



**T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

**SODYUM TETRABORAT SOLÜSYONU İLE
KAPLANMIŞ TİTANYUM YÜZEYİNDE ALP ENZİM
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

DIŞ HEKİMİ

HASAN ONUR SORKUN

DANIŞMAN

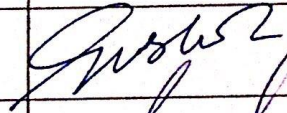
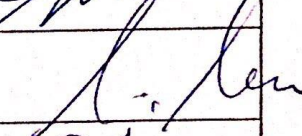
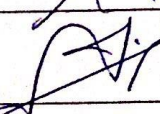
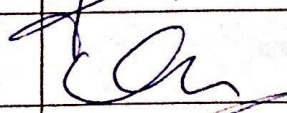
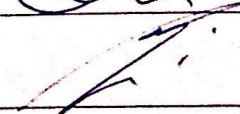
PROF.DR. AHMET HAMDİ ARSLAN

TEZ ONAYI

TEZ ONAYI FORMU

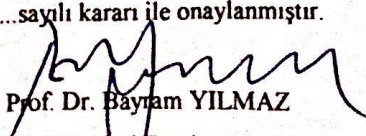
Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Doktora Programı
Tez Başlığı : Sodyum Tetraborat Solüsyonu İle Kaplanmış Titanyum Yüzeyinde Alp Enzim Etkinliğinin Karşılaştırmalı İncelenmesi
Tez Sahibi : Hasan Onur Sorkun
Sınav Tarihi : 21.06.2018

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı:	PROF. DR. NURHAN GÜLER	
Tez danışmanı:	PROF. DR. AHMET H. ARSLAN	
Üye:	PROF. DR. KAMIL GÖKER	
Üye:	DOÇ. DR. ZELAL ADIGÜZEL	
Üye:	DOÇ. DR. EDİZ DENİZ	

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 22/06/2018 tarih ve 2018/11-20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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.

HASAN ONUR SORKUN

İTHAF

Her zaman yanımda olan aileme ithafen...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimi ile bana her konuda yol gösteren, yardımını ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Ahmet H. Arslan'a**,

Tez çalışmamın hazırlanması sürecinde akademik ve mesleki bilgilerini benimle paylaşan değerli hocam Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Başkan'ı **Prof. Dr. Nurhan Güler'e**,

Desteklerini esirgemeyen bölüm hocalarım, Sayın **Prof. Dr. Ceyda Özçakır Tomruk**, Sayın **Doç Dr. Ediz Deniz'e**, Sayın **Yrd. Doç. Dr. Fatih Cabbar**, Sayın **Öğr. Gör. Dr. Çağrı Burdurlu** ve Sayın **Öğr. Gör. Dr. Volkan Dağışan'a**

Doktora tez çalışmamda yardım ve desteklerinden dolayı, Sayın **Doç. Dr. Fatma Yücel**, **Doç. Dr. Zelal Adıgüzel** ve Sayın **Dr. Arzu Taş'a**

Bu dönem boyunca birlikte çalıştığım dostlarım, **Dr. Doğuhan Taşcı**, **Dt. Hazar Yıldız**, **Dr. Hakan Gülşen**, **Dt. Ozan Nizam**, **Dt. Hakkı Tekin**, **Dt. Hanzade Hazal Sayiner**, **Dt. Sezer Işıksaçan**, **Dt. Berk Tolonay**, **Dt. Çınar Kulle'ye**

Doktora dönemimin her aşamasında benden dostluk ve yardımlarını esirgemeyen Sayın **Dr. Faiz Muhaffel**, ve **Dr. Simge Şenalp'e**,

Bana hem dostluk hem kardeşlik yapan, her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan değerli **Dr. Ayşegül Erten** ve **Dr. Mert Tayşi**,

Tüm eğitim-öğretim hayatım boyunca göstermiş oldukları maddi manevi destek için ve yolumu açarak bana örnek teşkil ettikleri için annem **Ayşe Sorkun** babam **Dt. Hüseyin Sorkun'a** ve kardeşim **Dr. Uğur Sorkun'a**,

