

MOHAMMED ALZBOUN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2020

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

(DOKTORA TEZİ)

**BOR İLE MODİFİYE EDİLMİŞ TİTANYUM İMPLANT
YÜZEYLERDE BAKTERİYEL ADEZYONUN VE
OSTEOBLAST AKTİVİTESİNİN İN VİTRO ANALİZİ**

MOHAMMED ALZBOUN

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE CANSU BAŞEĞMEZ**

**ORAL İMPLANTOLOJİ ANABİLİM DALI
ORAL İMPLANTOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

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

Mohammed Alzboun

İTHAF

Annem, Babam ve Aya'ya ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Öncelikle, değerli hocalarım Doç. Dr. Ayşe Cansu Başeğmez, Prof. Dr. Volkan Arısan, Yrd. Doç. Dr. Leyla Türker Şener ve Doç. Dr. Nursen Topçuoğlu 'ya, beni doktora öğrencileri olarak kabul ettikleri için ve bu proje sürecindeki yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, doktora sırasında değerli eğitimlerinden dolayı Prof. Dr. Selim Eranlı, Prof. Dr. Serdar Yalçın, Doç. Dr. Nilüfer Bölükbaşı Balcıoğlu, Dr. Alper Gültekin, Dr. Çağlar Çınar, Dr. Alper Sağlanmak ve Dr. Sinem Yeniyol'e;

Tüm doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Oral İmplantoloji Bölümü personeline de teşvikleri için;

Ayrıca, doktora eğitim boyunca her zaman yanımda olup desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Şebnem Mozioğlu' na;

İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Fizik Bölümü, Prof. Dr. Ayşe Erol, Dr. Fahrettin Sarcan ve Dr. Furkan Kuruoğlu 'ya bilimsel çalışmamı güçlendiren yüzey karakterizasyonu için;

Çalışmamın her bölümündeki katkılarından dolayı, test edilen yüzeyleri hazırladığı için Sayın Ediz Yavaş'a;

Tez çalışmama katkılarından dolayı Devadent İmplant Ticaret A.Ş.'ye, Teşekkür ederim.

Son olarak en değerlilerim olan sevgilim ve aileme bilimsel çalışmalarım için çok huzurlu ve dengeli bir atmosfer hazırladıkları için şükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31831.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Biyomateryaller.....	6
2.1.1. İmplant Materyalleri	8
2.1.1.1. Titanyum	9
2.1.1.2. Zirkonyum.....	11
2.1.1.3. Tantal.....	11
2.1.1.4. Paslanmaz Çelik	12
2.1.1.5. Polimerik İmplantlar	12
2.1.1.6. Poli Eter-Eter-Keton (PEEK).....	13
2.1.1.7. Gelecek Vaat Eden Alaşımlar	13
2.2. Titanyum İmplant Malzeme Yüzeyleri	14
2.2.1. Yüzey Değişikliklerinin Kategorileri:.....	14
2.2.1.1. Yüzey topografisini değiştirme yöntemleri.....	14
2.2.1.2. Dental İmplantların Biyolojik olarak aktif ilaçlarla Birleşimi	22
2.2.1.3. Yüzey Modifikasyonlarında Biyokimyasal Yöntemler	23
2.2.2. Kaplama olarak Kullanılan Diğer Malzemeler	23
2.2.2.1. İmplantlarda İnorganik Kaplama Malzemeleri:	24
2.2.2.2. İmplantlarda Kullanılan Organik Kaplama Malzemeleri.....	25
2.2.2.3. İmplantlarda Kompozit ve Kombine Kaplama Malzemeleri	26

2.2.3. Oksit Tabakası.....	27
2.2.4. Pürüzlülük	28
2.2.5. Yüzey Analizi Testleri:	30
2.2.5.1. XPS:	31
2.2.5.2. SEM:	31
2.2.5.3. KLSM (Konfokal lazer tarama mikroskopisi):	32
2.2.5.4. Mekanik Profilometri:	32
2.3. Peri-implant patolojisi.....	33
Anti-bakteriyel testler:	36
2.3.1. Difüzyon Yöntemleri	36
2.3.1.1. Agar disk difüzyon yöntemi	36
2.3.1.2. Antimikrobiyal gradyan yöntemi (Etest)	37
2.3.1.3. Diğer difüzyon yöntemleri	37
2.3.2. İnce tabaka kromatografisi (TLC) –biyoatografi	38
2.3.3. Seyreltme yöntemleri	38
2.3.4. Zamana bağlı öldürme yöntemi (zamanla öldürme eğrisi)	38
2.3.5. ATP biyoluminesans deneyi	39
2.4. Canlı kemiğin hücreleri:	39
2.4.1. Hücre Adezyonu:	40
2.4.2. Osteokalsin	41
2.5. Bor elementi hakkında genel bilgiler	43
2.6. In Vitro Çalışmalar	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Deneysel Disklerin Üretimi	46
3.2. Malzemeler ve yöntemler	49
3.2.1. Titanyum alaşımı (Ti-6Al-4V) yüzeylerin karakterizasyonu.....	49
3.2.1.1. Mekanik Profilometri	49
3.2.1.2. Konfokal Lazer Tarama Mikroskopisi (KLSM):	51
3.2.1.3. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) Analizi:	51
3.3. İnsan fetal osteoblast hücrelerinin kültürü:	52
3.3.1. Hücre adezyonu ve yayılımı.....	54
3.3.2. Hücre Canlılığı/Proliferasyonu Deneyi	55
3.3.3. Osteokalsin aktivitesi	56

3.4. Bakteriyel analiz	59
3.4.1. Bakteri kültürleri	59
3.4.2. Tükürük hazırlama	59
3.4.3. Deney tasarımı	60
3.4.3.1. Bakteriyel sayım (CFU)	61
3.4.3.2. Konfokal Lazer Tarama Mikroskopisi (KLSM) Analizi:	63
3.4.3.3. SEM Görüntüleme	64
3.5. İstatistiksel Analiz:.....	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. Yüzey Karakterizasyonu	65
4.1.1. Profilometre Analizi.....	65
4.1.2. KLSM Analizi	66
4.1.3. XPS Analizi.....	67
4.2. Biyolojik Yanıt.....	70
4.2.1. Hücre Adezyonu ve yayılımı	70
4.2.2. Hücre canlılığı / proliferasyonu (CCK-8)	71
4.2.3. Osteokalsin üretimi	73
4.3. Bakteriyel cevap.....	78
4.3.1. SEM Görüntüleme ile Adezyon Analiz	78
4.3.2. Bakteriyel Adezyonu (CFU)	79
4.3.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Analizi (KLTM).....	81
5. TARTIŞMA	86
KAYNAKLAR	95
HAM VERİLER	128
FORMLAR	133
ETİK KURUL KARARI	134
PATENT HAKKI İZNİ	135
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	136
ÖZGEÇMİŞ	137

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan yüzey modifikasyon yöntemleri	48
Tablo 4-1: Stilus profilometrisi ile elde edilen yüzey pürüzlülük değerleri (ölçüm alanı 100 x 100 μm^2).....	65
Tablo 4-2: Örneklerin yüzey pürüzlülüğünü ve yüzey topografisini gösteren Konfokal tarama lazer mikroskobu ile elde edilen sonuçlar	67
Tablo 4-3: XPS yüzey kompozisyonu analizi, numunelerin kimyasal kompozisyonunu gösterir	69
Tablo 4-4: hFOB canlılığı ve proliferasyonu CCK-8 ile 1. , 4. ve 7. günde değerlendirildi.	73
Tablo 4-5: Osteokalsin seviyeleri, iki farklı zaman aralığında hücre tabakası lizatlarında ölçüldü	76
Tablo 4-6: Osteokalsin seviyeleri, iki farklı zaman aralığında hücre kültürü ortamında ölçüldü	78
Tablo 4-7: Deneysel yüzeylerde sayılan canlı bakteri sayısı.	81
Tablo 4-8: Antibakteriyel aktivitenin, Live / Dead ® BacLight TM bakteriyel canlılık kiti sonuçları ve KLTM analizi ve ImageJ yazılımı ile değerlendirilmesi.....	84

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3-1: (a) Kumlama işleminden sonra disk yüzeyleri asitle aşındırma prosedürü için hazırlık gerçekleştirildi. (b) A. (SLA), B. (SBF), C. (SBF-B), ve D. (SAF) grupları resmedilmiştir.....	48
Şekil 3-2: Bu çalışmada kullanılan mekanik stylus profilometrisi (KLA-Tencor, P-16 + / P-6, ABD).....	50
Şekil 3-3: Bu çalışmada kullanılan konfokal lazer tarama mikroskopisi (KLSM).....	51
Şekil 3-4: hücre kültürü: Hücre geçişi sırasında insan fetal osteoblast hücrelerini gösteren elektron mikroskop görüntüsü.....	54
Şekil 3-5: CCK-8 deneyi: CCK-8'in uygulanmasından sonra, ELISA okuma ölçümünden önce, farklı modifiye edilmiş disk yüzeylerinden toplanan hFOB ile 24 oluklu plakanın görüntüsü.	56
Şekil 3-6: OCN testi: (a). Hücre ortamından ve hücre lizat işleminden osteokalsin toplandıktan sonra OCN ölçümü için süreci. (b). OCN testi: ELISA Okuyucu sonuçları için hazırlanan OCN testinin son aşaması.	58
Şekil 3-7: Bakterilerin anaerop ortamda, Çalkalama makinesi'nde(çalkalayıcı) inkübe edilmesi.....	60
Şekil 3-8: Tüplere konulan disklerin vortekslenmesi	61
Şekil 3-9: (a) <i>S. mutans</i> dilüsyonunun 0.1 alikuotu, Mitis-salivarius bacitrasin agar plakaları üzerinde ekildi (M259, HiMedia Laboratories, Hindistan). (b) Tüm petriler, koloniler sayılmadan ve CFU / mL olarak hesaplanmadan önce 4 gün boyunca inkübe edildi.	62
Şekil 3-10: Brucella kanlı agarda <i>P. gingivalis</i> kolonileri. (a-b) <i>P. gingivalis</i> bakterilerinin tek bir kolonisinin 10 ml BHI et suyuna (hemin ve menadion ile desteklenmiş) aşılandı ve ardından oluklu plakalar içeren diske yerleştirildi; (b) Kuyucuklara yerleştirilen diskler üzerine besiyeri eklenmesi; (c) <i>P. gingivalis</i> dilüsyonunun 0.1 alikuotu Brucella kan agar (hemin ve menadion ile desteklenmiş) (Pronadisa Lab. Conda, Madrid, İspanya) plakaları üzerine ekildi; (d) Disk kültürlerinin inkübasyonu 5 gün boyunca yapıldı.	63
Şekil 4-1: Örneklerin yüzey pürüzlülüğünü ve yüzey topografisini gösteren Konfokal tarama lazer mikroskobu ile elde edilen üç boyutlu görüntüler; (A) SLA, (B) SBF, (C) SBF-B ve (D) SAF yüzeyleri.....	66

Şekil 4-2: Hazırlanan yüzeylerin X ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) araştırma spektrumları.	70
Şekil 4-3: 7. günde disk yüzeyleri üzerinde hFOB hücrelerinin elektron mikrograflarının taranması Tüm grupların yüzeylerine yayılan hFOB hücreleri (oklar). HFOB hücrelerinin yayılması, numunelerin neredeyse tüm yüzeyini kaplamaktadır.	71
Şekil 4-4: 1., 4. ve 7. günlerde gerçekleştirilen hücre canlılığı analizinin dağılım grafikleri. 1. günde SBF * $p = 0.039$, 4. günde SAF ** $p = 0.0194$ ve 7. günde SLA *** $p = 0.0229$ ile karşılaştırıldığında, 1.,4. ve 7. günde SBF-B için anlamlı farklılıklar saptanmıştır.	72
Şekil 4-5: OCN testi: Hücre ortamından ve hücre lizat işleminden osteokalsin toplandıktan sonra OCN ölçümü için süreci.	74
Şekil 4-6: Hücre kültürü ortamında osteokalsin üretiminin saçılma grafikleri.....	75
Şekil 4-7: Hücre kültürü ortamında osteokalsin üretiminin saçılma grafikleri; 7. günde SBF-B ve SLA arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p = 0.0132$)	77
Şekil 4-8: Yüzey numuneleri üzerindeki yapışkan bakteri kolonilerinin (oklar ile işaretlenmiş) SEM mikrografları. (20k-40k x 15000, 30000 ve 50000 büyütmelerde)..	79
Şekil 4-9: Bakteriyel yapışma testinin saçılma grafikleri (CFU / ml)	80
Şekil 4-10: İncelenen yüzeylere <i>S.mutans</i> ve <i>P.gingivalis</i> adezyonlarının Konfokal Lazer Tarama Mikroskopisi (KLTM) mikrografları. Canlı ve cansız bakteriler sırasıyla yeşil ve kırmızı renklerde görülebilir (Live / Dead Bac Light™ boyama; 10x10 büyütme)	83
Şekil 4-11: Yüzeylerin canlı ve cansız bakteri sayımları	85

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

°C: Santigrat Derece

ALP: Alkalen Fosfataz

aPDT: Fotodinamik Antimikrobiyal Tedavi (FDAT)

BA: Borik Asit

BGLAP: Kemik Gama-karboksiglutamik Asit içeren Protein

BMP-2: Kemik Morfogenetik Proteinleri 2

BMP-7: Kemik Morfogenetik Proteinleri 7

BMP: Kemik Morfogenetik Proteinleri

BMSC: Kemik İliği Stroma Hücreleri

BSP: Kemik Siyaloprotein

Ca-P: Kalsiyum Fosfat

CCK-8: Cell Counting Kit-8

CFRPEEK: Karbon Fiber Takviyeli Polietereterketon

CFU: Koloni Oluşturan Birim

ColIA1: Kollajen Tip 1 Alfa 1

CP Ti: Ticari olarak Saf Titanyumlar

Dlx5: Distal-Less Homeobox 5

DOT: Disodyum Oktaborat Tetrahidrat

ECM: Hücre Dışı Matris

ESCA: Kimyasal Analiz için Elektron Spektroskopisi

F: Tekrarlayan Ölçümlerde Varyans Analizi

FGF-2: Fibroblast Büyüme Faktörü 2

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

GF: Büyüme Faktörü

HA: Hidroksiapatit.

hFOB: İnsan Fetal Osteoblast hücresi

Hob: İnsan Osteoblast Hücresi

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

KTSM: Konfokal Tarama Lazer Mikroskobu

MAO: Plazma Elektrolitik Oksidasyonu

Max: Maksimum

MB: Metilen Mavisi

MC3T3: Fare kalvarisinden türetilmiş osteoblast öncü hücre çizgisi

MIC: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

Min: Minimum

mRNA: Mesajcı RNA

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)- 2-(4 -sulfofenil)-2H-tetrazolyum (Canlılık Testi)

MTT: (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür) (Canlılık Testi)

Kolorimetrik testi. Metiltiazol Difenil Tetrazolyum

n: Örnek Sayısı

NaB: Sodyum Borat

NCP: Kollajenöz Olmayan Protein

NOAEL: (gözlenmeyen-yan etki düzeyi) değeri

nm: nanometre

N.S: Bir anlamlı fark yok

OCN: Osteokalsin

Ort: Ortalama

Osx: Osterix

PdGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

pH: Potansiyel Hidrojen (Bir çözeltideki asidiklik ve alkalilik yoğunluğunu gösteren ölçüm birimidir)

PP: Polipropilen

PTFE: Politetrafloroetilen

PVDF: Polivinil Diflorür

RGD: Tripeptit Arg-Gly-Asp (amino asit dizisi)

Runt-related transcription Factor 2: Runt-bağımlı Transkripsiyon Faktörü

Runx 2: Runt-bağımlı Transkripsiyon Faktörü 2

Sa: Değerlendirilen Profilin Aritmetik Ortalama Sapması;

SAM: Kendinden Monte Tek Tabakalar

SaOs2: *İnsan Osteosarkoma Hücre Hattı*

SD: Standart Sapma

SEM: Tarama Elektron Mikroskobu

Sku: Basıklık

SLA: Kumlanmış ve Asitle Dağlanmış

Sp: Profilin Enbüyük Tepe Yüksekliği Değeri;

Sq: Değerlendirilen Profilin Ortalama Karekök Sapması;

Ssk: Çarpıklık;

Sz: Profilin Enbüyük Yüksekliği Değerleri Ortalaması

t: Student t test

TGF-β1: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1

Ti: Titanyum

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi

UV: Ultraviole

WST-1: *Suda Çözülebilir Bir Tetrazolyum Tuzları*-1. 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)- 2H-tetrazolyum (Canlılık Testi)

XPS: X- Işını fotoelektron Spektroskopisi

XPS: X-ışını Destekli Fotoelektron Spektroskopisi

XTT: XML Tunneling Technology. (2,3-Bis(2-metoksi4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum) (Canlılık Testi)

Z: Mann Whitney U Test

µm: Micrometre

ÖZET

Alzboun, M. (2020). Bor İle Modifiye Titanyum İmplant Yüzeylerinde Biyofilm Oluşumu ve Osteoblast Aktivitesinin in vitro Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Oral İmplantoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmanın amacı; bor ile modifiye titanyum (Ti) yüzey işleme yöntemlerinin geleneksel kumlama ve asitleme yöntemleri üzerine olan etkisini karşılaştırmaktır.

Toplam 216 adet olan tornalanmış titanyum (Ti) diskler dört eşit gruba ayrılmıştır. Bunlardan birincisi alüminyum oksit (Al_2O_3) ile kumlanmış ve hidroklorik / sülfürik asit ile asitlenmiş standart implant yüzeyi (kontrol, SLA); ikincisi alüminyum oksit (Al_2O_3) ve borik asit (H_3BO_3) ile kumlanmış ardından tetrafluoroborik asit ile asitlenmiş yüzey (test 1, SBF); üçüncüsü alüminyum oksit (Al_2O_3) ve borik asit (H_3BO_3) ile kumlanmış ardından tetrafluoroborik asit ile asitlenmiş, daha sonra borik asit solüsyonu eklenmiş yüzey (test 2, SBF-B); dördüncüsü ise alüminyum oksit (Al_2O_3) ile kumlanmış ve tetrafluoroborik asit ile asitlenmiş yüzeydir (test 3, SAF).

Yüzey özelliklerinin ölçümü için konfokal lazer tarama mikroskopisi, stylus profilometrisi, tarama elektron mikroskopisi ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi kullanılmıştır. *Porphyromonas gingivalis* ve *Streptococcus mutans*'ın adezyon davranışı ve canlılığı; insan fetal osteoblastik hücrelerinin canlılıkları ve osteokalsin üretimi hücre kültürleri ve lizat analizleri ile ölçülmüştür. Sonuçlar parametrik olmayan testlerle analiz edilmiştir ($p < 0.05$).

Bulgular: Aritmetik ortalama yüksekliği (Sa) 1.6 (SD: 0.6) μm olan tüm örneklerin yüzey alan pürüzlülüklerinin değerleri birbirlerine benzer bulunmuştur. SBF-B yüzeyi; SLA, SBF ve SAF yüzeyleri ile karşılaştırıldığında en yüksek CCK-8 (% 187.5, IQR: 37.5; $p = 0.0231$) ve osteokalsin üretimini (228.9 ng / ml IQR: 14.1; $p < 0.0001$) sağlarken, *P.gingivalis* ve *S.mutans* bakterilerinin her ikisi için de en düşük adezyon oranlarını ((sırasıyla (45x102 (IQR: 22.5x102) and (290x103 (IQR: 45.5x103)) ($p=0.0002$) göstermiştir.

Sonuçlar: In-vitro incelemenin sınırları dahilinde, alüminyum oksit ve borik asit ile kumlanmış, tetrafluoroborik asitle asitlenmiş, ardından borik asit solüsyonu eklenmiş Ti yüzeyinin (SBF-B); anlamlı derecede osteoblast yapışmasını arttırdığı ve bakteriyel adezyonu azalttığı sonucuna varılabilir. SBF-B yüzeyi; SLA, SBF ve SAF yüzeylerine kıyasla daha iyi sonuçlar ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Titanyum Yüzey İşlemi, Borik Asit, Tetrafluoroborik Asit, Osteoblast, Bakteri Adezyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31831

ABSTRACT

Alzboun, M. (2020). In Vitro Comparison of Titanium Surface Conditioning via Boron-compounds and Sand-blasting Acid-etching. İstanbul University, Institute of Health Science, Oral Implantology Dep. Doktora Thesis. İstanbul.

Objectives: The aim of this study was to compare the effect of a boron-based titanium (Ti) surface treatment method against the conventional sand-blasted & acid-etched Ti implant surfaces.

Material and Methods: A total of 216 machined titanium (Ti) discs were divided into four equal groups and the following surface treatments were applied; Aluminum oxide (Al_2O_3) sand-blasting and hydrochloric/ sulfuric acid ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$) etching (SLA). Aluminum oxide (Al_2O_3) with boric acid (H_3BO_3) particle sand-blasting and tetrafluoroboric acid (HBF_4) etching (SBF). Wetting of the SBF surface by boric acid-solution (SBF-B). Aluminium oxide (Al_2O_3) sand-blasting and tetrafluoroboric acid (HBF_4) etching (SAF). Confocal laser scanning microscopy, stylus profilometry, scanning electron microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy was used for the quantification of the surface characteristics. Adhesion and viability of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* and cell adhesion, osteocalcin production and viability of human fetal osteoblastic cells was quantified by cell cultures and lysate analyses. Results were analyzed by non-parametric tests ($p < 0.05$).

Results: Surface area roughness parameters were similar in all specimens with an arithmetical mean height (Sa) of 1.6 (SD: 0.6) μm . SBF-B surface yielded the highest cell viability/proliferation (187.5%, IQR: 37.5; $p = 0.0231$), osteocalcin production (228.9 ng/ml IQR: 14.1; $p < 0.0001$), and also the lowest adhesion rate for both bacteria (45×10^2 CFU/ml (IQR: 22.5×10^2)) and (290×10^3 CFU/ml (IQR: 45.5×10^3)) for *P.gingivalis* and *S.mutans*, respectively; $p = 0.0002$). SLA, SBF and SAF surfaces revealed inferior outcomes as compared to the SBF-B surface.

Conclusion: Within the limits of the in-vitro investigation it can be concluded that, boric acid-wetting of the aluminum-oxide and boric-acid blasted and tetrafluoroboric acid etched Ti surfaces (SBF-B) increase osteoblast adhesion and reduce the bacterial adherence.

Key words: Boron, Boric acid, Tetrafluoroboric acid, Titanium, Osteoblast, Bacteria, Surface characteristics.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Titanyum dental implantlarla ilgili ilk bulgunun 1969'da yayınlanmasından bu yana tüm implant karakteristikleri çeşitli şekillerde manipüle edilmiştir [1]. Saf titanyum minimal inflamasyon göstermesine rağmen [2], daha hızlı iyileşme ve daha az komplikasyon elde etmek için yüzey modifikasyonu kavramı ortaya çıkmış ve kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

Dental implant tedavisinin öngörülebilirliğini arttırmak için osseointegrasyon mekanizmasının biyolojik ve fizyolojik prensiplerine hâkim olmak gerekir. Üç aşamaya ayrılmış intraosseöz dental implant çevresindeki yara iyileşmesi bölgede kan pıhtısı oluşumuyla başlar ve dokuda biyokimyasal aktivite gelişir. Bunu hücrel aktivasyon ve hücrel yanıt izler [3].

Malzeme yüzeyinin, hücre yanıtının karmaşık sürecini [4] ve osseointegrasyon sürecini etkilemede rolü olduğu bulunmuştur [5]. Bu yüzeyler hidrofobisite [6], pürüzlülük [7][8], yumuşaklık ve kimyasal içerik [6] vb. ile modifiye edilebilir. Ayrıca bir çok yüzey modifikasyonunun da bakteriyel direnç üzerinde avantajlı sonuçları olduğu kanıtlanmıştır [9][10][11].

Günümüzde daha az invaziv ve travmatik yöntemler , iyileşmeyi hızlandırıcı faktörler ile destekleme ve peri-implant hastalıklarını önleme gibi protokoller [12][13] içeren implantasyon uygulamaları tercih edilmektedir.

Birçok fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyolojik modifikasyonlar ile uyumluluğu ve antibakteriyel karakteri arttırabilecek, osseointegrasyonu hızlandırabilecek ideal implant yüzeyleri tanıtılmasına rağmen tüm bu özelliklere sahip ideal implant yüzeyi için araştırmalar hala devam etmektedir [14][15].

Malzeme kimyası ve topografyası osteoblast farklılaşmasını hızlandırmasına rağmen bu konuda birtakım aksilikler yaşanmıştır [6]. İmplantın tüm fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyolojik karakterleri arasındaki dengeyi kötüleştirme pahasına [16]; bazı

modifikasyonlar, özel mekanizmalar ya da materyallerin [17] daha iyi iyileştirme özellikleri kullanarak güçlendirebilir [18].

Sonuç olarak öngörülemeyen sonuçlara yol açmamak adına implant modifikasyonu dikkatle karakterize edilmelidir.

Kemik-implant arayüzünün gelişimi, kemik matriksi ve osteoblastların biyomalzeme ile doğrudan etkileşimine bağlıdır. Osteoblast adezyonu, kemik-biyomateryal etkileşimi için esastır. 1993 yılında osteoblast-biyomateryal etkileşimiyle ilgili yapılan bir in vitro çalışmada, herhangi bir yüzey modifikasyonu yapılmaksızın çeşitli materyallerin hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerindeki etkisi incelenmiştir [19]. Anselma ve arkadaşları, yüzey özelliklerinin osteoblast adezyonu üzerindeki etkisini de bildirmiştir [20]. Protivínský ve arkadaşları, farklı yüzey modifikasyon yöntemleri ile osteoblastın etkisini bildirmiştir [21]. Bazı modifikasyonlarda, kemik matriksi ile ilişkili genlerin güçlendirilmesinden ziyade, bu modifikasyonların spesifik etkisinin değerlendirilmesinde önemli bir nokta olan proliferasyon artışı sonucu osteokalsin salınımı artar [22].

İmplant çevresi sağlıklı ve enfekte mikrobiyal profiller arasındaki fark hastalıklı implantların ve çevrelerindeki doku anomalilerinin modeli ve kanıtı olarak değerlendirilir [23]. Mikrobiyal flora dengesini korumak ve implant çevresindeki patojenik türleri azaltmak sağlıklı sert ve yumuşak dokuları korur [24].

Dental implantlarla ilgili rehabilitasyonda peri-implant mukoziti meydana gelebilir [25], bunu peri-implantitis takip eder [26] ve bu enfeksiyon çeşitli yöntemlerle tedavi edilmeyip önlenmezse[27][28][29] kemik yıkımı başlayabilir [30] bu da implantın ve üst yapısının uzun vadede başarısını azaltır. 2015 yılında yapılan Avrupa Osseointegrasyon Birliği (EAO) konferansında antibiyotiklerin basit vakalar üzerinde yararlı bir etkisi bulunmadığı iddia edilmesine rağmen, kompleks vakalarda profilaktik antibiyotiklerin yararlı etkisi hala kabul görülmektedir [31]. Bu noktada, bir tarafta risk altında ve oral hastalığa sahip hastaların dental implant tedavisi, diğer bir tarafta enfekte diş çekimi sonrası yapılan immedat implant tedavisi [32] gibi rehabilitasyonlarda, antibiyotik protokollerinin uygulanmasının iyileştirme üzerindeki etkisi araştırılmaktadır.

Peri-implant enfeksiyonlarına karşı önleyici stratejiler hem hasta hem de klinisyen için tercih edilir, bu nedenle antibakteriyel implant karakterizasyonu elde etmek için titanyum dental implant modifikasyonu üzerine çok sayıda çalışma tasarlanmıştır.

Dental implant yüzeyinde oluşabilecek enfeksiyonu ve peri-implantitisi önlemek amacıyla kullanılan antibakteriyel ajanlar arasında antibiyotikler [33] ve klorheksidin içerikli antimikrobiyal kaplamalar yer alır [34]. Bununla birlikte bu tür yaklaşımlar genellikle kısa süreli antimikrobiyal etkinlik oluştururken [35], klorheksidin kullanımının insan hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [36]. Magnezyum iyon implantasyonu yapılmış implantlara çinko ilavesi yapılmasının biyouyumluluktan ödün vermeden antibakteriyel koruma sağladığı bulunmuştur [37]. Benzer şekilde, kompozit bir nano kaplama, doğal bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bilinen gümüş nanopartiküllerin (Ag NP'ler) gömülmesi yoluyla sentezlenmiş ve implantların yüzeylerini hem antibakteriyel hem de biyouyumlu hale getirmek için polietereeterketon polimer matrisine biyoaktif cam ile yerleştirilmiştir [38]. Ayrıca plazma nitrüleme ve çoklu ark iyonu kaplama ile elde edilen modifiye kaplamalar bakteriyel yapışmayı önemli ölçüde azaltmıştır [9]. Jimbo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada florür iyonunun kimyasal modifikasyonunun TiO₂'nin hidrofilik özelliğini arttırdığı ve ilk hücre yanıtının geliştiği öne sürülmüştür [39].

Bor elementi açısından, biyolojik aktiviteler üzerindeki etkilerini değerlendirmek için çok sayıda çalışmada spesifik olarak borik asit (BA) araştırılmıştır [40][41][42]. Borik asit (BA) uygulaması in vitro [42], in vivo [43] ve klinik çalışmalarda araştırılmıştır [44].

Diyet kemik sağlığı için oldukça önemli bir role sahip olduğundan; kalsiyum, magnezyum, fosfor, potasyum, protein, D vitamini, demir, manganez, florür, çinko, Bor(B), bakır, vitamin (K), (A), (C) ve B vitamini kompleksleri gibi spesifik besinlerin yetersiz alımı kemik remodelingini bozar ve kemik kaybı olasılığını artırır [42][45].

Bor eksikliğinin kemik iyileşmesi ve periodontal kemik yeniden şekillenmesi üzerindeki etkisini araştırmak için sıçan ve fare modelleri üzerinde çalışmalar

yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda B eksikliğinin osteogenez azalması kaynaklı, kemik iyileşmesinde üzerinde değişikliğine neden olduğu bulunmuştur [45].

Bor osteojenik farklılaşma üzerindeki mekanizması henüz ortaya çıkmamış olsa da, insan kemik iliği stromal hücrelerinde (BMSC'ler) osteojenik farklılaşmaya bağlı marker gen sentezini uyararak osteojenik süreç üzerinde fark edilir bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [46]. Ayrıca başka bir çalışmada B'nin, mineralize doku ile bağlantılı olduğu düşünülen kollajen-I, osteopontin (OPN), kemik sialoprotein ve osteokalsin gibi hücre dışı matris proteinlerinin mRNA ekspresyonunu düzenlediği bulunmuştur [42].

Çok sayıda çalışma, B'nin çeşitli hücrelerde osteojenik süreç üzerindeki yapıcı rolünü desteklemektedir. Ancak diğer çalışmalar B'nin örneğin plazma alkalın fosfataz aktivitesini etkilemediği için kemik kalsifikasyonu üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını bildirmiştir [47]. Diğer taraftan, B'nin kemikteki kalsiyum ve fosfor konsantrasyonları üzerinde önemli bir etkisi de bulunmamıştır [48]. Tasli ve ark., çalışmasında NaB ile tedavi edilen kültürün, NaB tedavisi olmayan hücre kültüründen önemli ölçüde daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiğini göstermiştir [49].

Diğer taraftan, diş implantlarının yüzey modifikasyon prosedüründe floroborik asit kimyasal bir çözelti olarak kullanılmıştır [50][51][52]. Ancak bu çalışmalar, floroborik asidin implant üzerindeki yüzey karakterizasyonu ile ilgili kesin etkilerini derinlemesine araştırmamıştır.

Yapılan bu çalışmada tetrafloroborik asit, borik asit partikülleri ve çözeltisi kullanılarak; SBF, SBF-B ve SAF olmak üzere üç farklı test diski hazırlanarak üretilen modifiye yüzeylerin yüzey karakterizasyonu, hFOB hücre biyolojisi ve bakteriye yapışma üzerindeki etkileri araştırılmış; test diskleri birbirleriyle ve kontrol grubu olan SLA yüzeyli diskler ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın hipotezi, yüzey modifikasyonu yapılmış Ti6Al4V disklerinin bakteriyel adezyonu azaltacağı ve osteoblastların biyolojik aktivitelerini teşvik eden biyoyumlu bir yüzey sağlayacağıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Titanyum materyalinin tanıtılmasından günümüze kadar, bu materyalin dental ve ortopedik kullanımı araştırılacak önemli konulardan biri haline gelmiştir. Birçok bilimsel alan, vücut dokuları ile titanyum arasındaki etkileşimi anlama ve hem mekanik hem de biyolojik seviyede daha iyi bir implant materyali ve yüzeyi ortaya koyma çabasına dahil olmuştur.

Dental implant disiplini; temel bilimler, cerrahi, biyomalzeme ve protez araştırmalarını bir bütün olarak kapsamaktadır [53].

Osseointegrasyon tanımı ilk olarak Branemark tarafından tanıtılmış [54], ve birkaç yıl sonra, “ışık mikroskobu çözünürlüğü seviyesinde, yüklü bir implant yüzeyi ile kemik arasındaki doğrudan temas” olarak yayınlanmıştır [54].

Günümüzde, bu terim implant diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve sadece mikroskobik kemik implantı arayüzünü değil, aynı zamanda rijit fiksasyonun klinik durumunu da gösterir. Rijit fiksasyon, 1 ila 500 g'lık bir kuvvet uygulandığında implantın klinik olarak gözlemlenemeyen hareketini ifade eder [55].

Bu bilgilerin ışığında, “Osseointegrasyon, kemiğin titanyum implantların çevresinde (kemik implant arayüzünde), onları dokulardan korumak için olduğu bir yabancı cisim reaksiyonudur” denilerek yeni bir osseointegrasyon tanımı yapılmıştır [56].

Albrektsson, titanyum oral implantlar için yabancı cisim reaksiyonlarını tanımlamıştır ve titanyum implantların etrafındaki marjinal kemik kaybının, bir hastalığı temsil etmek yerine yabancı cisme karşı immünolojik bir reaksiyonla açıklanabileceğini bildirmiştir [57].

Biyomateryal bir yüzeyin yönelimi, hücre dışı matris (ECM) proteinlerini, konakçı hücreleri (fibroblastlar, osteoblastlar, endotel hücreleri) ve bakterileri içeren bir "yüzey yarışı" olarak kavramsallaştırılabilir. İmplant yüzeyi doku tarafından çevrelendiğinde, bakteriyel kolonizasyon için daha az elverişli duruma getirilerek bir çeşit savunma mekanizması oluşturulur [58].

Yapılan bir çok çalışmadan sonra, bir implant prosedürünün başarılı sonucunun, İmplant malzemesinin biyouyumluluğuna, implant yüzeyinin mikroskobik ve mikroskobik yapısına, sağlıklı (enfekte olmamış) ve morfolojik (kemik kalitesi) olarak sağlam implant yatağı statüsüne, cerrahi tekniğe, bozulmamış iyileşme evresine , protez tasarımına ve uzun dönem yükleme prosedürüne bağlı olduğu kabul edilmiştir [59].

Genel olarak, dental implantların uzun süreli sağkalım oranları mükemmeldir. Bununla birlikte, implant kayıpları az sayıda hastada halen görülmektedir. Yetersiz osseointegrasyona bağlı primer implant kayıpları, hastaların %1-2'sinde ilk birkaç ay içinde görülür. Genellikle peri-implantitisin neden olduğu sekonder implant kayıpları ise, hastaların yaklaşık% 5'inde başarılı bir osseointegrasyondan birkaç yıl sonra gelişir ve yaygın olarak görülür [60].

Yüzey modifikasyonlarına pozitif kemik dokusu cevabı veren mekanizmalar ve farklı klinik durumlarda implant stabilitesinin sonuçları tam olarak anlaşılmamıştır.

Bu nedenle, kemik iyileşmesini ve implant başarısını arttırmak için çeşitli kavramlara dayanan farklı yöntemlerin olduğu düşünülmüştür. Bugün, kabaca şekil, boyut, dökme ve yüzey malzemesi, yiv tasarımı, implant-abutment bağlantısı, yüzey topografyası, yüzey kimyası, ıslanabilirlik ve yüzey modifikasyonu gibi değişen binlerce faktörle farklı implant sistemi bulunmaktadır [61]. Örneğin, yüzey modifikasyonları üzerine biyomedikal araştırmanın birincil amacı, erken dönem kemik entegrasyonunu kolaylaştırmak ve önemli miktarda marjinal kemik kaybı olmaksızın uzun süreli kemik-implant teması sağlamaktır. Üstelik, Antibakteriyel modifiye yüzeyler günümüzde, implantları, enfekte bölgelere osseointegrasyon direnci veya komplikasyonu olmaksızın yerleştirmek [62], ve mikrobiyal enfeksiyon nedeniyle periimplantitis ve kemik kaybı süreçlerini engellemek için tercih edilmektedir.

2.1. Biyomateriyaller

Tıbbi alanda yapay organlar, doku büyümesi destekleyiciler veya ilaç salınımı sağlayan cihazlar gibi biyomateriyal olarak kullanılan her malzeme, insan vücudunda

herhangi bir seviyede alerjenik veya inflamatuvar bir tepkiye neden olmamak veya bunu stimüle etmemek için spesifik özelliklere sahip olmalıdır. İmplant için kullanılan bir biyolojik madde akla geldiğinde dikkate alınması gereken özellikler biyouyumluluk, biyo-işlevsellik, kimyasal ve mekanik stablitedir. Bu özelliklerin yanı sıra implant bölgesinde irritasyon (tahriş), reddetme ve / veya bunun gibi problemleri önlemek için materyal sterilize edilmelidir [63].

Biyomalzemenin biyouyumluluğu, yabancı bir maddeyi vücuda bütünü bir parçası olarak kabul eden ve çalışma sahasında herhangi bir zararlı etki belirtileri göstermeyen organizma ile ilgilidir. Biyouyumluluk ifadesi, toksisite, doku uyumu, kan uyumu (hemouyumluluk) ve biyo-işlevsellik özellikleri gibi malzemelerin farklı özelliklerini kapsar [63].

Williams Biyomateryalleri Sözlüğü, biyouyumluluğu 'bir malzemenin belirli bir durumda uygun bir konakçı yanıtı ile performans gösterme kabiliyeti' olarak tanımlamıştır. Bu tanımdan önce, baskın olan görüş, başarılı malzemelerin vücutta büyük ölçüde etkisiz (inert) bir biçimde rol oynadığı şeklindedir [64].

Biyofonksiyonellik, malzemenin tasarlandığı fonksiyonları, istenen sürede ve etkin bir şekilde yerine getirmesi için esastır. Uzun ömürlü biyofonksiyonel materyaller için materyal işlevselliğini kısmen kaybetme riski nedeniyle, doku ile temas ettiğinde bozulmamalı ve etkinleştirildiği tüm süreç boyunca kimyasal ve mekanik kararlılığını da korumalıdır. Metaller için bozulma, tolere edilebilir bir derecede değilse, vücuda zararlı etkilere neden olan korozyonla ilişkilidir [65].

Vücut yanıtlarına değinildiğinde, biyomalzemeler biyotolere, biyoinert, biyoaktif ve biyobozunur olarak tanımlamalara ayrılabilir. Biyotolere, vücut tarafından tolere edilebilen fibroz doku yuvasının oluşumu ile konak dokudan ayrılan, malzemelerdir. Bu katman, kimyasal bileşiklerin, iyonların, korozyon ürünlerinin ve implante malzemeden kaynaklanan diğer ürünlerin salınması ile indüklenir. Çoğu metaller ve sentetik polimer malzemeler biyotolere malzemeler arasında sayılmaktadır [63].

