştur. Bununla birlikte hücre canlılık (Şekil 4.18., Şekil 4.19., Şekil 4.20.) ve ALP (Şekil 4.24.) deneyleri göstermiştir ki en yoğun Saos-2 hücre büyümesi en hidrofilik yüzey olan Lazer+SLA işleminin birlikte uygulandığı 4. grupta görülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1) Yüzey topografisinin hücre proliferasyonu üzerine etkisi vardır ve pürüzlü yüzeylerde kültüre edilen osteoblast hücreleri, daha pürüzsüz yüzeylerde kültüre edilen hücrelerden daha fazla diferansiye osteoblast özelliklerine sahip olma eğilimindedir.

2) Grade 23 titanyum yüzeylerde  $TiO_2$  tabakasının kalınlığıyla doğru orantılı olacak şekilde korozyon direncinin ve hücre adezyonunun arttığı görülmüştür. Bu artışın osseointegrasyon süresini, dolayısı ile yükleme protokollerini kısaltacağı öngörülebilmektedir.

3) SLA yüzeylerin pürüzlü ve düzensiz yüzeyleri sayesinde iyi bir ıslanabilme kabiliyetine sahiptir. Yüzey pürüzlülüğü belirli miktara kadar arttıkça, osteoblastların biyolojik davranışları olumlu yönde etkilenerek hücre bağlantısı artar.

4) Bu konuda yapılacak ileri çalışmalarda ALP ve MTT'ye ek olarak kollajen, gen ve protein ekspresyonuna bakılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Bernhardt A, Lode A, Peters F, Gelinsky M. Comparative evaluation of different calcium phosphate-based bone graft granules - an in vitro study with osteoblast-like cells. *Clinical oral implants research*. 2013;24(4):441-9.
2. Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontology 2000*. 2008;47:15-26.
3. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;19(18):1621-39.
4. Elias CN, Lima JHC, Valiev R, Meyers MA. Biomedical applications of titanium and its alloys. *JOM*. 2008;60(3):46-9.
5. M. J. Donachie. *A Technical Guide: Titanium: , American Technical Publishers,; 2000.*
6. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2003;66(2):247-59.
7. Albrektsson T, Brånemark P-I, Hansson H-A, Kasemo B, Larsson K, Lundström I, et al. The interface zone of inorganic implantsIn vivo: Titanium implants in bone. *Annals of Biomedical Engineering*. 1983;11(1):1-27.
8. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*. 1999;20(23–24):2311-21.
9. Murai K, Takeshita F, Ayukawa Y, Kiyoshima T, Suetsugu T, Tanaka T. Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1996;30(4):523-33.
10. THOMSEN P, LARSSON C, ERICSON LE, SENNERBY L, LAUSMAA J, KASEMO B. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1997;8(11):653-65.
11. Kirmanidou Y, Sidira M, Drosou ME, Bennani V, Bakopoulou A, Tsouknidas A, et al. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *BioMed research international*. 2016;2016:2908570.
12. Mangano C, Piattelli A, Raspanti M, Mangano F, Cassoni A, Iezzi G, et al. Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray dispersive spectrometry evaluation of direct laser metal sintering surface and human bone interface: a case series. *Lasers in medical science*. 2011;26(1):133-8.

13. Lopez-Heredia MA, Sohler J, Gaillard C, Quillard S, Dorget M, Layrolle P. Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(17):2608-15.
14. Traini T, Mangano C, Sammons RL, Mangano F, Macchi A, Piattelli A. Direct laser metal sintering as a new approach to fabrication of an isoelastic functionally graded material for manufacture of porous titanium dental implants. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2008;24(11):1525-33.
15. Xue W, Krishna BV, Bandyopadhyay A, Bose S. Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium. *Acta biomaterialia*. 2007;3(6):1007-18.
16. Li JP, de Wijn JR, Van Blitterswijk CA, de Groot K. Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: preparation and in vitro experiment. *Biomaterials*. 2006;27(8):1223-35.
17. Mupparapu M, Beideman R. Imaging for maxillofacial reconstruction and implantology. *Oral and maxillofacial surgery: reconstructive and implant surgery Philadelphia: WB Saunders*. 2000:17-34.
18. E. RM. *Dentistry: an illustrated history*. 2nd ed ed: Abradale Press 1985.
19. Greenfield E. Implantation of artificial crown and bridge abutments. 1913. *The International journal of oral implantology: implantologist*. 1991;7(2):63.
20. Linkow LI, Dorfman JD. Implantology in dentistry. A brief historical perspective. *The New York state dental journal*. 1991;57(6):31-5.
21. Burch RH. Dr. Pinkney Adams--a dentist before his time. *Arkansas dentistry*. 1997;68(3):14-5.
22. Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants - past and future, 1966-2042. *Journal (Canadian Dental Association)*. 2005;71(5):327.
23. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*. 1969;3(2):81-100.
24. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery Supplementum*. 1977;16:1-132.
25. Southam JC, Selwyn P. Structural changes around screws used in the treatment of fractured human mandibles. *The British journal of oral surgery*. 1971;8(3):211-21.
26. Albrektsson T, Sennerby L. State of the art in oral implants. *Journal of clinical periodontology*. 1991;18(6):474-81.
27. Schnitman PA, Shulman LB. *Dental Implants--benefit & Risk: Proceedings of an NIH-Harvard Consensus Development Conference Held at Harvard School of*