Bu sürecin her anında yanımda olan, benimle birlikte sevinen ve üzülen, bana her zaman destek olan arkadaşım, eşim **Dr. Güliz Kılınçoğlu Sorkun'a**, teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Tez onayı	ii
beyan	iii
ithaf	iv
teşekkür.....	v
İçindekiler.....	vi
Tablolar listesi.....	viii
Şekiller listesi	ix
Özet	xi
abstract	xii
1. Giriş ve amaç	1
2. Genel bilgiler	2
2.1. Biyomateryal olarak kullanılan titanyumun özellikleri	2
2.1.1. Titanyumun yüzey oksidasyonu	3
2.2. Titanyum biyouyumluluğu	4
2.3. Osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon nedir?	5
2.4. Osseointegrasyon	7
2.5. Yüzey topografisinin osseointegrasyona etkisi	8
2.6. Yüzey modifikasyon işlemleri	9
2.6.1. Machined Yüzey	10
2.6.2. Plazma sprej kaplama yöntemi	10
2.6.3. Asitle pürüzlendirme yöntemi.....	11
2.6.4. Kumlanmış ve Asitle Pürüzlendirilmiş (SLA) yüzeyler	12
2.6.5. Mikro-ark oksidasyon yöntemi (MAO)	13
2.7. Hücre-İmplant Etkileşimi ve Hücre Modelleri	13
2.8. Hücre modelleri	15
2.8.1. Kemik eksplant hücre kültürleri.....	16
2.8.2. Transforme ve transforme edilmemiş hücre dizileri	16
2.8.3. İmmortalize hücre dizileri.....	16
2.8.4. Primer kemik iliği hücre kültürleri.....	17

2.9. Bor	18
2.10. Gamma ışınları ile sterilizasyon	20
2.11. ALP Enzim etkinliğinin önemi	22
3. gereç ve yöntem	24
3.1. Deney grupları	24
3.2. Titanyum disklerin hazırlanması	24
3.2.1. Titanyum disk yüzeylerinin hazırlanması	24
3.2.2. Mikro-ark oksidasyon (MAO) yöntemi ile disk yüzeylerinin kaplanması	25
3.3. Yüzeylerin SEM ile incelenmesi	26
3.4. Örneklerin sterilizasyonu	27
3.5. Osteoblast Hücre Kültürü	28
3.6. SEM örneklerinin hazırlanması	29
3.7. Titanyum Yüzeylerde Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Belirlenmesi	31
3.8. İstatistiksel Değerlendirme	34
4. BULGULAR	35
4.1. Üçüncü Gün ALP ölçümlerinin değerlendirilmesi	35
4.2. Yedinci Gün ALP ölçümlerinin değerlendirilmesi	38
4.3. Ondördüncü Günde ALP ölçümlerinin değerlendirilmesi	39
5. tartışma	45
6. sonuç ve öneriler	49
KAYNAKLAR	50
özgeçmiş	65

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4- 1:B grubu için t6 ve t43 değerleri	36
Tablo 4- 2: AE için t6 ve t43 değerleri	36
Tablo 4- 3: MS grubu 3. gün ALP değerleri.....	37
Tablo 4- 4: Üçüncü gün için grupların ALP değerleri.....	37
Tablo 4- 5: B grubu için t6 ve t43 değerleri	38
Tablo 4- 6: MS için 7. gün ALP değerleri	38
Tablo 4- 7: Yedinci gün ortalama ALP değerleri	39
Tablo 4- 8: B grubu için t6ve t43 değerleri.	40
Tablo 4- 9: MS grubu için t6ve t43 değerleri.	40
Tablo 4- 10: AE grubu için t6ve t43 değerleri.....	40
Tablo 4- 11: Ondördüncü gün grupların ALP değerleri.	41
Tablo 4- 12: Üçüncü gün ALP ölçüm verileri	42
Tablo 4- 13: Yedinci Gün ALP ölçüm verileri	43
Tablo 4- 14: Ondördüncü gün ALP ölçüm verileri.....	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil2- 1:Yeni oluşan kemik hücreleri	6
Şekil2- 2: Co-60 ışınlama cihazı.....	21
Şekil2- 3: Gama ışınları	22
Şekil 3- 1: Mikro ark oksidasyon cihazı (İTÜ metalurji mühendisliği ABD)	26
Şekil 3- 2: Bor ile kaplı titanyum disk yüzeylerinin SEM görüntüsü.....	27
Şekil 3- 3: Örneklerin ultrasonik cihaz ile temizlenmesi.....	27
Şekil 3- 4: Gamma ışınları sistemi.....	28
Şekil 3- 5: Diskler üzerine hücre ekimi yapıldı.	29
Şekil 3- 6: MS diskleri hücre ekimi sonrası 20.000 büyütmede SEM analizi	30
Şekil 3- 7: AE diskleri hücre ekimi sonrası 20.000 büyütmede SEM analizi	30
Şekil 3- 8: Bor kaplı diskler hücre ekimi sonrası 20.000 büyütmede SEM analizi.....	31
Şekil 3- 9: QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit.....	32
Şekil 3- 10: Hücre lizatlarının kuyucuklara yerleştirilmesi	33
Şekil 3- 11: ELİSA Reader Cihazı.....	33