Biyoinert, vücut tarafından da tolere edilen, fakat materyal ile doku arasında kimyasal reaksiyonun olmadığı materyallerdir. Malzemedeki bileşenlerin salınımı ya hiç

olmaz ya da çok az miktarda olur ve fibroz doku yuvasının oluşumu minimum görülür. Biyoinert malzemelerin yaygın örnekleri alümina, zirkonya, titanyum ve alaşımlar ve karbondur [63].

Biyoaktif bir materyal, dokular ve materyal arasında bağ oluşturan, materyal arayüzünde spesifik bir biyolojik cevap ortaya çıkaran bir malzemedir [63].

Biyoobzunur ise, vücutla temas ettiğinde belli bir süre boyunca bozulan, çözünen veya emilen materyalleri temsil eder. İmplant edilmiş malzemenin geri çekilmesi için ekstra bir ameliyat gerektirmediğinden, uygulamaları çok ilgi çekmektedir. Bu sınıf içinde en önemlisi biyopolimerlerdir [63].

Bir implant uygulaması için malzeme seçimindeki amaç, genellikle birçok farklı istenen özelliği karşılamasıdır. Bununla birlikte, implantasyon bölgesindeki dokunun yabancı bir materyalin oluşturduğu biyokimyasal hasara nasıl tepki verdiği de her zaman önemli olmaktadır. Dr. Jonathan Black, “biyolojik performans” teriminin, konakçı ve materyal arasındaki çeşitli etkileşimleri temsil etmek için biyoyumluluktan daha uygun olduğunu belirtmiştir [66].

2.1.1. İmplant Materyalleri

Biyomalzeme terimi, doku ve doku fonksiyonlarını ikame etmek veya yenilemek amacıyla canlı bir sistem içine implante edilmek veya yerleştirilmek üzere tasarlanmış materyalleri ifade eder.

Klasik olarak, biyomalzemeler polimerler, metaller, seramikler ve doğal malzemeler olarak dört türe ayrılır. İki farklı tipte biyomalzeme bir araya geldiğinde, kompozit biyomalzemeler olarak bilinen beşinci tip elde edilir. Biyomalzemeler, diğer uygulamaların yanı sıra ortopedik, dental, kardiyovasküler, oftalmolojik ve rekonstrüktif cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır. İnert metallerin ve alaşımların keşfedilmesi; bu malzemelerin fiziko-kimyasal özellikleri ve biyolojik çevre ile uyumlulukları nedeniyle , onları ortopedi ve diş hekimliği gibi biyomedikal alanlarda popüler hale getirmiştir [67].

Dental implantlar için kullanılan materyallerin biyo-uyumlu, hipoalerjenik, kimyasal olarak inert, aşınmaya dayanıklı ve stabil olması istenir [68]. Korozyon direnci

yüksek ve termodinamik olarak kararlı rodyum (Rd), paladyum (Pd), iridyum (Ir) ve platin (Pt) gibi “soy” metaller vardır. Bununla birlikte, titanyum (Ti), vanadyum (V), zirkonyum (Zr), niyobyum (Nb) ve tantal (Ta) gibi pasifleştirici metaller, termodinamik olarak kararsızdır ve korozyona karşı dirençleri, yüzeylerinde koruyucu bir oksit tabakasının oluşmasıyla sağlanır [67]. Bu metaller arasında, titanyum (Ti), biyouyumluluk, stabilite ve korozyon direnci dahil olmak üzere fiziksel özellikleri nedeniyle referans standart malzeme olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, estetik restorasyonlara olan yüksek talep, itriya-stabilize zirkonya (ZrO_2) seramik implant abutmentlerinin de bu malzemeler arasına eklenmesini desteklemiştir [69].

2.1.1.1. Titanyum

Oral implantolojinin son zamanlarda bilimsel bir bakış açısıyla yükselmesine rağmen, bu disiplinin kökenlerinin eski zamanlara dayandığı unutulmamalıdır. İmplantın ideal malzemesini ve tasarımını bulmak için, Branemark 1952'de tavşanlarla ilgili araştırmalar yapmış ve femur kemiğinde kan akışını incelemek için kazayla titanyum parçalarını kemiğe yerleştirdikten sonra onların kemiğe sıkı bir şekilde tutunduğunu gözlemlemiştir [70].

Titanyumun kemiğe uygunluğunun keşfedilmesi, araştırmacıları titanyum üzerinde daha ilgili kılarak, onları implant tasarımı ve yüzey özellikleri üzerinde yoğunlaşmaya yöneltmiştir. 1960'lar titanyum implantların doğum zamanıdır ve bu implantlar günümüzde eksik dişlerin yerini almak için güvenilir bir tedavi haline gelmiştir [71].

Titanyum, dental implant üretiminde ortak malzeme haline geldiğinden, ideal ve başarılı bir implant elde edebilmek için bu malzeme üzerine birçok çalışma ve araştırma yapılmıştır.

İmplantın uzun dönem başarısını etkileyen tek faktör biyouyumluluk değildir, çünkü üretildiği malzemenin veya alaşımın mekanik özellikleri de uyumluluğun kendisi kadar önemlidir.

Titanyum Sınıflaması

Titanyum, 1790'da İngiliz kimyager ve mineralog William Gregor tarafından mineral Menakanit analiziyle keşfedilmiştir [72].

Titanyum oksijenle ile reaksiyona girer ve bu temas titanyum yüzeyinde bir oksit tabakası oluşumuyla sonuçlanır [73]. Amerikan Test ve Malzemeler Derneği (ASTM) implant biyomateriyalleri altında sınıflandırılmış altı ayrı titanyum türünü kabul etmiştir. Bunlardan ilk 4'ü ticari olarak saf titanyum (CpTi) olarak alt gruplandırılmış, diğer 2 si ise ASTM'ye göre titanyum (Ti) alaşımları adı altında alt gruplandırılan sınıf 5'den sınıf 31'e kadar yaklaşık 27 alaşım içerisinde seçilmiştir.

Diğer bir deyişle, ticari olarak saf titanyum (CpTi) oksijen, demir ve karbon içeriğinin miktarının tanımladığı saflık derecesine göre 4 sınıfa ayrılmıştır [74]. Grade 1, yüksek kirlenmeye sahip olan Grade 4'e karşıt olarak diğer metaller tarafından kirlenme oranı en düşük olan sınıf olarak kabul edilir [68]. Ticari olarak saf titanyum alaşımsız titanyum olarak da adlandırılır ve genellikle bazı karbon, oksijen, azot ve demir iz elementleri içerir. Bu iz elementler saf titanyumun mekanik özelliklerini belirgin bir şekilde iyileştirir ve Grade I'den Grade IV'e doğru daha yüksek miktarlarda bulunur [71]. Örneğin Branemark implantları (Nobel Biocare, Zürih, İsviçre) sınıf 4ten üretilen ITI implantlarının aksine sınıf 1 den üretilmiştir (Straumann, Basel, İsviçre) [75]. Sınıf 5 titanyum alaşımı %6 alüminyum ve% 4 vanadyum içerdiğinden Ti-6AL-4V olarak da bilinir, bu da materyale mekanik bir mukavemet ve kırılma direnci sağlar. Bu alaşım, CP Ti'ye kıyasla üstün fiziksel ve mekanik özellik gösterdiğinden dolayı diş hekimliğinde kullanılmadan önce birçok tıbbi cihazda uygulanmıştır [68].

Titanyum için alaşım elementleri oda sıcaklığında mikroyapılarına göre α -stabilizatörler (Al, O, N, C), β -stabilizatörler (Mo, Nb, Ta, Fe, V) ve nötrler (Zr) olarak üç kategoriye ayrılabilir. α grubunun temel özelliği yüksek korozyon direncidir, ancak ortam sıcaklığında $\alpha + \beta$ alaşımlarına kıyasla mukavemeti sınırlıdır. β grubu, yüksek mukavemet özelliği gösterir. Düşük elastik modül ve üstün korozyon direnci kombinasyonu ile karakterize edilir [68].

2.1.1.2. Zirkonyum

Zirkonyum tıbbi kullanım bakımından geniş çapta uygulama alanı bulmuştur ve estetik implantlara duyulan ilgiden dolayı implant diş hekimliğinde yerini almıştır. Zirkonyum su ve oksijen ile oldukça reaktiftir ve bu kristalin dioksit formuna zirkonya (ZrO_2) denir. Zirkonya sıcaklığa bağlı monoklinik, dörtgen ve kübik olarak 3 kristalografik yapıda bulunur. Birkaç in vitro çalışma zirkonyanın biyouyumlu bir malzeme olduğunu ortaya koymuş, osteoblast yapışmasını ve çoğalmasını iyileştirdiği görülmüştür [76], çeşitli hayvan çalışmalarında ise osseointegrasyonu izlenmiştir [77][78].

Ayrıca, Straumann Institute AG (Basel, İsviçre) tarafından geliştirilen ve %13-17 zirkonyum (TiZr) içeren yeni bir titanyum zirkonyum alaşımı (ticari olarak Roxolid), uzama ve yorulma dayanımı bakımından saf Ti'ye kıyasla geliştirilmiş mekanik özellikler göstermiştir. Dahası, bu materyalin Gottlow ve ark. tarafından ve minyatür domuz çeneleri içine yerleştirildikten sonra implantasyon alanındaki stabiliteyi ve kemik cevabını arttırdığı gösterilmiştir [79]. Ayrıca, Kohal ve ark. Zirkonyum implantların uzun dönem okluzal yüklere karşı direnç gösterebileceğini ileri sürmüştür [77]. Ancak, konuyla ilgili orta ve uzun vadedeki çalışmalar halen yetersizdir [68].

Zirkonyum klinik bir materyal olarak yaygın şekilde kullanılmamasına rağmen, kimyasal olarak titanyum ile benzerdir ve travmatolojik, ortopedik ve dental implant uygulamaları için zirkonyum ve zirkonyum alaşımlarının kullanıldığı bildirilmiştir. Titanyum ile ortak birçok özelliğe sahiptir. Hem titanyum hem de zirkonyum geçiş metalleri olmasına rağmen, oksidasyon hızı, suyla etkileşim, kristal yapı, taşıma özellikleri ve bunların oksitleri gibi fizikokimyasal özellikleri kantitatif olarak farklılık gösterir; bu farklılıkların biyolojik tepki üzerinde bir etkisi olabileceği düşünülmektedir [67].

2.1.1.3. Tantal

Tantal, periyodik tablodaki V grubuna ait ısıya dayanıklı bir tür metaldir. Doğal pasifleştirici oksit tabakası Ta_2O_5 nedeniyle iyi bir korozyon direnci gösterir. İmplantlar

için dökme malzeme veya yüzey kaplamaları olarak kullanılmış ve inertlik, esneklik, mekanik stabilite ve biyouyumluluk gibi mükemmel fiziksel ve biyolojik özellikler göstermiştir. Mezenkimal kök hücreler ve osteoblastik hücreler kullanılarak yapılan in vitro karşılaştırmalı çalışmalar, hücre morfolojisi, çoğalması açısından Ta ile Ti arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir [68].

2.1.1.4. Paslanmaz Çelik

Düşük maliyeti ve kolay üretimi nedeniyle, paslanmaz çelik de implant malzemesi olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu materyal uzun dönem bir uygulama sırasında vücuda güçlü bir şekilde metal iyonları salınmasına neden olmuştur [80]. Bu nedenle, sadece geçici implantlar için uygulanmıştır [81].

İn vitro testlerde, osteoblastik hücrelerde DNA hasarı ile çoğalma ve farklılaşma açısından toksisite göstermiştir [82]. Pasivasyon davranışını arttırmak için krom ile (% 12-13) krom dioksit ve molibden (% 2-3) tabakası olarak stabilize edilmiştir [83][84]. Geçmişte korozyon direncini daha da artırmak için Nikel (Ni) de uygulanmıştır Ancak Nikel iyonlarının salınımı ile implantın biyolojik uyumluluğu azalmış ve dolayısıyla materyal nikelsiz alaşımlarla değiştirilmiştir. Vücut sıvıları varlığında korozyonu ve iyon salınımını azaltmak ve malzemenin biyoaktivitesini arttırmak için çeşitli yüzey modifikasyonları, özellikle de film kaplamaları yapılmıştır [85][68].

2.1.1.5. Polimerik İmplantlar

Polimetilmetakrilat ve politetraflouetilen formundaki polimerik implantlar ilk kez 1930'larda kullanılmıştır. Bu malzemelerin şu anki kullanımı implantların bileşenleriyle sınırlıdır [15].

2.1.1.6. Poli Eter-Eter-Keton (PEEK)

PEEK, yüksek biyouyumluluğa sahip polimerlerden biridir. Bir biyomateryal olarak, protez üst yapıların yanı sıra dental, ortopedik ve kardiyovasküler cihazlar da dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalar için kullanımı artan bir şekilde kabul görmektedir. PEEK, mükemmel mekanik özelliklerinden ötürü, potansiyel bir dental implant materyali olarak da tartışılmaktadır [86].

2.1.1.7. Gelecek Vaat Eden Alaşımlar

Niobyum (Nb), Molibden (Mo) ve Tantal (Ta) ve Hafniyum (Hf) gibi yeni alaşımlardan yararlanılmıştır (Bruschi, Steinmüller-Nethl et al. 2015). Ti-Nb, Ti-Al-Nb, Ti-Nb-Zr ve Ti-Nb-Hf gibi farklı alaşımlarda biyouyumluluğu ve hemolitik aktivite yokluğunu kanıtlamak için çeşitli in vitro çalışmalar yapılmıştır [87][88][89][90]. Lee ve ark. in vivo olarak Ti-15Mo-1Bi alaşımının tavşan femuruna yerleştirildiğinde çevre kemiği, Ti-6Al-4V'ye kıyasla % 249'a ve Ti-7.5Mo ile kıyasla ise % 100'e kadar artırabildiğini göstermiştir [91].

Lavos-Valereto ve ark. köpeklerde, osseointegrasyonun daha fazla kaplama veya yüzey işlemi uygulanmadığında bile elde edilebileceğini doğrulamak amacıyla Ti-6Al-7Nb alaşımını araştırmıştır [92].

Vanadyum ile ilgili toksisite kaygıları nedeniyle Ti-6Al-7Nb ve Ti-5Al-2.5Fe gibi vanadyum içermeyen $\alpha + \beta$ türü alaşımları, implant malzemesi olarak geliştirilmiştir. Ayrıca, düşük elastikiyet modülü olan Nb, Ta, Zr ve Pd gibi toksik olmayan elementlerden oluşan, vanadyum ve alüminyum içermeyen titanyum alaşımları geliştirilmeye devam etmektedir.

Bunlar esasen β türü alaşımlardır ve muhtemelen, kemiğe daha yakın olan düşük elastikiyet modülü nedeniyle mekanik açıdan bakıldığında, $\alpha + \beta$ alaşımlarına kıyasla daha yüksek mukavemet ve dayanıklılık sağlayabildikleri için, daha elverişli oldukları düşünülmektedir [71].

Biyomedikal kullanım için çok çeşitli titanyum alaşımları üzerinde devam eden araştırmalara rağmen, ticari olarak saf titanyum (sınıf 1-4) hala implant dış hekimliğinde en yaygın kullanılan malzeme olmaya devam etmektedir [68].

2.2. Titanyum İmplant Malzeme Yüzeyleri

İmplant yüzey modifikasyonlarının geliştirilmesinin temel amacı, daha hızlı ve daha güçlü kemik oluşumuyla osseointegrasyonun teşvik edilmesidir. Bu durum, zayıf kemik kalitesi ve yetersiz kemik miktarı olgularındaki iyileşme sürecinde, klinik performansı artırarak daha iyi bir stabilite sağlayacaktır. Ayrıca, bu tür bir gelişme kemik iyileşmesini hızlandırarak hemen veya erken yükleme protokollerine de izin verebilmektedir [93].

Yüzey mühendisliği teknolojilerindeki gelişmeler, mikro ve nano ölçeklerde morfoloji, kimya, kristal yapı, fiziksel ve mekanik özellikler dahil olmak üzere birçok karmaşık yüzey özellikleri bulunmasına sebebiyet vermiştir.

2.2.1. Yüzey Değişikliklerinin Kategorileri:

İmplantların yüzey modifikasyonu için kullanılan yöntemler genel olarak mekanik; kimyasal; ve fiziksel olmak üzere 3 tipte sınıflandırılabilir. Bu tekniklerin temel amacı; kemik entegrasyonunu artırmak için kemik oluşumunun uyarılması, yüzey kirleticilerin uzaklaştırılması, aşınma ve korozyon direncinin iyileştirilmesi gibi temelde implantın biyomekanik özelliklerini iyileştirmektir [94].

2.2.1.1. Yüzey topografisini değiştirme yöntemleri

2.2.1.1.1. Tornalama (Mekanik işlem)

İmplantoloji alanındaki araştırmalarda, “işlenmiş yüzey” terimi genellikle tornalanmış, frezelenmiş veya bazen cilalanmış bir yüzeyin açıklaması olarak kullanılır [95]. Orijinal Brånemark (Nobel Biocare) implantı, fazla yüzey işlemi görmeden tornalanmış bir Titanyum yapıda olup, minimal olarak pürüzlü bir yüzeye sahiptir. Uzun dönem iyi klinik sonuçlarla en çok kullanılan implant olmuştur.

Taramalı elektron mikroskobu analizi; işlenmiş implantların, üretimlerinde kullanılan cihazların özelliklerine bağlı olarak yüzeylerinde oluklar, sırtlar ve işaretlere sahip olduğunu göstermiştir. Bu yüzey kusurları kemiğin daha iyi kenetlenmesine sebep olarak mekanik direnç sağlamaktadır [94].

2.2.1.1.2. Kumlama (Mekanik işlem)

Kumlama malzemesi kimyasal olarak stabil ve biyouyumlu olmalıdır ayrıca titanyum implantların osseointegrasyonunu engellememelidir. Bu işlemlerde alümina, titanyum oksit ve kalsiyum fosfat parçacıkları gibi çeşitli seramik parçacıklar kullanılmaktadır [96].

Seramik parçacıklar, yüksek hızda bir ağızlık yardımıyla yüzeye püskürtülür; uygulanan partikül boyutuna bağlı olarak da farklı pürüzlülük dereceleri elde edilir. Titanyum dioksit tanecikleri ile kumlanmış titanyum implantların başarıları, hem in vitro [97][98] hem in vivo [99] hem de klinik prospektif çalışmalarla iyi bir şekilde kanıtlanmıştır [100][101][68].

Alümina (Al_2O_3) sıklıkla bir kumlama malzemesi olarak kullanılır ve kumlama ortamının granülometrisi ile değişen yüzey pürüzlülüğü üretir. Alümina asitte çözünmediğinden titanyum yüzeyinden çıkarılması zordur [96].

Wennerberg ve ark. tavşanlarla ilgili yaptıkları in-vivo çalışmada; TiO_2 partikülleri ile kumlanmış olan implantlar, Al_2O_3 ile partikülleri ile kumlanmış olan implantlarla karşılaştırıldığında benzer kemik-implant teması değerleri göstermiş olmasına rağmen; pürüzsüz titanyum ile karşılaştırıldıklarında her ikisinin de (TiO_2 veya Al_2O_3) biyomekanik fiksasyonunun arttığı bulmuştur [102].

Dental implant yüzeylerini pürüzlendirmek için, biyo-uyumlu, osteokondüktif ve rezorbe olabilen karakteristiklere sahip başka kumlama malzemeleri de üretilmiştir. Kalsiyum fosfatların hidroksiapatit, beta-trikalsiyum fosfat ve çeşitli karışımları yararlı kumlama malzemeleri olarak düşünülmüştür. Bu malzemeler emilebilir ve temiz, dokulu, saf bir titanyum yüzeye oluşturur. .Deneyisel çalışmalar, işlenmiş yüzeylere kıyasla bu yüzeylerde kemik-implant temasının daha yüksek olduğunu göstermiştir [103][104]. Ancak, osseointegrasyon tamamlandığında diğer kumlanmış yüzeylerle gözlemlenene benzer bir kemik-implant teması elde edildiği belirtilmiştir [105].

Yüzey pürüzlülüğü, kullanılan partiküllerin büyüklüğü ile artar [106] 25 μm ile kumlanan yüzeylerin, 75 μm ve 250 μm kumlanmış yüzeylere göre daha pürüzsüzken, işlenmiş yüzeylerden daha pürüzlü olduğu gözlenmiştir.

Ayrıca, 25 μm ve 75 μm partiküllerle kumlanan implantlar, tavşan tibia veya femurlarında 12 haftalık iyileşme sonrasında işlenmiş implant yüzeyine kıyasla daha yüksek geri çevirme torku göstermiştir. Aksine, 25 μm kumlanmış yüzey için işlenmiş yüzeye kıyasla anlamlı derecede daha yüksek kemik implantı teması gözlenirken, 12 hafta [102] ve 1 yıllık iyileşme sonrası kemik alanı işlenmiş yüzey için önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (Wennerberg, Ektessabi et al. 1997, Ballo, Omar et al. 2011).

250 μm partiküllere kıyasla 25 μm partiküllerle kumlanan implantlar için anlamlı derecede yüksek kemik implant teması ve belirgin kemik alanı bulunmasına rağmen benzer geri çevrilme momenti gözlenmiştir [93][107].

2.2.1.1.3. Asitle aşındırma (Kimyasal işlem):

İmplant yüzeyinin asitle aşındırma ile değiştirilmesi, kemik büyümesinin sağlanması için mikro çukurlar elde etme esasına dayanır. Asitle aşındırılmış implant yüzeyleri, orijinal yüzey pürüzlülüğü, asit tipi ve konsantrasyonu, sıcaklık ve zaman gibi çeşitli parametrelerden etkilenebilir. Aşındırma işleminin, farklı derinlikte düzensiz çukurlar vasıtası ile 0.5-3 μm mikro civarında bir pürüzlülük oluşturarak titanyum yüzeyini değiştirdiği düşünülmektedir. İmplant yüzeyi bozunmasının, tek tek titanyum tanelerinin yönelimine bağlı olabileceği öne sürülmüştür [108].

Asitle aşındırma, deforme olmuş yüzeyden birkaç atom tabakasını uzaklaştırır. Ayrıca, kumlama işleminden geriye kalan artık parçacıklar tarafından yüzey kirlenme olasılığını azaltarak yüzey temizliğinde etkin rol oynar. Bu işlemler, önceden kumlanmış pürüzlü yüzeyde üst üste binen mikro kaviteler oluşturur [109].

Osteointegrasyonu geliştirmek için sadece asitle yapılan aşındırmanın yararı Klokkevold ve ark. tarafından gösterilmiştir. Yaptıkları çalışmada asitle aşındırma işlemi sırasında meydana gelen derin pitlerin kemikle dolarak, implant ve kemiğin kenetlenmesine katkı sağladığını belirtmişlerdir [110].

Jimbo ve ark. implant yüzeylerine florid içerikli asit uyguladıklarında yüzeyin hidrofilik özellik kazandığını göstermişlerdir [39]. Biyomekanik ve histomorfometrik verilere dayanarak, kısa iyileşme döneminde, florid ile değişen implant yüzeylerinin, standart implant yüzeylerine oranla daha sıkı bir kemik desteği sağladığı ortaya çıkmıştır. Kalsifiye dokularda florid HA formasyonu ve florapatit ispatlanmıştır. Florid modifikasyonunun etkisi olarak artan apatit kristalleri, osteoprogenitor hücrelerin stimülasyonu, artan alkalen fosfataz aktivitesi, kemik matriksinin içinde yeni meydana gelen kolajen dokusunun birleşmesi rapor edilmiştir [15].

Bunlara ek olarak bir de çift aşamalı asitleme işlemi vardır. Öncelikle implantlar $\text{HCl} + \text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{HNO}_3 + \text{HF}$, veya HNO_3 içerikli solüsyonlara sonrasında ise titanyum oksit tabakasını stabil hale getirmek için HNO_3 içerikli solüsyona batırılır [109].

Titanyum implantların 100°C 'de konsantre HCl ve H_2SO_4 içerikli karışımda (çift aşamalı asitleme) birkaç dakika boyunca ısıtılmasıyla mikro düzeyde pürüzlü bir yüzey elde edilir.

Çift aşamalı asitleme yöntemiyle, implant yüzeyinde makroyapıdan ziyade mikroyapı oluşur [111]. Bu yüzeylerde osteokondüktif özelliğin arttığı, böylece fibrin ve osteojenik hücrelerin implant yüzeyine tutunarak doğrudan kemik oluşumu meydana getirdiği bulunmuştur [112][94].

Titanyum, florid iyonlarına karşı çok reaktiftir ve çözülebilir TiF_4 yapısına dönüşebilir. Uygulanan kimyasal işlemler neticesinde üretilen yüzey mikropürüzlü bir topografiye sahip olur. Böylelikle Titanyumun hem yüzey pürüzlüğü oluşturulur hem de dental implantların osteointegrasyonu açısından önemli bir florid katkısı sağlanmış olunur [113][114].

Kontrol grubuna kıyasla; implant yüzeyinin kimyasallarla muamele edilmesiyle osteoblastik farklılaşmanın arttığı gösterilmiştir [115].

Yapılan kimyasal işlemin, implant yüzeyini biyoaktif hale getirerek kemik-implant desteğini daha da geliştirme potansiyeline sahip olabileceği düşünülmüştür [96].

2.2.1.1.4. Kumlanmış ve asitlenmiş yüzeyler (Mekanik ve Kimyasal işlem)

Farklı protokoller ve bileşikler kullanarak yapılan kumlama ve asitle aşındırma kombinasyonları, iyi hücre kolonizasyonu ve farklılaşması sunan yüzey profilleri oluşturmak için kullanılan en yaygın yaklaşımlardan biridir [116]. İmplant yüzeyini değiştirmek için titanyum oksit ve alümina partikülleri kullanarak kum ve döküm kumu (grit) püskürtmesi kullanılır. Kumlama işlemi için 25 µm TiO₂ partikülleri kullanılır. Korundum adı verilen bu partiküller; demir, titanyum, vanadyum ve krom içeren alüminyum oksitin bir kristal formu olarak geçmektedir. Büyük tanecikli kumlama partikülleri 0.25-0.5mm iken orta tanecikli partiküller ise 250-500 µm boyutundadır. Asitle aşındırma, bir HCL / H₂SO₄ karışımı kullanılarak veya % 2 HF / % 10 HNO₃ içinde yapılabilir. Bu işlemler sonucunda yüzeyde çukur ve krater şeklinde pürüzler oluşur. Yüzey pürüzlülüğüne ek olarak, kumlama ve asitle aşındırmanın yüzey kalıntılarını uzaklaştırarak, metalin yüzey reaktivitesini artırabildiği düşünülmüştür [112].

Kumlama ve asitleme kemik oluşumunun hızını ve miktarını artırabilir. Yapılan çalışmalarda alkalın fosfataz aktivitesinin yükseldiği, kemik oluşumunda rol oynayan osteokalsin üretimi ile, latent dönüştürücü büyüme faktörü beta ve prostaglandin E₂'nin de arttığı bulunmuştur [94].

Kumlanmış ve asitlenmiş implantlara verilen kemik yanıtı, farklı implant yüzeylerinde karşılaştırılmıştır. Domuz modelinde yapılan bir çalışmada 10 haftalık iyileşme periyodunda , çift asitle modifiye edilmiş yüzeylerde, tek asitleme uygulanmış implant yüzeylerine kıyasla daha yüksek geri çevirme torku bulunmuştur [117].

Bir tavşan modelinde, kumlanmış ve florürle modifiye edilmiş implantlarda, sadece kumlanmış implantlara kıyasla, 1 ve 3 aylık iyileşme sonrası belirgin şekilde daha yüksek geri çevirme torku ve daha yüksek kemik implantı teması gözlenmiştir [113].

İşlenmiş yüzeye kıyasla önemli ölçüde daha yüksek geri çevirme torku elde edilirken, titanyum plazma ile muamele gören implantlara kıyasla benzer değerler elde edilmiş, kemik yoğunluğu açısından ise 3 farklı implant tipinin etrafında hiçbir fark gözlenmemiştir [118].

2.2.1.1.5. Anodizasyon (Kimyasal İşlem)

Anodizasyon titanyum oksit tabakasının kristal formunu ortaya çıkarır ve mikroyapıda değişiklikler üretir [119]. Anodizasyon işlemi oldukça karmaşıktır ve mevcut yoğunluk, asitlerin konsantrasyonu, bileşim ve elektrolit sıcaklığı gibi çeşitli parametrelere bağlıdır [96].

Mikro veya nano gözenekli yüzeyler, titanyumun güçlü asitlerde (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3 , HF) potansiyostatik veya galvanostatik anotlanmasıyla da üretilir. Anodizasyonun amacı, oksit tabakasını titanyum üzerinde kalınlaştırmaktır. Bir elektrolit çözeltisinde güçlü asitler kullanıldığında, oksit tabakası mevcut konveksiyon (yayılım) hatları boyunca eritilir ve diğer bölgelerde kalınlaştırılır. Oksit tabakanın mevcut konveksiyon hatları boyunca çözülmesi, titanyum yüzeyinde mikro veya nano gözenekler oluşturur [96].

Yüzey oksitler 5nm den yaklaşık 10,000nm'ye büyür. Ti Unit Sa değerinin 1,1 μm ve S_{dr} sinin ise 37% olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışma [116] anodik oksidasyon ile mikro ve nano yapıların varlığını gösteren 0.06-12 μm gözenek boyut dağılımına sahip, 2 μm kalınlığında pürüzlü Ti Unit yüzey oksit kaplamasının rapor edildiğini bildirmiştir, Hall ve Lausmaa'ya göre, yüzey tabakasında fosfat formunda% 5 fosfor vardır.

İmplant yüzeyinde; termodinamik olarak daha kararlı rutillerden kaynaklanan birkaç nokta olsa da amorf matristeki anataz TiO_2 olarak sunulan, amorf TiO_2 ve kristalin grenleri vardır

Anodik oksidasyon, doğal bir titanyum oksit tabakasının ve gözenekli bir topografyanın oluşmasına neden olur ve kemik oluşumu orta derecede pürüzlü oksitlenmiş yüzeyde meydana gelir [120].

2.2.1.1.6. Titanyum Plazma sprej (fiziksel işlem)

Titanyum plazma sprej (TPS), titanyum partiküllerinin yüksek sıcaklıkta bir plazma alevinin içine enjekte edilmesinden oluşur. Bu parçacıklar, yoğunlaşır kaynaştıkları implantların yüzeyine püskürtülür ve yaklaşık 30 μm kalınlığında yaklaşık

7 µm'lik ortalama bir pürüzlülüğe neden olurlar [121]. TPS işlemi diş implantlarının yüzey alanını başlangıç yüzey alanının yaklaşık altı katına kadar arttırabilir [122]. Bu implant geometrisine, başlangıç partikül büyüklüğü, plazma sıcaklığı ve ağızlık ile hedef arasındaki mesafe gibi işlem değişkenlerine bağlıdır [123]. Plazma spreyl kaplamalarla ilgili en büyük endişelerden biri, kaplamanın kemik dokusuna iyi bir şekilde bağlanmasına rağmen, titanyum implantın yüzeyinden olası zayıflaması neticesinde implant-kaplama arayüzünde oluşan başarısızlıktır. Bununla birlikte, yüzey alanında altı katlık bir artış kemik büyümesi ve yerleşimi için uygun olabilirken, implant yüzeyinin oral sıvılar ve bakterilere maruz kalması riskini de beraberinde getirir [124]. Ek olarak yüksek yüzey pürüzlülüğü, gözenekli bölgeler arasındaki etkileşim nedeniyle peri-implantitisin kontrolünde bir risk oluşturabilir ve patojenlerin derin kemik alanlarına geçişini kolaylaştırarak implant tedavisinin başarısını tehlikeye sokar [125]. SLA ve TPS implant yüzeylerini karşılaştıran bir klinik çalışmada, bu iki yüzey arasında klinik fark gözlemlenmemiştir [126].

Plazma torçuna enjekte edilecek tek malzeme titanyum değildir, hidroksiapatit de bu teknikte önemli bir yere sahiptir. HA plazma spreyl, hidroksiapatit (HA) seramik partiküllerinin yüksek sıcaklıkta bir plazma torçuna enjekte edildiği ve yoğunlaşıp kaynaşarak ince bir tabaka halinde titanyum yüzeyine yansıtıldığı bir tekniktir. Plazma spreyl kaplamalar, birkaç mikrometreden birkaç milimetreye kadar değişen bir kalınlıkta biriktirilebilir. Bu yöntem kullanılırken, kaplamanın mekanik olarak tutulmasını sağlamak için, metalik implantın yüzeyi, örneğin kumlama yoluyla, pürüzlendirilmelidir [96].

Bununla birlikte, plazma spreyl yöntemi, kaplamanın pürüzlülüğü ve substrat / kaplama ara yüzünde oluşan rezidüel stres gibi dezavantajların yanı sıra, başlangıç kalsiyum fosfat tozunun bileşiminde ve kristallüğünde sert değişiklikler meydana gelmesi gibi dezavantajlara da sahiptir [127][128].

Plazma spreyl HA kaplamalarında, trikalsiyum fosfatlar (β - ve α -TCP), tetra-kalsiyum fosfat, kalsiyum oksit ve amorf kalsiyum fosfat (ACP) gibi birkaç kalsiyum fosfat fazı gözlenmiştir [129][130].

Plazma spreyl HA kaplamaları genellikle, oldukça çözünür bir amorf kalsiyum fosfat fazına gömülmüş büyük kristalli HA parçacıklarından oluşur. Ayrıca, plazma

sprey tekniği, karmaşık bir şekle sahip mini dental implantların kaplanması için çok etkili değildir [96].

2.2.1.1.7. Lazerle Aşındırma ve Mikro-Ark Oksidasyonu:

Plazma Elektrolitik Oksidasyon (PEO), Spark Eloksal ve Mikroplazma Oksidasyon olarak da bilinen Mikro Ark Oksidasyonu (MAO), alüminyum, magnezyum ve titanyum gibi metallerin yüzeylerinin oksit kaplamalara dönüştürüldüğü bir işleme tekniğidir. Bu kaplamalar, kullanılan güç kaynağına, substrata ve elektrolite bağlı olarak, on ila yüzlerce mikron arasında değişebilir [131].

Mikro ark. oksidasyonuyla modifiye edilen implantlar tornalanmış implantlarla kıyaslandığında, artan hücre temasına bağlı olarak daha yüksek düzeyde kemik cevabı ve geri çevirme torku gösterir [132]. Lazer yöntemi, iyi osseointegrasyon için yeterli pürüzlülüğe sahip bir implant yüzeyi üretmek için kullanılabilecek bir işlemdir. Lazerle işlem görmüş Ti implantları, yüzey kirliliğini azaltmıştır [133] ve deneysel çalışmalar, tornalanmış yüzeyler ile karşılaştırıldığında, tavşan tibyasına yerleştirilmiş lazerle kazınmış implantlar için artmış bir torkun değerini göstermişlerdir [134].

Başka bir açıdan bakıldığında, lazer işleminin yüzeyde % 1.44 karbon ile karbon ve oksijen ile kirlenmeye neden olabileceğı düşünölmüştür. Deppe ve arkadaşları, karbonun havadaki karbon dioksitten sağlandığını ve lazerin; asitle aşındırma, kumlama veya plazma püskürtme tekniğine kıyasla en az kirletici yüzey işlemi olarak değerlendirilebileceğini belirlemişlerdir [135]. Ayrıca başka bir in vitro çalışmada, kalsiyum ve fosfor içeren MAO Ti implantlarının, yapay vücut sıvılarında, kemik benzeri apatit oluşumunu indökleme kabiliyetine sahip olduğu da bulunmuştur [136]. Oksitlenmiş implantların osseointegrasyon mekanizmasının mekanik kilitleme ve biyokimyasal bağlanma olduğu gösterilmiştir [137]. Lazerle aşındırma, MAO'dan önce bir implant yüzeyini ön işleme tabi tutmak için kullanılabilecek umut verici yeni bir yöntem olarak düşünölebilir [15].

2.2.1.2. Dental İmplantların Biyolojik olarak aktif ilaçlarla Birleşimi

2.2.1.2.1. Antibiyotik kaplama:

Cerrahi alan enfeksiyonlarını önlemenin olası bir yolu olarak antibakteriyel aktivite sağlayan ajanların implant yüzeyine uygulanmasıyla oluşturulan antibakteriyel kaplamalar incelenmiştir.

HA tabakası ile birlikte Gentamisin, dental implant cerrahisinde sistemik antibiyotiklerle birlikte lokal bir profilaktik ajan olarak implant yüzeyine kaplanabilir [33].

Tetrasiklin-HCl tedavisi, kirli implant yüzeylerinin dekontaminasyonu ve detoksifikasyonunda pratik ve etkili bir kimyasal yöntem olarak kabul edilmiştir. Tetrasiklin-HCl, kontamine olmuş implant yüzeyinde bulunabilecek mikroorganizmaları öldürebilen bir antimikrobiyal ajan olarak işlev görür. Ayrıca, smear tabakasını ve endotoksinleri implant yüzeyinden etkili bir şekilde uzaklaştırır. Ek olarak, kollajenaz aktivitesini inhibe eder, hücre çoğalmasının yanı sıra kemik iyileşmesini artırır [138].

Tetrasiklin ayrıca iyileşme sürecinin ilk aşaması sırasında implant yüzeyinde kan pıhtı yapışmasını ve tutulmasını çoğaltır ve böylece osseointegrasyona yardımcı olur [139].

2.2.1.2.2. Simvastatin

Statinler, karaciğer tarafından kolesterol biyosentezini azaltmak için 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim redüktazı inhibe eden yaygın ilaçlardır. Bu ilaçlar serum kolesterolü konsantrasyonlarını azaltır ve kalp krizi riskini düşürürler [140].

Simvastatin, kemik oluşumunu destekleyen kemik morfogenetik protein (BMP) 2 mRNA'nın ekspresyonunu indükleyebilir [141].

İn vitro bir çalışmada Yang ve ark.; simvastatin yüklü pürüzlü implant yüzeylerinin, preosteoblastların hızlandırılmış osteojenik farklılaşmasını teşvik ederek osseointegrasyonu artırma potansiyeli gösterdiğini belirtmişlerdir [142].

2.2.1.2.3. Bifosfonatlar

İmplantların yüzeyi ayrıca kemik yeniden şekillendirme işlemini kontrol eden moleküller ile yüklenebilir. Bifosfonatlar gibi kemik antiresorptif ilaçların, örneğin rezorbe edilmiş alveoler sırtlar gibi kemik desteği olmayan klinik vakalarda tedaviye dahil edilmesi çok önemli olabilmektedir. Son zamanlarda, titanyum implantlara eklenen bir bifosfonatın, peri-implant bölgede kemik yoğunluğu lokal olarak artırdığı gösterilmiştir [96].

Pamidronat veya Zoledronat içine batırılmış plazma sprej HA kaplı dental implantların kullanıldığı diğer deneysel çalışmalar, bu implantların kemik temas bölgesinde belirgin bir artış gösterdiğini belirtmiştir [143][144][145].

2.2.1.3. Yüzey Modifikasyonlarında Biyokimyasal Yöntemler

Yüzey modifikasyonlarının biyokimyasal yöntemleri fizikokimyasal ve morfolojik metodlara yardımcı olur. Amaçları, spesifik hücre ve doku tepkilerini indüklemek amacıyla biyomalzemelerdeki proteinleri, enzimleri veya peptitleri immobilize etmek veya başka bir deyişle doku-implant arayüzünü çeşitli modülatör moleküller ile doğrudan kontrol etmektir.