- Dental Medicine, June 13-14, 1978: US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 1980.
28. Tjellstrom A, Lindstrom J, Hallen O, Albrektsson T, Branemark PI. Osseointegrated titanium implants in the temporal bone. A clinical study on bone-anchored hearing aids. *The American journal of otology*. 1981;2(4):304-10.
  29. Tjellstrom A, Lindstrom J, Nylén O, Albrektsson T, Branemark PI, Birgersson B, et al. The bone-anchored auricular episthesis. *The Laryngoscope*. 1981;91(5):811-5.
  30. Zarb GA, Smith DC, Levant HC, Graham BS, Staatsexamen WZ. The effects of cemented and uncemented endosseous implants. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1979;42(2):202-10.
  31. Zarb GA. *Proceedings of the Toronto conference on osseointegration in clinical dentistry*: Mosby; 1984.
  32. Bränemark P, Zarb G, Albrektsson T. *Introduction to osseointegration. Tissue Integrated Protheses: Osseointegration in Clinical Dentistry* Chicago: Quintessence. 1985.
  33. Zarb GA, Schmitt A. Terminal dentition in elderly patients and implant therapy alternatives. *International dental journal*. 1990;40(2):67-73.
  34. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1981;52(2):155-70.
  35. Zarb G, Albrektsson T. Osseointegration: a requiem for the periodontal ligament. *Int J Periodont Rest Dent*. 1991;11(1):88-91.
  36. [http://dentalimplants.uchc.edu/about/surgery\\_osseointegration.html](http://dentalimplants.uchc.edu/about/surgery_osseointegration.html). [
  37. Hansson HA, Albrektsson T, Branemark PI. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1983;50(1):108-13.
  38. Lindén R, Pihakari A, Perälä A, Mäkelä A. *The 2002 dental implant yearbook. The finnish dental implant register*. Helsinki: National Agency for Medicines; 2003.
  39. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International journal of oral surgery*. 1981;10(6):387-416.
  40. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *European journal of oral sciences*. 1998;106(1):527-51.

41. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical oral implants research*. 2002;13(1):1-19.
42. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology 2000*. 1998;17:63-76.
43. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29 Suppl 3:197-212; discussion 32-3.
44. Cochran D. Implant therapy I. *Annals of periodontology*. 1996;1(1):707-91.
45. Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: a review of the literature. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1999;14(4):473-90.
46. Jovanovic SA. The management of peri-implant breakdown around functioning osseointegrated dental implants. *Journal of periodontology*. 1993;64(11 Suppl):1176-83.
47. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1986;1(1):11-25.
48. Tonetti MS, Schmid J. Pathogenesis of implant failures. *Periodontology 2000*. 1994;4:127-38.
49. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *European journal of oral sciences*. 1998;106(3):721-64.
50. Bain C. Influences of smoking on the periodontium and dental implants. *Dental update*. 1997;24(8):328-30.
51. Hutton JE, Heath MR, Chai JY, Harnett J, Jemt T, Johns RB, et al. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1995;10(1):33-42.
52. Sennerby L, Roos J. Surgical determinants of clinical success of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *The International journal of prosthodontics*. 1998;11(5):408-20.
53. Shaffer MD, Juruaz DA, Haggerty PC. The effect of periradicular endodontic pathosis on the apical region of adjacent implants. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1998;86(5):578-81.
54. Meffert RM. Maintenance and treatment of the ailing and failing implant. *Journal (Indiana Dental Association)*. 1994;73(3):22-4; quiz 5.