SEMBOLLER / kısaltmalar listesi

ALP	Alkalen fosfataz
B	Bor
HA	Hidroksiapatit
MAO	Mikro ark oksidasyon
Ti	Titanyum
TiO₂	Titanyum dioksit
BGF	Kemik büyüme faktörleri
IGF I-II	İnsulin-like büyüme faktörü (I-II)
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü
CA	Kalsiyum
PO₄	Fosfat
HCL	Hidroklorik asit
H₂SO₄	Sülfürik asit
SLA	Kumlanmış ve Asitle Pürüzlendirilmiş
AE	Asit etched
MS	Machine surface
TPS	Titanyum plasma sprey
P	Fosfor
NaH₂PO₄ 2H₂O	Sodyum Tetraborat
Ca(CH₃COO)₂ H₂O	Kalsiyum asetat monohidrat
Na₂B₄O₇ 10H₂O	Disodyum tetraborat
SEM	Scanning (Taramalı) elektron mikroskobu

ÖZET

Sorkun, H.O. (2018) Sodyum tetraborat solüsyonu ile kaplanmış titanyum yüzeyinde ALP enzim etkinliğinin karşılaştırmalı incelenmesi. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, diş ve çene cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Günümüzde titanyum implantların geliştirilmesi biyolojik spesifik yüzey modifikasyonlarına doğru yönelmektedir. Yapılan araştırmalarda Ti yüzeyinde iyileşmeyi ve rejenerasyonu tetikleyebilecek modifikasyon yöntemleri öne çıkmaktadır. Geliştirilmesi amaçlanan titanyum yüzeylerin amacı ise genel olarak implant osseointegrasyon süresinin kısaltılması, daha güçlü kemik-implant bağlantısı sağlamaktır. Bu doğrultuda tez çalışmamızda antimikrobiyal özelliği kanıtlanmış, kemik metabolizmasında etkinliği sıklıkla araştırılan bor (B) minerali yine son zamanlarda yüzey kaplamasında başarısı kanıtlanmış bir yöntem olan Mikro ark oksidasyon (MAO) yöntemi ile titanyum yüzey üzerine kaplanmıştır. Hazırlanan bor kaplı titanyum disk yüzeylerindeki alkalen fosfataz (ALP) etkinliği, işlenmemiş yüzey (MS) ve asitle pürüzlendirilmiş yüzeye (AE) sahip Ti diskler üzerindeki osteoblastların ALP etkinliği ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Çalışmamızda hazırlanan titanyum diskler 5 gruba ayrılmıştır ayrıca disk yerleştirilmeyen sadece hücre ekimi yapılan bir kontrol grubu oluşturulmuştur. 3, 7, 14. günlerde; 0.,6., 8., 43. ve 46. dakikalarda ALP enzim seviyeleri ölçülmüştür. Çalışmamız sonucunda B'un osteoblastik aktivite üzerindeki pozitif yönde etkili olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla B içeren titanyum yüzeyleri üzerinde yapılacak ileri çalışmalar ile implant osseointegrasyon sürelerinde kısalma ve daha güçlü osseointegrasyon sağlanabileceği düşünülmektedir. Bu yüzey özelliğini taşıyan ve implantasyon amacıyla kullanılacak materyaller için daha kapsamlı in vivo ve in vitro çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : Titanyum, yüzey, Bor, ALP, MAO

ABSTRACT

Sorkun H.O. Comparative study of ALP enzyme activity on titanium surface coated with sodium tetraborate solution. Yeditepe University, Institute of Health Science, Department of Oral and Maxillofacial Surgery. PhD Thesis. İstanbul. 2018.