Birinci yaklaşım, fibronektin, vitronektin, Tip I kollajen, osteogenin ve kemik sialoprotein gibi hücre adezyon moleküllerini kullanır. İkinci yaklaşım, mitojenitenden (interlökin büyüme faktörü-I, FGF-2, trombosit türevli büyüme faktörü-BB) kemik hücrelerinin artan aktivitesine kadar değişen, osteoindüksiyon için kollajen sentezini artıran, osteotropik etkileri olan biyomolekülleri kullanır [15].

2.2.2. Kaplama olarak Kullanılan Diğer Malzemeler

Biyouyumluluğu artırmak, hücre yanıtlarını arttırmak, iyileşmeyi arttırmak veya implant sağkalım oranını arttırmak için implantı kaplayabildiğimiz birçok uyumlu

malzeme vardır. Bunların bir kısmı yüzeylerin fiziksel, kimyasal, mekanik ve topografik özelliklerini değiştirerek yani yüzey modifikasyonu ile sağlanır.

2.2.2.1. İmplantlarda İnorganik Kaplama Malzemeleri:

2.2.2.1.1. Seramikler

Biyoseramikler, biyoaktif (biyocamlar / cam seramikler), biyobozunur (kalsiyum fosfat) veya biyoinert (alümina, zirkonya ve karbon) olarak sınıflandırılabilir [15].

Kimyasal bakış açısından, biyoseramikler alümina, zirkonya, karbon, kalsiyum fosfatlar, silika içeren bileşikler ve diğer bazı kimyasallardan hazırlanabilir. Bunlar arasında, fosfatlar, yüksek biyoyumluluk ve kemik integrasyonu gösterdikleri ve aynı zamanda kemiklerin inorganik kısımlarına benzer bir bileşim sundukları için biyomateriyal üretmek için ideal olarak kullanılabilirler [146].

2.2.2.1.2. Kalsiyum fosfat kaplamalar:

Çoğunlukla hidroksiapatit ile oluşan kalsiyum fosfat (CaP) kaplamaları, biyoyumlu, osteokondüktif ve emilebilir maddelerdir [147]. Ticari olarak temin edilebilen ilk HA kaplı implantlar, 1980'lerde görülmüştür. [148]. HA, implant yüzeyindeki serbest kalsiyum ve fosfat bileşiklerinin varlığından dolayı kemik ile güçlü bir kimyasal bağ oluşturur. HA seramik, tüm osteotropik olayların (epistaksis, apatit protein afinitesi ve yapısal osteotropizmin) birleştirildiği tek malzemedir. Belirtilmelidir ki, HA'nın yeni uygulama yöntemleri; plazmanın, minimum 50 µm kalınlığında bir kaplama ile spreylendiğinde daha önce kullanılanlardan daha ince HA katmanları ile sonuçlandığını göstermiştir. 1 µm veya nanometre kalınlığındaki güncel HA uygulamaları, implantın yüzeyden ayrılma (gevşeme) riskini azaltmıştır [15][116].

2.2.2.1.3. Biyomimetik kalsiyum fosfat kaplamalar:

Biyomimetik kaplamalar; tıbbi cihazlar üzerine, onların biyoyumluluklarını artırma amacıyla kalsiyum fosfat biriktirilmesi için mikroyapıların ve organizmal doku

fonksiyonlarının kullanımını esas alır [149]. Bu biyomimetik yöntem, kalsiyum fosfat apatit kristallerinin, fizyolojik sıcaklık ve pH koşulları altında simüle edilmiş vücut sıvıları vasıtasıyla dental implant yüzeyine çökmesini içerir [96].

Son zamanlarda biyomimetik kalsiyum fosfat kaplamasına dayanan bir kemik benzeri materyal de geliştirilmiştir [150][151].

2.2.2.2. İmplantlarda Kullanılan Organik Kaplama Malzemeleri

Son yirmi yılda, kemik dokusunun hücre dışı matrisinden (ECM) türetilen organik bileşikler, giderek artan oranda organik kemik implant kaplamalarının tasarımı için ilham kaynağı olarak kabul edilmektedir [152][153]. Kemik implantını organik moleküller kullanarak; pasif bir tıbbi cihazdan, istenen doku yanıtını talep edebilecek ve yönlendirecek bir implanta yükseltmek için farklı yaklaşımlar kullanılabilir [154][155]. Halen araştırılan organik yüzey modifikasyonları, doku-implant arayüzünde hücre yanıtı gerçekleşmesi hedefiyle; diğerlerinin yanı sıra yapısal proteinlerin, sinyal moleküllerinin, enzimlerin veya peptitlerin biyomateryal yüzeyler üzerinde hareketsizleştirilmesi esasını içerir [156][157]. Belirtildiği gibi yüzey Modifikasyonlarında Biyokimyasal Yöntemlerde; fibronektin, vitronektin, tip I kollajen, osteopontin ve kemik sialoprotein gibi ECM biyomolekülleri, kemik implantları üzerinde başarılı bir şekilde hareketsizleştirilmiştir.

Bu proteinler yüzeyler üzerinde, immobilizasyon esasına dayanarak çeşitli biyolojik etkiler göstermişlerdir, fakat proteinlerin adsorpsiyon vasıtasıyla çökme eğilimi implant yüzeyinde sorunlu bir artık bırakır ve hareketsizleştirilmiş proteinlerin etkinliğini azaltır [152]. Ancak, tüm proteinlerden türetilen kısa peptit sekansları bu sorunun üstesinden gelebilir [158]. Alternatif olarak, büyüme faktörleri (GF'ler) gibi osteotropik biyomoleküller implant yüzeyleri üzerinde hareketsizleştirilebilir. Kemik morfogenetik protein (BMP), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) dahil olmak üzere birçok (GF) büyüme faktörünün yüzeylerine sabitlendikten sonra implantların etrafında kemik dokusu oluşumunu uyardığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, kemik implantları çevresinde en çok BMP-2, BMP-7 ve

TGF-F1 gibi TGF- β üst familyası üyelerinin kemik oluşumu arttırılmasında ümit verici sonuçlar gösterdiği üzerine vurgu yapılmıştır [159][160]. Hücrel davranışı doğrudan hedeflemenin yanı sıra, kolajen gibi organik biyomoleküller, yüzey kaplamalarının mekanik özelliklerini de geliştirebilirken, osteopontin, osteonektin, kemik sialoprotein, osteokalsin veya alkalın fosfataz gibi biyomoleküller, implant yüzeylerine kalsiyum fosfat birikimi ile mineralizasyon başlatıcıları olarak incelenmiştir [152].

2.2.2.3. İmplantlarda Kompozit ve Kombine Kaplama Malzemeleri

Kemik kompozit bir doku olduğu için, inorganik ve organik bileşenlerden oluşan kompozit kaplamaların biriktirilmesi, biyoaktivite ve etkinliği artırmak amacıyla implant kaplamalarının tasarımında atılmış bir sonraki adım olarak görülmektedir [152]. Örneğin, kolajen ve CaP minerallerinden oluşan kompozit kaplamalar, hücrel yapışmayı, onu takip eden proliferasyonu ve farklılaşma fazlarını etkilemek amacıyla; mineral fazın (osteokondüksiyon açısından) ve kolajen matrisin (RGD sekanslarının bolluğu açısından) faydalarını birleştirebilir [161].

Kollajenin biyolojik etkilerine ek olarak, CaP-kollajen kompozit kaplamalarda, CaP kristallerinin implant yüzeylerine daha iyi tutulduğu gösterilmiştir (Bosco, Van Den Beucken et al. 2012). Ayrıca büyüme faktörleri implant yüzeyleri üzerine kalsiyum fosfat veya kollajen kaplamalarla birlikte çökelmiştir [159].

Enfeksiyonlar hala ortopedik implantların kısa ve uzun süreli stabilitesini tehlikeye atabilecek büyük bir tehdit olmaya devam ettiği için [162], antibiyotikler de CaP kaplamalarına titanyum implantlara yüklenmiştir [163]. Kaplanmış antibiyotik-HA-kompozit, in-vivo deneylerde CaP kaplamalara kıyasla daha düşük bir enfeksiyon oranı sergilemiştir [33]. Antibiyotik direnci riskini azaltmak için; klorheksidin, kloroksilenol ve poli (heksametilebiguanid) gibi antimikrobiyal aktiviteye sahip antibiyotik olmayan organik bileşikler de kaplamalar için potansiyel alternatifler olarak araştırılmıştır [34][164][18][165]. Bu gibi organik moleküller geniş antimikrobiyal etki spektrumları ve daha düşük ilaç direnci riski için kullanılmaktadır [152].

Kompozit kaplamalar, gümüş iyonları gibi antimikrobiyal elemanların organik veya inorganik kaplamalara dahil edilmesiyle de hazırlanabilir, çünkü gümüş elementine karşı bakteri direnci oldukça düşük olarak gözlenmektedir [166].

2.2.3. Oksit Tabakası

Dental implant yüzeylerindeki titanyum oksit filmlerin; fizikokimyasal ve içyükl (dielektrik) özellikleri, kristal yapısı ve yüzey morfolojisi gibi kavramlarının ,implantların biyouyumluluk ve osseointegrasyonunda önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür [167][168].

Metal ile çevre arasında doğrudan teması önleyen oksit tabakası, koruyucu bir tabaka görevi görür ve böylece iyon salınımını en aza indirir [169]. Altın, platin veya paladyum gibi soy metaller, kararlı bir oksit tabakası oluşturma yeteneğinden yoksundur ve bu nedenle endosseöz implantlar için tercih edilmezler. Dental üst yapı uygulamalarında kullanılırlar [170].

Titanyum dioksit doğada, esas olarak üç kristal yapı şeklinde bulunur: rutil, anataz ve brokit. Titanyum implantlarda pasif oksit tabakası, anataz ve rutil birlikte olarak veya sadece anatazdan ibaret olacak şekilde meydana gelir [67]. Özellikle, TiO_2 'nin biyomateriyalizasyon için en uygun yapısı anatazdır [171].

Ti-implant yüzeyi üzerine TiO_2 anataz kaplamalarının uygulanması, arayüzde materyal ve biyolojik çevre arasındaki etkileşimi arttırmanın en iyi yollarından biridir. Del Curto ve ark., Bir anataz tabakasının, amorf titanya tabakasına göre, bakteri metabolizmasını, hücre metabolik aktivitesi üzerinde olumsuz etkileri olmadan, önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir [172].

Oksidasyon süreci biyouyumluluğunun temel nedenidir. İmplantın yerleştirilmesinden sonra, toplanan granülositler, H_2O_2 gibi oksijenli bileşik türevlerini aşırı üreterek implant bölgesinde ciddi bir oksidatif stres oluşumunu tetikler. H_2O_2 'nin reaktif oksijen türlerine yıkımı ve daha sonra yüzeye dahil edilmesi, implant üzerindeki titanyum dioksit (TiO_2) tabakasının kalınlaşmasına neden olur [74][68].

2.2.4. Pürüzlülük

Tanım ve Kategori

Katı yüzeyler, oluşum yöntemlerinden bağımsız olarak öngörölmüş geometrik formlarından çeşitli düzensizlikler veya sapmalar içerir. Bu durum; yüzey şekil sapmalarından, atomlar arası uzaklıkların düzensizliklerine kadar çeşitlilikler içerebilir [173].

Yüzey dokusu makro, nano ve mikro pürüzlülük ile birikme ya da eksiltme nedeniyle oluşan yarık çatlak gibi faktörleri ve yönlerini verir [173]. Yüzey pürüzlülüğü; biri yüzeye dik, diğeri yüzeyin düzlemine paralel olmak koşuluyla iki temel düzlemde meydana gelebilir [174]. İmplantların yüzey konfigürasyonu, osseointegrasyon hızını etkileyen parametrelerden biri olarak kabul edilir [175]. Örneğin, osteoblastlar pürüzsüz yüzeylere kıyasla, pürüzlü yüzeylerde kültürlendiğinde kübik (farklılaştırıcı bir aşamaya bağılı olarak) bir şekil sergilerler [176].

Pürüzlü yüzeyler daha önce ayrıntılı olarak açıklandığı gibi, ilave kaplama teknolojileri veya çıkarma yöntemleri ile hazırlanırlar. Malzeme yüzeyinin düzensizliklerinin ölçeğine göre çeşitli yüzey pürüzlülükleri veya dereceleri ayırt edilebilir. Yüzey makropürüzlülüğü, insan gözüyle ayırt edilebilen düzensizlikler ile yani en az 100 µm den başlayan milimetre veya daha fazla boyutlarda oluşacak şekilde karakterize edilir. Mikro ölçekli yüzey pürüzlülüğü 1 ila 100 µm arasındaki düzensizlikler, mikron altı yüzey pürüzlülüğü 100 nm ila 1 µm arası düzensizlikler ve nano-pürüzlülük ise 100 nm'den düşük düzensizlikler olarak tanımlanabilir [177]. Her bir yüzey pürüzlülüğü tipinin, implantın davranışı ve yapışkan (adherent) hücreler üzerinde bir etkisi vardır [178].

Albrektsson ve Wennerberg'e göre; S_a değeri ile ölçölen yüzey pürüzlülüğüne bağılı olarak implantlar, pürüzsüz ($S_a < 0.5 \mu m$); minimal pürüzlü ($S_a 0.5-1.0 \mu m$ arasında), orta derecede pürüzlü ($S_a 1.0-2.0 \mu m$ arasında); pürüzlü ($S_a > 2.0 \mu m$) olacak şekilde dört farklı kategoriye ayrılabilir [179].

Çalışmaların büyük çoğunluğunda, asitlenmiş ve kumlanmış implantlar, ideal olarak kabul edilen ve göreceli olarak iyi sonuçlar gösteren 1.0-2.0 µm arası orta derecede yüzey pürüzlülüğü gösteren implantlardır [109].

Makro ölçekli pürüzlülük; implantın doğal dokuya sabitlenmesini artırır ve genellikle hücreler tarafından hissedilmez, örneğin onların bağlanmalarını ve yayılmalarını kısıtlamaz [180]. Mikro ölçekli pürüzlülük ise daha tartışmalıdır, çünkü hücreler yapışma alanlarında bulunan malzeme yüzey topografisi ile sınırlandırılabilirler [181]. Öte yandan bazı yazarlar mikro pürüzlü yüzeylerde büyüyen osteoblastların, pürüzsüz yüzeylerde büyüyen hücelere kıyasla; gen ekspresyonları ve daha yüksek mineralizasyon seviyeleri göstererek, farklılaşmaya karşı uyarıldığını bildirmiştir [180][182].

Benzer şekilde, son çalışmalar pürüzlü Ti ve Ti-6Al-4V'de alkalın fosfatata özgü aktivitenin arttığını göstermiştir. Pürüzlü Ti veya Ti alaşımı üzerinde osteokalsin üretimi gibi diğer osteoblast fenotip belirteçlerinin de arttığı bulunmuştur [183][184]. Pürüzlü yüzeylerde olgunlaşan hücreler, daha fazla kolajen üretimi, prostaglandin E₂ ve dönüştürücü büyüme faktörü β sergilemiştir [184]. Hücre dışı matris sentezi ve devamında oluşan in vitro mineralizasyon pürüzlü dokulu ve gözenekli kaplamalı titanyum üzerinde önemli ölçüde artış göstermiştir [185].

Diğer çalışmalar, yüzey pürüzlülüğünün fibroblastlar tarafından büyüme faktörü salınımını indüklediğini [186], osteoblast benzeri hücrelerin sistemik hormonlara cevabını arttırdığını [183], osteoblast ve kondrosit farklılaşmasını teşvik ettiğini göstermiştir [187].

Öte yandan topografideki nano ölçekli değişiklikler, hücre adezyonundaki farklılıklardan, hücre oryantasyonu, hücre motilitesi, yüzey antijeni görüntüleme, hücre iskeleti yoğunlaşması, tirozin kinazların aktivasyonu, transkripsiyonal aktiviteyi ve gen ekspresyonunu düzenleyen hücre içi sinyal yollarının modülasyonuna kadar çeşitli hücre davranışlarını ortaya çıkarır [188][189]. Güncel olarak CP Ti implantları üzerinde nanoyapılar oluşturmak için; tekli katmanların (SAMs) özkurulması, nanopartiküllerin biriktirilmesi, nano/mikro boyutta şekil oluşturma (litografi), çeşitli fiziksel ve kimyasal yaklaşımların sergilenmesi gibi çeşitli yöntemler araştırılmaktadır [68][190].

Ek olarak, birkaç çalışma osteoblast yapışmasının artması için nanoyapının yüzey kimyasından daha önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Örneğin, malzeme yüzeyinde nano boyutlu düzensizlikler oluşturulan bir çalışmada [191] politetrafloroetilen, polivinil-diflorür ve polipropilenin (PTFE / PVDF / PP) bir terpolimeri ağırlıkça% 2 ila 8 karbon nanotüp ile karıştırılmış ancak yüzey hidrofobisini (su damlası temas açısı yaklaşık 100°C) önemli ölçüde değiştirememiştir. Buna rağmen, nanotüp ile modifiye

edilmiş yüzeylerde, insan osteoblast benzeri hücrelerin sayısı ve yayılması önemli ölçüde artmıştır [180].

2.2.5. Yüzey Analizi Testleri:

Dental implantlar halen kayıp dişlerin restorasyonu ve ilgili bölgelerde yeni kemik oluşturulmasına yardımcı olmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Farklı ebat, şekil ve yüzey özelliklerine sahip çeşitli biyomalzemelerden imal edilebilirler. Farklı yüzey özellikleri, hücrel aktiviteyi ve doğrudan kemik osseointegrasyonunu artırabilecek şekilde tasarlanmıştır [192].

Başarılı bir implantasyon gerçekleşmesinin önemli bir koşulu da dental implant kalitesidir ve bu kaliteyi tanımlayan birçok önemli özellik vardır. Bir implant, malzeme ve şekil gibi makroskopik yapı sağlamanın yanı sıra, yüzeyin kimyasal, fiziksel, mekanik ve topografik özellikleri gibi mikroskobik yapıya da sahip olmalıdır. Bu çeşitli karakterizasyonlar, implant yüzeyine yakın olan hücrelerin yapışma aktivitesini etkilemektedir. Bu nedenle hücre proliferasyonu, osteoblast transformasyonu, kemik dokusu oluşumu ve osseointegrasyon hızı gibi aşamalar farklı yüzey topografilerinden etkilenir [190][192].

Literatürde, kumlanmış ve asitlenmiş yüzeylerin topografileri, farklı ölçüm ekipmanı ve değerlendirme teknikleri nedeniyle büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir, ancak esas olarak kumlanma ve asitlenme prosedürlerinde de farklılık görülebilmektedir.

Kumlamada, kullanılan parçacık türlerinin sertliği, boyutları ve uygulandığı darbe hızı, sonuçlardan doğrudan sorumludur. Genellikle titanyum (TiO_2) veya alümina (Al_2O_3) parçacıkları ile gerçekleştirilen kumlama işlemi, elde edilen mikro boşlukların boyutunun iyi kontrol edilmesini sağlar. Ancak kalan bazı parçacıklar gömülebilir ve implant yüzeyinin kirlenmesine neden olabilirler [109].

Bu nedenle, mikroskopi ve spektroskopi birbirinin tamamlayıcısıdır ve tek başına kullanılmaları bir materyalin karakterizasyonunu açıklamada yetersiz kalabilmektedir. Yüzey analizinde kullanılan en yaygın araçlardan bazıları ise şöyledir:

2.2.5.1. XPS:

Tüm çağdaş yüzey karakterizasyon yöntemlerinden kimyasal analiz için en yaygın kullanılan elektron spektroskopisidir (ESCA). ESCA'ya X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) de denir ve iki kısaltma birbirinin yerine de kullanılabilir [193][194].

AES ve XPS'e genellikle "yüzey analizi" teknikleri denir, ancak bu terim yanıltıcı olabilir. Bu teknikler intrinsek yüzey duyarlılıkları nedeniyle kullanışlı kabul edilseler de, daha derin katmanların bileşimini belirlemek için de kullanılabilirler [195].

X-ışınları ışık ışınları gibi hareket eden elektromanyetik enerji dalgalarıdır. X-ışınları angstrom aralığında dalga boylarına sahiptir. Ayrıca, X-ışınları oldukça enerjiktir ve sadece katılara nüfuz etmek ile kalmaz, aynı zamanda onların iç yapılarını araştırmak için de kullanılırlar.

Yüksek enerjili fotonlar veya elektronlar aracılığıyla atom uyarımının bir sonucu olarak, atomdan bir elektron çıkarılır ve iç yörüngede bir elektron boşluğu oluşur. Bu elektron boşlukları dış yörüngedeki elektronlar tarafından doldurulur. Bu fenomenin bir sonucu olarak, X-ışınları üretilir. Uyarılmış atom tarafından serbest bırakılan enerji her bir element için spesifiktir ve yoğunluk elementin miktarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir [196].

XPS, AES'nin yanı sıra, yüzeyi modifiye edilmiş malzemeleri ve aşınmaya dayanıklı kaplamaları incelemek için ideal tekniklerden biri olarak kabul edilir [195].

2.2.5.2. SEM:

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) genellikle bir malzemeye hızlı bir bakış gerektiğinde kullanılan ilk analitik araçtır. Bu noktada ışık mikroskobu artık yeterli uzamsal çözünürlük veya odak derinliği sağlayamamaktadır. SEM, araştırmacıya malzeme yüzeyinin oldukça büyütülmüş bir görüntüsünü temin eder (Miyoshi 2004). SEM, diğer elektron mikroskobu türlerinde olduğu gibi, mikroskobun üstündeki kaynaktan üretilen odaklanmış bir elektron demeti kullanır [196].

Standart SEM, yüzey görüntüleme için en kullanışlı elektron optik sistemidir ve XPS, SIMS, vb. ile analiz edilecek veya analiz edilmiş tüm yüzeyleri karakterize etmek için rutin olarak uygulanmalıdır. SEM muayenesi sırasında kontaminasyonun oluşmaması için, öncelikle yüzey analizleri yapılmalı sonra mikroskop görüntüsü elde edilmelidir [197].

SEM, genellikle yüksek çözünürlük ve üç boyutlu görüntüler elde etmek veya herhangi bir katı malzeme hakkında bileşimsel, topografik ve morfolojik bilgiler almak gibi geniş uygulama kapasitesine sahiptir. Bu nedenle metaller, polimerler, seramikler ve yüzey kaplamaları gibi çok çeşitli uygulamalar için tercih sebebidir [196].

2.2.5.3. KLSM (Konfokal lazer tarama mikroskopisi):

Piyasada her biri benzersiz özelliklere ve avantajlara sahip olan çeşitli tipte konfokal mikroskoplar mevcuttur. Floresans örneklerini incelemek için en yaygın olarak kullanılan tipler lazer taramalı konfokal mikroskoplardır. Bu mikroskoplar, adından da anlaşılacağı gibi, lazerleri ışık kaynağı olarak kullanır ve lazer ışığını numune boyutunca tarayarak görüntü toplama prensibine göre çalışır [198].

KLSM'nin mikroskoplar içindeki büyük avantajı, geleneksel bir epifloresans mikroskopta sadece gözle görülebilen, floresanla etiketlenmiş doku örneklerinin ayrıntılarını dijital bir görüntüde yakalama yeteneğidir. Enstrüman, konfokal lazer tarama mikroskobunun gücünü, başarılı çizimleriyle birleştirmiş ve otoritelerce kabul görmüştür [199].

Konfokal mikroskopi biyolojik, farmasötik, tıbbi ve malzeme bilimi araştırma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır ve genellikle mikroyapıların daha net görünmesini sağlayan lazer kaynaklı floresan (LIF) görüntüleme ile ilişkilidir [200].

2.2.5.4. Mekanik Profilometri:

Mekanik profiller son 50 yıldır kullanılmış ve geliştirilmiştir. Stylus profilometre teknikleri (mekanik izleme sistemlerine veya optik problara dayalı olarak) yüzey dokularının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [201].

Çalışma prensibi oldukça basittir: bir mil bir yüzey üzerinde çalışır ve mil hareket ettikçe yükseklik yer değiştirmeleri kapasitif bir dönüştürücü aracılığıyla kaydedilir ve yüzeyin bir profilini verir. Tipik bir prob (Stylus) ucu aleti, ölçülen yüzeye fiziksel olarak temas eden bir mil ucu ve bunun dikey hareketini bir elektrik sinyaline dönüştürmek için bir dönüştürücüden oluşur.

Milin yüzeye temas eden kısmı genellikle özenle üretilmiş bir profile sahip bir elmas uçtur. Bitiş şekilleri nedeniyle, bazı yüzeylerdeki bazı prob uçları derin bölgelere nüfuz etmez ve yüzey dokusunun çarpık veya filtrelenmiş bir ölçüsünü vermek durumunda kalabilir [202].

Üretim döngüsü sırasında ölçüm yapmak ürünlerin kontrol ve optimize edilmelerini sağlar; işleme sistemleri ve süreçleri üzerinde alınan kararları destekler. Böylelikle ürünün geliştirilmesine yardımcı olur. Döngünün sonunda yüzey dokusunun ölçülmesi ise, mühendislerin bileşenin performans kapasitesi hakkında bir görüş oluşturmalarına olanak sağlar.

2.3. Peri-implant patolojisi

Bakterilerin konakçı inflamatuvar sürecinin başlatılmasında temel bir rol oynadığı düşünüldüğü için [203], ağız boşluğunda periodontitis veya dental implant ile ilişkili peri-implantitis gibi bakteriyel komplikasyonların diş veya implant kaybına neden olabildiği belirtilmiştir [204][205].

Peri implantitis, yirmi yıldan uzun bir süre önce peri-implant dokularının bulaşıcı patolojik durumları için kullanılacak bir terim olarak tanıtılmıştır [206]. 1993'teki 1. Avrupa Periodontoloji Çalıştay'ında, bu terimin, özellikle peri-implant cep oluşumuna ve destekleyici kemik kaybına yol açan, osseointegre oral implantların etrafında oluşan tahrip edici inflamatuvar süreçler için kullanılması gerektiği kabul edilmiştir [207].

Titanyum implantların biyomedikal endüstrisinde popüler hale gelmesiyle, enfeksiyon yaygınlığında bir artış gözlenmiştir. Bu tür enfeksiyonları önlemek için, malzemelerin antibakteriyel yeteneğini geliştirme yaklaşımı geliştirilmiştir. Bir biyofilm topluluğundaki bakterilerin sistemik antibiyotiklerle ortadan kaldırılması zor

olduğundan, bakteriyel yapışmanın ilk ve en savunmasız aşamalarının engellenmesi ile biyomateriyaller yüzeyinde olgun biyofilm oluşumunu önlenmesi düşünülmüş bunun için çeşitli antibakteriyel stratejiler geliştirilmiştir [208].

Biyofilmler, ürettikleri hücre dışı polimerik maddeler matrisine gömülmüş, büyüme hızı ve gen transkripsiyonu bakımından değişmiş bir fenotip sergileyen; bir substrata, arayüze veya birbirlerine geri döndürülemez şekilde bağlanmış hücrelerle karakterize mikrobiyal olarak türemiş sesil (hareketsiz) bir topluluk olarak tanımlanır [209].

Sorunsuz primer iyileşmeyi takiben gözlenen implant başarısızlıklarının nedeni yaygın oklüzal stres veya enfeksiyonlar olarak gösterilmektedir [210].

Farklı periodontal hastalıklar için tanımlananlara benzer şekilde, mikroorganizmaların spesifik “kümelenmiş grupları” ile implantların klinik başarısızlığı arasında bir ilişki olduğunu gösteren klinik çalışmalar bulunmuştur [211].

Mombelli ve ark. sağlıklı ve sağlıklı implant bölgeleri arasında mikroflora kompozisyonu açısından önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Yazarlar peri-implantitin bölgeye özgü bir enfeksiyon olduğunu belirtmiş, bu durumun implant kaybı ile güçlü bir şekilde ilişkisi olduğunu ileri sürmüşlerdir [212][213][214].

Quirynen ve arkadaşlarına göre, bakteriyel yapışma ve tutunma fiziksel olarak dört aşamada gerçekleşir: bakterinin yüzeye taşınması, başlangıç bakteriyel yapışma, spesifik etkileşimlerle bağlanma ve son olarak yüzeylerin kolonizasyonu [215].

Öte yandan An ve Fredman, bakteriyel yapışmayı bir malzeme yüzeyinde; başlangıç, anlık ve geri dönüşümlü bir fiziksel faz (*birinci aşama*) ve ardından zamana bağlı ve geri dönüşümsüz bir moleküler ve hücresel faz (*ikinci aşama*) içeren iki fazlı bir süreç olarak tanımlamıştır [216].

Çalışmalarda; çeşitli biyomalzemelerde bakteriyel yapışma ve kolonizasyon incelenmiş ve genel olarak, organizmanın tipi, konsantrasyonu, büyüme fazı ve malzemelerin yüzey özellikleri gibi faktörlerin kolonizasyon seviyelerini değişen derecelerde etkilediği bulunmuştur [214][213][212].

Bir biyomalzeme yüzeyinin kaderi, hücre dışı matris (ECM) proteinleri, konakçı hücreleri (fibroblastlar, osteoblastlar, endotel hücreleri) ve bakterileri içeren bir “yüzey yarışı” olarak kavramsallaştırılabilir. Yarış doku tarafından kazanılırsa, yüzey işgal

edilir ve doku entegrasyonu ile savunulur, böylece bakteri kolonizasyonu için uygun koşullar azaltılmış olur [217].

Ancak önce bakteriyel yapışma meydana gelirse, konakçı hücrelerin, yüzeydeki birincil kolonilerle yer değiştirebilme olasılığının düşmesi sebebiyle, nihai enfeksiyona yatkın koşullar oluşabilir [218]. Vücut tarafından Ti yapıları implantlar üzerinde genel olarak iyi bir doku yanıtı oluşmasına rağmen, bazen bakteriler ilk “yüzey yarışı” sırasında implant üzerinde kolonize olabilirler [217].

İn vitro ve in vivo testlerde implant materyalleri üzerinde mikrobiyal kolonizasyon ve antibakteriyel aktivite bildirilmiştir [219][220][221][222]. Titanyumun kendisinde antibakteriyel aktivite yoktur [223], ve titanyum implantlarda olası plak oluşumu riski mevcuttur [224]. Buna karşın, oral bakterilerin kolonizasyonunu önlemek için titanyum implantlarda uygulanan yüzey modifikasyonları hakkında çok fazla deney yapılmıştır.

Titanyum implantın biyoyumluluğu; fizyolojik koşullar altında oluşan bir yüzey protein tabakasına atfedilebilir. Aslında bu protein tabakası yüzeyi bakteriyel kolonizasyon ve biyofilm oluşumu için uygun hale getirmektedir [225][226][227].

Bakteriyel kontaminasyonu hafifletmek için kapsamlı dezenfeksiyon ve sıkı aseptik cerrahi protokoller gibi çeşitli önlemler önerilmiş olsa da, bakteri istilasının genellikle ameliyattan sonra meydana geldiğine dair kanıtlar hala geçerliliğini sürdürmektedir [228]. Bakteriyel kontaminasyon daha sonra hematogen kaynaklardan da ortaya çıkabilmektedir [229]. Harici sabitleme pinleri gibi perkütanöz ve transmukozal implantlar; cilt, mukoza ve implant yüzeyi üzerindeki bakterilerin önce peri-implant yumuşak dokuyu sonra derin peri-implant kemik dokuyu istila edebilmesi riski nedeniyle bakteriyel kontaminasyona karşı daha savunmasızdır [230]. Ayrıca, perkütan / transmukozal implantlarla yumuşak doku bağlanması hala çok tatmin edici değildir ve bakteri istilası için başka bir endişe kaynağıdır [227].

Biyofilmdeki bakteriler antimikrobiyal ajanlarla tedaviye, planktonik muadillerine göre daha dirençli olduğu için [231][232], rutin antibiyotik tedavileri genellikle implantla ilişkili enfeksiyonu azaltamaz [227].

Ağız boşluğunda hepsi aynı ağızda mevcut olmamak kaydı ile 700'den fazla bakteriyel takson bulunmuştur [233]. Metilen mavisi (MB) kullanan aPDT'nin (Antimikrobiyal Fotodinamik Terapi) bakterisidal etkisi, *A.actinomycetemcomitans*,

F.nucleatum, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, and *S.sanguinis* gibi planktonik bakteri kültürlerinde incelenmiştir. Ata-Ali ve ark. tarafından yapılan inceleme çalışmasında, *A.aktinomisetemcomitans* ve *P.gingivalis*'in peri-implant yıkımında baskın patojenler olduğu sonucuna varılmıştır [234]. Subgingival ve peri-implant enfeksiyonlarıyla en sık ilişkili olduğu için *P.gingivalis*in ATCC 33277 kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur [235].

İmplantların çevresindeki enfeksiyonların patogeneğinde, bakterilerin biyomalzeme yüzeylerine ilk yapışmasının kritik bir olay olduğuna inanılmaktadır [236], bu nedenle uygulanması gereken en önemli strateji, implant yüzeyine ilk bakteri yapışmasını önlemektir.

Anti-bakteriyel testler:

Bu konuda, farklı biyomalzemelerin ve ilaçların araştırılmasında kullanılan birçok antibakteriyel test mevcuttur ve bunlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir;

2.3.1. Difüzyon Yöntemleri

2.3.1.1. Agar disk difüzyon yöntemi

Agar disk difüzyon yöntemi minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) belirlemek için uygun değildir, çünkü agar ortamına yayılmış antimikrobiyal maddenin miktarını ölçmek imkansızdır. Bununla birlikte, inhibisyon bölgelerini belirlenmiş algoritmalarla karşılaştırarak bazı mikroorganizmalar ve antibiyotikler için yaklaşık bir MIC hesaplanabilir [237].

Bununla birlikte, disk difüzyon testi diğer yöntemlere göre basitlik, düşük maliyet, çok sayıda mikroorganizmayı ve antimikrobiyal ajanı test etme yeteneği ve sağlanan sonuçları yorumlama kolaylığı açısından birçok avantaj sunar [238].

2.3.1.2. Antimikrobiyal gradyan yöntemi (Etest)

Antimikrobiyal gradyan yöntemi, MIC değerini belirlemek için seyreltme yöntemleri ilkesini difüzyon yöntemleriyle birleştirir.

Bu yöntem antibiyotiklerin, antifungallerin ve antimikobakterilerin MIC tayini için kullanılır [239].

2.3.1.3. Diğer difüzyon yöntemleri

Mikrobiyoloji araştırma laboratuvarlarında ekstraktları, fraksiyonları veya saf maddeleri antimikrobiyal güçleri açısından taramak veya mikroorganizmalar arasındaki antagonizmi araştırmak için başka difüzyon yöntemleri kullanılır.

2.3.1.3.1. Agar kuyu difüzyon yöntemi

Agar kuyu difüzyon yöntemi, bitkilerin veya mikrobiyal ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [240][241].

2.3.1.3.2. Agar tıkaç (plug) difüzyon yöntemi

Agar plug difüzyon yöntemi genellikle mikroorganizmalar arasındaki antagonizmi vurgulamak için kullanılır [242][243], ve yöntem disk difüzyon yönteminde kullanılanla benzerdir [238].

2.3.1.3.3. Çapraz çizgi yöntemi

Antagonizma için mikroorganizmaları hızla taramak için çapraz çizgi yöntemi kullanılır [244].

2.3.1.3.4. Zehirli gıda yöntemi

Zehirli gıda yöntemi çoğunlukla küflere karşı antifungal etkiyi değerlendirmek için kullanılır [245].

2.3.2. İnce tabaka kromatografisi (TLC) –biyoatografi

Bu teknik TLC'yi hem biyolojik hem de kimyasal tespit yöntemleri ile birleştirir.

Bu yaklaşımla anti-mikrobiyal bileşiklerin araştırılması için üç biyo-otografik teknik; yani agar difüzyonu, doğrudan biyo-otografi ve agar-kaplama deneyleri izah edilmiştir [238].

2.3.3. Seyreltme yöntemleri

Seyreltme yöntemleri, MIC değerlerinin belirlenmesi için en uygun yöntemlerdir, çünkü bu metodlar test edilen antimikrobiyal ajanın agarda (*agar seyreltme*) veya sıvı besiyerindeki (*makrodilüsyon veya mikro seyreltme*) konsantrasyonunu tahmin etme imkânı sunarlar.

Bakteri ve mantarlara karşı in vitro antimikrobiyal aktiviteyi kantitatif olarak ölçmek için sıvı besiyeri veya agar seyreltme yöntemi kullanılabilir.

Kaydedilen MIC değeri, test edilen mikroorganizmanın görünür büyümesini engelleyen tahlil edilmiş antimikrobiyal ajanın en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır ve genellikle mg/ml veya mg/L cinsinden ifade edilir [238].

2.3.4. Zamana bağlı öldürme yöntemi (zamanla öldürme eğrisi)

Zamana bağlı öldürme testi, bakterisidal veya fungisidal etkiyi belirlemek için en uygun yöntem olarak sunulmuştur. Anti-mikrobiyal ajan ile mikrobiyal suş arasındaki dinamik etkileşim hakkında bilgi elde etmek için güçlü bir araçtır. Zaman öldürme testi, zamana bağlı veya konsantrasyona bağlı bir antimikrobiyal etki ortaya çıkarır [246].

2.3.5. ATP biyoluminesans deneyi

ATP biyoluminesans deneyi, bakteri veya mantarlar tarafından üretilen adenozin trifosfat (ATP) ölçme kapasitesine dayanmaktadır. ATP, tüm canlı hücrelerin kimyasal enerji formu olduğundan, bir hücrede az çok sabit bir miktarda bulunur. Bu nedenle niceliği, bir örnekteki mikrobiyal popülasyonu tahmin etmek için kullanılır [238].

2.4. Canlı kemiğin hücreleri:

Kemik; hücreler ve kalsiyum hidroksiapatit birikimi ile mineralize olup kemiğe sertliği ve kuvveti veren hücre dışı bir matristen oluşur. Kemiğin üç farklı hücre tipine sahip olduğundan söz edilir; bunlar, osteoblastlar (kemik oluşturan hücreler), osteoklastlar (kemik yıkıcı hücreler) [247], ve lakünalar içine sıkışan osteoblastlar olarak adlandırılan osteositlerdir [248].

Osteoblastlar, transkripsiyon faktörlerine bağlı olarak, kondrositleri, miyoblastları, adipositleri ve tendon hücrelerini de oluşturan mezenkimal öncü hücrelerden türetilir [248].

Osteoblast hücre fenotipinin progresif oluşumunun in vitro incelemelerinden elde edilen sonuçlara dayanarak; bu hücrelerin, farklılaşma ve kemik matrisi salgılayabilme yeteneği kazanmadan önce [248][249], tanımlanmış geçici bir ekspresyon dizisi ile osteoblast belirteçlerinden farklılaştığı kabul edilmektedir [250].

Spesifik olarak; **proliferasyon, matris sentezi, matris olgunlaşması ve mineralizasyonu** olmak üzere dört faz tanımlanmış, her faz protein ve gen ekspresyonundaki karakteristik değişiklikler ile betimlenmiştir [251].

MSC'nin osteoprojenitor soylara bağlılığı; kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP'ler) ve Wnt sinyal ileti yollarının üyeleri de dahil olmak üzere, zamanında programlanmış aşamaları takiben spesifik genlerin ekspresyonunu gerektirir [252].

Runt-ilişkili transkripsiyon faktörleri (RUNX2), Distal içermeyen homeobox 5 (Dlx5) ve osterix (Osx) gibi faktörler osteoblast farklılaşması için çok önemlidir [253][254]. Ek olarak, Runx2 osteoblast farklılaşmasının ana genidir. Runx2-null farelerin osteoblastlardan yoksun olduğu gösterilmiştir.

Runx2,nin ColIA1, ALP, BSP, BGLAP ve OCN gibi osteoblastla ilişkili genleri artırma yönünde regüle ettiği gösterilmiştir [255].