55. Schnitman PA, Shulman LB. Recommendations of the consensus development conference on dental implants. *Journal of the American Dental Association* (1939). 1979;98(3):373-7.
56. Misch CE, Perel ML, Wang HL, Sammartino G, Galindo-Moreno P, Trisi P, et al. Implant success, survival, and failure: the International Congress of Oral Implantologists (ICOI) Pisa Consensus Conference. *Implant dentistry*. 2008;17(1):5-15.
57. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2000;15(5):675-90.
58. Hulbert SF, Bennett JT. State of the art in dental implants. *Journal of dental research*. 1975;54 Spec No B:B153-7.
59. Craig RG PJ. Cast and wrought base metal alloys. In: *Restorative dental materials*. 11 ed: St. Louis: Mosby.; 2002. 479-513 p.
60. Kelly JR, Rose TC. Nonprecious alloys for use in fixed prosthodontics: A literature review. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1983;49(3):363-70.
61. Blanco-Dalmau L. The nickel problem. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1982;48(1):99-101.
62. Jones TK, Hansen CA, Singer MT, Kessler HP. Dental implications of nickel hypersensitivity. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1986;56(4):507-9.
63. Parr GR, Gardner LK, Toth RW. Titanium: the mystery metal of implant dentistry. *Dental materials aspects. The Journal of prosthetic dentistry*. 1985;54(3):410-4.
64. Contreras EF, Henriques GE, Giolo SR, Nobilo MA. Fit of cast commercially pure titanium and Ti-6Al-4V alloy crowns before and after marginal refinement by electrical discharge machining. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2002;88(5):467-72.
65. Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence international* (Berlin, Germany : 1985). 1996;27(6):401-8.
66. Blackman R, Barghi N, Tran C. Dimensional changes in casting titanium removable partial denture frameworks. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1991;65(2):309-15.
67. Miyakawa O, Watanabe K, Okawa S, Kanatani M, Nakano S, Kobayashi M. Surface contamination of titanium by abrading treatment. *Dental materials journal*. 1996;15(1):11-21.
68. Taborelli M, Jobin M, Francois P, Vaudaux P, Tonetti M, Szmukler-Moncler S, et al. Influence of surface treatments developed for oral implants on the



- physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization. *Clinical oral implants research*. 1997;8(3):208-16.
69. Wakabayashi N, Ai M. A short-term clinical follow-up study of superplastic titanium alloy for major connectors of removable partial dentures. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1997;77(6):583-7.
  70. Boere G. Influence of fluoride on titanium in an acidic environment measured by polarization resistance technique. *Journal of applied biomaterials : an official journal of the Society for Biomaterials*. 1995;6(4):283-8.
  71. Misch CE. *Contemporary Implant Dentistry*. : Elsevier Health Sciences.; 2007.
  72. Weinstein A, Klawitter J, Anand S, Schuessler R. Stress analysis of porous rooted dental implants. *Implantologist*. 1977;1(2):104-9.
  73. Holmgren EP, Seckinger RJ, Kilgren LM, Mante F. Evaluating parameters of osseointegrated dental implants using finite element analysis--a two-dimensional comparative study examining the effects of implant diameter, implant shape, and load direction. *The Journal of oral implantology*. 1998;24(2):80-8.
  74. Baggi L, Cappelloni I, Di Girolamo M, Maceri F, Vairo G. The influence of implant diameter and length on stress distribution of osseointegrated implants related to crestal bone geometry: a three-dimensional finite element analysis. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2008;100(6):422-31.
  75. Ausiello P, Franciosa P, Martorelli M, Watts DC. Effects of thread features in osseointegrated titanium implants using a statistics-based finite element method. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2012;28(8):919-27.
  76. Kurtzman GM, Schwartz K. The subperiosteal implant as a viable long-term treatment modality in the severely atrophied mandible: a patient's 40-year case history. *The Journal of oral implantology*. 1995;21(1):35-9.
  77. Lin S, Shi S, LeGeros RZ, LeGeros JP. Three-dimensional finite element analyses of four designs of a high-strength silicon nitride implant. *Implant dentistry*. 2000;9(1):53-60.
  78. Misch CE ST, Bidez MW. . *Scientific rationale for dental implant design, Contemporary implant dentistry*. 3 ed. CE M, editor: St Louis (MO): Mosby; 2008. 200–29. p.
  79. Kan JY, Rungcharassaeng K, Kim J, Lozada JL, Goodacre CJ. Factors affecting the survival of implants placed in grafted maxillary sinuses: a clinical report. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2002;87(5):485-9.
  80. Hansson S, Werke M. The implant thread as a retention element in cortical bone: the effect of thread size and thread profile: a finite element study. *Journal of biomechanics*. 2003;36(9):1247-58.
  81. CE. M. *Contemporary implant dentistry*. 2 ed: St. Louis: Elsevier; 1999.