Nowadays, the focus of improvement efforts of titanium (Ti) implants is heading towards biologically specific surface modifications. The modification methods having ability to induce regeneration and healing on the Ti surface stand out in the studies conducted in this very field. The main functional purpose of Ti surfaces to be developed is to shorten the overall implant osseointegration time in order to provide a stronger bone-implant connection. In this thesis, Boron (B) mineral, which has been proved to have an antimicrobial property and of which efficiency has been intensively investigated, was used to coat the surfaces of Ti discs by making use of Micro Arc Oxidation (MAO) method, a proven method of surface coating. ALP (Alkaline Phosphatase) activity on prepared B-coated Ti disc surfaces was investigated in comparison with ALP activity of osteoblasts on Ti discs with untreated surface (MS) and acid-roughened surface (AE). The Ti discs prepared in our study were divided into 5 groups and a control group without disk placement but with only implanted cell was also created. ALP enzyme levels were measured on 3rd, 7th, 14th, days and at 0, 6th, 8th, 43rd and 46th minutes. The surfaces of Ti discs were coated with sodium tetraborate solution by MAO method. As a result of this study, Boron is thought to have a positive effect on osteoblastic activity. Therefore, it is assumed that with further studies on titanium surfaces containing Boron, implant osseointegration time might be shortened and stronger osseointegration can be ensured. More extensive in vivo and in vitro studies are required for the specified surface.

Key Words: MAO, Boron, titanium, surface, ALP

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Titanyum'un (Ti) yüksek dayanıklılığı, biyouyumluluğu ve korozyon direnci biyomateryal olarak kullanılan metaller arasında en tercih edilen metallere olmasının nedenlerindedir. Yıllardır kalça protezleri ve dental uygulamalarda kullanılan Ti özellikle sert dokunun yerine konulması amacıyla kullanılmaktadır.

Günümüzde Ti implantların geliştirilmesi biyolojik spesifik yüzey modifikasyonlarına doğru yönelmektedir. Yapılan araştırmalarda Ti yüzeyinde iyileşmeyi ve rejenerasyonu tetikleyebilecek modifikasyon yöntemleri öne çıkmaktadır.

Bor'un (B), 1900'lerden beri bitkiler için gerekli temel maddelerden olduğu bilinmektedir ancak insan ve hayvan organizmaları için önemi hala tam olarak bilinmemektedir. Bitki metabolizmasının yanı sıra bazı mikroorganizmalar için de temel maddelerdendir. Hatta bu sebeple autoinducer-2 (1), ve boromisin ve aplasmomisin gibi bazı antibiyotiklerin yapısına katılmıştır. (2) .

Bor, oldukça geniş bakteri, mantar ve maya spektrumuna karşı etkili bir antimikrobiyaldir (3, 4). Memeliler üzerinde en bilinen temel etkisi ise kemik ve diş gelişiminde oynadığı roldür. Bor eksikliğinde farelerde diş çekimi sonrası alveolar kemikte geç iyileşme tespit edilmiştir (5).

Son yıllarda implant materyalleri üzerine yapılan çalışmalarda osseointegrasyon süresini kısaltmak ve daha güçlü osseointegrasyon elde etmek temel amaçlardan olmuştur. Bu doğrultuda özellikle kemik yapımını uyarıcı titanyum yüzey modifikasyonları üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmamızda da osteoindüktif bir yüzey oluşturmak amacıyla titanyum yüzey üzerine kaplanan B'un osteoblastik aktivite üzerinde pozitif yönde etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyomateryal olarak kullanılan titanyumun özellikleri