Osteoblast farklılaşması sırasında Runx2 ve ColIA1 eksprese eden osteoblast progenitör rezervleri oluştuktan sonra, bir proliferasyon fazı gerçekleşir. Bu aşamada, osteoblast progenitörleri alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi gösterir ve preosteoblast olarak kabul edilir [253]. Öncül osteoblastların olgun osteoblastlara geçişi; Osx, osteokalsin (OCN), kemik sialoprotein (BSP) I / II ve kollajen tip I gibi kemik matriks proteinlerinin salgılanmasındaki artış ile karakterize edilir. Osteoblastlar morfolojik değişikliklere uğrayarak, büyük ve kübik hücrelere dönüşür [254][256][257][258].

Hücrelerin çoğalma potansiyeli; osteoblast fenotipiyle ilişkili genlerin ekspresyonu ve protein sentezi ile doğrudan ilişkili olsa da donör yaşından da etkilenir. Tip I kollajen ve osteonektin sentezi, fetal dönem ile 20 yaş arası hücrelerde en yüksek seviyede iken, 20 yaşın üzerindeki donörlerin kemiklerinden elde edilen hücrelerde kollajen seviyeleri yaklaşık olarak % 65 olarak gözlenmiştir [259][260].

İnsan primer osteoblast hücrelerini (HOb'ler) kullanmanın temel avantajı, türler arası farklılıkların olmaması ve farklılaştırılmış fenotiplerini in vitro olarak korumasıdır. Steven A.Harris, yaptığı çalışmada, hFOB 1.19 klonal hücre çizgisinin, insan osteoblast farklılaşmasının belirli aşamalarını incelemek için, homojen bir şekilde hızla çoğalan bir model sistemi sağladığını bulmuştur [261].

Öte yandan, primer insan hücreleri, heterojen bir hücre popülasyonunu temsil eder ve bu nedenle, izole edildikleri iskelet lokasyonuna ilişkin fenotipik farklılıklar gösterirler [262][263].

2.4.1. Hücre Adezyonu:

Biyomalzemelerin yüzey özelliklerinin hücre-biyomateryal ara yüzlerinin oluşmasında kritik bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Hücre yapışması ve hücre yayılması

implantoloji için önemli parametrelerdir. Düşük biyomateryal verimliliği, genellikle implantın çevre doku ile zayıf entegrasyonundan kaynaklanır [264][265].

Titanyum yüzeyinin kimyasal bileşim, elektrik yükü ve pürüzlülük gibi özellikleri osteogenez sırasında ilk hücre adezyonunu etkiler. Bu nedenden dolayı, birçok çalışma başarılı osseointegrasyon için titanyum yüzeyinde yapılacak değişiklikleri araştırma üzerine kurulmuştur [266].

Hücre adezyonu doğrudan hücre büyümesi, hücre göçü ve hücre farklılaşmasında rol oynayan temel bir süreçtir. Adezyon; embriyogenez, doku bütünlüğünün sürdürülmesi, yara iyileşmesi, immün yanıt, kanser metastazı ve biyomateryal doku entegrasyonu gibi bir çok süreçte etkilidir. Hücre adezyonunda hücre dışı matriks proteinleri (fibronektin, kollajen, laminin, vitronektin), hücre iskeleti proteinleri (aktin, talin, vinculin) ve membran reseptörleri (integrinler) gibi çok sayıda protein rol oynar [267].

Ayrıca hücrelerin yüzey ile etkileşimlerinin adsorbe edilen proteinlerin doğasına bağlı olduğu belirtilmiştir [268].

2.4.2. Osteokalsin

Düşük molekül ağırlığına sahip (5700 Da) olan Osteokalsin, kemikte bol miktarda bulunan (yaklaşık% 15) kollajen olmayan bir proteindir. Üç ila dört artık y-karboksiglütamik asit içerir; bu nedenle, sentezi K vitaminine bağımlıdır. Kemikğin yeniden yapılanması sürecinde osteoblastlar tarafından üretilir. Osteokalsin sentezi, D vitamini metaboliti, 1,25-dihidroksi-D3 (1,25 (OH), D3) tarafından uyarılır.

Bu indüksiyon, osteokalsin genindeki 1,25 (OH), D3 yanıt elemanı sayesinde transkripsiyonel olarak nükleer D vitamini reseptörü (VDR) tarafından yönlendirilir.

Retinoik asit olarak bilinen A vitamini de osteokalsin sentezinin genomik düzenlenmesinde rol oynar [269][270][271].

Başlangıçta, osteokalsinin kemik mineralizasyonunda işlev gördüğü düşünülmüştür. Bununla birlikte, 1978'de P. V. Hauschka, K vitamini içermeyen bir diyetle yetiştirilen ve K vitamini antagonisti dikoumarol ile tedavi edilen tavukların

kemik osteokalsinlerinin% 50'sinden fazlasını kaybettiğini ancak kemik defekti göstermediğini belirtmiştir [272].

Daha sonra, Price ve arkadaşları.8.9, yaptıkları çalışmada sıçanlara günlük az miktarda K vitamini ile birlikte, çok miktarda K vitamini antagonisti (varfarin) vererek bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu işlem, aşırı kanamayı önlemiş ama aynı zamanda kontrol grubunun 2% sinde osteokalsini çok düşük seviyelere indirmiştir. 2 aylıkken, hayvanların kemik gelişimi normal seviyelerde seyretmiştir. 8 ayda ise, varfarin ile tedavi edilen sıçanların kemik büyüme plakalarında tam boyuna kemik büyümesi eksikliği ve artmış kemik kütlesi gibi anormal füzyonlar gözlenmiştir. Yazarlar aşırı kemik mineralleşmesini önlemede osteokalsinin bir rolü olabileceğini iddia etmişlerdir [273][274]. Osteokalsin kemik hücre dışı matrisinin (ECM) en bol bulunan, kollajen olmayan proteindir (NCP) ve yalnızca osteoblastlar tarafından sentezlenir [275].

Mustafa ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada; osteokalsin aktivitesinin, farklı derecelerde pürüzlü yüzeylere sahip implant gruplarında, işlenmiş yüzeye sahip gruba kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir. Dahası, osteokalsin sentezi, işlenmiş yüzeylere kıyasla tüm kumlanmış yüzeylerde de belirgin şekilde artmıştır, bu da yüzey pürüzlülüğünün DNA sentezi ve osteoblast benzeri hücre farklılaşmasını uyardığını göstermektedir [276].

Kemik matriks proteinlerinin işlevi halen inceleme altında iken, bazı çalışmalar OCN'in temelde in vitro olarak daha fazla mineralleşmeyi inhibe ederek [277], ve in vivo olarak ise osteoklast farklılaşmasını aktive ve teşvik ederek [278], osteoblastların geç dönem terminal farklılaşmasında rol aldığını ileri sürmektedir.

Hayes ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, mikrotopografinin pürüzsüz bir yüzeye kıyasla; hızlandırılmış bir oranda, mezenkimal kök hücre farklılaşması ile osteoblast oluşumunu indüklemek için yeterli olabileceği görülmektedir [279]. Bu çalışmada cilalanmış numuneler için gözlenen OCN ekspresyonundaki azalma, aynı zamanda in vivo olarak aynı materyalleri araştıran çalışmalardan elde edilen ve çeşitli zaman noktalarında düşük kemik temas yüzdesi gösteren mekanik ve histolojik verilerle de ilişkilidir [279]. Terminal farklılaşmada pürüzlülük ile ilişkisi artış başka makalelerde de bildirilmiştir [279][280][281].

Bu nedenle, mikroyüzeylerle kıyaslandığında, cilalanmış numuneler üzerinde OCN mRNA'sında görülen anlamlı düşüş, , terminal farklılaşma öncesi, cilalı

numunelerde kültürlenmiş hücreler için , daha uzun bir süre beklenilmesi gerektiğini göstermiştir [279].

2.5. Bor elementi hakkında genel bilgiler

Bor, hem metalik hem de metalik olmayan karakterizasyonlara sahip olmasına rağmen, periyodik tablodaki grup 3A elementlerinde bulunan metal olmayan (yarı metal) bir elementtir (Nielsen 2000). İnsan vücudunda izlenebilir olan metallerden biridir [282][283], ve canlı organizmaların temel bir elementi olarak kabul edilir [42].

Diyet kemik sağlığı için oldukça önemli bir role sahip olduğundan; kalsiyum, magnezyum, fosfor, potasyum, protein, D vitamini, demir, manganez, florür, çinko, Bor(B), bakır, vitamin (K), (A), (C) ve B vitamini kompleksleri gibi spesifik besinlerin yetersiz alımı kemik remodelingini bozar ve kemik kaybı olasılığını artırır [42][45].

Bor eksikliğinin kemik iyileşmesi ve periodontal kemik yeniden şekillenmesi üzerindeki etkisini araştırmak için sıçan ve fare modelleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda B eksikliğinin osteogenez azalması kaynaklı, kemik iyileşmesinde üzerinde değişikliğine neden olduğu bulunmuştur [45].

Bor osteojenik farklılaşma üzerindeki mekanizması henüz ortaya çıkmamış olsa da, insan kemik iliği stromal hücrelerinde (BMSC'ler) osteojenik farklılaşmaya bağlı marker gen sentezini uyararak osteojenik süreç üzerinde fark edilir bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [46]. Ayrıca başka bir çalışmada B'nin, mineralize doku ile bağlantılı olduğu düşünülen kollajen-I, osteopontin (OPN), kemik sialoprotein ve osteokalsin gibi hücre dışı matris proteinlerinin mRNA ekspresyonunu düzenlediği bulunmuştur [42].

Çok sayıda çalışma, B'nin çeşitli hücrelerde osteojenik süreç üzerindeki yapıcı rolünü desteklemektedir. Ancak diğer çalışmalar B'nin örneğin plazma alkalın fosfataz aktivitesini etkilemediği için kemik kalsifikasyonu üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını bildirmiştir [47]. Diğer taraftan, B'nin kemikteki kalsiyum ve fosfor konsantrasyonları üzerinde önemli bir etkisi de bulunmamıştır [48]. Tasli ve ark., çalışmasında NaB ile tedavi edilen kültürün, NaB tedavisi olmayan hücre kültüründen

önemli ölçüde daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiğini göstermiştir [49]. Bor, çoğu enerji substrat metabolizması için gerekli olan en az 26 farklı enzimin aktivitesini etkiler. Öte yandan, M. Benderdour tarafından yapılan bir çalışmada, Bor'un fibroblast proliferasyonunu uyarmak üzerinde hiçbir etkisi olmadığını fark edilmiştir [284].

Diğer taraftan Hasan T ve ark., tarafından yapılan çalışmada, borik asit ve boraksın Ti O₂'nin neden olduğu hasara karşı DNA direncinde artışa yol açtığı sonucuna varılmıştır [285]. Sağlam ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise , borik asidin alveoler kemik kaybı üzerinde bazı inhibe edici etkileri olabileceği bulunmuştur [43].

Biyolojide, boratlar memelilerde düşük toksisiteye sahiptir (sofra tuzuna benzer), ancak eklem hacimliliği için daha toksiktir ve böcek öldürücü olarak kullanılır. Borik asit ise, hafif antimikrobiyaldir ve bor içeren doğal organik birçok antibiyotik bilinmektedir [286]. Sayin ve arkadaşları, bor içeren bileşiğin bakteriyel biyofilm üzerindeki etkisini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde bulmasalar da araştırılan çalışmada, bu bileşiğin çeşitli antibakteriyel ve antibiyofilm etkisi olduğu gözlenmiştir [287].

Diğer taraftan, diş implantlarının yüzey modifikasyon prosedüründe floroborik asit kimyasal bir çözelti olarak kullanılmıştır [50][51][52]. Ancak bu çalışmalar, floroborik asidin implant üzerindeki yüzey karakterizasyonu ile ilgili kesin etkilerini derinlemesine araştırmamıştır.

2.6. In Vitro Çalışmalar

Klinik çalışmalardan önce yüzey modifikasyonları dahil yeni biyomalzemelerin in vitro ve in vivo değerlendirmeye tabi tutulmalıdır. Bu tip değerlendirmeler tipik olarak in vitro testlerin in vivo laboratuvar deneylerine ve daha sonra insanlarda klinik çalışmalara dönüştüğü hiyerarşik bir yaklaşımı takip eder [288].

Hiyerarşik test yaklaşımı, yüzey değişikliklerinin başarılı bir şekilde çalışmakta olan önceki yüzeylerle karşılaştırıldığı durumlarda kullanışlıdır. Basit olarak, yeni yüzey veya biyomalzeme in vitro ve in vivo laboratuvar modellerinde test edildiğinde

başarılı modellerle eşdeğer performansa sahip değilse, zaman alıcı karmaşık klinik araştırma protokollerinden kaçınılması düşünülebilir [289].

İn vitro laboratuvar modelleri genellikle yeni yüzeylerin kontrol yüzeylerine karşı (dental implant yüzeylerinde, işlenmiş veya yüzeyde modifiye edilmiş c.p. Ti veya Titanyum alaşımları) hücre kültürleri üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi içerir. Hücre kültürü çalışmaları in vivo ve faz çalışmalarına geçişte ilk basamak olarak kabul görmüştür. Hücre bazlı sitotoksikite çalışmaları ile test edilen biyomalzemenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında temel bilgi edinilir [290]. Hücre kültürü, yeni biyomalzeme tasarımlarının güvenliği ile ilgili biyouyumluluğun ilk değerlendirmesi olarak faydalı olmuştur [291].

Yeni biyomalzemeler göz önüne alındığında, biyomateryal kaynaklı hücre sinyal moleküllerinin anlaşılması stratejik bir öneme sahiptir. Örneğin, monositlerin / makrofajların yabancı cisim reaksiyonundaki rolü [292][293], osteoblastlar ile ilgili spesifik bilgiler [294], aşınma parçacıklarına verilen osteoklast yanıtları[295] ve yüzey topografisinin spesifik in vitro analizlerinde taranabilir. Böylece, günümüzde in vitro deneyler, malzeme güvenliği açısından biyomedikal cihaz tasarımında giderek daha popüler hale gelmiştir.

Öte yandan, biyomalzemelerin güvenliği şu anda in vitro olarak test edilmesine rağmen, ABD'deki Ulusal Sağlık Enstitüleri gibi düzenleyici ve bilimsel devlet kurumları, daha kompleks laboratuvar tabanlı test yöntemleri geliştirmeye ilgi duyduklarını ifade etmişlerdir.

Amaç, konakçı dokuya benzer hücresel içerik ve mimari sunan organ kültürleri gibi daha temsili ve öngörücü in vivo davranış modelleri geliştirmektir [289].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya 07.04.2018 tarihinde İstanbul Üniversitesi'nde (Fizik Bölümü Nano ve Optoelektronik Araştırmalar Laboratuvarları; Mikrobiyoloji ABD; Biyofizik ABD ve Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünün Laboratuvarı) başlanmıştır.

3.1. Deneysel Disklerin Üretimi

Bu in vitro çalışma; deneysel implant yüzeylerinin üretilmesi, implant yüzey karakterizasyonu analizi, Osteoblast hücre analizi ve bakteri adezyonu analizi kısımlardan oluşmaktadır.

Deney ve kontrol yüzeylerine sahip disklerin üretimi ve yüzey analizinde, mevcut kullanılan implant yüzeyini temsil eden bir yüzey ve üç farklı konfigürasyonda borik asit ve tetrafluoroborik asit ile muamele edilen toplam 3 farklı yüzey karşılaştırılmıştır. Bu çalışma 3 test ve 1 kontrol grubu olmak üzere 4 ana grup şeklinde dizayn edilmiş ve disk üretimleri gerçekleştirilmiştir.

Bunlardan birincisi kumlanmış ve asitlenmiş standart implant yüzeyi (kontrol, SLA), ikinci yüzey alüminyum oksit (Al_2O_3) ve borik asit (H_3BO_3) ile kumlanmış ve Tetrafluoroborik asit ile asitlenmiş yüzey (test 1, SBF), üçüncü yüzey alüminyum oksit (Al_2O_3) ve borik asit (H_3BO_3) ile kumlanmış ve Tetrafluoroborik asit ile asitlenmiş, artı olarak borik asit solüsyonu eklenmiş yüzey (test 2, SBF-B), dördüncü yüzey ise alüminyum oksit (Al_2O_3) ile kumlanmış ve Tetrafluoroborik asit ile asitlenmiş yüzeydir (test 3, SAF) (Tablo 3-1).

Dört grubun hepsi aşağıda anlatıldığı gibi daha ayrıntılı olarak hazırlandı:

Kontrol grubu 0: SLA

Tüm diskler, 5 saniye boyunca 6 barlık bir basınçta $120\ \mu m$ büyüklüğünde Al_2O_3 parçacıkları ile kumlanmış, daha sonra 120 saniye boyunca hidroflorik asit içeren ajanla

işlem görmüştür. Hava ile kontaminasyonu azaltmak için diskler %0.9 luk NaCl solüsyonu (serum izotonik) içinde muhafaza edilmiştir.

Test grubu 1: SBF

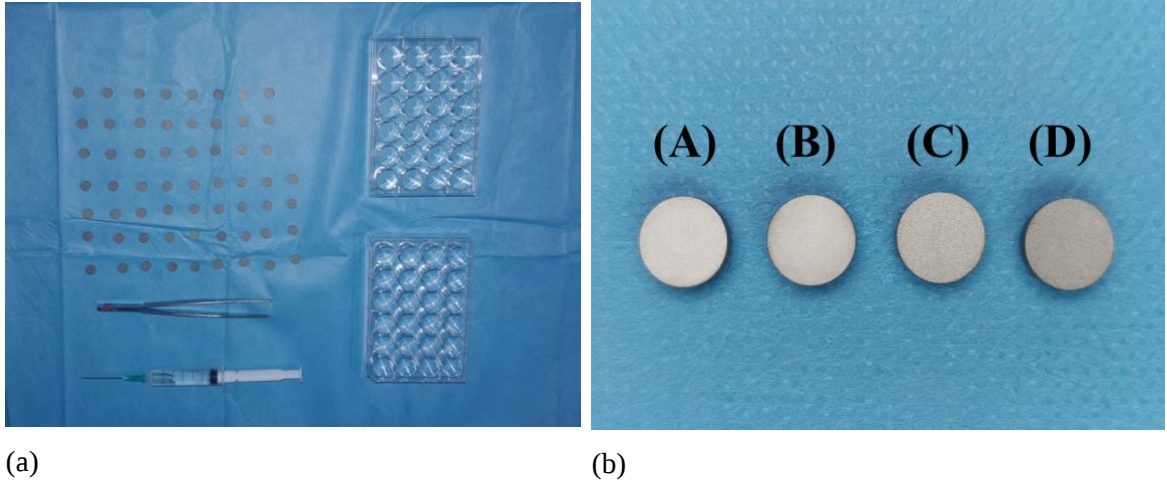
Tüm diskler ilk önce 5 saniye boyunca 6 barlık bir basınçta 120 µm büyüklüğünde Al₂O₃ parçacıkları ile kumlanmış, daha sonra 10 saniye boyunca 4 barlık bir basınçta Borik asit (H₃BO₃) partikülleri ile kumlanmaya devam edilmiştir. Son olarak da 60 saniye boyunca tetrafloroborik asit ile işlem görmüştür. Hava ile kontaminasyonu azaltmak için diskler %0.9 luk NaCl solüsyonu (serum izotonik) içinde muhafaza edilmiştir.

Test grubu 2: SBF-B

Grup 1 ile aynıdır. Tüm diskler ilk önce 5 saniye boyunca 6 barlık bir basınçta 120 µm büyüklüğünde Al₂O₃ parçacıkları ile kumlanmış, daha sonra 10 saniye boyunca 4 barlık bir basınçta Borik asit (H₃BO₃) partikülleri ile kumlanmaya devam edilmiştir. Son olarak da 60 saniye boyunca tetrafloroborik asit ile işlem görmüştür. Hava ile kontaminasyonu azaltmak için diskler NaCl solüsyonu içinde muhafaza edilmiştir. Daha sonra tüm diskler, biyolojik ve antibakteriyel incelemeler yapılmadan önce, 3000 µg/ml konsantrasyonda borik asit (H₃BO₃) içine daldırılmıştır.

Test grubu 3: SAF

Tüm diskler ilk önce 5 saniye boyunca 5 barlık bir basınçta 120 µm büyüklüğünde Al₂O₃ parçacıkları ile kumlanmış, daha sonra 60 saniye boyunca tetrafloroborik asit ile muamele edilmiştir (Şekil 3-1; Tablo 3-1).



Şekil 3-1: (a) Kumlama işleminden sonra disk yüzeyleri asitle aşındırma prosedürü için hazırlık gerçekleştirildi. (b) A. (SLA), B. (SBF), C. (SBF-B), ve D. (SAF) grupları resmedilmiştir.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan yüzey modifikasyon yöntemleri

<u>Tedavi grubu</u>	<u>SLA Yüzey</u>	<u>SBF Yüzey</u>	<u>SBF-B Yüzey</u>	<u>SAF Yüzey</u>
Kumlama	*Al ₂ O ₃	Al ₂ O ₃ ve ***H ₃ BO ₃	Al ₂ O ₃ ve H ₃ BO ₃	Al ₂ O ₃
Asitleme	**HCl/H ₂ SO ₄	HBF ₄	HBF ₄	HBF ₄
Ek işlemler	-	-	Borik Asit Solüsyonu	-

* (Al₂O₃): Alüminyum oksit, (H₃BO₃): Moleküler biyoloji uygulaması için belirlenmiş borik asit partikülleri, (HBF₄): Tetrafloroborik asit ve (Borik asit çözeltisi): H₃BO₃ ve Salin

Preparatlarda kullanılan malzemeler detaylı olarak:

- * Al_2O_3 Parçacıklar: 120 μm çapında
- * H_3BO_3 Parçacıklar: 60-100 μm çapında
- * Tetrafloroborik asit H_3BFO_4 : HBF_4 lineer formülü ile H_2O içinde ağırlıkça %48 ve 25°C 'de (Sigma 207934-500G) yoğunlukça 1.4 g / mL
- * Hidroflorik asit içeren ajan; Sadece kontrol grubu üretimi için kullanılmış
- * Borik asit çözeltisi: $20-30^\circ\text{C}$ derecede 3000mg.ml (Sigma, Amerika: B 6768 kodlu ürün)

Tüm diskler dikkatlice yıkanmış, paketlenmiş ve (γ) Gama ışını ile sterilize edilmiştir.

3.2. Malzemeler ve yöntemler

Dört farklı titanyum yüzey işleme kombinasyonunu (SLA, SBF, SBF-B ve SAF) karakterize etmek için bir dizi işlem ve analiz uygulanmıştır.

3.2.1. Titanyum alaşımı (Ti-6Al-4V) yüzeylerin karakterizasyonu

3.2.1.1. Mekanik Profilometri

Çok sayıda çalışma; implant yüzey profilinin, bir yandan osteoblastik hücre aktivitelerini [296][297] diğer yandan bakteriyel adezyonlar [298] [221] ve biyofilm oluşumunu [299] etkileyen önemli bir değişken olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada dört grubun tamamı; yaklaşık olarak aynı pürüzlülük değerine sahip olacak şekilde tasarlanmıştır.

Tüm pürüzlülük değerlerinin eşitlenmesi; her grup için kullanılan kumlama malzemelerinde, parçacık boyutlarında ve asit ajanlarındaki farklılıklar nedeniyle ile neredeyse mümkün değildir.

Tüm grupların yüzey pürüzlülüğü, bir prob ucu mekanik profilometrisi (KLA-Tencor, P-16 + / P) kullanılarak Sq (karekök ortalama pürüzlülüğü), Sz, Ssk, Sku, Sa (ortalama pürüzlülüğü) değerleri ile ölçülmüştür. Kaydedilen tüm ölçümler, yüzey özelliklerini tanımlamak ve değerlendirmek için; her numunede rastgele seçilen 3 farklı 100x100 µm alanın analiz edilmesiyle elde edilmiştir. Yüzey pürüzlülüğü, mekanik bir prob ucu profilometrisi (KLA-Tencor, P-16 + / P-6) kullanılarak iki boyutlu olarak ölçülmüştür (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Bu çalışmada kullanılan mekanik stylus profilometrisi (KLA-Tencor, P-16 + / P-6, ABD)

3.2.1.2. Konfokal Lazer Tarama Mikroskopisi (KLSM):

Üç boyutlu görüntünün yeniden yapılandırılması konfokal lazer tarama mikroskobu (Leica KLSM, Heidelberg, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her grup için toplam üç örnek kullanılmıştır. Her örnekte üç farklı alan rastgele seçildi. 10x optik yakınlaştırma ve 5x büyütmede 2x2 mm tarama boyutu kullanılarak yüzey pürüzlülüğü ile ilgili daha fazla ayrıntı için tarandı. Bu çekim görüntüleri en iyi kalite ve çözünürlük ile karakterize edilir (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: Bu çalışmada kullanılan konfokal lazer tarama mikroskopisi (KLSM)

3.2.1.3. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) Analizi:

Tüm numuneler için element bileşimini kantitatif olarak analiz etmek ve kimyasal durumlarını değerlendirmek için X-ışını Fotoelektron spektroskopisi kullanılmıştır. Bu analiz ; fiziksel ve kimyasal işlemlerin ardından Ti6Al4V alaşımının kimyasal etkileşiminin doğasını açıklayacaktır. Analiz edilecek her numune için üç farklı örnek belirlenmiştir.

Çeşitli titanyum alaşımlarının yüzey bileşimleri, X-ışını fotoelektron spektrumlarından, K - Alphas kullanılarak (K - Alphas; Thermo Scientific™, (Waltham, ABD) belirlenmiştir.

Her numunenin yüzeyinde bulunan elementler, 0-1400 eV enerji aralığında 1 eV aralıklarla ve 150 eV geçiş enerjisinde kaydedilen, spektrumlarından ölçülmüştür. Seçilmiş fotoelektron tepe noktaları için (O 1s, Ti 2p, C 1s, N 1s, Mg 1s, Ca 2p, Cl 2p ve Si 2p) , 0.1 eV aralıklarda ve 20 eV'lik bir geçiş enerjisinde, yüksek çözünürlüklü spektrumlar kaydedilmiştir.

3.3. İnsan fetal osteoblast hücrelerinin kültürü:

İnsan fetal osteoblast hücre dizisi (hFOB 1.19), hücre kültürü amaçları için Amerikan Tıp Kültür Koleksiyon Organizasyonu (ATCC® CRL-11372™, Virginia, ABD) tarafından sağlanmıştır. -80 ° C'de muhafaza edilen hücreler kültür için hazırlanmıştır.

Deney süreci hücre büyümesi ile başlatılmıştır. Dondurulmuş hücre (hFOB), sıvı azot deposundan çıkarılmış ve tüp, laboratuvar teknisyeni tarafından 5 dakika boyunca elde tutularak ısıtılmıştır.

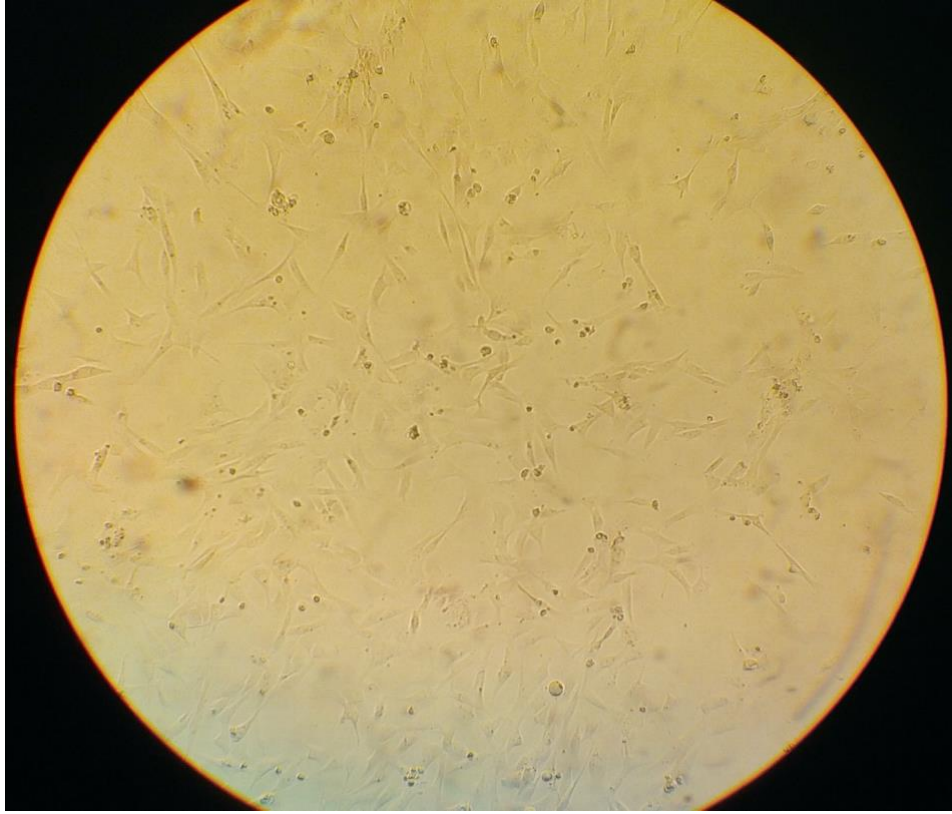
Sonra kriyoprezervasyon tüpü açılmış, hücreler önceden hazırlanmış medyuma eklenmiş, ve 15 ml'lik tüp içine yerleştirilen hacimce toplam 7 mL çözelti oluşturulmuştur. Tüp 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra mevcut medyum atılmış ve tüp içine tekrar 4 mL medyum ilave edilmiştir. Hücrelerin tüpün dibinde durgun kalmadığından emin olmak ve tüm tüpe yayılmalarını sağlamak için çözelti birkaç kez hafifçe karıştırılmıştır.

Daha sonra çözelti, 25 mL'lik bir flaska aktarılmış ve inkübasyondan önce hücrelerin varlığını ve durumunu kontrol etmek için mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 3-4). Ortam bir hafta boyunca iki kez değiştirilmiştir.

Bir hafta sonra, iki flask'ın medyumunu atılmıştır. Daha sonra her birine 2 mL %0.25 tripsin / EDTA (Gibco, Birleşik Krallık) ilave edilmiş ve tüm hücrelerin tüp duvarlarından ayrılması için hafifçe çalkalanmıştır. Flasklar, 2 dakika boyunca inkübatöre alınmış, sonra çıkarılmıştır. Her flaskın medyumunu, yüzeyinde akan hücreleri ile birlikte 15 mL'lik bir tüpün içine yerleştirilmiş; 15 mL kültür ortamı üstüne eklendikten sonra, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Tüplerin içindeki yüzeyel fazın(supernatant) tamamı atılmış, tüplere yeniden 1 mL hazırlanmış medyumunu ilave edilmiş ve çözelti hücrelerin tüm ortama yayılması için tekrar pipetle karıştırılmıştır. Son olarak, hazırlanmış medyum yeni flasklara (75 mL'lik) 4 adet olacak şekilde dağıtılmıştır, daha sonra sıkıca kapatılmadan önce 40 mL hazırlanmış medyumunu ilave edilmiş ve inkübatöre yerleştirilmiştir.

Bu prosedür, tüm testleri yapmamızı sağlayan hücre sayısına ulaşana kadar tekrarlanır.



Şekil 3-4: hücre kültürü: Hücre geçişi sırasında insan fetal osteoblast hücrelerini gösteren elektron mikroskop görüntüsü.

3.3.1. Hücre adezyonu ve yayılımı

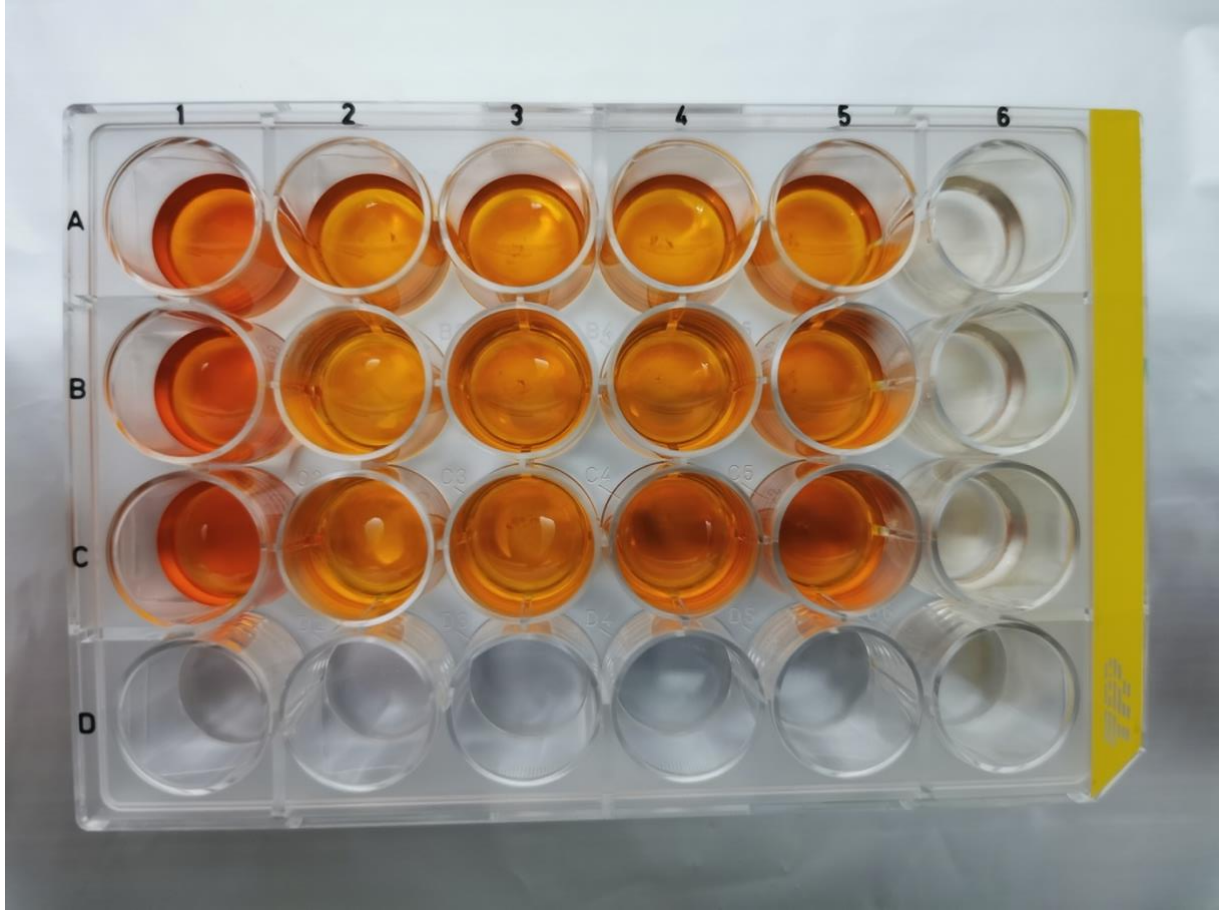
Numuneler üzerinde, yapışmış hFOB hücrelerinin morfolojisini görselleştirmek için SEM görüntüleme uygulanmıştır.

1,4 ve 7 günlük kültürlenme işleminden sonra, diskler yeni bir oyuk plakasına çıkarılmıştır, daha sonra % 50 etil alkol çözeltisi 5 dakika süreyle ; ardından % 70, % 90 ve % 96 konsantrasyonda etil alkol çözeltisi her biri 10 dakika süre olacak şekilde uygulanmıştır [300][301]. Son olarak da 15 dakika boyunca iki kez % 100 konsantrasyon uygulanmıştır. (FSEM, FEI, SIRION100, Eindhoven, Hollanda).

3.3.2. Hücre Canlılığı/Proliferasyonu Deneyi

Prefabrik disk yüzeylerinin ve katkı maddelerinin sitotoksitesini belirlemek ve bunların insan hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için Hücre Sayma Kiti-8 (CCK-8) (Abbkine Scientific, Wuhan, Çin) kullanılmıştır [302]. hFOB hücrelerinin tüpten ayrışması için , 2 mL tripsin (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) uygulanmış ve flasktaki tüm hücrelerin üzerine gelmesi için hafifçe karıştırılmıştır. Ardından flask 2 dakika boyunca inkübatöre yerleştirilmiştir. Daha sonraki adım; santrifüj için falkon tüpü dökülmeden önce 5 ml taze medyumunu ilave edilmiştir ve hafifçe karıştırılmıştır. 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlemeden sonra,tüm tripsinin süspansiyondan atılmasının sağlanması için bu adım bir kez daha gerçekleştirilmiştir. Tüplere 3 ml hazırlanmış medyumunu (complete growth medyumunu) ilave edilmiş ve süspansiyon, numuneler üzerinde hücre aşılmasından önce hücre sayımı için hazırlanan ortam içinde hücreleri eşit olarak dağıtmak için hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra, 1 ml hazırlanmış medyumunu ilave edilmeden ve inkübatöre yerleştirilmeden önce her numuneye 5×10^4 hücre aşılmıştır. Hücre canlılığı ve proliferasyonu değerlendirme için 1 gün, 4 gün ve 7 gün süre belirlenmiştir. Her bir zaman noktasında, CCK-8 seti kullanılarak değerlendirme için kuyu plakaları inkübatörden çıkarılmıştır. DMEM her oyuktan atılmış ve diskler iki kez PBS ile yıkanmıştır.

Diskler dikkatlice tekrar kuyucuklara ve 600 µl renksiz DMEM ve 60 µl CCK-8'e yerleştirilmiş ve Elisa Reading elde edilmeden önce 4 saat inkübasyonda tutulmuştur (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: CCK-8 deneyi: CCK-8'in uygulanmasından sonra, ELISA okuma ölçümünden önce, farklı modifiye edilmiş disk yüzeylerinden toplanan hFOB ile 24 oluklu plakanın görüntüsü.

3.3.3. Osteokalsin aktivitesi

Bu tahlil, osteoblast farklılaşması sırasında erken dönem aktiviteye sahip olduğu düşünülen ALP aktivite tahlilinin aksine; osteoblast hücre olgunluğunu gösteren geç dönem aktiviteye sahip olduğu düşünülen osteokalsinin, 2 farklı zaman noktasındaki durumunu (7. gün ve 14. gün) içeren bir tahlili şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya kontrol grubu ve üç test grubunun tümü dahil edilmiş , her bir numuneye 3×10^4 hücre aşılanmış ve 7 ila 14 gün boyunca ortak kültür yapılmıştır. Beklentimize göre MTT tahlilinde daha düşük sonuçlar elde ettikten sonra, ikinci test grubuna (SBF-B), her hücre öncesi hücre aşılama maddesine 3mg/ml konsantre borik

asit içeren ortam hazırlamak yerine 20 μ L 3mg konsantre borik asit damlası eklenmesi kararlaştırılmıştır. Testin yapılması, üreticiye göre adım adım gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle, 500 μ L standart seyreltici standarda eklenmiştir (toz haline getirilmiş form). Elde edilen çözeltinin konsantrasyonu (doygün çözelti) 8000 pg / mL'dir. Her birine 0.5mL Standart çözücü (Dilüent) eklenerek 7 Eppendorf hazırlanmıştır. Daha sonra, en yüksek standart nokta olarak kabul edilen ilk Eppendorf'a 0.5 mL doymuş çözelti ilave edilmiştir. Çözelti, süspansiyonu pipetle hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra 0.5 mL pipet içinde tutularak ikinci Eppendorf'a ilave edilmiş, böylece ilk Eppendorf 0.5 mL süspansiyon ve 4000 pg / mL konsantrasyonunda elde edilmiştir. dizi, 7. Eppendorf karşılanana kadar tutulmuştur. Süspansiyonun hafifçe karıştırılmasından sonra, daha önceki 0.5 mL süspansiyon aspire edilmiş ve bu analizde boşluğu 0pg / mL olarak gösterecek olan 8. Eppendorf'a (sonuncu) eklenmiştir

Her Eppendorf'un 100 μ L'sini standart seriyi temsil eden kuyucuk plakalara boşaltılmıştır.