82. Lacefield WR. Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials. *Advances in dental research*. 1999;13(1):21-6.
83. Özcan M, Hämmerle C. Titanium as a reconstruction and implant material in dentistry: advantages and pitfalls. *Materials*. 2012;5(9):1528-45.
84. Rosales-Leal J, Rodríguez-Valverde M, Mazzaglia G, Ramon-Torregrosa P, Diaz-Rodriguez L, Garcia-Martinez O, et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010;365(1):222-9.
85. Nakae H, Yoshida M, Yokota M. Effects of roughness pitch of surfaces on their wettability. *Journal of materials science*. 2005;40(9):2287-93.
86. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering: C*. 2003;23(4):551-60.
87. Sollazzo V, Pezzetti F, Scarano A, Piattelli A, Bignozzi CA, Massari L, et al. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo. *Dental materials*. 2008;24(3):357-61.
88. Goyal N, Kaur R. Effect Of Various Implant Surface Treatments On Osseointegration-A Literature Review. *Indian Journal of Dental Sciences*. 2012;4(1).
89. Brunette DM TP, Textor M, Thompsen P. *Titanium in Medicine* springer; 2002.
90. Chiesa R, Sandrini E, Santin M, Rondelli G, Cigada A. Osteointegration of titanium and its alloys by anodic spark deposition and other electrochemical techniques: a review. *Journal of applied biomaterials & biomechanics : JABB*. 2003;1(2):91-107.
91. Giordano C, Sandrini E, Del Curto B, Signorelli E, Rondelli G, Di Silvio L. Titanium for osteointegration: Comparison between a novel biomimetic treatment and commercially exploited surfaces. *Journal of applied biomaterials & biomechanics : JABB*. 2004;2(1):35-44.
92. Le Guehenec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta biomaterialia*. 2008;4(3):535-43.
93. Bagno A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2004;15(9):935-49.
94. Schwartz Z, Martin JY, Dean DD, Simpson J, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mater Res*. 1996;30(2):145-55.

95. Bra-nemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T, Rosen HM. Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry. LWW; 1986.
96. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*. 2009;20 Suppl 4:185-206.
97. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends in biotechnology*. 2010;28(4):198-206.
98. MacDonald DE, Rapuano BE, Deo N, Stranick M, Somasundaran P, Boskey AL. Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. *Biomaterials*. 2004;25(16):3135-46.
99. Braceras I, De Maeztu MA, Alava JI, Gay-Escoda C. In vivo low-density bone apposition on different implant surface materials. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2009;38(3):274-8.
100. Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2007;23(7):844-54.
101. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clinical oral implants research*. 2000;11(6):530-9.
102. Trisi P, Lazzara R, Rao W, Rebaudi A. Bone-implant contact and bone quality: evaluation of expected and actual bone contact on machined and osseotite implant surfaces. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2002;22(6):535-45.
103. Cameron HU, Pilliar RM, Macnab I. The rate of bone ingrowth into porous metal. *J Biomed Mater Res*. 1976;10(2):295-302.
104. Cochran DL, Buser D, ten Bruggenkate CM, Weingart D, Taylor TM, Bernard JP, et al. The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clinical oral implants research*. 2002;13(2):144-53.
105. Ogiso M, Tabata T, Ichijo T, Borgese D. Examination of human bone surrounded by a dense hydroxyapatite dental implant after long-term use. *Journal of long-term effects of medical implants*. 1992;2(4):235-47.
106. Biesbrock AR, Edgerton M. Evaluation of the clinical predictability of hydroxyapatite-coated endosseous dental implants: a review of the literature. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1995;10(6):712-20.
107. Misch CE. Divisions of available bone in implant dentistry. *The International journal of oral implantology : implantologist*. 1990;7(1):9-17.
108. Vercaigne S, Wolke JG, Naert I, Jansen JA. A histological evaluation of TiO<sub>2</sub>-gritblasted and Ca-P magnetron sputter coated implants placed into the