Dünya nüfusundaki yaşlı popülasyonun artmasıyla birlikte yaşlanma ile kaybedilen dokular yerine çeşitli biyomateryallerden üretilmiş çeşitli protezlerin uygulanması oldukça yaygınlaşmıştır. Özellikle kalça protezleri, dental implantların kullanımı önemli ölçüde artmıştır. Metal biyomateryaller, sert doku protezleri için en uygun materyallerdir. Bu biyomateryaller arasında en yaygın kullanılan alaşımlar titanyum (Ti) alaşımlarıdır. Günümüzde Ti alaşımların biyomateryal olarak bu denli dikkat çekmesinin sebepleri şu şekilde sıralanabilir; mükemmel dayanıklılığı ve korozyon direnci, allerjik olmaması, metal biyomateryaller arasında biyouyumluluğu en yüksek materyal olması. Saf Ti ve Ti-6Al-4V hala en yaygın kullanılan biyomateryallerdir. Bu Ti alaşımlara biyomedikal uygulamalarda oldukça fazla ihtiyaç doğmuştur (6).

Ti ve alaşımları dental uygulamalarda da geniş uygulama alanı bulmuştur. Dental implantlar, günümüzde kısmi tam dişsizlik durumlarında tedavi yöntemi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Titanyum implantların iyi osseointegrasyon için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özelliklerden en önemlisi titanyumun hava ile temasıyla doğal olarak oluşan oksit tabakasıdır. Diğer önemli yüzey özellikleri ise; yüzey topografisi, yüzey kimyası, ıslanabilirlik şeklindedir (7).

Protein adsorpsiyonu, hücre-yüzey etkileşimi, implant-doku yüzeyinde meydana gelen hücre-doku gelişimi gibi osseointegrasyon açısından önemli faktörler yüzey özelliklerinden etkilenmektedir (8, 9).

Yüzey ıslanabilirliği büyük oranda yüzey enerjisine bağlıdır ve fizyolojik çevre ile olan teması belirler. Artmış ıslanabilirlik bu yüzden implant yüzeyi ve biyolojik çevre arasındaki etkileşimleri artırır. Kalsiyum ve fosfat iyonları gibi inorganik moleküller, hidroksile olmuş TiO_2 yüzeylere hızlıca absorbe edilirler. (10).

2.1.1. Titanyumun yüzey oksidasyonu

Titanyum hava ile temas ettiğinde yüzeyinde kuvvetli pasif bir oksit tabakası oluşmaktadır ve titanyumun korozyona olan direncini arttırmaktadır. Titanyumun biyouyumluluğu oldukça yüksek seviyedeki pasif olan oksit tabakasının fiziksel ve elektrokimyasal dayanıklılığıyla direkt olarak ilişkilidir. Titanyum oksijen içeriğine göre dört tipe ayrılmaktadır. Oksijen oranı %0,4 oranında olanlar 4. tip olarak, %0,18 oranında oksijen içerenler de 1. tip olarak sınıflandırılmaktadır (11)

Oksidasyon sırasında titanyum yüzeyinde çeşitli oksit yapıları oluşabilmektedir. Bu oksitlerden TiO_2 en sık oluşan ve en stabil olanıdır. Amorf, anataz, rutil ve brukit olmak üzere 4 farklı yapıda bulunmaktadır. TiO_2 kimyasal ataklara karşı oldukça dayanıklıdır bu durum titanyumu korozyona karşı dirençli bir materyal haline getirir. (12, 13, 14)

^[1]_{SEP} Titanyumun yüzeyinde oluşan bu pasifize edici oksit tabakanın korozyona karşı direnci sağlamanın yanında fizyolojik sıvılar ve proteinler gibi implantasyon sırasında yüzeyle temasa geçen maddelerle de kimyasal reaksiyona girdiği düşünülmektedir (14). TiO_2 kemik-implant aralığında biyolojik mekanizmaları etkileyen bir takım organik ve inorganik kimyasal reaksiyonda aktif olduğu savunulmaktadır. Bu sebeple, titanyumun oksit tabakasının kalınlığı, kristal yapısı ve kompozisyonunda meydana gelen değişimler, biyolojik performansı etkileyen önemli faktörler olarak kabul edilmektedir (15, 16, 17).