Araştırma osteokalsin kültür süspansiyonu ve disklerdeki ekli hücreler için ayrı ayrı yapılmıştır. Biri 1 hafta ölçümü diğeri 2 hafta ölçümü olmak üzere 2 farklı zaman noktası testi uygulanmıştır. Sonuçlar aynı günde tutulabilsin diye 2 haftalık olan ilgili grupta 1 hafta önce başlatıldı, böylece herhangi bir zaman noktasındaki tüm gruplar aynı kriterleri elde edebildi.

Hücre lizatı tahlili yapılması için, önce bağlı hücre, Tripsin uygulanarak disklerden ayrıştırılmış ve 2 dakika boyunca inkübatöre konmuştur. Daha sonra her çukur levhasına 1mL tamamlanmamış DMEM ilave edilmiştir ve süspansiyon içinde hücreleri tüp (falkon tüpü) içine alınmadan önce dağıtmak için 20 saniye boyunca hafifçe karıştırılmıştır. Süspansiyon 5 dakika 3000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant (Medyum) atılmış, sonra hücreler üç kez soğuk PBS'de yıkanmıştır. Hücreler daha sonra PBS içerisinde yeniden süspanse edilmiştir ve -20 ° C'de dondurulmadan önce vortekse tabi tutulmuştur. Bir sonraki adımda, süspansiyon hafifçe eksik çözdürülmüş ve bu dondurma / çözme döngüsü işlemi üç kez tekrar edilmiştir.

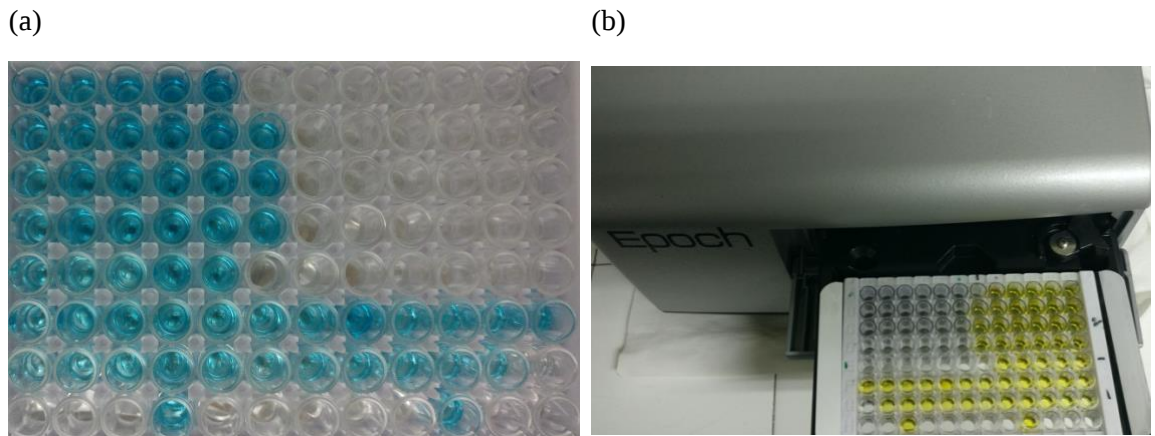
Her numunenin süspansiyonu, hücre lizat süspansiyonundan ayrı olarak yerleştirilmiştir ve test buna göre sürdürülmüştür. Kuyu plakası 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden 10 dakika önce Detection Reagent A, Assay seyreltici A'nın 1: 100 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Kuyu plakaları alınmıştır ve süspansiyonlar kuyu plakası yıkanmadan çıkarılmıştır. 100 μ L tespit Reaktif A

eklenmiş, daha sonra Plaka kapatıcı ile kapatıldıktan sonra 1 saat daha inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinden 10 dakika önce, Tespit Reaktifi B, Tespit Reaktifi A hazırlığı için yapıldığı haliyle tekrar 1: 100 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Ayrıca, Yıkama çözeltisi, 580 mL damıtılmış suyla seyreltilmiş 20 mL Yıkama Çözeltisi konsantresi ile hazırlanmıştır.

Kuyu plakası inkübatörden çıkarılmış ve süspansiyon pipetle (çekerek) çıkarılmıştır. 350 ul Yıkama çözeltisi, daha sonra her bir oyuğa ilave edilmiş ve yıkama çözeltisinin dökülmesinden ve plakanın emici kağıda geçirilmesinden önce 2 dakika bekletilmiştir. Bu adım 3 kez tekrarlanmıştır.

Yıkama tamamlandıktan sonra, her bir oyuğa 100 uL Tespit Reaktifi B ilave edilmiştir ve daha sonra Plaka kapatıcı ile kaplandıktan sonra 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, yıkama prosedürü 4 kez daha önce açıklandığı gibi yıkama prosedürü tekrar yapılmıştır. Daha sonra 90 µL Substrat Solüsyonu ilave edilmiştir, ardından iyi plaka 20 ° C'ye kadar ışığa maruz kalma faktörü göz önüne alınarak inkübe edilmiştir, çünkü çukur levhasının ışığa maruz kalmaması gerekmektedir. Kuyu plakasına herhangi bir ışık girmesini önlemek için kuyu plakası alüminyum folyo ile bağlanmıştır. Daha sonra hemen 450 nm'de ölçüm yapmak için kuyu plakası Elisa okuyucuya yerleştirilmiştir (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: OCN testi: (a). Hücre ortamından ve hücre lizat işleminden osteokalsin toplandıktan sonra OCN ölçümü için süreci. (b). OCN testi: ELISA Okuyucu sonuçları için hazırlanan OCN testinin son aşaması.

3.4. Bakteriyel analiz

3.4.1. Bakteri kültürleri

Bu çalışmada iki farklı bakteri türü seçilmiştir, biri *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) ve ikincisi ise *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Bakteriyel kültür gece boyunca *S.mutan* için 1 gece ve *P. gingivalis* için 3 gün tutulduktan sonra, beyin kalp infüzyonunda (BHI) Agar (Merck KGaA 64271 Darmstadt, Almanya) alt kültüründe tutulmuş; daha sonra bakteriler Brucella agarda (Merck) ile 5 mg / mL hemin, 5 mg / mL menadion ve %5 koyun kanı ile kültürlenmiştir. Daha sonra, tüm kültürler %80 N₂, %10 CO₂ ve %10 H₂ hava ortamının karşılanabileceği ve %10 H₂ hava ortamının karşılanabileceği kavanoz içine yerleştirilen atmosfer jeneratörü (GasPack) ile birlikte kavanozlara (Oksoïd) koyulmuş ve kavanozlar sıkıca kapatılmıştır. Böylece inkübasyon sırasındaki anaerobik durum korunabilmiştir.

Tek bir *S.mutans* bakteri kolonisi, bakteri süspansiyonu hazırlanması için 10 mL Beyin Kalp İnfüzyon Suyu (BHI) içine aşılanırken *P.gingivalis* süspansiyonu, tek bir koloni 5 mg / mL hemin ve 5 mg / mL menadion ile desteklenmiş 10 mL Brucella agar ((Pronadisa Lab. Conda, Madrid, İspanya) içine aşılanarak hazırlanmıştır. Bakteriyel süspansiyonların bulanıklığı, son konsantrasyon (1.5x10⁸ cfu / mL) olan McFarland 0.5 bulanıklık standardına uygun hale getirilmiştir.

3.4.2. Tükürük hazırlama

Ortamı insandaki ağız içi ortamına benzetmek için bu deneyde normal insan tükürüğü kullanılmıştır.

Uyarılmamış insan tükürüğü toplanmış ve deney süresine kadar -20 ° C'de alikotlarda depolanmıştır. Deney gününde, tükürük sıvısı santrifüjlenmiş (15 gC'de 15

dakika boyunca 15 ° C'de), 0.22 µm filtrasyonla sterilize edilmiş ve 24 kuyu plakalara boşaltılmıştır. Pelet oluşumu ve bakteriyel yapışma deneyleri için kullanılmıştır.

Sağlıklı gönüllüden yeme, içme ve diş fırçalama işlemlerinden en az 1.5 saat sonra toplanan uyarımsız tükürük örnekleri 15,000 x g devirde 4C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant 0.45 µm filtrasyonla steril edilmiş ve -20 C'de saklanmıştır.

3.4.3. Deney tasarımı

Her grup için 10 gama-ışını sterilize edilmiş örnek, altısı CFU analizi, üçü KLSM analizi ve bir tanesi SEM görüntüleme için belirlenmiştir. Disklerin tümü 24 kuyu polistiren hücre kültür plakalarına yerleştirilmiş, daha sonra 2 ml steril PBS ile yıkanmadan önce en az bir saat boyunca 37 ° C'de 500 µl tükürük ile kaplanmıştır. Daha sonra, numuneler yeni bir 24 oyuklu polistiren hücre kültürü plakalarına yerleştirilmiş ve her bir diske 2 ml bakteri içeren ortam (10⁶ CFU mL⁻¹) eklenmiştir. *P.gingivalis* ve *S. mutans* için inkübasyon süresi sırasıyla 2 saat ve 4 saat olarak belirlenmiştir (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: Bakterilerin anaerop ortamda, Çalkalama makinesi'nde(çalkalayıcı) inkübe edilmesi

Bakteriyel adezyon yapışma deneyi:

Muamele edilen yüzeylerin antibakteriyel aktiviteleri ve borik asit çözeltisi, bu deneyde, hem *P. gingivalis* (ATCC 33277) hem de *S.mutans*'a (ATCC 25175) karşı değerlendirilmiştir. Deneylerin her biri ayrı ayrı yapılmıştır.

Kültürleme işleminden sonra numuneler, bağlanmayan veya cansız bakterileri uzaklaştırmak için PBS ile hafifçe durulanmıştır.

3.4.3.1. Bakteriyel sayım (CFU)

Süpernatant, her bir diskin 1 mL salin çözeltisi içeren bir tüpe daldırılması, ardından vorteks kullanılarak 20 saniye boyunca mekanik olarak hücresel ayrılma işlemi ile müdahale edilmesi vasıtasıyla yıkanmıştır (Şekil 3-8). Nihai bakteriyel süspansiyon, seri olarak 10 kat seyreltilmiştir.

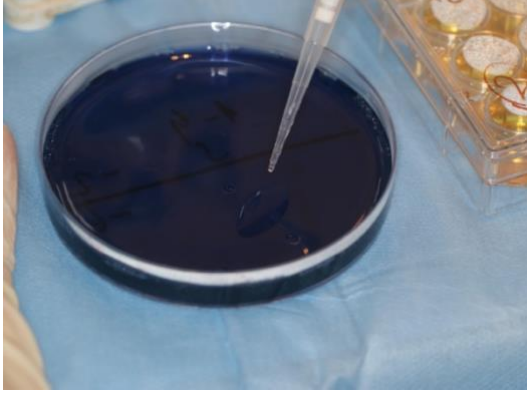


Şekil 3-8: Tüplere konulan disklerin vortekslenmesi

Dilüsyonun 0.1'lik kısmı, *S.mutans* için Mitis-salivarius bacitrasin agar plakalarına (M259, HiMedia Laboratories, Hindistan), *P. gingivalis* için ise hemin ve

menadione plakaları ile desteklenmiş Brucella kan agarına (Pronadisa Lab. Conda, Madrid, İspanya) ekilmiştir. Son olarak, inkübasyondan sonra koloniler sayılmış ve CFU / mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 3-9, 3-10).

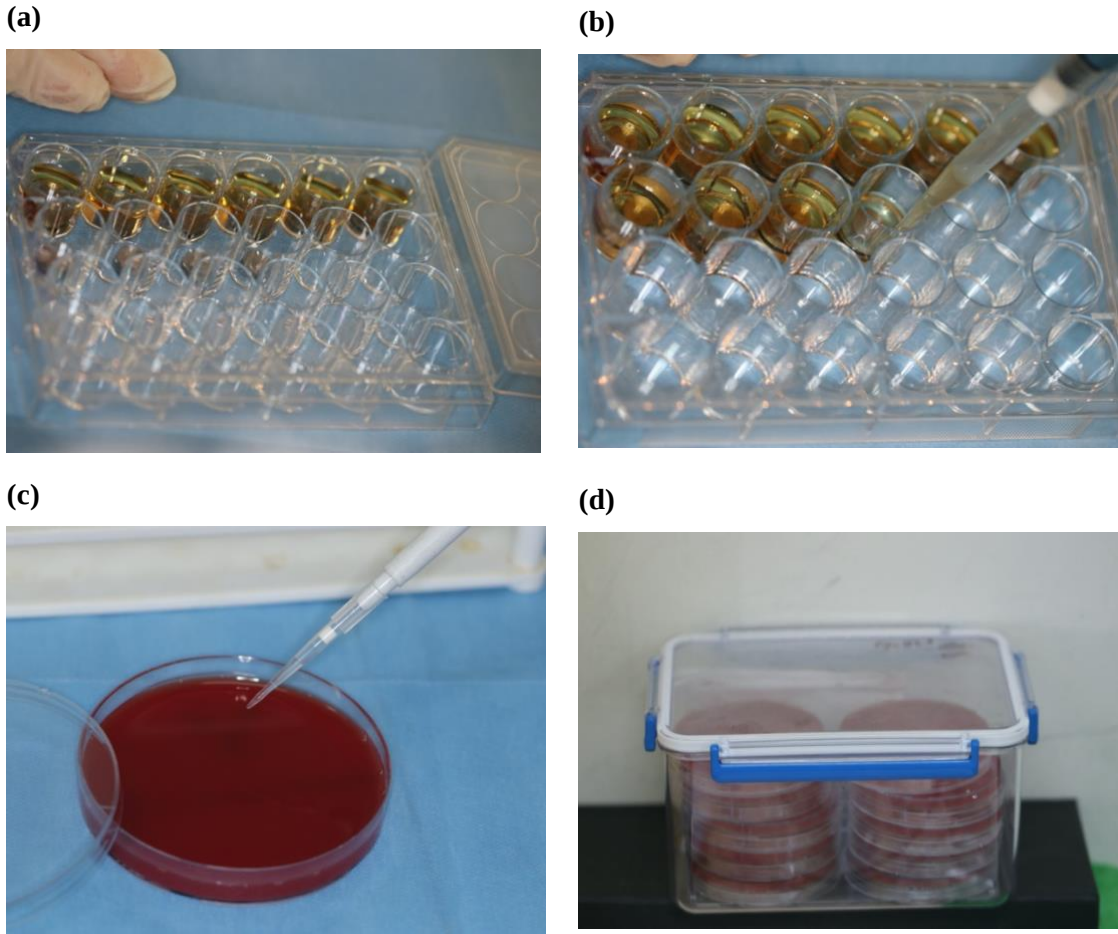
(a)



(b)



Şekil 3-9: (a) *S. mutans* dilüsyonunun 0.1 alikuotu, Mitis-salivarius bacitrasin agar plakaları üzerinde ekildi (M259, HiMedia Laboratories, Hindistan). (b) Tüm petriler, koloniler sayılmadan ve CFU / mL olarak hesaplanmadan önce 4 gün boyunca inkübe edildi.



Şekil 3-10: Brucella kanlı agarda *P. gingivalis* kolonileri. (a-b) *P. gingivalis* bakterilerinin tek bir kolonisinin 10 ml BHI et suyuna (hemin ve menadion ile desteklenmiş) aşılandı ve ardından oluklu plakalar içeren diske yerleştirildi; (b) Kuyucuklara yerleştirilen diskler üzerine besiyeri eklenmesi; (c) *P. gingivalis* dilüsyonunun 0.1 alikuotu Brucella kan agar (hemin ve menadion ile desteklenmiş) (Pronadisa Lab. Conda, Madrid, İspanya) plakaları üzerine ekildi; (d) Disk kültürlerinin inkübasyonu 5 gün boyunca yapıldı.

3.4.3.2. Konfokal Lazer Tarama Mikroskopisi (KLSM) Analizi:

Her grup için örnekler yeni sterilize edilmiş 24 oyuklu plakalara aktarılmış; Live/Dead Bac Light™ Bakteriyel Canlılık ve Sayma Kiti (Invitrogen, Merelbeke, Belçika) kullanılarak boyanmış ve ışık koruması altında 15 dakika beklemeye bırakılmıştır. Örneklerin her birinde rastgele üç alan seçilmiş ve KLSM (Leica KLSM, Heidelberg, Almanya) ile analiz edilmiştir. 488 ve 532 nm'lik uyarma dalga boyları

kullanılmış ve örnekler 10 x 10 büyütme optik lenslerden yararlanılarak gözlenmiştir. Elde edilen görüntüler Comstat programı kullanılarak analiz edilmiş, canlı ve cansız bakteri sayısı buna göre hesaplanmıştır.

3.4.3.3. SEM Görüntüleme

Örneklere Etanol [303] ile kurutma işlemi uygulandıktan sonra diskler, her bir örnek üzerindeki bakterilerin morfolojisini görselleştirmek ve araştırmak için ; 15000, 30000, 50000X lik büyütmede tarama elektron mikroskobu (SEM; FEI Versa 3D Dual Beam, ABD) ile taranmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz:

Ortalama, standart sapma (SS), medyan, çeyrekler arası aralık (IQR), aralık (minimum - maksimum) ve % 95 güven aralığından (CI) oluşan tanımlayıcı istatistikler hesaplandı. Geçerli bir örneklem büyüklüğü hesaplamasına uyarlanabilir önceki bir çalışmanın olmaması nedeniyle normallik varsayılmamıştır. Grup parametreleri arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Dunn'un post-hoc testi çiftler arası karşılaştırmalar için kullanıldı. Ardışık günlerde ölçülen hücre canlılığı / proliferasyonu (CCK-8) değerlerinin değişimini analiz etmek için Friedman testi kullanıldı. %95'in üzerinde herhangi bir olasılık seviyesi ($p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler ticari bir yazılım paketinde (GraphPad Prism (v6.0), La Jolla, California, ABD) gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Yüzey Karakterizasyonu

4.1.1. Profilometre Analizi

Profilometre analizi, tüm üretim (SLA) ve işlenmiş yüzeyler (SAF, SFB ve SFB-B) için yüzey pürüzlülüğü değerini (Sa) eşitlemek amacıyla; disk üretimi sırasında numuneler üzerinde gerçekleştirilen ilk analizdir. Böylece çalışmadaki varyasyon faktörleri azaltılmıştır. SLA, SAF, SBF ve SBF-B'nin Sa değerleri sırasıyla 1.65, 1.70, 1.75 ve 1.65 tir (Tablo 4-1). Ayrıca, (Tablo 4-1) 'de gösterilen (Sq, Ssk, Sku, Sp, Sv ve Sz) parametrelerinin ölçümleri, Sa değerlerinin benzerliğine rağmen, gruplar arasındaki pürüzlülük değişimlerini izah etmektedir.

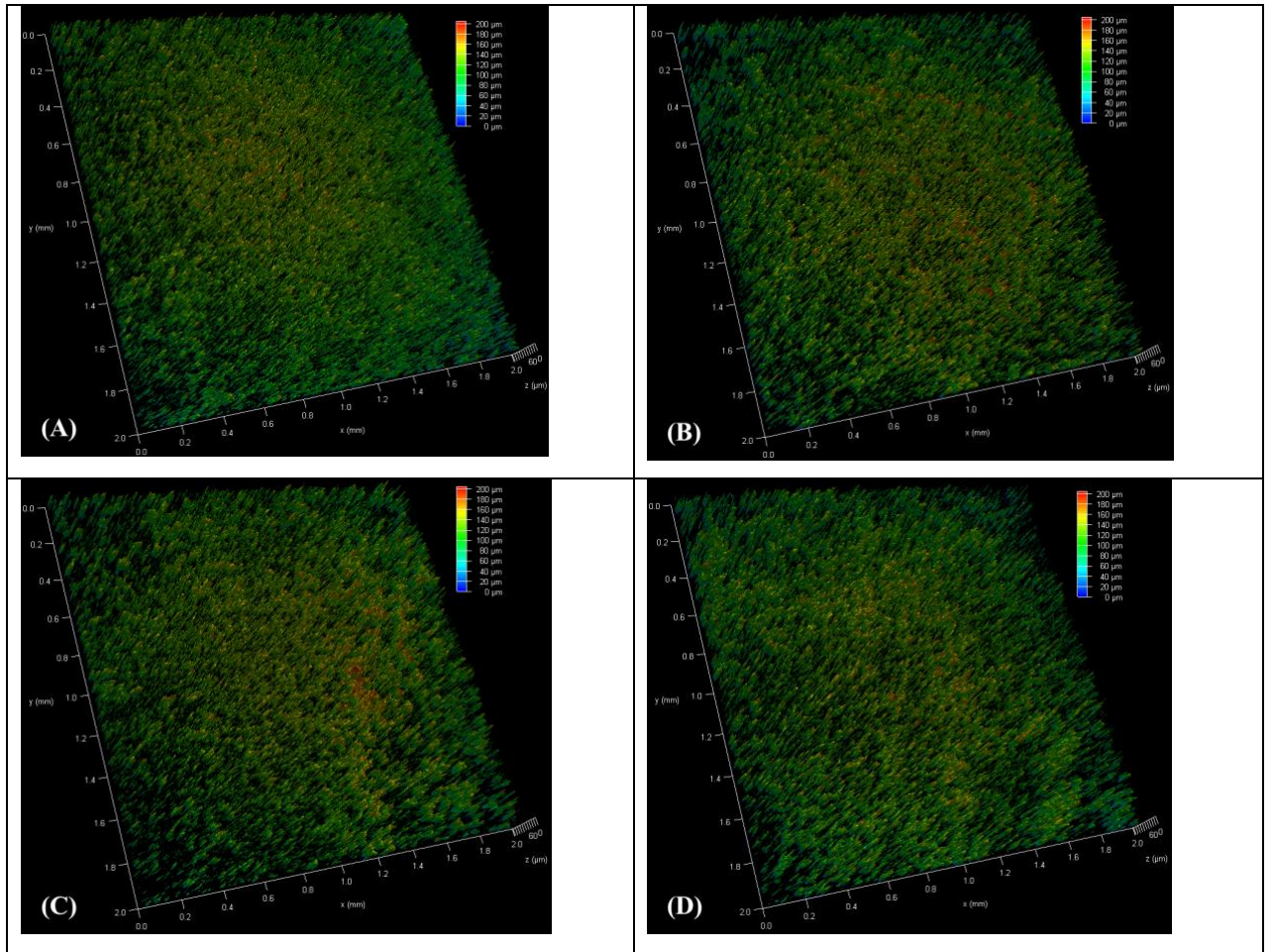
Tablo 4-1: Stilus profilometrisi ile elde edilen yüzey pürüzlülük değerleri (ölçüm alanı 100 x 100 µm²)

Medyan (IQR)	Sa	Sq	Ssk	Sku	Sp	Sz
SLA	1.6 (IQR 0.13)	1.93 (IQR 0.26)	0.425 (IQR 0.892)	2.63 (IQR 1.48)	5.47 (IQR 0.48)	10 (IQR 1.97)
SBF \ SBF-B	1.63 (IQR 0.41)	2.08 (IQR 0.37)	0.462 (IQR 1.564)	3.55 (IQR 3.45)	7.7 (IQR 3.73)	13.5 (IQR 4.56)
SAF	1.69 (IQR 0.24)	2.16 (IQR 0.43)	-0.168 (IQR 1.48)	3.46 (IQR 1.43)	5.76 (IQR 2.65)	12.4 (IQR 3.1)

* **Sa** Değerlendirilen profilin Aritmetik ortalama sapması; **Sq** Değerlendirilen profilin Ortalama karekök sapması, **Ssk** Çarpıklık; **Sku** Basıklık, **Sp** Profilin enbüyük tepe yüksekliği değeri; **Sz** Profilin enbüyük yüksekliği değerleri Ortalaması

4.1.2. KLSM Analizi

KLSM analizi yüzey sertliği ile alakalı spesifik değerlendirmeler yapılmasına daha çok olanak tanımıştır. 2 mm x 2 mm'lik bir alan üzerinde numune başına üç ölçüm elde edilmiştir. Kantitatif analiz; genişlik, konumsal, hibrit ve fonksiyonel parametrelerin (Tablo 4-2) ölçümlerini ortaya koymak için ImageJ64 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalitatif analizde ise, karşılaştırılabilir Sa değerleri olmasına rağmen numuneler arasında gözle görülür bir farklılık gösterilmiştir (Tablo 4-2); (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Örneklerin yüzey pürüzlülüğünü ve yüzey topografisini gösteren Konfokal tarama lazer mikroskobu ile elde edilen üç boyutlu görüntüler; (A) SLA, (B) SBF, (C) SBF-B ve (D) SAF yüzeyleri.

Tablo 4-2: Örneklerin yüzey pürüzlülüğünü ve yüzey topografisini gösteren Konfokal tarama lazer mikroskobu ile elde edilen sonuçlar

Grup/S _{değerleri}		(Str)	Sdr (%)
SLA	Medyan (IQR)	0.34 (IQR 0.2)	77.14 (IQR 12)
	95% CI	0.31- 0.36	67.12 – 81.12
SBF	Medyan (IQR)	0.21 (IQR 0.6)	68.46 (IQR 9.5)
	95% CI	0.18- 0.25	63.0 -72.3
SBF-B	Medyan (IQR)	0.21 (IQR 0.5)	67.76 (IQR 9)
	95% CI	0.18- 0.24	65.55 – 72.77
SAF	Medyan (IQR)	0.26 (IQR 0.4)	71.12 (IQR 14.6)
	95% CI	0.21 – 0.28	62.02 – 82.0
P		N.S	N.S

* Str: Texture aspect ratio (uzaysal parametresi); Sdr: Developed interfacial area ratio (karışım parametresi). Herhangi bir anlamlı fark tespit edilemedi (N.S).

4.1.3. XPS Analizi

XPS anket spektrumları, (Şekil 4-2) 'de gösterildiği gibi numuneler için; yüzeylerin oksijen (O) titanyum (Ti) ve karbon (C) gibi ana bileşenlerini içeren kimyasal kompozisyonunu ortaya koyarak; tüm yüzeyi tespit etmiştir. SBF, SBF-B ve SAF gruplarının çeşitli mekanik ve kimyasal işlemlerine maruz kalmasına rağmen, aralarında sınırlı farklılıklar ortaya çıkmıştır.

SBF ve SBF-B grupları aynı üretim süreçlerine sahip olduğundan, konsantrasyonları sırasıyla %50.03 ve %61.99 olan SAF ve SLA ile karşılaştırıldığında, yüzey açısından en düşük karbon (C) elementine (% 45.99) sahip olduğu bulunmuştur. Bu durum, atmosfer kaynaklı maruz kalınan daha az karbon dioksit (CO₂) reaksiyonuna

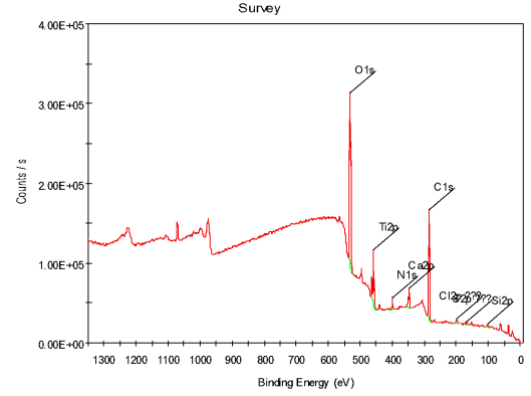
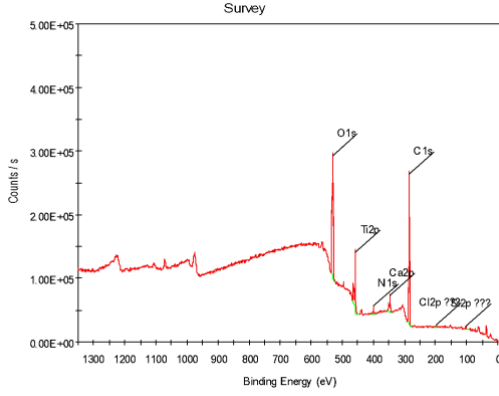
ve adsorpsiyonuna işaret etmektedir. SLA örnekleri ise tüm gruplar arasında en yüksek konsantrasyonu göstermiştir.

Tüm test grupları (SAF, SBF ve SBF-B); sırasıyla (sırayla % 35.58; % 36.04; ve % 36.04) benzer oksijen (O) yüzey konsantrasyonu değerleri göstermiştir, SLA ise en düşük konsantrasyona (% 26.10) sahip olarak belirlenmiştir. 187 eV civarındaki bir seviyede düşük büyüklükteki tepeler, 187-189 eV'deki B ve B-oksitlerin bağlanma enerjisine karşılık gelir. Üçlü soru işaretleri (???) ve Si2S plazmonları olarak etiketlenen tepeler, B elementiyile üst üste bindirme olabilecek yerlerdir [304]. Üçlü soru işaretleri (???) ve Si2S plazmonları olarak etiketlenen tepeler, B elementiyile üst üste bindirme olabilir. Ek olarak, 72.6 eV enerji seviyesi çevresinde, tüm spektrumlarda (Al)nin bağlanma enerjisine karşılık gelen benzer pikler gözlemlenmiştir (Tablo 4-3; Şekil 4-2). Flor tespit edilmedi.

Tablo 4-3: XPS yüzey kompozisyonu analizi, numunelerin kimyasal kompozisyonunu gösterir

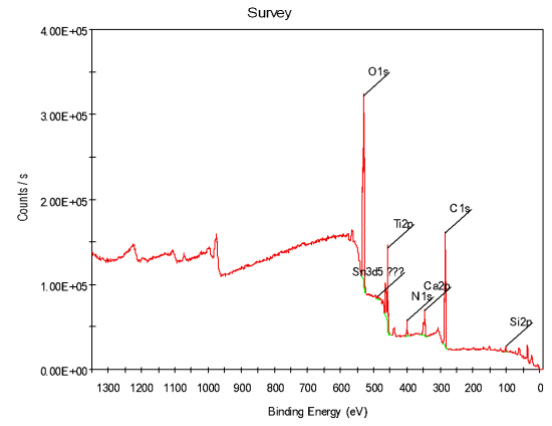
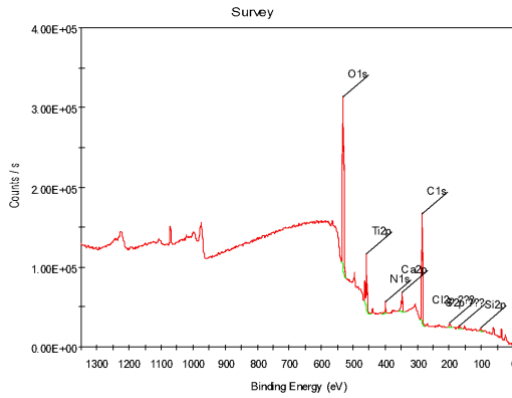
Chemical Composition (at%)	SLA	SAF	SBF	SBF-B
O	26.10	35.58	35.77	36.04
C	61.99	50.03	46.77	45.99
Ti	4.47	5.56	5.30	5.80
N	2.92	3.56	2.43	2.59
Ca2p	2.03	2.97	2.3	2.42
Cl2p (???)	0.49	-	1.03	2.88
Si2p	-	2.3	1.41	2.43
S2p (???)	1.98	-	0.8	0.94
Mg1s (???)	-	-	-	0.91

* Xps analizi için istatistiksel analiz yapılmadı



SLA

SBF



SBF-B

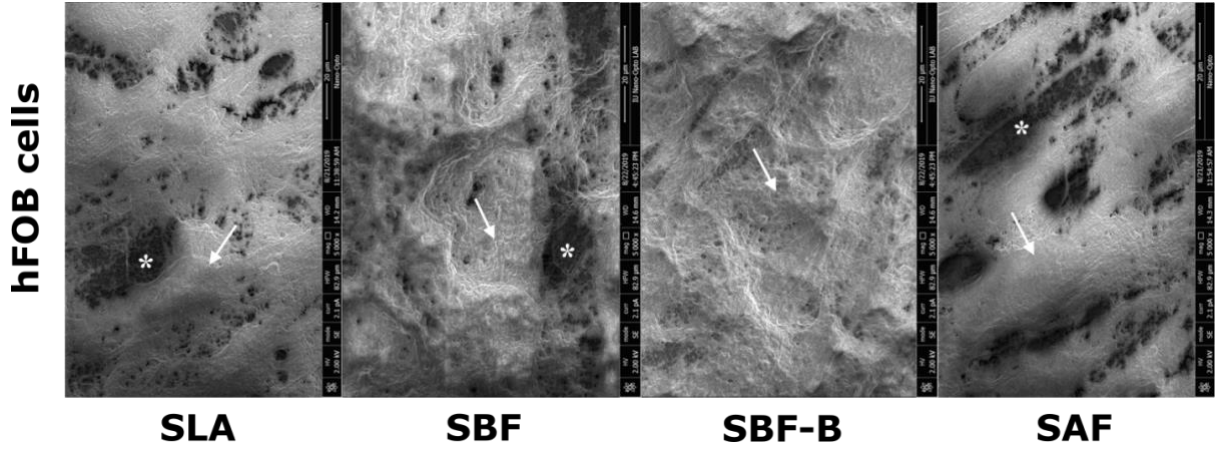
SAF

Şekil 4-2: Hazırlanan yüzeylerin X ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) araştırma spektrumları.

4.2. Biyolojik Yanıt

4.2.1. Hücre Adezyonu ve yayılımı

SEM taraması, hücrelerin çeşitli mesafelerde (2000x ve 5000x) ve farklı zaman aralıklarında (1,4 ve 7 gün) bağlanma potansiyelini göstermiştir. Bütün grupların tüm örneklerinde hücre adezyonu gerçekleşmiştir. 1. günde, hFOB hücreleri tek bir tabaka halinde tüm disk yüzeylerine yayılmıştır. 4. günde ve 7. günde, hücreler disk yüzeyinin her tarafına yayılmış ve geniş ölçüde çoğalma göstererek, hücre kenarlarıyla uyumlu bir şekilde birleşmiştir. Hücre grupları yoğunlaşarak, titanyum yüzey üzerinde seyrek görünümü olan çok tabakalı bir halde kendini göstermiştir (Şekil 4-3). Osteoblast hücreleri yüzey boyunca 10-30 μm aralığa ulaşacak şekilde uzantılar oluşmuştur.



Şekil 4-3: 7. günde disk yüzeyleri üzerinde hFOB hücrelerinin elektron mikrograflarının taranması Tüm grupların yüzeylerine yayılan hFOB hücreleri (oklar). HFOB hücrelerinin yayılması, numunelerin neredeyse tüm yüzeyini kaplamaktadır.

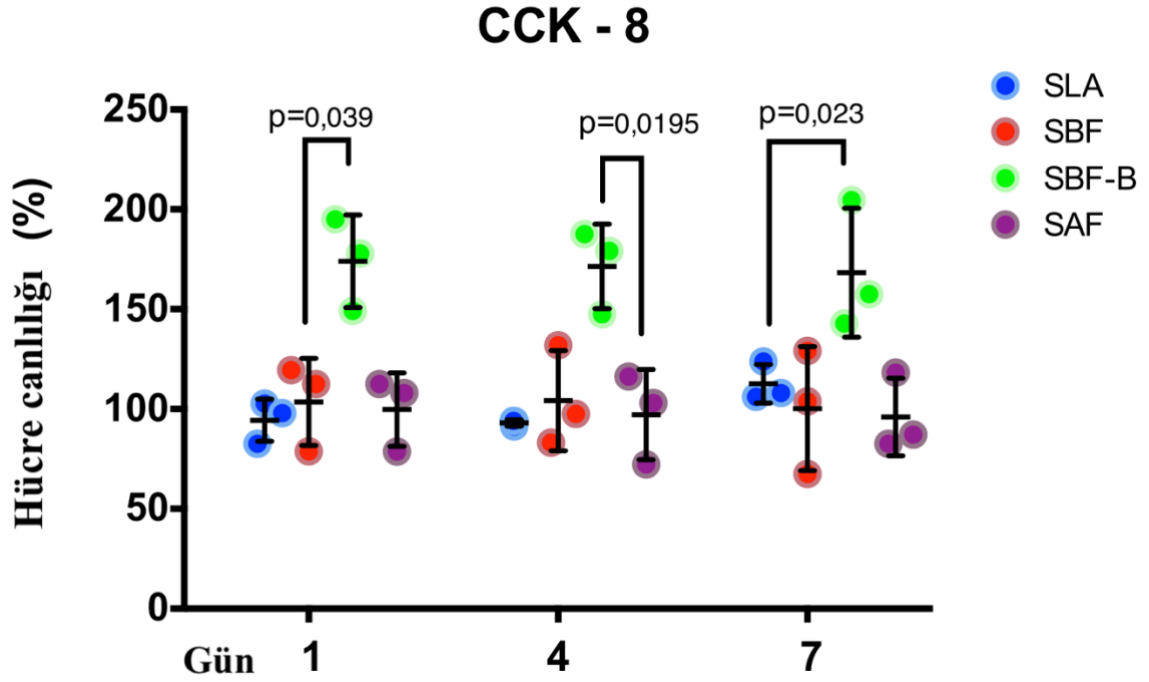
4.2.2. Hücre canlılığı / proliferasyonu (CCK-8)

Hücre proliferasyonunu değerlendirmek amacıyla CCK-8 kit kullanılmış; sonra veriler toplanarak 1,4 ve 7 günlük aralıklarla ayrı ayrı değerlendirilmiştir. 1. gün analizinde gruplar arasında hücre canlılığı (CCK-8) oranı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Kruskal-Wallis testi $p = 0.0231$). SLA, SBF, SBF-B ve SAF değerleri sırasıyla (%93.75 (IQR 41.3), %78.75 (IQR 30), %187.5 (IQR 37.5) ve %112.5 (IQR 33.8)) bir miktar farklılık göstermesine rağmen, en yüksek performansı gösteren SBF-B grubu (%187.5 (IQR: 37.5)) değeri olmuş ve sadece SBF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.039$). Kontrol SLA ve SAF grupları da, sırasıyla (93.75 (IQR: 41.3) ve 112.5 (IQR: 33.8) ile SBF'den daha fazla proliferasyon aktivite seviyesi göstermiştir. SBF grubu ise, en düşük proliferasyon aktivitesine sahip olmasıyla (78.75 (IQR: 30)); en düşük sütunda yer almıştır (Tablo 4-4; Şekil 4-4).

4. günde, analizinde gruplar arasında hücre canlılığı (CCK-8) oranı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Kruskal-Wallis testi $p = 0.0069$). SLA ve SBF benzer sonuçlar ortaya koymuştur (sırasıyla 102.7 (IQR: 14.90) ve 103.8 (IQR: 29.23)). Tüm gruplar arasında en yüksek proliferasyon aktivitesini gösteren SBF-B grubu (147.4

(IQR: 6.3)), en az proliferasyon aktivitesine sahip SAF (78.59 (IQR: 14.91)) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p = 0.0194$) göstermiştir (Tablo 4-4; Şekil 4-4).

7. günde, analizinde gruplar arasında hücre canlılığı (CCK-8) oranı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Kruskal-Wallis testi $p = 0.0003$). SBF-B sadece SLA grubuna (97.88 IQR: 14.03) ($p = 0.0229$) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiş ve (179.2 (IQR: 26.7)) değeri ile en yüksek proliferasyon aktivitesine sahip olmaya devam etmiştir. SLA'ya göre daha fazla hücre proliferasyon aktivitesi gösteren SAF grupları olmasına rağmen (sırasıyla 129.2 (IQR: 12.5) ve 108.1 (IQR: 15.2)), aralarında anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo 4-4; Şekil 4-4).