- trabecular bone of the goat: Part 2. Clinical oral implants research. 2000;11(4):314-24.
109. Milev A, Kannangara G, Ben-Nissan B. Morphological stability of hydroxyapatite precursor. *Materials Letters*. 2003;57(13):1960-5.
  110. Gan L, Wang J, Tache A, Valiquette N, Deporter D, Pilliar R. Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part II: Short-term in vivo studies. *Biomaterials*. 2004;25(22):5313-21.
  111. Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Martini D, Tinti A, Mauro G, et al. Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces. *Journal of periodontology*. 2005;76(3):364-72.
  112. Bornstein MM, Valderrama P, Jones AA, Wilson TG, Seibl R, Cochran DL. Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. *Clinical oral implants research*. 2008;19(3):233-41.
  113. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO<sub>2</sub> blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clinical oral implants research*. 2001;12(2):128-34.
  114. Gotfredsen K, Nimb L, Hjorting-Hansen E, Jensen JS, Holmen A. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO<sub>2</sub>-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clinical oral implants research*. 1992;3(2):77-84.
  115. Rasmusson L, Roos J, Bystedt H. A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants. *Clinical implant dentistry and related research*. 2005;7(1):36-42.
  116. Sul YT, Johansson CB, Roser K, Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomaterials*. 2002;23(8):1809-17.
  117. Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2003;18(3):341-8.
  118. Degidi M, Nardi D, Piattelli A. 10-year follow-up of immediately loaded implants with TiUnite porous anodized surface. *Clinical implant dentistry and related research*. 2012;14(6):828-38.
  119. Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Branemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clinical implant dentistry and related research*. 2003;5 Suppl 1:57-63.

120. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2004;19(5):659-66.
121. Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO<sub>2</sub> grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials*. 2006;27(6):926-36.
122. Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*. 2009;30(5):736-42.
123. Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, Wennerberg A. An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials*. 2003;24(5):701-10.
124. Guarnieri R, Placella R, Testarelli L, Iorio-Siciliano V, Grande M. Clinical, radiographic, and esthetic evaluation of immediately loaded laser microtextured implants placed into fresh extraction sockets in the anterior maxilla: a 2-year retrospective multicentric study. *Implant dentistry*. 2014;23(2):144-54.
125. Schade R, Sikiric MD, Lamolle S, Ronold HJ, Lyngstadass SP, Liefeyth K, et al. Biomimetic organic-inorganic nanocomposite coatings for titanium implants. In vitro and in vivo biological testing. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;95(3):691-700.
126. Herr Y, Woo J, Kwon Y, Park J, Heo S, Chung J, editors. Implant surface conditioning with Tetracycline-HCl: A SEM study. *Key Engineering Materials*; 2008: Trans Tech Publ.
127. Petzold C, Monjo M, Rubert M, Reinholt FP, Gomez-Florit M, Ramis JM, et al. Effect of proline-rich synthetic peptide-coated titanium implants on bone healing in a rabbit model. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2013;28(6):e547-55.
128. Simmons CA, Valiquette N, Pilliar RM. Osseointegration of sintered porous-surfaced and plasma spray-coated implants: An animal model study of early postimplantation healing response and mechanical stability. *J Biomed Mater Res*. 1999;47(2):127-38.
129. Ong JL, Chan DC. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review. *Critical reviews in biomedical engineering*. 2000;28(5-6):667-707.
130. Fouda M, Nemat A, Gawish A, Baiuomy AR. Does the coating of titanium implants by hydroxyapatite affect the elaboration of free radicals. *An Experimental Study Austr J Basic Appl Sci*. 2009;3:1122-9.
131. Green J, Weiss A, Stern A. Lasers and radiofrequency devices in dentistry. *Dental clinics of North America*. 2011;55(3):585-97, ix-x.

132. M. S. Oral and maxillofacial surgery, Lasers in oral and maxillofacial surgery. . editor. FR, editor: St Louis (MO): Saunders/Elsevier; 2009. p. 237–58. p.
133. Einstein A. Zur quantentheorie der strahlung. Physikalische Zeitschrift. 1917;18:121-8.
134. Kopfermann H, Ladenburg R. Experimental Proof of Negative Dispersion.'. Nature. 1928;122:438-9.
135. Radziemski L, Cremers D. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: from the concept of atoms to LIBS 2012. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 2013;87:3-10.
136. Schawlow AL, Townes CH. Infrared and optical masers. Physical Review. 1958;112(6):1940.
137. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. 1960.
138. Sorokin P, Stevenson M. Stimulated infrared emission from trivalent uranium. Physical Review Letters. 1960;5(12):557.
139. Javan A, Bennett Jr WR, Herriott DR. Population inversion and continuous optical maser oscillation in a gas discharge containing a He-Ne mixture. Physical Review Letters. 1961;6(3):106.
140. White A, Rigden J. Continuous gas maser operation in visible. Proceedings of the Institute of Radio Engineers. 1962;50(7):1697-&.
141. Geusic J, Marcos H, Van Uitert L. Laser oscillations in Nd-doped yttrium aluminum, yttrium gallium and gadolinium garnets. Applied Physics Letters. 1964;4(10):182-4.
142. Radziemski LJ. From LASER to LIBS, the path of technology development. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 2002;57(7):1109-13.
143. Guttenberg SA, Emery RW, 3rd. Laser physics and tissue interaction. Oral and maxillofacial surgery clinics of North America. 2004;16(2):143-7.
144. M S. Lasers in oral and maxillofacial surgery: St Louis (MO): Saunders/Elsevier; 2009.
145. Colt H, Mathur P. Basic principles of laser-tissue interactions. UpToDate version. 2004;14:1-5.
146. Kuroda D, Niinomi M, Morinaga M, Kato Y, Yashiro T. Design and mechanical properties of new  $\beta$  type titanium alloys for implant materials. Materials Science and Engineering: A. 1998;243(1):244-9.
147. Bhattarai SR, Khalil KA, Dewidar M, Hwang PH, Yi HK, Kim HY. Novel production method and in-vitro cell compatibility of porous Ti-6Al-4V alloy disk for hard tissue engineering. Journal of biomedical materials research Part A. 2008;86(2):289-99.
148. Krishna BV, Bose S, Bandyopadhyay A. Low stiffness porous Ti structures for load-bearing implants. Acta biomaterialia. 2007;3(6):997-1006.

149. Turner TM, Sumner DR, Urban RM, Rivero DP, Galante JO. A comparative study of porous coatings in a weight-bearing total hip-arthroplasty model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1986;68(9):1396-409.
150. Head WC, Bauk DJ, Emerson RH, Jr. Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*. 1995(311):85-90.
151. Oh I-H, Nomura N, Masahashi N, Hanada S. Mechanical properties of porous titanium compacts prepared by powder sintering. *Scripta Materialia*. 2003;49(12):1197-202.
152. Hollander DA, von Walter M, Wirtz T, Sellei R, Schmidt-Rohlfing B, Paar O, et al. Structural, mechanical and in vitro characterization of individually structured Ti-6Al-4V produced by direct laser forming. *Biomaterials*. 2006;27(7):955-63.
153. Mangano FG, Cirotti B, Sammons RL, Mangano C. Custom-made, root-analogue direct laser metal forming implant: a case report. *Lasers in medical science*. 2012;27(6):1241-5.
154. Ghuneim WA. In situ tooth replica custom implant: a 3-dimensional finite element stress and strain analysis. *The Journal of oral implantology*. 2013;39(5):559-73.
155. Attar H, Calin M, Zhang L, Scudino S, Eckert J. Manufacture by selective laser melting and mechanical behavior of commercially pure titanium. *Materials Science and Engineering: A*. 2014;593:170-7.
156. Gu D, Hagedorn Y-C, Meiners W, Meng G, Batista RJS, Wissenbach K, et al. Densification behavior, microstructure evolution, and wear performance of selective laser melting processed commercially pure titanium. *Acta Materialia*. 2012;60(9):3849-60.
157. Stamp R, Fox P, O'Neill W, Jones E, Sutcliffe C. The development of a scanning strategy for the manufacture of porous biomaterials by selective laser melting. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2009;20(9):1839-48.
158. Deckard C, Beaman J. Process and control issues in selective laser sintering. *ASME Prod Eng Div (Publication) PED*. 1988;33(33):191-7.
159. Mullen L, Stamp RC, Brooks WK, Jones E, Sutcliffe CJ. Selective Laser Melting: a regular unit cell approach for the manufacture of porous, titanium, bone in-growth constructs, suitable for orthopedic applications. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2009;89(2):325-34.
160. Santos EC, Shiomi M, Osakada K, Laoui T. Rapid manufacturing of metal components by laser forming. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*. 2006;46(12):1459-68.

161. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*. 2009;20 Suppl 4:172-84.
162. Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NH. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *Journal of dental research*. 2006;85(6):496-500.
163. Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2000;15(3):331-44.
164. Whitehouse D. 3 - Profile and areal (3D) parameter characterization. *Surfaces and Their Measurement*. Oxford: Kogan Page Science; 2002. p. 48-95.
165. Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 1995;29(12):1567-75.
166. Kilpadi DV, Lemons JE. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 1994;28(12):1419-25.
167. Vercaigne S, Wolke J, Naert I, Jansen J. The effect of titanium plasma-sprayed implants on trabecular bone healing in the goat. *Biomaterials*. 1998;19(11):1093-9.
168. Ong JL, Prince CW, Raikar GN, Lucas LC. Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. *Implant dentistry*. 1996;5(2):83-8.
169. Lincks J, Boyan B, Blanchard C, Lohmann C, Liu Y, Cochran D, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*. 1998;19(23):2219-32.
170. Feighan JE, Goldberg VM, Davy D, Parr JA, Stevenson S. The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1995;77(9):1380-95.
171. Goldberg VM, Stevenson S, Feighan J, Davy D. Biology of grit-blasted titanium alloy implants. *Clinical orthopaedics and related research*. 1995(319):122-9.
172. D'Lima DD, Lemperle SM, Chen PC, Holmes RE, Colwell CW. Bone response to implant surface morphology. *The Journal of arthroplasty*. 1998;13(8):928-34.
173. Sawase T, Wennerberg A, Hallgren C, Miyamoto I, Albrektsson T. Atomic force microscopic study of commercially available implant abutments. *Clinical implant dentistry and related research*. 1999;1(2):92-7.
174. Cooper LF, Masuda T, Whitson SW, Yliheikkila P, Felton DA. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and