Şekil 4-4: 1., 4. ve 7. günlerde gerçekleştirilen hücre canlılığı analizinin dağılım grafikleri. 1. günde SBF * $p = 0.039$, 4. günde SAF ** $p = 0.0194$ ve 7. günde SLA * $p = 0.0229$ ile karşılaştırıldığında, 1., 4. ve 7. günde SBF-B için anlamlı farklılıklar saptanmıştır.**

Tablo 4-4: hFOB canlılığı ve proliferasyonu CCK-8 ile 1. , 4. ve 7. günde değerlendirildi.

CCK-8		SLA	SBF	SBF-B	SAF
Gün 1	Ortalama (SS)	100 (21.32)	81.25 (15.16)	180 (19.84)	103.8 (18.5)
	Medyan (IQR)	93.75 (41.3)	78.75 (30)	187.5 (37.5)	112.5 (33.8)
	(min-max)	(82.5-123.8)	(67.5-97.5) ^A	(157.5-195) ^A	(82.5-116.3)
	%95 CI	47.03-153	43.6-118.9	130.7-229.3	57.8-149.7
Gün 4	Ortalama (SS)	100 (7.813)	99.81 (15.04)	146.5 (3.262)	79.35 (7.484)
	Medyan (IQR)	102.7 (14.9)	103.8 (29.23)	147.4 (6.29) ^B	78.59 (14.91) ^B
	(min-max)	(91.2-106.1)	83.17 (112.4)	(142.8-149.1)	(72.28-87.19)
	%95 CI	80.59-119.4	62.45-137.2	138.4-154.6	60.76-97.95
Gün 7	Ortalama (SS)	100 (7.227)	126.9 (6.565)	187.3 (15.06)	109.7 (7.765)
	Medyan (IQR)	97.88 (14.03) ^C	129.2 (12.5)	179.2 (26.7) ^C	108.1 (15.2)
	(min-max)	(94.07-108.1)	(119.4-131.9)	(178-204.7)	(103-118.2)
	%95 CI	82.05-118	110.5-143.2	149.9-224.7	90.46-129

* SBF-B ve SBF arasında 1. günde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p = 0.039). 4. günde SBF-B ve SAF arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p = 0.0195). 7. günde SBF-B ve SLA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p = 0.048).

4.2.3. Osteokalsin üretimi

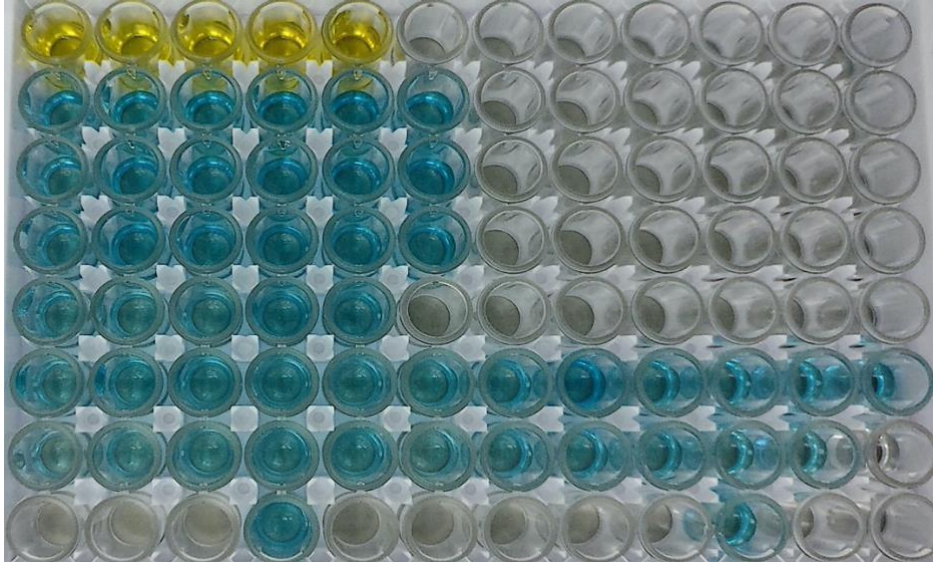
Fenotipik işaretleyici (marker) osteokalsin (OC), hücre lizatları ve ortam süspansiyonu (hücre kültürü süpernatları) temelinde ELISA testi kullanılarak iki farklı zaman aralığında (7. ve 14. gün) ayrı ayrı analiz edilmiştir (Şekil 4-5).

Hücre lizat analizi ile değerlendirilen osteokalsin sentezi ölçümü, 7. günde SBF-B grubunun diğer gruplara göre ayırt edici karakterizasyonunu da doğrulamıştır. SBF-B grubu tüm gruplar arasında en yüksek düzeyi göstermiştir (228.09 ng/ml, (IQR: 14.1)). Buna rağmen, sadece SLA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark meydana gelmiştir

(98.35 ng/ml (IQR: 8.31); $p = 0.0132$). SAF ve SBF değerleri SLA'ya yakın değerler gösterirken (sirasıyla 120.7 ng/ml (IQR: 15.7), 112.4 ng/ml (IQR: 5.8), 98.35 ng/ml (IQR: 8.31), SLA ve birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemişlerdir.

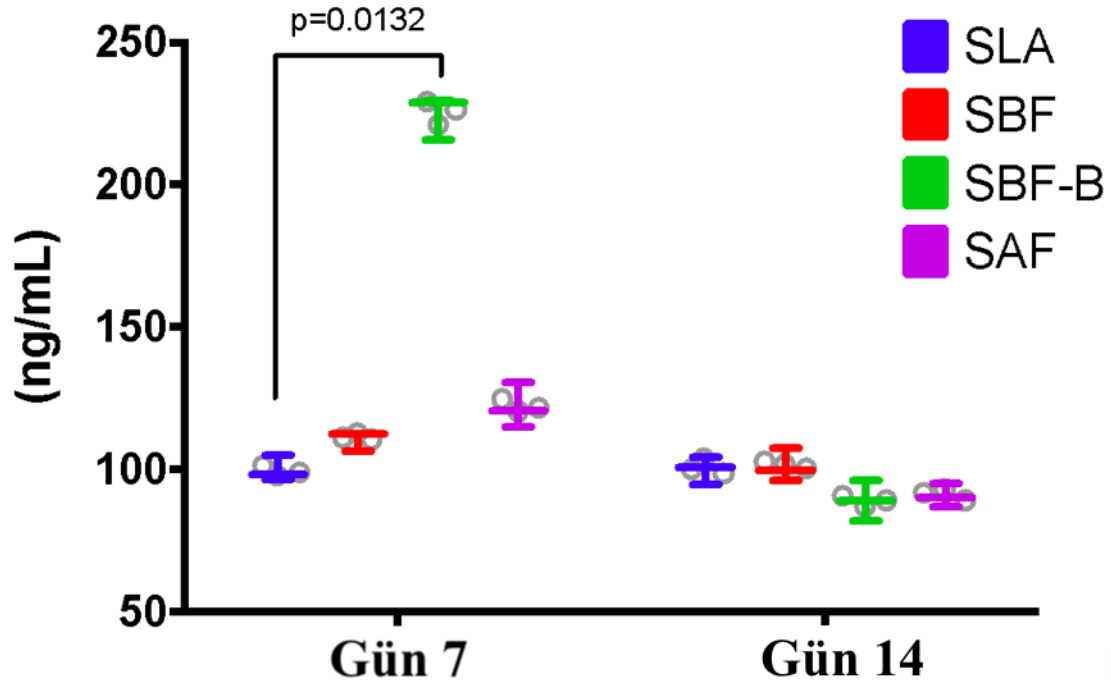
14. günde, tüm numunelerin sonuçları yakınsak (karşılaştırılabilir) bulunmuştur. OC'nin SBF-B ekspresyonu, düşüş (89.08 ng/ml, (IQR: 14.36)) gösteren, 7. gün ölümüyle karşılaştırıldığında, SAF sonucunun (90.05 ng/ml (IQR: 8.07)) yanı sıra, gruplar arasında en düşük seviyeyi göstermektedir.

SLA ve SBF sırasıyla 100.9 ng (IQR: 9.67) ve 99.73 ng/ml (IQR: 11.32) ile en yüksek seviyeleri kaydetmiştir. Yine de gruplar arasındaki fark, herhangi bir biyoistatistiksel önem göstermemiştir (Tablo 4-5; şekil 4-6).



şekil 4-5: OCN testi: Hücre ortamından ve hücre lizat işleminden osteokalsin toplandıktan sonra OCN lm için süreci.

Hücre Lizat



Şekil 4-6: Hücre kültürü ortamında osteokalsin üretiminin saçılma grafikleri

Tablo 4-5: Osteokalsin seviyeleri, iki farklı zaman aralığında hücre tabakası lizatlarında ölçüldü

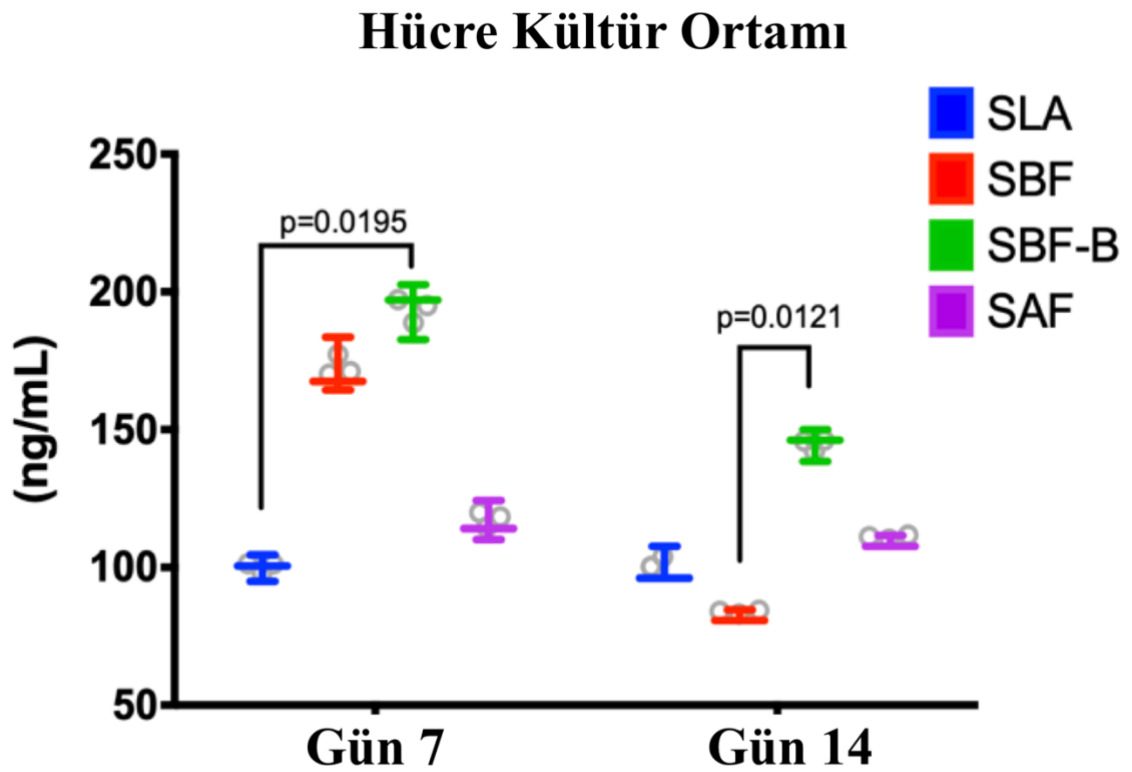
(OC) Hücre					
lizat		SLA	SBF	SBF-B	SAF
Gün 7	Ortalama		110.5		
	(SS)	100 (4.375)	(3.343)	224.8 (7.886)	122 (7.94)
	Medyan				
	(IQR)	98.35 (8.31)*	112.4 (5.80)	228.9 (14.1)*	120.7 (15.7)
	(min-max)	(96.69-105)	(106.6-112.4)	(215.7-229.8)	(114.9-130.6)
	%95 CI	89.13-110.9	102.2-118.8	205.2-244.4	102.3-141.8
Gün 14	Ortalama		101.1		
	(SS)	100 (4.897)	(5.779)	89.03 (7.18)	90.69 (4.073)
	Medyan				
	(IQR)	100.9 (9.67)	99.7 (11.3) [†]	89.08 (14.36) [†]	90.05 (8.069)
	(min-max)	(94.7-104.4)	(96.2-107.5)	(81.82-96.18)	(86.98-95.05)
	%95 CI	87.84-112.2	86.78-115.5	71.19-106.9	80.57-100.8

* SBF-B, 7. günde diğer gruplara kıyasla daha yüksek OC seviyeleri sergilemiş olmasına rağmen, sadece SLA grup ile anlamlı derece farklılık saptandı (p = 0.0132).

Öte yandan, kültür ortamına Osteokalsin salınımı, hücre lizat analizi ile karşılaştırıldığında kontrast sonuçlar göstermiştir. 7. Günde yapılan OC ölçümleri ile, en yüksek OC seviyesine SBF'nin (197.1 ng/ml (IQR: 20.0)) ve onu takiben SBF-B nin (167.6 ng/ml (IQR: 19.1)) bulunduğu doğrulanmıştır. SAF'nin (114.1 ng/ml (IQR: 14.4)) SLA grubundan (100.5 ng/ml (IQR: 9.55)) daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. SBF-B, SLA ve SAF'den çok daha iyi sonuçlar gösterse de, sadece SBF ve SLA grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur (p = 0.0194). Aralarında biyoistatistiksel olarak başka bir anlamlı fark bulunamamıştır.

14 gün sonra elde edilen sonuçlar, farklı çıkarak, SBF-B grubunun ortamında (146.2 ng/ml (IQR: 11.5)) tüm örneklerle kıyasla daha yüksek osteokalsin seviyesi bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca, SAF ve SLA, daha düşük miktarlarda OC salınımı

(sırasıyla 107.7 ng/ml (IQR: 3.8) ve 96.15 ng/ml (IQR: 11.55)) ile benzer seviyeler göstermiştir. Bu grubunun altında, en az OC sentezi birikimi ile SBF görülmüştür (80.77 ng/ml (IQR: 3.85)). SBF-B ve SBF grupları örnekler arasında sırasıyla en yüksek ve en düşük seviyelere sahip olduklarından, tek anlamlı fark bu gruplar arasında gözlenmiştir (Tablo 4-6; Şekil 4-7).



Şekil 4-7: Hücre kültürü ortamında osteokalsin üretiminin saçılma grafikleri; 7. günde SBF-B ve SLA arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p = 0.0132$)

Tablo 4-6: Osteokalsin seviyeleri, iki farklı zaman aralığında hücre kültürü ortamında ölçüldü

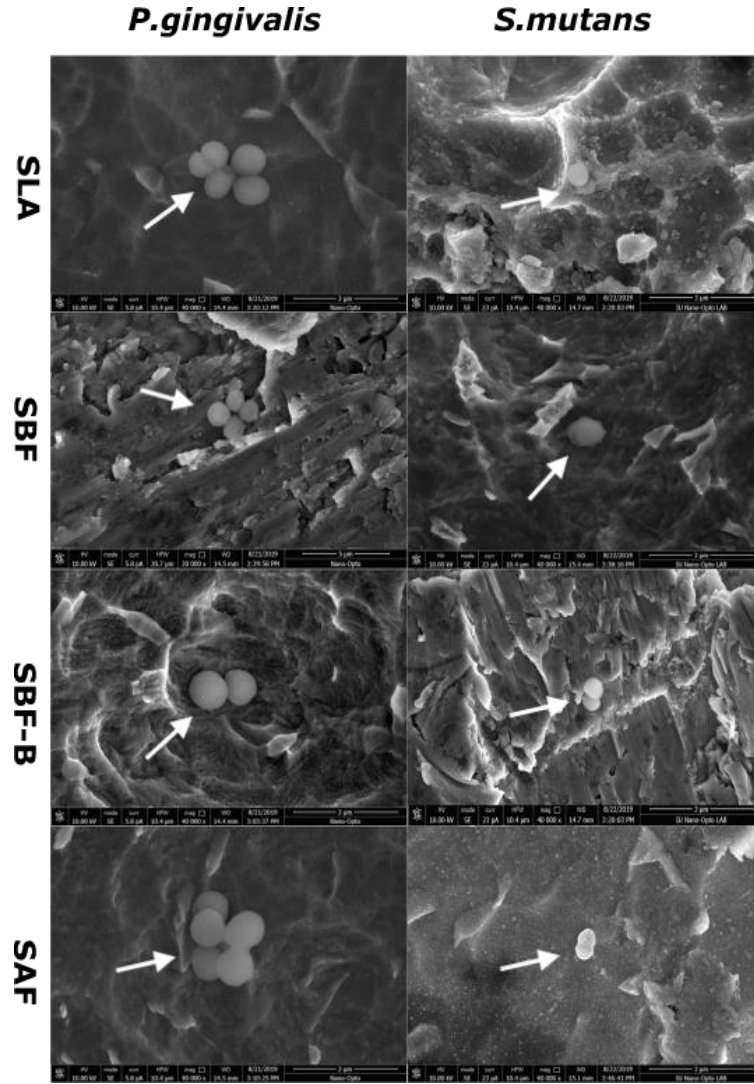
(OC) Kültür					
Medya		SLA	SBF	SBF-B	SAF
Gün 7	Ortalama				
	(SS)	100 (4.807)	171.8 (10.26)	194.1 (10.29)	116.2 (7.412)
	Medyan	100.5			
	(IQR)	(9.55)*	167.6 (19.1)	197.1 (20)*	114.1 (14.4)
	(min-max)	(94.95-104.5)	(164.4-183.5)	(182.7-202.7)	(110.1-124.5)
	%95 CI	88.06-111.9	146.3-197.3	168.6-219.7	97.81-134.6
Gün 14	Ortalama				
	(SS)	100 (6.663)	82.05 (2.223)	144.9 (5.876)	109 (2.223)
	Medyan				
	(IQR)	96.15 (11.55)	80.77 (3.85)*	146.2 (11.5)*	107.7 (3.8)
	(min-max)	(96.15-107.7)	(80.77-84.62)	(138.5-150)	(107.7-111.5)
	%95 CI	83.45-116.5	76.53-87.58	130.3-159.5	103.5-114.5

* 7. günde SBF-B ve SLA gruplar arasında ($p = 0.0195$); 14. günde SBF-B ve SBF gruplar arasında ($p = 0.0121$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı

4.3. Bakteriyel cevap

4.3.1. SEM Görüntüleme ile Adezyon Analiz

Değiştirilmiş yüzeyler üzerindeki yapışkan bakterileri morfolojisinin yüzeyler üzerinde herhangi bir fark göstermediği görülmüştür (Şekil 4-8).



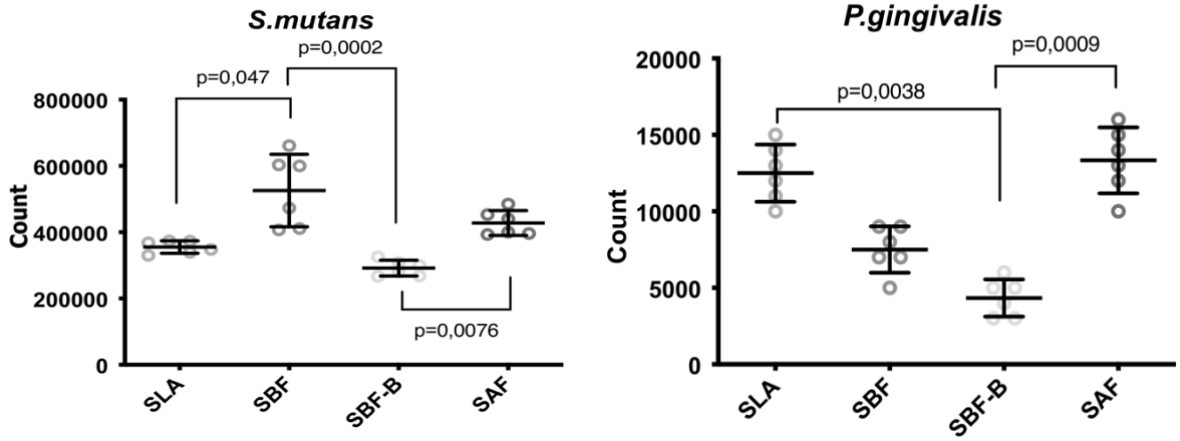
Şekil 4-8: Yüzey numuneleri üzerindeki yapışkan bakteri kolonilerinin (oklar ile işaretlenmiş) SEM mikrografları. (20k-40k x 15000, 30000 ve 50000 büyütmelerde)

4.3.2. Bakteriyel Adezyonu (CFU)

Bakteri sayısı *S. mutans* ve *P.gingivalis* için ayrı ayrı CFU bakteri sayım analizi ile hesaplanmıştır. *P.gingivalis* adherent bakteri sayısı, SBF-B grubunda (4500 (IQR: 2250)) en düşük seviyede gözlemlenirken, SBF grubunda daha fazla sayıda bakteri sayısı gözlemlenmiştir (7500 (IQR: 2500)). Buna karşılık SLA ve SAF grupları en yüksek bakteri sağ kalım değerlerini (sırasıyla 12500 CFU/ml (IQR: 3500) ve 13500 CFU/ml (IQR: 3750)) göstermiştir. SBF-B ve SBF gruplarının SLA ve SAF ile farklı

sonuçları olmasına rağmen, sadece SBF-B ve SLA grupları ($p = 0.0038$) ile SBF-B ve SAF grupları ($p = 0.0009$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterilmiştir.

S.mutans bakterisinin CFU bakteri sayım analizi sonucunda, hayatta kalan *S.mutans* bakterileri SBF-B grubu üzerinde en düşük seviyededir (290000 CFU/ml, IQR 45500); ve ardından SLA ve SAF grupları gelmektedir (358000 CFU/ml, IQR 36500 ve 420000 CFU/ml, IQR 65750). SBF grubu, hem SLA hem de SBF-B'ye kıyasla anlamlı fark kaydeden tüm gruplar arasında en yüksek sağ kalım bakteri sayım değerlerini göstermiştir (sırasıyla $p = 0.047$ ve $p = 0.0002$). Diğer bir yandan SAF grubu ise SBF-B grubuna göre anlamlı farklılık göstermiştir ($p = 0.0076$) (Tablo 4-7; Şekil 4-9).



Şekil 4-9: Bakteriye yapışma testinin saçılma grafikleri (CFU / ml)

Tablo 4-7: Deneysel yüzeylerde sayılan canlı bakteri sayısı.

Bakteri Sayımı (CFU)	SLA	SBF	SBF-B	SAF
Ortalama (SS)	355333 (18886)	525833 (109384)	291667 (23889)	427833 (37552)
Medyan (IQR)	358000 (36500) ^A	536500 (207500) ^{A,B}	290000 (45500) ^{B,C}	420000 (65750) ^C
<i>S.mutans</i> (min-max)	(330000-374000)	(407000-661000)	(267000-326000)	(393000-485000)
%95 CI	335514-375153	411041-640625	266597-316736	388425-467242
Ortalama (SS)	12500 (1871)	7500 (1517)	4333 (1211)	13333 (2160)
Medyan (IQR)	12500 (3500)*	7500 (2500)	4500 (2250)*†	13500 (3750)†
<i>P.gingivalis</i> (min-max)	(10000-15000)	(5000-9000)	(3000-6000)	(10000-16000)
%95 CI	10537-14463	5908-9092	3062-5604	11066-15600

* İstatistiksel olarak anlamlı farklar veren gruplar sembol ve harflerle işaretlenmiştir.

4.3.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Analizi (KLTM)

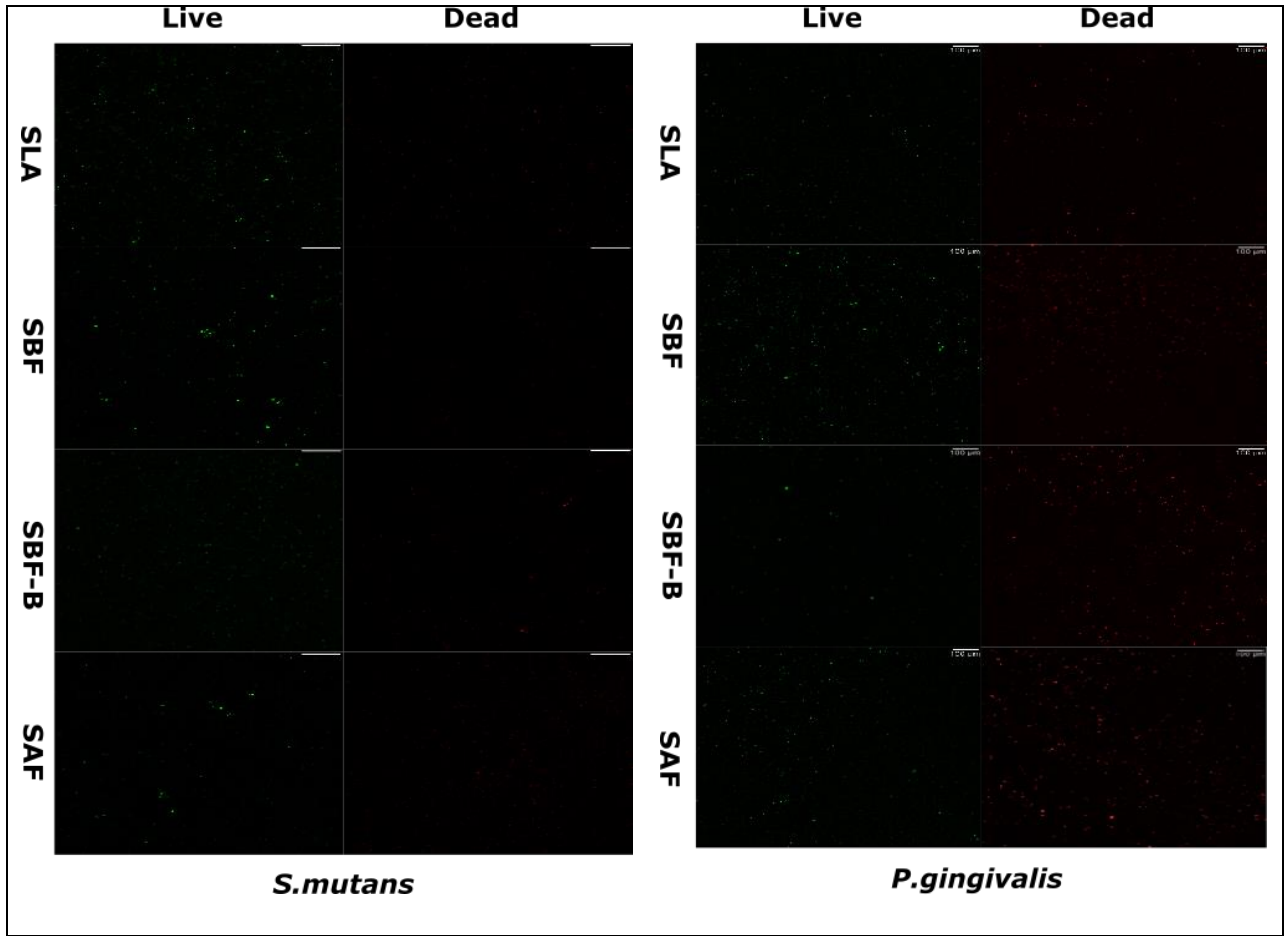
Farklı işlenmiş yüzeyler üzerindeki canlı ve cansız bakterilerin görüntüleri Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Analizi kullanılarak elde edilmiş ve buna göre analiz edilmiştir. “Live / Dead Bac LightTM Bakteriyel Canlılık ve Sayma Kiti” yardımıyla numuneler üzerinde hem canlı (yeşil) hem de cansız (kırmızı) yapışık bakteriler tespit edilerek yüzeylerin bakteriyel adezyon ve antibakteriyel etkisi gösterilmiştir. Canlı ve cansız bakterilerin görüntüleri (Şekil 4-10), hem canlı hem de cansız bakterileri aynı düzen içerisinde hesaplamak için ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir.

Sonuçlar *S.mutans* için, en düşük sayıda canlı bakteriye sahip grubun SBF-B olduğunu göstermiştir (3.0, IQR 8.50). SLA ve SAF grupları (sırasıyla IQR 12.5 (7.0)

ve IQR 19.5 (7.0)) yaklaşık olarak benzer sonuçlar göstermiştir. SBF grubu en yüksek yapışık, canlı *S.mutans* bakterisini (IQR 22.5 (25.0)) gösterirken, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 4-8; Şekil 4-11).

Yapışık cansız *S.mutans* için, SBF-B grupları en fazla sayıda cansız bakteriye (6.0 (IQR: 17.5)) sahipken, SBF, SLA ve SAF grupları, SBF-B gruplarına kıyasla daha az sayıda cansız bakteri sergilemiştir (sırasıyla 4.0 (IQR: 12.0), 1.0 (IQR: 10.5) ve 2.0 (IQR: 3.50)) (Tablo 4-8).

Öte yandan, *P.gingivalis* analiz sonuçları, ne canlı ne de cansız bakteriler açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. Bununla rağmen, SBF-B grubu örnekleri; yüzeye bağlı en az sayıda canlı ve en fazla cansız bakteriye sahip bulunmuştur (sırasıyla 125.5 (IQR: 148) ve 375.0 (IQR: 251). SAF, SBF ve SLA grupları, hem canlı (146.5 (IQR: 109.25), 155.0 (IQR: 350.8) ve 156.0 (IQR: 177.75) hem de cansız bakteriler (242.0 (IQR: 175.5), 315.5 (IQR: 123.2) ve 329.5 (IQR: 213)) için yakın sonuçlar göstermiştir (Tablo 4-8; Şekil 21).

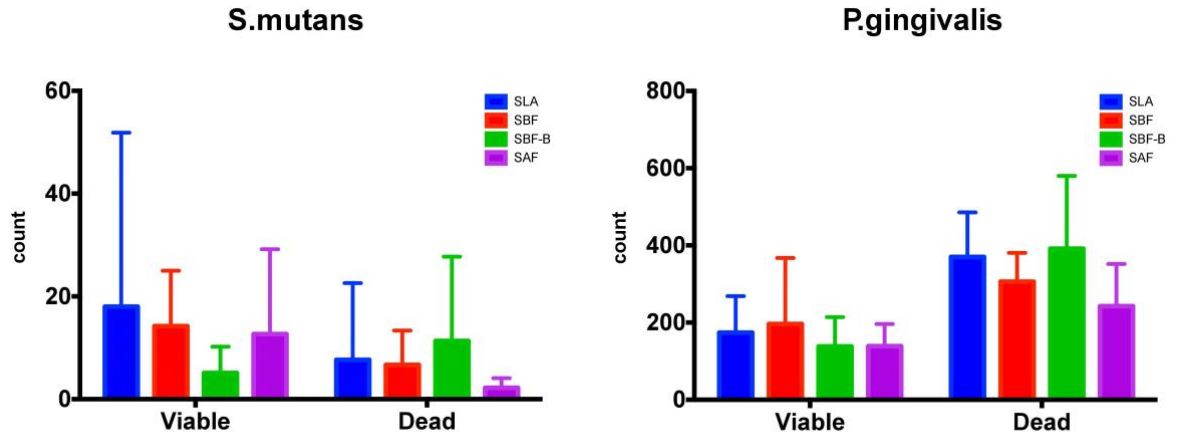


Şekil 4-10: İncelenen yüzeylere *S. mutans* ve *P. gingivalis* adezyonlarının Konfokal Lazer Tarama Mikroskopisi (KLTM) mikrografları. Canlı ve cansız bakteriler sırasıyla yeşil ve kırmızı renklere görülebilir (Live / Dead Bac Light™ boyama; 10x10 büyütme)

Tablo 4-8: Antibakteriyel aktivitenin, Live / Dead ® BacLight ™ bakteriyel canlılık kiti sonuçları ve KLTm analizi ve ImageJ yazılımı ile değerlendirilmesi

Bakteri Sayımı		SLA	SBF	SBF-B	SAF
Canlı <i>S.mutans</i>	Ortalama (SS)	18 (33.85)	14.22 (10.78)	5.111 (5.11)	12.67 (16.52)
	Medyan (IQR)	7 (12.5)	13 (18)	3 (8.5)	7 (19.5)
	(min-max)	(0-107)	(1-33)	(1-15)	(0-48)
	%95 CI	(-8.019-44.02)	(5.936-22.51)	(1.183-9.039)	(-0.03381-25.37)
Cansız <i>S.mutans</i>	Ortalama (SS)	7.667 (14.92)	6.667 (6.69)	11.33 (16.41)	2.222 (1.856)
	Medyan (IQR)	1 (10.5)	4 (12)	6 (17.5)	2 (3.5)
	(min-max)	(0-45)	(0-18)	(0-50)	(0-5)
	%95 CI	(-3.806-19.14)	(1.525-11.81)	(-1.28-23.95)	(0.7956-3.649)
Canlı <i>P.gingivalis</i>	Ortalama (SS)	174.2 (94.46)	196.2 (171.3)	138.2 (76.12)	139 (57.4)
	Medyan (IQR)	156 (177.75)	155 (350.8)	125.5 (148)	146.5 (109.25)
	(min-max)	(81-324)	(22-399)	(50-249)	(67-219)
	%95 CI	75.04-273.3	16.44-375.9	58.28-218.1	78.76-199.2
Cansız <i>P.gingivalis</i>	Ortalama (SS)	370.2 (115.4)	306 (74.51)	391.3 (188.7)	242.7 (109.4)
	Medyan (IQR)	329.5 (213)	315.5 (123.2)	375 (251)	242 (175.5)
	(min-max)	(244-535)	(187-395)	(227-745)	(117-423)
	%95 CI	249.1-491.2	227.8-384.2	193.3-589.4	127.9-357.4

* Gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4-11: Yüzeylerin canlı ve cansız bakteri sayımları

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada; titanyum yüzeyler alüminyum oksit partikülleri (Al_2O_3), borik asit partikülleri (H_3BO_3), hidroklorik asit/sülfürik asit (HCl/H_2SO_4) ve tetrafloroborik asit solüsyonu (HBF_4) ile muamele edilmiş, bu işlemin hFOB hücreleri ile iki ana oral patojen bakterinin proliferasyonu ve adezyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Deneyde kullanılan yüzeylerin Sa değerlerinin, piyasada bulunan ticari implantlara yakın değerlerde ($1.7 \mu m$) olması objektif değerlendirme yapılmasına imkân sağlamıştır. İşlemden geçirilen yüzeylerde az miktarda bor elementi tespit edilmiştir. hFOB hücrelerinin yayılması döt grupta da hemen hemen tüm disk yüzeylerini kaplamıştır. Hücre canlılığı analizi, 1. günde SBF, 4. günde SAF ve 7. günde SLA ile karşılaştırıldığında, SBF-B'nin hücre proliferasyon hızında belirgin bir artış olduğunu göstermiştir. Hücre kültürü ortamındaki OC üretim analizi de SBF-B'de en yüksek seviyeyi rapor etmiş ve 7. günde SLA ve 14. günde SBF ile karşılaştırıldığında önemli bir farklılık göstermiştir. Hücre lizat analizinde OC sadece 7. günde SBF-B ve SAF arasında anlamlı bir fark göstermiştir. Bakteriyel adezyon açısından bakıldığında, CLSM analizinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamışken; CFU analizinde grupların geri kalanı ile karşılaştırıldığında SBF-B'de *S.mutans*'ın az sayıda yapışan bakteri göstermesi ile anlam bir fark saptanmıştır. Ayrıca, *P.gingivalis* adezyonu SBF-B'de en düşük sayıyı kaydetmiş, ancak anlamlı fark sadece SLA ve SAF gruplarına kıyasla tespit edilmiştir. Sonuç olarak en yüksek osteoblast afinitesi ve bakteriyel tutunmaya karşı en fazla direnç, borik asit püskürtülmüş ve tetrafloroborik asit ile muamele edilmiş titanyum alaşımı yüzeylere borik asit solüsyonu uygulanması sonucu gözlenmiştir.

In vitro çalışma:

Mevcut çalışma, yeni biyomateriyaller ve modifikasyonlarına dair pilot bir çalışma olup ileri araştırmalar öncesinde test edilmesi gerekmektedir. Yeni biyomateriyaller ve/veya modifikasyonlarına dair in vitro deneylerin yapılması, canlı hücreler ile

herhangi bir materyal ve/veya modifikasyonu arasında gerçekleşmesi muhtemel reaksiyonların anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Bu deneyler, daha ideal ve etkili sonuçların alınması açısından, materyal ve modifikasyonların ve/veya kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi için de yol gösterici olabilmektedir.

Yeni biyomateryaller göz önüne alındığında, biyomateryal kaynaklı hücre sinyal moleküllerinin anlaşılması stratejik bir öneme sahiptir. Örneğin, monositlerin / makrofajların yabancı cisim reaksiyonundaki rolü [292][293], osteoblastlar ile ilgili spesifik bilgiler [294], aşınma parçacıklarına verilen osteoklast yanıtları (Makihira, Mine et al. 2007) ve yüzey topografisinin spesifik in vitro analizlerinde taranabilir. Böylece, günümüzde in vitro deneyler, malzeme güvenliği açısından biyomedikal cihaz tasarımında giderek daha popüler hale gelmiştir.

Öte yandan, biyomalzemelerin güvenliği şu anda in vitro olarak test edilmesine rağmen, ABD'deki Ulusal Sağlık Enstitüleri gibi düzenleyici ve bilimsel devlet kurumları, daha kompleks laboratuvar tabanlı test yöntemleri geliştirmeye ilgi duyduklarını ifade etmişlerdir.

Amaç, konakçı dokuya benzer hücresel içerik ve mimari sunan organ kültürleri gibi daha temsili ve öngörücü in vivo davranış modelleri geliştirmektir [289].

hFOB Hücreler:

Mevcut çalışmada, borik asit ve modifikasyonlarının canlı insan hücreleri üzerindeki muhtemel etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hFOB hücreler kullanılmıştır. Benzer araştırmalarda bu amaçla çeşitli hücreler kullanılmıştır [305][306]. İnsan primer osteoblast hücrelerini (HOB'ler) kullanmanın temel avantajı, türler arası farklılıkların olmaması ve farklılaştırılmış fenotiplerini in vitro olarak korumasıdır. Steven A.Harris, yaptığı çalışmada, hFOB 1.19 klonal hücre çizgisinin, insan osteoblast farklılaşmasının belirli aşamalarını incelemek için, homojen bir şekilde hızla çoğalan bir model sistemi sağladığını bulmuştur [305][306].

CCK-8:

CCK-8, bu çalışmada hücre canlılığı ve proliferasyon aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu tip araştırmalar için MTT, XTT, WST-1,

MTS gibi farklı yöntemler mevcuttur [307]. CCK-8, sağladığı avantajların diğer yöntemlerin avantajlarından üstün olması sebebiyle tercih edilmiştir. CCK-8; oda sıcaklığında en az 6 ay, 0-5 °C’de ise 1 yıl stabil kalabilmektedir. CCK-8 formazan ve 1-metoksi PMS’nin kültür ortamındaki hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olmadığından, bir önceki deneyde kullanılan aynı hücreler ek deneyler için de kullanılabilir. In vitro deneylerde CCK-8 kullanmanın diğer bir avantajı ise deney prosedürünün tamamlanması için ek adımlara ihtiyaç olmaması ve bu sayede kısa zamanda gerçekleştirilebilmesidir [308].

Yüzey Pürüzlülüğü Parametreleri:

Orta derecede yüzey pürüzlülüğüne sahip implantlar (yaklaşık 1.7 μm), tormalanmış veya yüksek derecede pürüzlü yüzeylere kıyasla ciddi avantajlar sağlamaktadır [309] ve oral implantoloji alanında endüstri standardı olarak kabul görmektedir. Bu sebeple bu çalışmada, ticari implantların topoloji ve topografisini temsil edecek şekilde 1,5-2 μm yüzey pürüzlülüğüne sahip implantlar kullanılmıştır.