- plasma-sprayed titanium surfaces. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1999;14(1):37-47.
175. Wataha J, Hanks C. Biocompatibility testing—what can we anticipate. *Trans Acad Dent Mater*. 1997;10:109-20.
  176. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2001;86(2):203-9.
  177. Lemons JE. Dental implant biomaterials. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 1990;121(6):716-9.
  178. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 1996;12(3):186-93.
  179. Schuster GS, Lefebvre CA, Wataha JC, White SN. Biocompatibility of posterior restorative materials. *Journal of the California Dental Association*. 1996;24(9):17-31.
  180. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2012;28(1):23-40.
  181. Autian J. The use of rabbit implants and tissue culture tests for the evaluation of dental materials. *International dental journal*. 1970;20(3):481-90.
  182. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *Journal of dentistry*. 2014;42(2):185-98.
  183. Bianchi L, Ribeiro AP, de Oliveira Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Transdental cytotoxicity of experimental adhesive systems of different hydrophilicity applied to ethanol-saturated dentin. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2013;29(9):980-90.
  184. Grayson WL, Martens TP, Eng GM, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. Biomimetic approach to tissue engineering. *Seminars in cell & developmental biology*. 2009;20(6):665-73.
  185. WJ. W. The use of laboratory animals in toxicologic research, *Principles and methods of toxicology*. AW H, editor: Taylor & Francis; 2001. 773–818 p.
  186. Meyer O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology letters*. 2003;140-141:21-30.
  187. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annual review of materials research*. 2001;31(1):81-110.
  188. Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2000;16(3):188-97.

189. Mjor IA. Minimum requirements for new dental materials. *Journal of oral rehabilitation*. 2007;34(12):907-12.
190. Bayne S. Dental restorations for oral rehabilitation—testing of laboratory properties versus clinical performance for clinical decision making. *Journal of oral rehabilitation*. 2007;34(12):921-32.
191. G. S. Determination of biocompatibility. *Biocompatibility of dental materials*. Schmalz G A-BD, editor: Springer; 2010.
192. Cochrane Collaboration Website: <http://www.cochrane.org> [
193. Bayne SC. Correlation of clinical performance with 'in vitro tests' of restorative dental materials that use polymer-based matrices. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2012;28(1):52-71.
194. Schmalz G. Modern concepts in biocompatibility testing of restorative materials. *Trans Acad Dent Mater*. 1996;9:170-9.
195. Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. *Acta biomaterialia*. 2014;10(7):2894-906.
196. Warnes TW. Alkaline phosphatase. *Gut*. 1972;13(11):926-37.
197. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2014;29(3):269-78.
198. Steinemann SG. Titanium--the material of choice? *Periodontology 2000*. 1998;17:7-21.
199. Lim YJ, Oshida Y, Andres CJ, Barco MT. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2001;16(3):333-42.
200. Eriksson C, Lausmaa J, Nygren H. Interactions between human whole blood and modified TiO<sub>2</sub>-surfaces: influence of surface topography and oxide thickness on leukocyte adhesion and activation. *Biomaterials*. 2001;22(14):1987-96.
201. Abraham CM. A brief historical perspective on dental implants, their surface coatings and treatments. *The open dentistry journal*. 2014;8:50-5.
202. Novaes AB, Jr., Souza SL, de Oliveira PT, Souza AM. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2002;17(3):377-83.
203. Keller JC, Draughn RA, Wightman JP, Dougherty WJ, Meletiou SD. Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1990;5(4):360-7.
204. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A

- histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(7):889-902.
205. Sola-Ruiz MF, Perez-Martinez C, Labaig-Rueda C, Carda C, Martin De Llano JJ. Behavior of Human Osteoblast Cells Cultured on Titanium Discs in Relation to Surface Roughness and Presence of Melatonin. *International journal of molecular sciences.* 2017;18(4).
  206. Elias CN, Fernandes DJ, Resende CR, Roestel J. Mechanical properties, surface morphology and stability of a modified commercially pure high strength titanium alloy for dental implants. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials.* 2015;31(2):e1-e13.
  207. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer research.* 1987;47(18):4961-6.
  208. Klinger A, Tadir A, Halabi A, Shapira L. The effect of surface processing of titanium implants on the behavior of human osteoblast-like Saos-2 cells. *Clinical implant dentistry and related research.* 2011;13(1):64-70.
  209. Ramaglia L, Postiglione L, Di Spigna G, Capece G, Salzano S, Rossi G. Sandblasted-acid-etched titanium surface influences in vitro the biological behavior of SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Dental materials journal.* 2011;30(2):183-92.
  210. Shapira L, Halabi A. Behavior of two osteoblast-like cell lines cultured on machined or rough titanium surfaces. *Clinical oral implants research.* 2009;20(1):50-5.
  211. Pivodova V, Frankova J, Dolezel P, Ulrichova J. The response of osteoblast-like SaOS-2 cells to modified titanium surfaces. *The International journal of oral & maxillofacial implants.* 2013;28(5):1386-94.
  212. Koike M, Greer P, Owen K, Lilly G, Murr LE, Gaytan SM, et al. Evaluation of Titanium Alloys Fabricated Using Rapid Prototyping Technologies-Electron Beam Melting and Laser Beam Melting. *Materials (Basel, Switzerland).* 2011;4(10):1776-92.
  213. Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials.* 2006;27(13):2651-70.
  214. Peng W, Xu L, You J, Fang L, Zhang Q. Selective laser melting of titanium alloy enables osseointegration of porous multi-rooted implants in a rabbit model. *Biomedical engineering online.* 2016;15(1):85.
  215. Shaoki A, Xu JY, Sun H, Chen XS, Ouyang J, Zhuang XM, et al. Osseointegration of three-dimensional designed titanium implants manufactured by selective laser melting. *Biofabrication.* 2016;8(4):045014.
  216. Mangano C, Mangano FG, Shibli JA, Ricci M, Perrotti V, d'Avila S, et al. Immediate loading of mandibular overdentures supported by unsplinted

- direct laser metal-forming implants: results from a 1-year prospective study. *Journal of periodontology*. 2012;83(1):70-8.
217. Medvedev AE, Neumann A, Ng HP, Lapovok R, Kasper C, Lowe TC, et al. Combined effect of grain refinement and surface modification of pure titanium on the attachment of mesenchymal stem cells and osteoblast-like SaOS-2 cells. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2017;71:483-97.
  218. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *The International journal of prosthodontics*. 1998;11(5):391-401.
  219. Trisi P, Rao W, Rebaudi A. A histometric comparison of smooth and rough titanium implants in human low-density jawbone. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1999;14(5):689-98.
  220. Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2000;15(6):779-84.
  221. Conserva E, Menini M, Ravera G, Pera P. The role of surface implant treatments on the biological behavior of SaOS-2 osteoblast-like cells. An in vitro comparative study. *Clinical oral implants research*. 2013;24(8):880-9.
  222. Tan L, Dodd RA, Crone WC. Corrosion and wear-corrosion behavior of NiTi modified by plasma source ion implantation. *Biomaterials*. 2003;24(22):3931-9.
  223. Yang CH, Wang YT, Tsai WF, Ai CF, Lin MC, Huang HH. Effect of oxygen plasma immersion ion implantation treatment on corrosion resistance and cell adhesion of titanium surface. *Clinical oral implants research*. 2011;22(12):1426-32.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Emin Orkun Olcay

Doğum yeri ve tarihi Uyuğu : Altındağ / 15.08.1987/ T.C

İletişim adresi ve telefonu : Rauf Paşa Hanı Sokak Ata Konakları B/7  
Acıbadem/İSTANBUL

### II- Eğitimi

2013-2017 Hacettepe Üniversitesi, Doktora, Protetik Diş Tedavisi

2007-2012 Yeditepe Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

### III- Mesleki Deneyimi

2013-2017 Hacettepe Üniversitesi Protetik Diş Tedavisi Bölümünde Araştırma  
Görevlisi

### IV- Bilimsel Faaliyetleri

2014 European Prosthodontic Association (EPA) poster sunumu

2015 Planmed Implantology Education Group (PIEG) poster sunumu

2016 Planmed Implantology Education Group (PIEG) poster sunumu