Wennerberg, yüzey mikrotopografisinin kesin olarak saptanması için yüksekliğin, uzamsal ve hibrit betimleyici parametrelerin değerlendirilmesi gerekliliğini savunmuştur [175]. Anselme ve arkadaşları, yüzey pürüzlülüğünün genlik ve yapısal bütünlük açısından değerlendirilmesi gereken bir faktör olduğundan bahsetmiştir [20]. İmplant Yüzeyi Tanımlama Standartları (ISIS) sistemi, yüzey mikrotopografisini ölçme ve sınıflandırma amacıyla Sa ve Sdr parametrelerini seçmiştir. Sa, yüzey mikrotopografisinin ortalama yükseklikteki deviasyon genliğini temsil ederken; Sdr, yüzey topografisinin piklerinin sayısı ve yüksekliğinin integrasyonunu temsil etmektedir [310]. Yüzey mikrotopografisinin ileri ve kesin tanımı için, hibrit ve uzamsal parametreler göz önüne alındığında KLSM analizleri ile benzerlik gösteren, optik profilometri analizleri yapılmıştır. Örnekler arasında Sa değerleri bir dereceye kadar benzerlik gösterse de, bazı uzamsal ve hibrit parametrik değerlerde şiddetli varyasyonlar gözlenmiştir. Üretimde yüzey modifikasyonu amacıyla farklı materyallerin kullanılması, her parametre ölçeğinde spesifik ve benzer değerlerin alınmasını güçleştirmektedir.

Bu deneyde yüzey preparasyonu işlemleri esnasında Ti-disklere tetrafloroborik asit uygulandığı anda kimyasal etkileşim gerçekleşti. Pürüzlülük seviyesi, osteoblastik hücrelerin farklılaşma ve proliferasyon kapasitesini etkilediğinden ve kimyasal yapının da kendi etkileri olduğu bilindiğinden[184], her modifikasyon yöntemi için kimyasal yapıyı ve element seviyesini belirlemek üzere yüzey analizi işlemleri uygulandı.

Kumlama ve dağlama yoluyla borun kuvvetli uygulanmasına rağmen, yüzey bileşimi (XPS spektrumları) Ti numunelerinde çok düşük seviyelerde B elementi göstermiştir. Flor elementinin Ti yüzeyine afinitesi, borik asit ve tetrafloroborik asit ile çok zayıf bir kimyasal bağa sahip gibi görünmekteydi. Bu, yüzeylerin nihai yoğun yıkamasından kaynaklanabilir. Ayrıca, tetrafloroborik asidin substrat ile reaksiyonu aşındırıcı görünmektedir ve reaksiyon sırasında hidrojen atomunun değişimi disk substratı ile daha fazla baği bloke etmiş olabilir [311][312]. Bu bulgulara dayanarak, mevcut metodolojinin, Ti yüzeyinde bor (B +) ve flor (F-) iyonlarının yeterli tutulması için elverişsiz olduğu sonucuna varılabilir. Bununla birlikte, bu metodolojinin başka faydalar sağladığı görülmüştür. Karbon ve Osteoblast yokluğu ve ilgili kemik biriktirme mekanizmasının hidrokarbon kontaminasyonunun azaltılması ve bunun sonucunda oksijenin artmasıyla arttığı gösterilmiştir [313]. Bu bulgulara istinaden kullanılan metodolojinin Ti yüzeylerde boron tutulumu sağlamakta yetersiz olduğu sonucuna varılabilir.

Kumlama ve dağlama yoluyla borun kuvvetli uygulanmasına rağmen, yüzey bileşimi (XPS spektrumları) Ti numunelerinde çok düşük seviyelerde B elementi göstermiştir. Flor elementinin Ti yüzeyine afinitesi, borik asit ve tetrafloroborik asit ile çok zayıf bir kimyasal bağa sahip gibi görünmekteydi. Bu, yüzeylerin nihai yoğun yıkamasından kaynaklanabilir. Ayrıca, tetrafloroborik asidin substrat ile reaksiyonu aşındırıcı görünmektedir ve reaksiyon sırasında hidrojen atomunun değişimi disk substratı ile daha fazla baği bloke etmiş olabilir [311][312]. Bu bulgulara dayanarak, mevcut metodolojinin, Ti yüzeyinde bor (B +) ve flor (F-) iyonlarının yeterli tutulması için elverişsiz olduğu sonucuna varılabilir. Bununla birlikte, bu metodolojinin başka faydalar sağladığı görülmüştür. Karbonun azalmasına ve Osteoblast ile ilişkili kemik

birikiminin artışına, hidrokarbon kontaminasyonunun azalması ve oksijen artışının neden olduğu gösterilmiştir [313]. Bu bulgulara istinaden kullanılan metodolojinin Ti yüzeylerde boron tutulumu sağlamakta yetersiz olduğu sonucuna varılabilir.

Yüzeylerde karbon ve oksijen:

Hidrokarbon ve takip eden oksijen kontaminasyonunun azaltılmasıyla osteoblast ve ilgili kemik depozisyon mekanizmalarının arttığı gösterilmiştir [313]. Çalışmamızın bulgularına göre; tetrafloroborik asit-uygulanmış yüzeylerin karbon dioksit (CO₂) etkileşimi ve adsorpsiyon oranlarının SLA yüzeylere kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir. Özellikle SBF-B en düşük karbon ve en yüksek oksijen yüzdelerini sergilemiştir. Bu durum da borik asidin Ti yüzey kimyası üzerindeki olumlu etkilerine bir işaret olarak kabul edilebilir.

Bu bulgulara istinaden kullanılan metodolojinin Ti yüzeylerde boron tutulumu sağlamakta yetersiz olduğu sonucuna varılabilir.

Borik asit (BA) konsantrasyonu:

“Tüm maddeler zehirdir; zehir olmayan hiçbir madde yoktur. Doğru doz devayı zehirden ayırt edebilir.” Paracelsus.

Yeni bir materyal dozu , canlı bir vücuda uygulanmadan önce belirlenmesi gereken esas faktördür, zira etkin maddedeki artış ya da azalış vücut üzerindeki etkiyi değiştirebildiği gibi, insan vücudunun maddeye gösterdiği tepki de etkileri değiştirebilir [314]. Dahası, bu gibi konulardaki en zor mesele, hücre canlılığındaki dalgalanma ve borik asidin antibakteriyel etkisi arasındaki avantajlı dengenin en doğru değerini bulmaktır. Buna ilaveten, materyalin etkilerini değerlendirmek için uygulanan farklı testler değişken sonuçlar üretmiştir [42], bu da bizi karar verme sürecinde, göreceli bir karara, yani bir karmaşıklık durumuna sürükler. BA için gelişimsel bir defekt tespit eden NOAEL değerinin (gözlenmeyen-yan etki düzeyi) günde 55 mg borik asit/kg olduğu değerlendirilmiş, sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmaya göre bu değer günde 9.6 mg B/kg’a eşdeğer bulunmuştur [315].

Tetraforoborik asit

Tetrafloroborik asit güçlü bir asittir [316]. Tetrafloroborik asit, dental implant üretimi sürecinde çok-basamaklı implant yüzey modifikasyonu işlemleri sırasında uygulanmaktadır [52][50][51]. Botticelli ve ark. tarafından yapılan tüm çalışmalar aynı modifiye edilmiş yüzeyleri kullansa da, tetrafloroborik asit bileşiği, yüzeylere uygulanan bir çok sıralı kimyasal reaksiyonlardan sadece birini temsil etmektedir. Bu durum, imalatlarda çoklu varyasyon faktörleri gösterilmesine neden olmuştur. Yüzey karakterizasyon araştırması yapılmadan bir dizi kimyasal reaksiyon uygulamak, tetrafloroborik asit etki çalışmasını daha az güvenilir hale getirmektedir.

OCN and hFOB:

Bu çalışmada kullanılan hFOB, in -vitro ortamda implant yüzeylerinde osteoblasta benzer davranışlar gösteren, insan fetal ostablast hücre hattıdır. Bu hFOB hücre hattı, SaOs2 veya MC3T3 gibi diğer hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında, insan hücresine benzer özellik sergileyen en yüksek hücre standardına sahip olarak kabul edilir [306].

Osteokalsin seviyesi; mineralizasyonun erken dönem , osteoblast farklılaşmasının ise geç dönem belirteci olarak kabul edilir. Deney dönemi boyunca, SBF-B yüzeyinde, en yüksek hücre canlılığı ve osteokalsin üretimi gözlenmiştir [317].

SBF-B yüzeyinin osteokalsin ekspresyonu, hücre lizatı üzerinde çeşitli inceleme dönemlerinde 7. günde anlamlı derecede yüksek regülasyon göstermiştir. Toplanan hücre kültür ortamı ölçümlerinde ise 7. ve 14. günlerde yüksek regülasyon göstermiştir. Hakkı ve ark. yaptıkları bir çalışmada borik asit içeren örneklerde pre-osteblastik hücreler kullanmışlar (MC3T3-E1) ve osteokalsin mRNA ekspresyon testinde anlamlı derecede yüksek regülasyon bulduklarını bildirmişlerdir [42].

Diğer taraftan, Ying ve ark., borik asitin çoklu konsantrasyonunu ve bunların kemik iliği stromal hücreleri (BMSC' ler) üzerindeki etkilerini araştırmış ve 1, 10 ve 100 ng / ml konsantrasyonlarda stromal hücrelerin proliferasyonlarını arttıran bir etkilerinin olmadığını bildirmişlerdir ($P > 0.05$). Buna karşılık, 1000 ng / ml konsantrasyonun, hücrelerin proliferasyon aktivitelerini ($P < 0.05$) 4,7 ve 14. günde

inhibe ettiği görülmüştür. 10 ve 100 ng / ml B tedavisinin ise daha yüksek osteokalsin mRNA salınımını tetiklediği gözlenmiştir ($P < 0.05$) [46].

Borlanmış bileşiklerin, in-vitro ve in-vivo ortamlarda anti-osteoporotik ve anti-enflamatuar özellikler, sergilediği bildirilmiştir [318].

Liu ve arkadaşları, borik asit ve çinko borat-magnezyum borat gibi diğer bor Liu ve arkadaşları, borik asit ve çinko borat-magnezyum borat gibi diğer bor bileşiklerinin osteogenez üzerinde, osteoblastik farklılaşmayı arttıran ve ALP aktivitesini yükselten ve kemikle ilgili genleri ve kalsiyum biriktirilmiş minerallerin regülasyonunu arttıran etkinliklerinin olduğunu belirtmişlerdir [319]. Bu dorultuda Xia ve ark. Polikaprolakton kompozit üzerine ağırlığının %30'u oranında bor uyguladıkları bir çalışmada benzer şekilde osteokalsinin artmış regülasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir [320]. Bu sonuçlar, borik asit solüsyonu ilavesinin, osteogenezin başlamasını ve osteoblast canlılığını önemli ölçüde artırabileceğini göstermektedir.

Yüzeyler üzerinde bakteri yoğunluğu ve etkinliğini gösteren analizler incelendiğinde ise; bakteriyel adezyon ve CLSM analizleri de hücresel analizlerin pozitif sonuçlarını doğrularken, SBF-B yüzeyi diğer yüzeylere oranla daha düşük bir bakteriyel adezyon göstermiştir. Fakültatif olarak anaerobik, gram-pozitif bir kok olan *S.mutans*, oral biyofilm oluşumunda ve olgunlaşmasındaki hayati rolü nedeniyle, ağız boşluğundaki önemli hastalık aktivatörlerinden biridir. Non-motil, Gram-negatif, anaerobik bir bakteri olan *P.gingivalis* ise, periodontitis ve peri-implant kemik yıkımının başlamasından sorumlu olan [321][322][323], disbiyotik sürece katkıda bulunan ve hastalığın prognozunda anahtar görevi gören bir patojendir [324]. Borik asit çözeltisinin SBF yüzeyine (SBF-B) uygulanması, her iki bakterinin de istatistiksel olarak anlamlı derecede en düşük canlılık oranıyla sonuçlanmıştır. Benzer sonuç, borun kateterler veya protez eklemler gibi kalıcı tıbbi malzemelerin küçük boşluklarına borosilikat ince cam formunda uygulanmasıyla da bildirilmiştir. Borun, biyofilmi % 90'ını azalttığı rapor edilmiştir [325]. Sopchenski ve ark., çalışmalarında bor katkılı TiO₂ kaplamasının, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde bakterisidal aktivitesini gözlemlemiştir [326]. Başka bir çalışmada Wang ve ark., *S.mutans* ve *P.gingivalis*, bakteri canlılığı kitleri (Live / Dead BacLight) ile karbon fiberle güçlendirilmiş polietereeterketonu (CFRPEEK) araştırmak için kullanmış CLSM yardımıyla analiz edildikten sonra bu kitlerin materyalin antibakteriyel etkisini ortaya

koymak için etkili olduğunu göstermiştir [302]. Bor bileşiklerinin anti-bakteriyel özelliğini kanıtlayan bu bulgulara dayanılarak, borik asitin özellikle Ti yüzey uygulamalarına ek olarak kullanılması önerilebilir.

Mevcut bulgular Bor elementinin; kalsiyum, magnezyum ve D vitamini fonksiyonları üzerindeki rolü ile insan kemik sağlığını desteklediğini ve genel sağlık açısından yarar sağladığını göstermiştir [327]. Sayin ve ark. yaptıkları bir çalışmada, istatistiksel anlamlı sonuçlara ulaşamamaları da borik asit (BA) ve disodyum oktaborat tetrahidratın (DOT) farklı bakteriler üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri olduğunu bildirmişlerdir [287]. Zan ve ark., borik asidin *E.faecalis* biyofilmelerine karşı da bakterisidal etkisi olduğunu bildirmiş ve kök kanal tedavisi irrigasyonlarında borik asidin yüksek konsantrasyonda kullanımını önermişlerdir [328]. Sayin ve arkadaşları, bor içeren bileşiğin bakteriyel biyofilm üzerindeki etkisini istatistiksel olarak anlamlı bulamamaları da, bu bileşiğin çeşitli antibakteriyel ve antibiyofilm etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir [287].

CFU sonuçlarına göre, gruplar yaklaşık aynı pürüzlülük değerine sahip olsalar da, *S.mutans* kolonizasyonu açısından SBF yüzeylerin; SLA ve SBF-B yüzeyler ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek sonuçlara sahip olduğu; *P.gingivalis* kolonizasyonu açısından incelendiğinde ise SBF-B yüzeylerin; SAF ve SLA yüzeyler ile karşılaştırıldığında daha düşük sonuçlara sahip olduğu bulunmuştur. Yüzey pürüzlülüğünün ve ıslanabilirliğinin bakterilerin adezyon özelliklerini etkileyebileceği ileri sürülmüştür [329]. Bakterilerin erken kolonizasyonu, yüzey topografisi ile ilişkili bulunmuştur [330]. Buna karşın Lin ve arkadaşları, *S.mutans* veya *P.gingivalis* biyofilmelerinin oluşum miktarında yüzey pürüzlülüğün etkisinin olmadığını bildirmiştir [331]. Jeyachandran ve ark., titanyum, titanyum nitrür ve modifiye edilmiş hidroksiapatit kaplama üzerine yapılan in vitro çalışmalarında, pürüzlü yüzey grupları üzerinde daha az bakteriyel adezyon rapor etmişlerdir. Bu durum, çeşitli kaplama kompozisyonlarının; gruplar arasındaki bakteriyel adezyon varyasyonlarını açıklamada, etkili olduğunu düşündürmektedir [332].

Sonuç

- Tüm gruplarda yüzey pürüzlülüğünün Sa değerleri yaklaşık olarak benzer olsa da hibrit ve uzamsal parametreler gruplar arasında değişkenlik göstermiştir.
- XPS analizi ile, tüm yüzeylerin oksijen (O), titanyum (Ti) ve karbon (C) ana bileşenlerini içerdiği tespit edilmiştir. SBF ve SBF-B yüzeyleri en düşük karbon (C) element konsantrasyonlarını, SLA yüzeyi ise en düşük O konsantrasyonunu ortaya çıkarmıştır.
- Osteoblast hücre kültürü analizine dayanarak, tüm grupların tüm örneklerinde hücre yapışması gözlenmiştir. Ayrıca, CCK-8 analizi ile SBF-B grubu 1., 4. ve 7. günlerde tüm gruplar ile karşılaştırıldığında en yüksek hücre canlılığı / proliferasyonu değerini kaydetmiştir.
- Hücre kültürü ortamındaki Elisa testi, 7. ve 14. günde SBF-B grubunda en yüksek osteokalsin değerlerini göstermiştir. Hücre lizati üzerindeki Elisa testi ise, sadece 7. günde SBF-B grubunda en yüksek osteokalsin değerlerini göstermiştir.
- CFU analizi, grupların geri kalanına kıyasla *P.gingivalis* ve *S.mutans* adezyonu açısından SBF-B'de en az bakteri sayımını göstermiştir.
- Yüzeylerin canlı ve cansız bakteri sayımlarının yapıldığı KLTM analizi, tüm gruplar arasında herhangi anlamlı bir fark göstermemiştir.

Bu sonuçlara dayanarak, Ti implant yüzeylerine borik asit çözeltisi eklenmesinin, etkin bir antibakteriyel yapışma görevi görebileceği; SBF-B yüzeyi ile gösterildiği gibi osteoblast adezyon ve aktivitesini artırabileceği sonucuna varılabilir.

Ti Dental implantların yüzey modifikasyonunda borik asit bileşikler uygulamaların in-situ ve klinik uygulamadaki potansiyelini etkinliğini açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Juodzbals G, Sapragoniene M, Wennerberg A, Baltrukonis T. Titanium dental implant surface micromorphology optimization. *J Oral Implantol* 2007;33:177–85. [https://doi.org/10.1563/1548-1336\(2007\)33\[177:TDISMO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1563/1548-1336(2007)33[177:TDISMO]2.0.CO;2).
- [2] Lee MH, Park IS, Min KS, Ahn SG, Park JM, Song KY, et al. Evaluation of in vitro and in vivo tests for Surface-modified Titanium by H₂so₄ and H₂O₂ Treatment. *Met Mater Int* 2007;13:109–15. <https://doi.org/10.1007/BF03027560>.
- [3] Stanford CM. Surface modifications of dental implants. *Aust Dent J* 2008;53:S26–33. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00038.x>.
- [4] Chang H-I, Wang Y. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. *Regen. Med. Tissue Eng. - Cells Biomater.*, InTechOpen; 2011. <https://doi.org/10.5772/21983>.
- [5] Longo G, Ioannidu CA, D’Abusco AS, Superti F, Misiano C, Zanoni R, et al. Improving osteoblast response in vitro by a nanostructured thin film with titanium carbide and titanium oxides clustered around graphitic carbon. *PLoS One* 2016;11:e0152566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152566>.
- [6] Liao H, Andersson AS, Sutherland D, Petronis S, Kasemo B, Thomsen P. Response of rat osteoblast-like cells to microstructured model surfaces in vitro. *Biomaterials* 2003;24:649–54. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00379-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00379-4).
- [7] 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;30:145–55. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199602\)30:2<145::AID-JBM3>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199602)30:2<145::AID-JBM3>3.0.CO;2-R).
- [8] Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2004;25:625–31. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00571-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00571-4).
- [9] Lin N, Huang X, Zou J, Zhang X, Qin L, Fan A, et al. Effects of plasma nitriding and multiple arc ion plating TiN coating on bacterial adhesion of commercial pure titanium via in vitro investigations. *Surf Coatings Technol* 2012;209:212–5. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2012.07.046>.

- [10] Ji MK, Park SW, Lee K, Kang IC, Yun KD, Kim HS, et al. Evaluation of antibacterial activity and osteoblast-like cell viability of TiN, ZrN and (Ti1-xZrx)N coating on titanium. *J Adv Prosthodont* 2015;7:166–71. <https://doi.org/10.4047/jap.2015.7.2.166>.
- [11] Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD, et al. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 2006;27:5512–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.003>.
- [12] Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K, Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: Dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *J Photochem Photobiol A Chem* 1997;106:51–6. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(97\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(97)00038-5).
- [13] Koban I, Holtfreter B, Hübner NO, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, et al. Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - Proof of principle experiment. *J Clin Periodontol* 2011;38:956–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01740.x>.
- [14] Anil S, Anand PS, Alghamdi H, Janse JA. Dental Implant Surface Enhancement and Osseointegration. *Implant Dent. - A Rapidly Evol. Pract.*, InTech; 2011. <https://doi.org/10.5772/16475>.
- [15] Garg H, Bedi G, Garg A. Implant surface modifications: A review. *J Clin Diagnostic Res* 2012;6:319–24.
- [16] Jiang Y, Zhang L, Wen D, Ding Y. Role of physical and chemical interactions in the antibacterial behavior of ZnO nanoparticles against *E. coli*. *Mater Sci Eng C* 2016;69:1361–6. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.044>.
- [17] Dědková K, Janíková B, Matějová K, Čabanová K, Váňa R, Kalup A, et al. ZnO/graphite composites and its antibacterial activity at different conditions. *J Photochem Photobiol B Biol* 2015;151:256–63. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.017>.
- [18] Kim H, Choi S-H, Ryu J-J, Koh S-Y, Park J-H, Lee I-S. The biocompatibility of SLA-treated titanium implants. *Biomed Mater* 2008;3:025011. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/2/025011>.
- [19] Vrouwenvelder WCA, Groot CG, de Groot K. Histological and biochemical

- evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxylapatite, titanium alloy, and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 1993;27:465–75. <https://doi.org/10.1002/jbm.820270407>.
- [20] Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155–66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200002\)49:2<155::AID-JBM2>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200002)49:2<155::AID-JBM2>3.0.CO;2-J).
- [21] Protivínský J, Appleford M, Strnad J, Helebrant A, Ong JL. Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:542–50.
- [22] Nakazawa M, Yamada M, Wakamura M, Egusa H, Sakurai K. Activation of Osteoblastic Function on Titanium Surface with Titanium-Doped Hydroxyapatite Nanoparticle Coating: An In Vitro Study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2017;32:779–91. <https://doi.org/10.11607/jomi.5421>.
- [23] Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:975–82. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x>.
- [24] Quirynen M, Vogels R, Peeters W, Van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of “pristine” peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:25–37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01194.x>.
- [25] Zitzmann NU, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J. Experimental peri-implant mucositis in man. *J Clin Periodontol* 2001;28:517–23. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028006517.x>.
- [26] Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35:286–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x>.
- [27] Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, et al. Primary prevention of peri-implantitis: Managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol* 2015;42:S152–7.
- [28] Algraft H, Borumandi F, Cascarini L. Peri-implantitis. *Br J Oral Maxillofac*

- Surg 2012;50:689–94.
- [29] Figuero E, Graziani F, Sanz I, Herrera D, Sanz M. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontol* 2000 2014;66:255–73. <https://doi.org/10.1111/prd.12049>.
 - [30] Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T. Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:440–6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01137.x>.
 - [31] Klinge B, Flemming T, Cosyn J, De Bruyn H, Eisner BM, Hultin M, et al. The patient undergoing implant therapy. Summary and consensus statements. The 4th EAO Consensus Conference 2015. *Clin Oral Implants Res* 2015;26:64–7. <https://doi.org/10.1111/clr.12675>.
 - [32] Lindeboom JAH, Tjiook Y, Kroon FHM. Immediate placement of implants in periapical infected sites: A prospective randomized study in 50 patients. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2006;101:705–10. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.08.022>.
 - [33] Alt V, Bitschnau A, Österling J, Sewing A, Meyer C, Kraus R, et al. The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 2006;27:4627–34. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.035>.
 - [34] Kozlovsky A, Artzi Z, Moses O, Kamin-Belsky N, Greenstein RB-N. Interaction of Chlorhexidine With Smooth and Rough Types of Titanium Surfaces. *J Periodontol* 2006;77:1194–200. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050401>.
 - [35] Radin S, Campbell JT, Ducheyne P, Cuckler JM. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials* 1997;18:777–82. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00190-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00190-1).
 - [36] Lessa FCR, Aranha AMF, Nogueira I, Giro EMA, Hebling J, Costa CA de S. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci* 2010;18:50–8. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572010000100010>.
 - [37] He G, Wu Y, Zhang Y, Zhu Y, Liu Y, Li N, et al. Addition of Zn to the ternary Mg-Ca-Sr alloys significantly improves their antibacterial properties. *J Mater Chem B* 2015;3:6676–89. <https://doi.org/10.1039/c5tb01319d>.
 - [38] Seuss S, Heinloth M, Boccaccini AR. Development of bioactive composite

- coatings based on combination of PEEK, bioactive glass and Ag nanoparticles with antibacterial properties. *Surf Coatings Technol* 2016;301:100–5. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.03.057>.
- [39] Jimbo R, Sawase T, Baba K, Kurogi T, Shibata Y, Atsuta M. Enhanced initial cell responses to chemically modified anodized titanium. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10:55–61. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2007.00061.x>.
- [40] Sopchenski L, Cogo S, Dias-Ntipanyj MF, Elifio-Espósito S, Popat KC, Soares P. Bioactive and antibacterial boron doped TiO₂ coating obtained by PEO. *Appl Surf Sci* 2018;458:49–58. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.07.049>.
- [41] Sacco P, Furlani F, Cok M, Travan A, Borgogna M, Marsich E, et al. Boric Acid Induced Transient Cross-Links in Lactose-Modified Chitosan (Chitlac). *Biomacromolecules* 2017;18:4206–13. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01237>.
- [42] Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol* 2010;24:243–50. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.03.003>.
- [43] Sağlam M, Hatipoğlu M, Köseoğlu S, Esen HH, Kelebek S. Boric acid inhibits alveolar bone loss in rats by affecting RANKL and osteoprotegerin expression. *J Periodontal Res* 2014;49:472–9. <https://doi.org/10.1111/jre.12126>.
- [44] Sağlam M, Arslan U, Buket Bozkurt Ş, Hakki SS. Boric Acid Irrigation as an Adjunct to Mechanical Periodontal Therapy in Patients With Chronic Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. *J Periodontol* 2013;84:1297–308. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120467>.
- [45] Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anat Rec* 2008;291:441–7. <https://doi.org/10.1002/ar.20672>.
- [46] Ying X, Cheng S, Wang W, Lin Z, Chen Q, Zhang W, et al. Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biol Trace Elem Res* 2011;144:306–15. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9094-x>.
- [47] Armstrong TA, Spears JW. Effect of dietary boron on growth performance, calcium and phosphorus metabolism, and bone mechanical properties in growing barrows. *J Anim Sci* 2001;79:3120–7. <https://doi.org/10.2527/2001.79123120x>.
- [48] Nielsen FH. Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone

- characteristics and plasma lipids in rats. *BioFactors* 2004;20:161–71. <https://doi.org/10.1002/biof.5520200305>.
- [49] Taşlı PN, Doğan A, Demirci S, Şahin F. Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro. *Biol Trace Elem Res* 2013;153:419–27. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9657-0>.
- [50] Caneva M, Lang NP, Calvo Guirado JL, Spriano S, Iezzi G, Botticelli D. Bone healing at bicortically installed implants with different surface configurations. An experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2015;26:293–9. <https://doi.org/10.1111/clr.12475>.
- [51] Lumetti S, Manfredi E, Ferraris S, Spriano S, Passeri G, Ghiacci G, et al. The response of osteoblastic MC3T3-E1 cells to micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med* 2016;27:1–9. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5678-5>.
- [52] Beolchini M, Lang NP, Gómez Moreno G, Iezzi G, Botticelli D, Calvo Guirado JL. Bone healing at implants with different surface configurations: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2016;27:196–202. <https://doi.org/10.1111/clr.12562>.
- [53] Zarb GA. Introduction to osseointegration in clinical dentistry. *J Prosthet Dent* 1983;49:824. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(83\)90357-8](https://doi.org/10.1016/0022-3913(83)90357-8).
- [54] Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop* 1981;52:155–70. <https://doi.org/10.3109/17453678108991776>.
- [55] Misch CE. Contemporary implant dentistry-E-Book. Elsevier Health Sciences; 2007.
- [56] Albrektsson T, Chrcanovic B, Jacobsson M, Wennerberg A. Osseointegration of Implants – A Biological and Clinical Overview. *JSM Dent Surg* 2017;2:1022.
- [57] Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, De Bruyn H %J C implant dentistry, research related. “Peri-Implantitis”: A Complication of a Foreign Body or a Man-Made “Disease”. *Facts and Fiction* 2016;18:840–9.
- [58] Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. 1987. *Clin Orthop Relat Res* 2004;237:4–12.

- [59] Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR %J I j oral maxillofac implants. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success 1986;1:11–25.
- [60] Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A %J J of OR. Reasons for failures of oral implants 2014;41:443–76.
- [61] Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C, et al. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. Biomed Res Int 2016;2016:6285620. <https://doi.org/10.1155/2016/6285620>.
- [62] Novaes AB, Papalexiou V, Grisi MFM, Souza SSL, Taba M, Kajiwar JK. Influence of implant microstructure on the osseointegration of immediate implants placed in periodontally infected sites: A histomorphometric study in dogs. Clin Oral Implants Res 2004;15:34–43. <https://doi.org/10.1046/j.1600-0501.2003.00968.x>.
- [63] dos Santos V, Brandalise RN, Savaris M. Biomaterials: Characteristics and Properties. Eng. Biomater., Springer; 2017, p. 5–15. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58607-6_2.
- [64] Williams DF, Williams DF. The Williams dictionary of biomaterials. Liverpool University Press; 1999.
- [65] Ravaglioli A, Krajewski A. Bioceramics: Materials· Properties· Applications. Springer Science & Business Media; 1991.
- [66] Commissionat Y. Use of biomaterials in dental implantology. Bull Acad Natl Med 1995;179:569.
- [67] Olmedo DG, Tasat D, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Systemic and local tissue response to titanium corrosion. Trans. - 7th World Biomater. Congr., InTech; 2004, p. 1334. <https://doi.org/10.5772/32500>.
- [68] Bruschi M, Steinmüller-Nethl D, Goriwoda W, Rasse M. Composition and Modifications of Dental Implant Surfaces. J Oral Implant 2015;2015:1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/527426>.
- [69] De Avila ED, Avila-Campos MJ, Vergani CE, Spolidório DMP, De Assis Mollo F. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. J Prosthet Dent 2016;115:428–36. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.09.016>.
- [70] Abraham CM. A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface

- Coatings and Treatments. *Open Dent J* 2014;8:50–5. <https://doi.org/10.2174/1874210601408010050>.
- [71] Osman RB, Swain M V. A critical review of dental implant materials with an emphasis on titanium versus zirconia. *Materials (Basel)* 2015;8:932–58. <https://doi.org/10.3390/ma8030932>.
- [72] Spencer LJ. *The Mineralogical Magazine and Journal of the Mineralogical Society*. vol. 5. 1882.
- [73] Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R Reports* 2004;47:49–121. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>.
- [74] Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T %J C implant dentistry, research related. The peri-implantitis: implant surfaces, microstructure, and physicochemical aspects 2012;14:170–83.
- [75] Ahmad M, Gawronski D, Blum J, Goldberg J, Gronowicz The Japanese Society for Biomaterials, G %J J of BMRAOJ of TS for B, Biomaterials TAS for. Differential response of human osteoblast-like cells to commercially pure (cp) titanium grades 1 and 4 1999;46:121–31.
- [76] Josset Y, Oum'hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res* 1999;47:481–93. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19991215\)47:4<481::AID-JBM4>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19991215)47:4<481::AID-JBM4>3.0.CO;2-Y).
- [77] Kohal RJ, Weng D, Bächle M, Strub JR %J J of P. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment 2004;75:1262–8.
- [78] Scarano A, Di Carlo F, Quaranta M, Piattelli A %J J of OI. Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits 2003;29:8–12.
- [79] Gottlow J, Dard M, Kjellson F, Obrecht M, Sennerby L %J C implant dentistry, research related. Evaluation of a new titanium-zirconium dental implant: a biomechanical and histological comparative study in the mini pig 2012;14:538–45.
- [80] Fathi MH, Salehi M, Saatchi A, Mortazavi V, Moosavi SB. In vitro corrosion behavior of bioceramic, metallic, and bioceramic-metallic coated stainless steel

- dental implants. *Dent Mater* 2003;19:188–98. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(02\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(02)00029-5).
- [81] Gotman I. Characteristics of metals used in implants. *J Endourol* 1997;11:383–9. <https://doi.org/10.1089/end.1997.11.383>.
- [82] Morais S, Sousa JP, Fernandes MH, Carvalho GS, De Bruijn JD, Van Blitterswijk CA. Decreased consumption of Ca and P during in vitro biomineralization and biologically induced deposition of Ni and Cr in presence of stainless steel corrosion products. *J Biomed Mater Res* 1998;42:199–212. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199811\)42:2<199::AID-JBM5>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199811)42:2<199::AID-JBM5>3.0.CO;2-K).
- [83] Yoo YR, Jang SG, Oh KT, Kim JG, Kim YS. Influences of passivating elements on the corrosion and biocompatibility of super stainless steels. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2008;86:310–20. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31018>.
- [84] Ortiz AJ, Fernández E, Vicente A, Calvo JL, Ortiz C. Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: Toxicity and DNA damage. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2011;140:e115–22. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.02.021>.
- [85] Fathi MH, Mortazavi V. Tantalum , Niobium and Titanium Coatings for Biocompatibility Improvement of Dental Implants. *Dentel Res J* 2007;4:74–82.
- [86] Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent Mater* 2018;34:40–57. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.09.007>.
- [87] Fukuda A, Takemoto M, Saito T, Fujibayashi S, Neo M, Yamaguchi S, et al. Bone bonding bioactivity of Ti metal and Ti-Zr-Nb-Ta alloys with Ca ions incorporated on their surfaces by simple chemical and heat treatments. *Acta Biomater* 2011;7:1379–86. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.09.026>.
- [88] Wang BL, Li L, Zheng YF. In vitro cytotoxicity and hemocompatibility studies of Ti-Nb, Ti-Nb-Zr and Ti-Nb-Hf biomedical shape memory alloys. *Biomed Mater* 2010;5:44102. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/4/044102>.
- [89] Osathanon T, Bepinyowong K, Arksornnukit M, Takahashi H, Pavasant P. Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. *J Oral Sci* 2011;53:23–30.

- <https://doi.org/10.2334/josnurd.53.23>.
- [90] Li GK, Gao F, Wang ZG. A photogrammetry-based system for 3D surface reconstruction of prosthetics and orthotics. *Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. EMBS, IEEE*; 2011, p. 8459–62. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6092087>.
 - [91] Lee J, Lin D, Ju C, Yin H, Chuang C, Lin The Japanese Society for Biomaterials, JC %J J of BMRPBABAOJ of TS for B, et al. In-vitro and in-vivo evaluation of a new Ti-15Mo-1Bi alloy 2009;91:643–50.
 - [92] Lavos-Valereto IC, König B, Rossa C, Marcantonio E, Zavaglia AC. A study of histological responses from Ti-6Al-7Nb alloy dental implants with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating in dogs. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:273–6. <https://doi.org/10.1023/A:1008975418453>.
 - [93] M. A, Omar O, Xia W, Palmquist A. Dental Implant Surfaces – Physicochemical Properties, Biological Performance, and Trends. *Implant Dent. - A Rapidly Evol. Pract.*, InTech; 2011. <https://doi.org/10.5772/17512>.
 - [94] Gupta S, Dahiya V, Shukla P. Surface topography of dental implants: A review. *J Dent Implant* 2014;4:66. <https://doi.org/10.4103/0974-6781.131009>.
 - [95] Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* n.d.;15:331–44.
 - [96] Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23:844–54. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>.
 - [97] Mustafa K, Lopez BS, Hultenby K, Wennerberg A, Arvidson K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surface blasted with TiO₂ particles. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:1985–207.
 - [98] DA CL; MT; WS; YPF. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *J Prosthet Dent* 1999;82:A1. [https://doi.org/10.1016/s0022-3913\(99\)70172-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3913(99)70172-1).
 - [99] Gotfredson K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjørting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1223–31. <https://doi.org/10.1002/jbm.820291009>.
 - [100] Makkonen TA, Holmberg S, Niemi L, Olsson C, Tammisalo T, Peltola J. A 5-

- year prospective clinical study of Astra Tech dental implants supporting fixed bridges or overdentures in the edentulous mandible. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:469–75. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1997.080605.x>.
- [101] Arvidson K, Bystedt H, Frykholm A, Von Konow L, Lothigius E. Five-year prospective follow-up report of the Astra Tech Dental Implant System in the treatment of edentulous mandibles. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:225–34. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1998.090403.x>.
- [102] Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric study of screw-shaped and removal torque titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 1995;6:24–30. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1995.060103.x>.
- [103] Oates TW, Arnold RM, Cagna DR, Dyer SR, Hartman GA, Loughlin RM, et al. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Implant Dent* 2002;11:394. <https://doi.org/10.1097/00008505-200211040-00051>.
- [104] Piattelli M, Scarano A, Paolantonio M, Iezzi G, Petrone G, Piattelli A. Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol* 2002;28:2–8. [https://doi.org/10.1563/1548-1336\(2002\)028<0002:BRTMAR>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1563/1548-1336(2002)028<0002:BRTMAR>2.3.CO;2).
- [105] Müller WD, Gross U, Fritz T, Voigt C, Franklin KB, Fischer P, et al. Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:349–56. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.00791.x>.
- [106] Wennerberg A, Albrektsson T, Ulrich H, Krol JJ. An optical three-dimensional technique for topographical descriptions of surgical implants. *J Biomed Eng* 1992;14:412–8. [https://doi.org/10.1016/0141-5425\(92\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0141-5425(92)90087-2).
- [107] Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials* 1996;17:15–22. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)80750-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)80750-2).
- [108] Diab Al-Radha DAS. The influence of different acids etch on dental implants titanium surface. *IOSR J Dent Med Sci* 2016;15:87–91. <https://doi.org/10.9790/0853-1508098791>.

- [109] Rosa MB, Albrektsson T, Francischone CE, Schwartz Filho HO, Wennerberg A. The influence of surface treatment on the implant roughness pattern. *J Appl Oral Sci* 2012;20:550–5. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000500010>.
- [110] Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface: A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:442–7. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1997.080601.x>.
- [111] Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:530–9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2000.011006530.x>.
- [112] Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:779–84.
- [113] Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmén A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:659–66.
- [114] Ellingsen JE. Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:749–53. <https://doi.org/10.1007/BF00134312>.
- [115] Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmén A, et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 2006;27:926–36. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.009>.
- [116] Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:63–74.
- [117] Szmukler-Moncler S, Perrin D, Ahossi V, Magnin G, Bernard JP. Biological Properties of Acid Etched Titanium Implants: Effect of Sandblasting on Bone Anchorage. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2004;68:149–59. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.20003>.
- [118] Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1999;45:75–83. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-)

- 4636(199905)45:2<75::AID-JBM1>3.0.CO;2-P.
- [119] Sul YT, Johansson CB, Röser K, Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomaterials* 2002;23:1809–17. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00307-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00307-6).
 - [120] Jarmar T, Palmquist A, Brånemark R, Hermansson L, Engqvist H, Thomsen P. Characterization of the surface properties of commercially available dental implants using scanning electron microscopy, focused ion beam, and high-resolution transmission electron microscopy. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10:11–22. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2007.00056.x>.
 - [121] Rasmusson L, Kahnberg KE, Tan A. Effects of implant design and surface on bone regeneration and implant stability: An experimental study in the dog mandible. *Clin Implant Dent Relat Res* 2001;3:2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2001.tb00123.x>.
 - [122] Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Brånemark System® TiUnite™ and machined-surface implants in the posterior mandible: A randomized open-ended clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5:57–63. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2003.tb00016.x>.
 - [123] Jungner M, Lundqvist P, Lundgren S. Oxidized titanium implants (Nobel Biocare® TiUnite™) compared with turned titanium implants (Nobel Biocare® mark III™) with respect to implant failure in a group of consecutive patients treated with early functional loading and two-stage protocol. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:308–12. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01101.x>.
 - [124] Schupbach P, Glauser R, Rocci A, Martignoni M, Sennerby L, Lundgren A, et al. The Human Bone–Oxidized Titanium Implant Interface: A Light Microscopic, Scanning Electron Microscopic, Back-Scatter Scanning Electron Microscopic, and Energy-Dispersive X-Ray Study of Clinically Retrieved Dental Implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005;7:s36–43. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2005.tb00073.x>.
 - [125] Sul Y-T, Johansson CB, Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:625–34.
 - [126] Loughlin RM, Arnold RM, Cagna DR, Dyer SR, Hartman GA, Oates TW. Early loading of sandblasted and acid-etched (SLA) implants: a prospective split-mouth

- comparative study. *Implant Dent* 2002;11:394. <https://doi.org/10.1097/00008505-200211040-00050>.
- [127] Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2005;74:782–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30291>.
- [128] Radin SR, Ducheyne P. Plasma spraying induced changes of calcium phosphate ceramic characteristics and the effect on in vitro stability. *J Mater Sci Mater Med* 1992;3:33–42. <https://doi.org/10.1007/BF00702942>.
- [129] De Groot K, Wolke JGC, Jansen JA. State of the art: hydroxylapatite coatings for dental implants. *J Oral Implantol* 1994;20:232.
- [130] Kim Y, LeGeros J, LeGeros R. Characterization of commercial HA-coated dental implants. *J. Dent. Res.*, vol. 73, AMER ASSOC DENTAL RESEARCH 1619 DUKE ST, ALEXANDRIA, VA 22314; 1994, p. 137.
- [131] Dunleavy CS, Golosnoy IO, Curran JA, Clyne TW. Characterisation of discharge events during plasma electrolytic oxidation. *Surf Coatings Technol* 2009;203:3410–9. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2009.05.004>.
- [132] Li LH, Kong YM, Kim HW, Kim YW, Kim HE, Heo SJ, et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials* 2004;25:2867–75. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.048>.
- [133] Gaggl A, Schultes G, Müller WD, Kärcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces-a comparative study. *Biomaterials* 2000;21:1067–73. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00002-8).
- [134] Cho SA, Park KT. The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials* 2003;24:3611–7. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00218-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00218-7).
- [135] Deppe H, Warmuth S, Heinrich A, Körner T. Laser-assisted three-dimensional surface modifications of titanium implants: Preliminary data. *Lasers Med Sci* 2005;19:229–33. <https://doi.org/10.1007/s10103-005-0327-0>.
- [136] Song WH, Jun YK, Han Y, Hong SH. Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania. *Biomaterials* 2004;25:3341–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.103>.
- [137] Sul Y-T, Johansson C, Albrektsson T, JIJ of P. Which surface properties

- enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *J Prosthet Dent* 2007;98:428. [https://doi.org/10.1016/s0022-3913\(07\)60140-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3913(07)60140-1).
- [138] Herr Y, Woo JA, Kwon YH, Park JB, Heo SJ, Chung JH. Implant surface conditioning with tetracycline-HCl: A SEM study. *Key Eng. Mater.*, vol. 361-363 II, Trans Tech Publ; 2008, p. 849–52. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.361-363.849>.
- [139] Anil S, Anand PS, Alghamdi H, Janse JA. Dental Implant Surface Enhancement and Osseointegration. *Implant Dent - A Rapidly Evol Pract* 2011. <https://doi.org/10.5772/16475>.
- [140] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425–30. <https://doi.org/10.1038/343425a0>.
- [141] Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* (80-) 1999;286:1946–9. <https://doi.org/10.1126/science.286.5446.1946>.
- [142] Yang F, Zhao SF, Zhang F, He FM, Yang GL. Simvastatin-loaded porous implant surfaces stimulate preosteoblasts differentiation: An in vitro study. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2011;111:551–6. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.06.018>.
- [143] Kajiwarra H, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Iyama S, Atsuta I, et al. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. *Biomaterials* 2005;26:581–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.072>.
- [144] Yoshinari M, Oda Y, Ueki H, Yokose S. Immobilization of bisphosphonates on surface modified titanium. *Biomaterials* 2001;22:709–15. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00234-9).
- [145] Peter B, Pioletti DP, Laïb S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, et al. Calcium phosphate drug delivery system: Influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 2005;36:52–60. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.10.004>.
- [146] Vallet-Regí M, Ruiz-Hernández E. Bioceramics: From bone regeneration to cancer nanomedicine. *Adv Mater* 2011;23:5177–218. <https://doi.org/10.1002/adma.201101586>.

- [147] Tomisa AP, Launey ME, Lee JS, Mankani MH, Wegst UGK, Saiz E. Nanotechnology approaches to improve dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26 Suppl:25–44; discussion 45-9.
- [148] Jayaswal GP, Dange SP, Khalikar AN. Bioceramic in dental implants: A review. *J Indian Prosthodont Soc* 2010;10:8–12. <https://doi.org/10.1007/s13191-010-0002-4>.
- [149] Schliephake H, Scharnweber D, Roessler S, Dard M, Sewing A, Aref A. Biomimetic calcium phosphate composite coating of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:738–46.
- [150] Liu T, Wu G, Wismeijer D, Gu Z, Liu Y. Deproteinized bovine bone functionalized with the slow delivery of BMP-2 for the repair of critical-sized bone defects in sheep. *Bone* 2013;56:110–8. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.05.017>.
- [151] Liu T, Wu G, Zheng Y, Wismeijer D, Everts V, Liu Y. Cell-mediated BMP-2 release from a novel dual-drug delivery system promotes bone formation. *Clin Oral Implants Res* 2014;25:1412–21. <https://doi.org/10.1111/clr.12283>.
- [152] Bosco R, Van Den Beucken J V., Leeuwenburgh S, Jansen J. Surface engineering for bone implants: A trend from passive to active surfaces. *Coatings* 2012;2:95–119. <https://doi.org/10.3390/coatings2030095>.
- [153] De Jonge LT, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharm Res* 2008;25:2357–69. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9617-0>.
- [154] Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 1998;40:324–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199805\)40:2<324::AID-JBM18>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199805)40:2<324::AID-JBM18>3.0.CO;2-L).
- [155] Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the Platelet-Derived Growth Factor/Insulin-Like Growth Factor-I Combination on Bone Regeneration Around Titanium Dental Implants. Results of a Pilot Study in Beagle Dogs. *J Periodontol* 1991;62:710–6. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.11.710>.
- [156] Schliephake H, Scharnweber D. Chemical and biological functionalization of

- titanium for dental implants. *J Mater Chem* 2008;18:2404–14. <https://doi.org/10.1039/b715355b>.
- [157] Nijhuis AWG, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA. Wet-Chemical Deposition of Functional Coatings for Bone Implantology. *Macromol Biosci* 2010;10:1316–29. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000142>.
- [158] Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4353–64.
- [159] Siebers MC, Walboomers XF, Leeuwenburgh SCG, Wolke JCG, Boerman OC, Jansen JA %J T engineering. Transforming Growth Factor- β 1 Release from a Porous Electrostatic Spray Deposition–Derived Calcium Phosphate Coating 2006;12:2449–56.
- [160] Hall J, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UME %J J of clinical periodontology. Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model 2007;34:444–51.
- [161] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667–81. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2).
- [162] Ewald A, Hösel D, Patel S, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U. Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity. *Acta Biomater* 2011;7:4064–70. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.049>.
- [163] Jahoda D, Nyc O, Pokorný D, Landor I, Sosna A. Antibiotic treatment for prevention of infectious complications in joint replacement. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2006;73:108–14.
- [164] Harris LG, Mead L, Müller-Oberländer E, Richards RG. Bacteria and cell cytocompatibility studies on coated medical grade titanium surfaces. *J Biomed Mater Res - Part A* 2006;78:50–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30611>.
- [165] Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Carpi A, Fini M, Giavaresi G, et al. Adsorption of cationic antibacterial on collagen-coated titanium implant devices 2004;58:418–22.
- [166] Pratten J, Nazhat SN, Blaker JJ, Boccaccini AR. In vitro attachment of staphylococcus epidermidis to surgical sutures with and without Ag-containing bioactive glass coating. *J Biomater Appl* 2004;19:47–57. <https://doi.org/10.1177/0885328204043200>.
- [167] Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser The Japanese

- Society for Biomaterials, D %J J of BMRAOJ of TS for B, Biomaterials the AS for. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible 1998;40:1–11.
- [168] Elias CN. Titanium dental implant surfaces. 65th ABM Int Congr 18th IFHTSE Congr 1st TMS/ABM Int Mater Congr 2010 2010;6:5067–72. <https://doi.org/10.1590/s1517-70762010000200008>.
- [169] Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActive®) and conventional SLA titanium implants: A pilot study in dogs. *J Clin Periodontol* 2007;34:78–86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.01008.x>.
- [170] Lacefield WR. Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials. *Adv Dent Res* 1999;13:21–6. <https://doi.org/10.1177/08959374990130011001>.
- [171] Mao C, Li H, Cui F, Ma C, Feng Q. Oriented growth of phosphates on polycrystalline titanium in a process mimicking biomineralization. *J Cryst Growth* 1999;206:308–21. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(99\)00315-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(99)00315-2).
- [172] Del Curto B, Brunella MF, Giordano C, Pedferri MP, Valtulina V, Visai L, et al. Decreased bacterial adhesion to surface-treated titanium. *Int J Artif Organs* 2005;28:718–30. <https://doi.org/10.1177/039139880502800711>.
- [173] Bhushan B. Surface roughness analysis and measurement techniques. *Mod. Tribol. Handb. Vol. One Princ. Tribol.*, CRC press; 2000, p. 49–119. <https://doi.org/10.1201/9780849377877.ch2>.
- [174] Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AEP, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: A literature review. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:55–67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01367.x>.
- [175] Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:172–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x>.
- [176] Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone–biomaterial interface. *J Cell Biochem* 1994;56:340–7. <https://doi.org/10.1002/jcb.240560310>.
- [177] Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanometer surface roughness

- increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J Biomed Mater Res - Part A* 2004;70:129–38. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30073>.
- [178] Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 2011;29:739–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.004>.
- [179] Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* n.d.;17:544–64.
- [180] Vagaská B, Bačáková L, Filová E, Balík K. Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiol Res* 2010;59:309–22.
- [181] Lossdörfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, et al. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res - Part A* 2004;70:361–9. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30025>.
- [182] Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res* 2003;82:372–6. <https://doi.org/10.1177/154405910308200509>.
- [183] Ong JL, Carnes DL, Cardenas HL, Cavin R. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent* 1997;6:19–24. <https://doi.org/10.1097/00008505-199700610-00045>.
- [184] Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomater Silver Jubil Compend* 1998;19:147–60. <https://doi.org/10.1016/B978-008045154-1.50019-8>.
- [185] Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 2001;22:1241–51. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00274-X).
- [186] Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:329–45. <https://doi.org/10.1177/10454411960070040301>.
- [187] Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans.

- Clin Oral Implants Res 2011;22:349–56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02172.x>.
- [188] Curtis A, Wilkinson C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *Biochem. Soc. Symp.*, vol. 65, 1999, p. 15–26.
- [189] Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* (80-) 2005;310:1135–8. <https://doi.org/10.1126/science.1106587>.
- [190] Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology - From micron- to nanotopography. *Biomaterials* 2008;29:3822–35. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.012>.
- [191] Bacakova L, Grausova L, Vacik J, Fraczek A, Blazewicz S, Kromka A, et al. Improved adhesion and growth of human osteoblast-like MG 63 cells on biomaterials modified with carbon nanoparticles 2007;16:2133–40.
- [192] Gunay A, Sagbas B, Durakbasa MN. Importance of measurement parameters for the dental implant surface characterization. *Acta Phys Pol A* 2014;125:484–7. <https://doi.org/10.12693/APhysPolA.125.484>.
- [193] Kibel MH. X-ray photoelectron spectroscopy. *Surf. Anal. Methods Mater. Sci.*, Springer; 2003, p. 175–201.
- [194] Ratner BD, Castner DG. *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis. Surf Anal - Princ Tech Second Ed* 2009;2:47–112. <https://doi.org/10.1002/9780470721582.ch3>.
- [195] Miyoshi K. *Surface Characterization Techniques: An Overview*. Mech. Tribol., CRC Press; 2002, p. 1–46.
- [196] Erdoğan G, Güler G, Kiliç T, Kiliç DO, Erdoğan B, Tosun Z, et al. Surface Characterization Techniques. *Surf Treat Biol Chem Phys Appl* 2016;67–114. <https://doi.org/10.1002/9783527698813.ch3>.
- [197] Turner PS, Nockolds CE, Bulcock S. *Electron Microscope Techniques for Surface Characterization. Surf. Anal. Methods Mater. Sci.*, Springer; 2003, p. 85–105. https://doi.org/10.1007/978-3-662-05227-3_3.
- [198] Smith CL. Basic confocal microscopy. *Curr Protoc Neurosci* 2011;56:2. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0202s56>.
- [199] Paddock SW. Confocal laser scanning microscopy. *Biotechniques* 1999;27:992–1004.
- [200] Kihm KD. Near-Field Characterization of Micro/Nano-Scaled Fluid Flows.

- Springer Science & Business Media; 2011. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20426-5>.
- [201] Manfred S. A practical Guide to the Assessment of Surface Texture. Mahr Feinprüf; 1991.
 - [202] Leach RK. The measurement of surface texture using stylus instruments 2014.
 - [203] Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008;35:282–5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01283.x>.
 - [204] Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect* 2009;72:104–10. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.010>.
 - [205] Norowski Jr PA, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater An Off J Soc Biomater Japanese Soc Biomater Aust Soc Biomater Korean Soc Biomater* 2009;88:530–43.
 - [206] Mombelli A, van Oosten MAC, Schürch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:145–51. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1987.tb00298.x>.
 - [207] Albrektsson T. Consensus report of session IV. Proceeding 1st Eur. Work. Periodontol., Quintessence Publishing Co.; 1985, p. 365–9.
 - [208] Knetsch MLW, Koole LH. New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers (Basel)* 2011;3:340–66. <https://doi.org/10.3390/polym3010340>.
 - [209] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–93. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.
 - [210] Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5:31–8.
 - [211] Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary Bacterial Colonization of Implant Surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implant* 1999;14:226–32.
 - [212] Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grander U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin*

- Periodontol 1995;22:124–30. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1995.tb00123.x>.
- [213] Mombelli A. Microbiology of the dental implant. *Adv Dent Res* 1993;7:202–6. <https://doi.org/10.1177/08959374930070021201>.
- [214] Mombelli A, Mericske-ster R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clin Oral Implants Res* 1990;1:1–7. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1990.010101.x>.
- [215] Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man: A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995;22:1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1995.tb01765.x>.
- [216] An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998;43:338–48. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199823\)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B).
- [217] Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* (80-) 1987;237:1588–95.
- [218] Costerton JW, Marrie TJ, Cheng K-J. *Phenomena of Bacterial Adhesion*. Bact. Adhes., Springer; 1985, p. 3–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6514-7_1.
- [219] Jin G, Cao H, Qiao Y, Meng F, Zhu H, Liu X. Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014;117:158–65. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.025>.
- [220] Petrini P, Arciola CR, Pezzali I, Bozzini S, Montanaro L, Tanzi MC, et al. Antibacterial activity of zinc modified titanium oxide surface. *Int J Artif Organs* 2006;29:434–42. <https://doi.org/10.1177/039139880602900414>.
- [221] Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:156–64. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01815.x>.
- [222] Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant Dent* 2006;15:298–304. <https://doi.org/10.1097/01.id.0000226823.58425.19>.
- [223] Bellanda M, Cassinelli C, Morra M. Reduced plaque accumulation on

- hydrocarbon thin film deposited on restorative acrylic polymers. *J Biomed Mater Res* 1997;36:216–22. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199708\)36:2<216::AID-JBM10>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199708)36:2<216::AID-JBM10>3.0.CO;2-E).
- [224] Buchanan RA, Rigney ED, Williams JM. Ion implantation of surgical Ti-6Al-4V for improved resistance to wear-accelerated corrosion. *J Biomed Mater Res* 1987;21:355–66. <https://doi.org/10.1002/jbm.820210308>.
- [225] Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: Active release strategies. *Chem Soc Rev* 2006;35:780–9. <https://doi.org/10.1039/b515219b>.
- [226] Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury* 2006;37:S3-14. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.003>.
- [227] Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2009;91:470–80. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31463>.
- [228] Oakes JA, Wood AJJ. Infections in surgery. *N Engl J Med* 1986;315:1129–38.
- [229] Schmalzried TP, Amstutz HC, Au MK, Dorey FJ. Etiology of deep sepsis in total hip arthroplasty: The significance of hematogenous and recurrent infections. *Clin Orthop Relat Res* 1992;200–7. <https://doi.org/10.1097/00003086-199207000-00026>.
- [230] Green SA, Ripley MJ. Chronic osteomyelitis in pin tracks. *J Bone Jt Surg - Ser A* 1984;66:1092–8. <https://doi.org/10.2106/00004623-198466070-00017>.
- [231] Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 2006;64:313–25. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>.
- [232] Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005;13:34–40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>.
- [233] Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. Streptococcus mutans, caries and simulation models. *Nutrients* 2010;2:290–8. <https://doi.org/10.3390/nu2030290>.
- [234] Ata-Ali J, Candel-Marti ME, Flichy-Fernández AJ, Peñarrocha-Oltra D, Balaguer-Martinez JF, Diago MP. Peri-implantitis: Associated microbiota and treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:e937-43. <https://doi.org/10.4317/medoral.17227>.

- [235] Kulkarni Aranya A, Pushalkar S, Zhao M, LeGeros RZ, Zhang Y, Saxena D. Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res - Part A* 2017;105:2218–27. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36081>.
- [236] Busscher HJ, Van Der Mei RBHC. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 1995;128:229–34. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00103-C](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00103-C).
- [237] Nijs A, Cartuyvels R, Mewis A, Peeters V, Rummens JL, Magerman K. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2003;41:3627–30. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3627-3630.2003>.
- [238] Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016;6:71–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [239] Joloba ML, Bajaksouzian S, Jacobs MR. Evaluation of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3834–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3834-3836.2000>.
- [240] Magaldi S, Mata-Essayag S, Hartung De Capriles C, Perez C, Colella MT, Olaizola C, et al. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int J Infect Dis* 2004;8:39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>.
- [241] Valgas C, De Souza SM, Smânia EFA, Smânia A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian J Microbiol* 2007;38:369–80. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>.
- [242] Elleuch L, Shaaban M, Smaoui S, Mellouli L, Karray-Rebai I, Fourati-Ben Fguira L, et al. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial streptomyces sp. TN262. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:579–93. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8808-4>.
- [243] Jiménez-Esquilín AE, Roane TM. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005;32:378–81. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0007-x>.
- [244] Hilal Cadirci B, Citak S. A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan J Nutr* 2005;4:237–41. <https://doi.org/10.3923/pjn.2005.237.241>.
- [245] Kumar SN, Nambisan B, Sundaresan A, Mohandas C, Anto RJ. Isolation and

- identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Ann Microbiol* 2014;64:209–18. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0653-6>.
- [246] Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:268–80. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.268-280.2004>.
- [247] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* (80-) 2000;289:1501–4. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1501>.
- [248] Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reum Port* 2007;32:103–10. [https://doi.org/10.1016/s0169-6009\(08\)80210-3](https://doi.org/10.1016/s0169-6009(08)80210-3).
- [249] Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Lawrence Riggs B. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000;141:4768–76. <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7840>.
- [250] Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3:269–305. <https://doi.org/10.1177/10454411920030030501>.
- [251] Czekańska EM. In vitro cell and culture models for osteoblasts and their progenitors By Supervised by. School of Biosciences, 2014.
- [252] Grigoriadis AE, Heersche JNM, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: Effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 1988;106:2139–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.6.2139>.
- [253] Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 2014;561:3–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>.
- [254] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747–54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80257-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80257-3).
- [255] Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D %J W journal of stem

- cells. *Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts* 2013;5:136.
- [256] Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015;2015:421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- [257] Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005;8:751–64. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.02.017>.
- [258] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5).
- [259] Fedarko NS, Vetter UK, Weinstein S, Robey PG. Age-related changes in hyaluronan, proteoglycan, collagen, and osteonectin synthesis by human bone cells. *J Cell Physiol* 1992;151:215–27. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041510202>.
- [260] Czekańska EM. *In vitro cell and culture models for osteoblasts and their progenitors* 2014.
- [261] Harris SA, Enger RJ, Riggs LB, Spelsberg TC. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1995;10:178–86. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650100203>.
- [262] Martínez ME, Del Campo MT, Medina S, Sánchez M, Sánchez-Cabezudo MJ, Esbrit P, et al. Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif Tissue Int* 1999;64:280–6. <https://doi.org/10.1007/s002239900619>.
- [263] Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, et al. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2511–7. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.8.7629252>.
- [264] 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. *Mater Sci Eng C* 2003;23:551–60. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(03\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(03)00033-X).
- [265] Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue

- integration. Clin Orthop Relat Res 2004;237:4–12.
- [266] Kim EH, Park SH, Chi SY, Woo HD, Heo Y, Ito Y, et al. Enhancement effect of cell adhesion on titanium surface using phosphonated low-molecular-weight chitosan derivative. Macromol Res 2016;24:99–103. <https://doi.org/10.1007/s13233-015-3135-9>.
- [267] Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. J Biomed Mater Res 2000;49:155–66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200002\)49:2<155::AID-JBM2>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200002)49:2<155::AID-JBM2>3.0.CO;2-J).
- [268] Baier RE. Conditioning surfaces to suit the biomedical environment: Recent progress. J Biomech Eng 1982;104:257–71. <https://doi.org/10.1115/1.3138358>.
- [269] Wolf G. Function of the Bone Protein Osteocalcin: Definitive Evidence. Nutr Rev 2009;54:332–3. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1996.tb03798.x>.
- [270] Price PA, Baukol SA. 1,25-dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. J Biol Chem 1980;255:11660–3.
- [271] Weinreb M, Shinar D, Rodan GA. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. J Bone Miner Res 1990;5:831–42. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650050806>.
- [272] Hauschka P V., Reid ML. Vitamin K dependence of a calcium-binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in chicken bone. J Biol Chem 1978;253:9063–8.
- [273] Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. Nutr Rev 1996;54:332–3.
- [274] Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, Jee WS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79:7734–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7734>.
- [275] Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature 1996;382:448–52. <https://doi.org/10.1038/382448a0>.
- [276] Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K.

- Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:515–25. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2001.120513.x>.
- [277] Boskey AL. Overview of cellular elements and macromolecules implicated in the initiation of mineralization. *Chem Biol Miner Tissues* 1985;335.
- [278] Glowacki J, Lian JB. Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell Differ* 1987;21:247–54. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(87\)90479-9](https://doi.org/10.1016/0045-6039(87)90479-9).
- [279] Hayes JS, Khan IM, Archer CW, Richards RG. The role of surface microtopography in the modulation of osteoblast differentiation. *Eur Cells Mater* 2010;20:98–108. <https://doi.org/10.22203/eCM.v020a09>.
- [280] Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res - Part A* 2004;69:462–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30016>.
- [281] Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H₂SO₄/H₂O₂ treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. *J Biomed Mater Res - Part A* 2010;94:169–79. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32701>.
- [282] Nielsen FH. Importance of making dietary recommendations for elements designated as nutritionally beneficial, pharmacologically beneficial, or conditionally essential. *J Trace Elem Exp Med* 2000;13:113–29. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-670X\(2000\)13:1<113::AID-JTRA13>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-670X(2000)13:1<113::AID-JTRA13>3.0.CO;2-D).
- [283] Nielsen FH. The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of Boron. *Biol Trace Elem Res* 1998;66:319–30. <https://doi.org/10.1007/BF02783145>.
- [284] Benderdour M, Hess K, Dzondo-Gadet M, Nabet P, Belleville F, Dousset B. Boron modulates extracellular matrix and TNF α synthesis in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:746–51. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8688>.
- [285] Turkez H. Effects of boric acid and borax on titanium dioxide genotoxicity. *J Appl Toxicol* 2008;28:658–64. <https://doi.org/10.1002/jat.1318>.

- [286] Schummer D, Höfle G, Reichenbach H. The Tartrolons, New Boron-containing Antibiotics from a Myxobacterium, *Sorangium cellulosum*. *J Antibiot (Tokyo)* 1995;48:26–30. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.26>.
- [287] Sayin Z, Ucan US, Sakmanoglu A. Antibacterial and Antibiofilm Effects of Boron on Different Bacteria. *Biol Trace Elem Res* 2016;173:241–6. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0637-z>.
- [288] Lemons JE %J J of OI. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants 2004;30:318–24.
- [289] Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NRF, Cardaropoli G, et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2009;88:579–96. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31264>.
- [290] Riss TL, Moravec RA. Cell proliferation assays: Improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. *Cell Biol. Four-Volume Set*, vol. 1, Elsevier; 2006, p. 25–31. <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50005-8>.
- [291] Groth T, Falck P, Miethke RR. Cytotoxicity of biomaterials - Basic mechanisms and in vitro test methods: A review. *ATLA Altern to Lab Anim* 1995;23:790–9.
- [292] Tamaki Y, Sasaki K, Sasaki A, Takakubo Y, Hasegawa H, Ogino T, et al. Enhanced osteolytic potential of monocytes/macrophages derived from bone marrow after particle stimulation. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2008;84:191–204. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30861>.
- [293] Schildhauer TA, Peter E, Muhr G, Koller M. Activation of human leukocytes on tantalum trabecular metal in comparison to commonly used orthopedic metal implant materials. *J Biomed Mater Res - Part A* 2009;88:332–41. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31850>.
- [294] Lenz R, Mittelmeier W, Hansmann D, Brem R, Diehl P, Fritsche A, et al. Response of human osteoblasts exposed to wear particles generated at the interface of total hip stems and bone cement. *J Biomed Mater Res - Part A* 2009;89:370–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31996>.
- [295] Makihira S, Mine Y, Kosaka E, Nikawa H. Titanium surface roughness accelerates RANKL-dependent differentiation in the osteoclast precursor cell line, RAW264.7. *Dent Mater J* 2007;26:739–45.

<https://doi.org/10.4012/dmj.26.739>.

- [296] Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Belcastro S, Guerra M, Calvitti M, et al. Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:719–25.
- [297] Balloni S, Calvi EM, Damiani F, Bistoni G, Calvitti M, Locci P, et al. Effects of titanium surface roughness on mesenchymal stem cell commitment and differentiation signaling. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24:627–35.
- [298] Yoda I, Koseki H, Tomita M, Shida T, Horiuchi H, Sakoda H, et al. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiol* 2014;14:234. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0234-2>.
- [299] Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CHF. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24:616–26. <https://doi.org/10.5167/uzh-26110>.
- [300] Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, Heyde H van der, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomater* 2009;5:3215–23. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.05.008>.
- [301] Kim BS, Kim JS, Park YM, Choi BY, Lee J. Mg ion implantation on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell. *Mater Sci Eng C* 2013;33:1554–60. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.061>.
- [302] Wang X, Lu T, Wen J, Xu L, Zeng D, Wu Q, et al. Selective responses of human gingival fibroblasts and bacteria on carbon fiber reinforced polyetheretherketone with multilevel nanostructured TiO₂. *Biomaterials* 2016;83:207–18. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.001>.
- [303] Kaptan F, Güven EP, Topcuoğlu N, Yazıcı M, Külekçi G. In vitro assessment of the recurrent doses of topical gaseous ozone in the removal of *Enterococcus faecalis* biofilms in root canals. *Niger J Clin Pract* 2014;17:573–8. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.141421>.
- [304] Menzli S, Laribi A, Mrezguia H, Arbi I, Akremi A, Chefi C, et al. Photoelectron spectroscopic studies of ultra-thin CuPc layers on a Si(111)-(√3 × √3)R30°-B surface. *Surf Sci* 2016;654:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2016.08.002>.
- [305] Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:683–92.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01054.x>.

- [306] Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res - Part A* 2014;102:2636–43. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34937>.
- [307] Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predict Risk to Our Actual World* 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
- [308] Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Commun* 1999;36:47–50. <https://doi.org/10.1039/a809656b>.
- [309] Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17:536–43.
- [310] Ehrenfest DMD, Corso M Del, Kang B, Leclercq P, Mazor Z, Horowitz R a, et al. Identification card and codification of the chemical and morphological characteristics of 62 dental implant surfaces . Part 3 : sand-blasted / acid-etched (SLA type) and related surfaces (Group 2A , main subtractive process). *POSEIDO J* 2014;2:37–55.
- [311] Smith RA, McBroom RB. Boron oxides, boric acid, and borates. *Kirk-Othmer Encycl Chem Technol* 2000.
- [312] Crapse KP, Kyser EA. Literature Review of Boric Acid Solubility Data. vol. 578. *SRS*; 2011. <https://doi.org/10.2172/1025802>.
- [313] Hayashi R, Ueno T, Migita S, Tsutsumi Y, Doi H, Ogawa T, et al. Hydrocarbon deposition attenuates osteoblast activity on titanium. *J Dent Res* 2014;93:698–703. <https://doi.org/10.1177/0022034514536578>.
- [314] Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women 1 . *FASEB J* 1987;1:394–7. <https://doi.org/10.1096/fasebj.1.5.3678698>.
- [315] Price CJ, Strong PL, Marr MC, Myers CB, Murray FJ. Developmental toxicity NOAEL and postnatal recovery in rats fed boric acid during gestation. *Fundam Appl Toxicol* 1996;32:179–93. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0121>.
- [316] Albert R, Dax K, Pleschko R, Stütz AE. Tetrafluoroboric acid, an efficient

- catalyst in carbohydrate protection and deprotection reactions. *Carbohydr Res* 1985;137:282–90. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)85171-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)85171-5).
- [317] Herath HMTU, Di Silvio L, Evans JRG. Osteoblast response to zirconia surfaces with different topographies. *Mater Sci Eng C* 2015;57:363–70. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.052>.
- [318] Benderdour M, Bui-Van T, Dicko A, Belleville F. In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *J Trace Elem Med Biol* 1998;12:2–7. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(98\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(98)80014-X).
- [319] Liu YJ, Su WT, Chen PH. Magnesium and zinc borate enhance osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro. *J Biomater Appl* 2018;32:765–74. <https://doi.org/10.1177/0885328217740730>.
- [320] Xia L, Ma W, Zhou Y, Gui Z, Yao A, Wang D, et al. Stimulatory Effects of Boron Containing Bioactive Glass on Osteogenesis and Angiogenesis of Polycaprolactone: In Vitro Study. *Biomed Res Int* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8961409>.
- [321] Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 2002;28:177–89. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280107.x>.
- [322] Ata-Ali J, Candel-Marti ME, Flichy-Fernández AJ, Peñarrocha-Oltra D, Balaguer-Martinez JF, Diago MP. Peri-implantitis: Associated microbiota and treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:e937–43. <https://doi.org/10.4317/medoral.17227>.
- [323] Zhang W, Ju J, Rigney T, Tribble G. *Porphyromonas gingivalis* infection increases osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in a periodontitis mouse model. *BMC Oral Health* 2014;14:89. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-89>.
- [324] Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:717–25.
- [325] Klinger-Strobel M, Makarewicz O, Pletz MW, Stallmach A, Lautenschläger C. TiO₂-containing and ZnO-containing borosilicate glass—a novel thin glass with exceptional antibiofilm performances to prevent microfouling. *J Mater Sci Mater Med* 2016;27:175. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5792-4>.
- [326] Sopchenski L, Cogo S, Dias-Ntipanyj MF, Elifio-Espósito S, Popat KC, Soares

- P. Bioactive and antibacterial boron doped TiO₂ coating obtained by PEO. *Appl Surf Sci* 2018;458:49–58. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.07.049>.
- [327] Meacham SL, Taper LJ, Volpe SL. Effect of boron supplementation on blood and urinary calcium, magnesium, and phosphorus, and urinary boron in athletic and sedentary women. *Am J Clin Nutr* 1995;61:341–5. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.2.341>.
- [328] ZAN R, HUBBEZOGLU I, OZDEMIR AK, TUNC T, SUMER Z, ALICI O. Antibacterial Effect of Different Concentration of Boric acid against *Enterococcus Faecalis* Biofilms in Root Canal. *Marmara Dent J* 2013;1:76–80.
- [329] Wassmann T, Kreis S, Behr M, Buergers R. The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *Int J Implant Dent* 2017;3:1–11. <https://doi.org/10.1186/s40729-017-0093-3>.
- [330] Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Fackler A, Follo M, Hellwig E, Bächle M, et al. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol* 2013;58:1139–47. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.04.011>.
- [331] Yan Lin H, Liu Y, Wismeijer D, Crielaard W, Mei Deng D. Effects of Oral Implant Surface Roughness on Bacterial Biofilm Formation and Treatment Efficacy. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28:1226–31. <https://doi.org/10.11607/jomi.3099>.
- [332] Jeyachandran YL, Venkatachalam S, Karunagaran B, Narayandass SK, Mangalaraj D, Bao CY, et al. Bacterial adhesion studies on titanium, titanium nitride and modified hydroxyapatite thin films. *Mater Sci Eng C* 2007;27:35–41. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.01.004>.

HAM VERİLER

Yüzeylerin canlı ve cansız *P.gingivalis* bakteri sayımlarının KLTm analizi değerlerine ait ham veriler:

Canlı <i>P.gingivalis</i>	SLA	SBF	SBF-B	SAF
Örnek 1	324	232	128	146
Örnek 2	171	78	205	147
Örnek 3	242	52	50	80
Örnek 4	141	22	74	65
Örnek 5	81	394	249	219
Örnek 6	86	399	123	175
Cansız <i>P.gingivalis</i>	SLA	SBF	SBF-B	SAF
Örnek 1	485	359	368	268
Örnek 2	535	187	382	216
Örnek 3	359	337	232	117
Örnek 4	300	294	227	150
Örnek 5	298	395	745	282
Örnek 6	244	264	394	423

Yüzeylerin canlı ve cansız *S.mutans* bakteri sayımlarının KLTM analizi değerlerine ait ham veriler:

Canlı <i>S.mutans</i>	SLA	SBF	SBF-B	SAF
Örnek 1	7	20	3	9
Örnek 2	5	33	1	48
Örnek 3	8	13	10	33
Örnek 4	2	25	9	0
Örnek 5	3	8	1	1
Örnek 6	0	4	1	2
Örnek 7	11	19	15	6
Örnek 8	107	5	5	8
Örnek 9	19	1	1	7
Cansız <i>S.mutans</i>	SLA	SBF	SBF-B	SAF
Örnek 1	16	0	10	4
Örnek 2	45	12	6	3
Örnek 3	0	0	12	0
Örnek 4	0	18	0	5
Örnek 5	1	4	0	2
Örnek 6	2	10	0	4
Örnek 7	0	13	1	1
Örnek 8	5	2	50	0
Örnek 9	0	1	23	1

Deneyisel yüzeylerde sayılan canlı *P.gingivalis* bakteri değerlerine ait ham veriler:

Bakteri Sayımı (CFU)	SLA	SBF	SBF-B	SAF
Örnek 1	14000	7000	4000	15000
Örnek 2	13000	9000	3000	14000
Örnek 3	10000	5000	5000	12000
Örnek 4	12000	9000	5000	16000
Örnek 5	11000	7000	6000	10000
Örnek 6	15000	8000	3000	13000

Deneyisel yüzeylerde sayılan canlı *S.mutans* bakteri değerlerine ait ham veriler:

Bakteri Sayımı (CFU)	SLA	SBF	SBF-B	SAF
Örnek 1	348000	411000	326000	396000
Örnek 2	339000	603000	309000	440000
Örnek 3	373000	600000	268000	393000
Örnek 4	374000	407000	300000	400000
Örnek 5	368000	661000	267000	453000
Örnek 6	330000	473000	280000	485000

Osteokalsin seviyelerinin, iki farklı zaman aralığında hücre lizat değerlerine ait ham veriler:

Grup/Gün	Örnek	Gün 7	Gün 14	Örnek	Gün 7	Gün 14
Medya kültür ortamında				Hücre lizat		
SLA	1	96.69	100.86	1	104.52	96.15
	2	98.35	104.41	2	100.53	96.15
	3	104.96	94.73	3	94.95	107.69
SBF	1	112.4	107.48	1	167.55	84.62
	2	112.4	96.18	2	164.36	80.77
	3	106.61	99.73	3	183.51	80.77
SBF-B	1	229.75	96.18	1	202.66	146.15
	2	215.7	89.08	2	197.07	138.46
	3	228.93	81.82	3	182.71	150
SAF	1	130.58	95.05	1	124.27	107.69
	2	114.88	90.05	2	110.11	107.69
	3	120.66	86.98	3	114.1	111.54

hFOB canlılığı/proliferasyonunun CCK-8 ile 1., 4., ve 7. gündeki değerlerine ait ham veriler:

	SLA	SBF	SBF-B	SAF
1. gün	82.50	78.75	195	112.5
	93.75	97.50	187.5	116.25
	123.75	67.50	157.5	82.50
4. gün	SLA	SBF	SBF-B	SAF
	102.68	112.43	149.14	78.59
	91.20	83.17	147.42	72.28
7. gün	106.12	103.82	142.83	87.19
	SLA	SBF	SBF-B	SAF
	97.88	119.44	177.97	108.05
7. gün	94.07	131.94	179.24	102.97
	108.05	129.17	204.66	118.22

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mohammed	Soyadı	Alzboun
Doğ.Yeri	Beit Jalla	Doğ.Tar.	17 Kasım 1987
Email	m.zboun@gmail.com	Uyruğu	Filistin

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2020
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	-
Lisans	LUMHS University	2011
Lise	Talitha Kumi School	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Arapça	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Program	
Mendeley & EndNote Programs	
Macintosh Pages, Keynotes	

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

A. Bilimsel yayınlar:

M. Alzboun, AHA. Qamheya, S. Kızılaslan, C. Aktolun, A. Başeğmez, C. Karabuda, V. Arısan. Peri-İmplantitis Patolojisi ve Tedavi Protokolleri. Oral İmplantoloji Dergisi, Cilt 15, Sayı 2, sy.18-22, 2014.

B. Poster ve Sunum Bilgileri:

M. Alzboun, A. Gültekin, A. Başeğmez, S. Yalçın. “Aşırı Derecede Kemik Atrofisi Olan Hastada Kemik Ogmentasyonu”. Türk Oral İmplantoloji Derneği & Azerbaycan İmplantoloji Derneği Toplantısı dahilinde, XIII. Uluslararası Bilimsel Sempozyumu ve ortak Toplantısı dahilinde. Kemer. Antalya 2016. Bildiri Kitapçığı sy:10.

M. Alzboun, C. Yılmaz, A. Başeğmez, S. Ersanlı. “Peri-İmplant yumuşak Doku Yönetiminde Serbest Dişeti Grefti Kullanımı” Türk Oral İmplantoloji Derneği XXVIII. Uluslararası Bilimsel Kongre, İstanbul, TÜRKİYE 2017. Bildiri Kitapçığı sy:74.

B. Alper Gültekin, G. Kaya, A. Doğan, M. Alzboun, A. Başeğmez, S. Yalçın. “Alveolar Ogmentasyon Yapılan Bir Hastada İyileşme Döneminde Geçici İmplant Tedavisi” Türk Oral İmplantoloji Derneği XXVIII. Uluslararası Bilimsel Kongre, İstanbul, TÜRKİYE 2017. Bildiri Kitapçığı sy:65.

AHA. Qamheya, M. Alzboun, V. Arısan. “Full mouth rehabilitation of a skeletal class III edentulous patient using a hybrid prosthesis” Türk Oral İmplantoloji Derneği XXVII. Uluslararası Bilimsel Kongre, İstanbul, TÜRKİYE 2016. Bildiri Kitapçığı sy:68.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kitap okuma