Korozyon direnci, metal biyomateryallerin en önemli özelliklerindedir. Korozyon, hem protezlerin bozulması hem de protezlerden potansiyel olarak toksik veya alerjik parçaların salınması anlamında ciddi problem oluşturmaktadır. Hem saf Ti hem de $Ti6Al4V$, korozyona karşı direnci yüksek materyaller olarak yüksek bir ilgiye sahiptir. Titanyumun yüksek korozyon direnci, yüzeyde oluşan yaklaşık 10 nm kalınlığındaki solid oksit tabakasına (TiO_2) bağlıdır. Bu oksit tabakası, titanyumu asit ataklarına, kimyasal ve termal etkilere karşı korumaktadır. Mevcut oksit tabakası herhangi bir şekilde zarar görse bile hava ve su varlığında yeniden oluşabilmektedir. Oksit tabakasında kalıcı hasarların oluşması, ağızda bulunmayan oldukça yüksek etmenlerin varlığına bağlıdır. Biyolojik ortamdaki korozyon çalışmaları, titanyumun mükemmel korozyon direncini teyit etmiştir (18).

2.2. Titanyum biyoyumluluğu

Biyoyumluluk bir materyalin spesifik bir uygulama sonunda uygun konak cevabı gösterebilme yeteneğidir (19).

Titanyum ve alaşımlarının tercih edilmelerinin en önemli nedeni biyolojik uyum göstermeleridir. Titanyum ve alaşımlarının biyoyum özellikleri, üstün korozyon direncinden kaynaklanmaktadır. Bu korozyon direnci ise materyalin yüzeyinde oluşan oksit tabakasının, materyali elektromanyetik ataklara karşı korumasıyla oluşur. Titanyumun kemikle osseointegrasyonunun mükemmel olması ve yüzeyinde hidroksiapatite benzer tarzda kalsiyum fosfattan zengin bir tabakanın şekillenmesine olanak tanınması, biyolojik uyumu belirleyen diğer kriterlerdendir (20, 21).

Biyolojik uyumu belirleyen diğer bir kriter de normal şartlar altında titanyumun kemikle osseointegrasyonunun mükemmel olması ve üzerinde hidroksiapatite benzer tarzda kalsiyum fosfattan zengin bir tabakanın şekillenmesine imkan tanınmasıdır. Biyomateriyal olan titanyumla ilgili yapılan biyoyumluluk çalışmaları çok çeşitli in-vitro testlerden hayvan deneyleri ve in vivo çalışmalara kadar uzanmaktadır. Literatürde, implant materyali olarak kullanılan titanyuma ait korozyon ürünlerinin lokal lenf nodlarında ve iç organlarda biriktiği ve galvanik yan etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar tarafından titanyuma karşı alerjik reaksiyon vakası da rapor edilmiştir (22, 23, 24, 25)

20. yy sonu, 21. yy başlarında biyoyumluluk terimi çoğunlukla düşük toksisite ile açıklanırdı. İmplantın yerleştirildiği bölgedeki yumuşak dokuda reaksiyonu, göreceli olarak aselüler yabancı cisim kapsülü oluşturmak şeklindedir ve titanyum düşük iyon salınımı ile tam olarak bu tanıma uymaktadır (26)

ISO standartlarına göre (ISO 10993-1) bazı testler tanımlanmış olup bu testleri başarıyla geçen bir materyal biyoyumlu olarak tanımlanmaktadır. Bu testler; hayvan çalışmaları, genotoksisite ve karsinojenik etkiyi, gonotoksisiteyi, kanla etkileşim testlerini, in vitro sitotoksisite testlerini, sistemik toksisiteyi, materyallerin degradasyonunu, implantasyon sonrası lokal etkilerin ve sterilizasyon artıklarının saptanmasını, irritasyon ve sensiviteyi, örneklerin hazırlanmasını, degradasyon ürünlerinin saptanmasını ve miktarının tayinini içeren testlerdir (27).

Urban ve ark 2000 yılında yaptıkları in vivo çalışmada kalça/diz protezi taşıyan hastalar üzerinde koroziv ürünlerin vücuda yaygın olarak dağılabildiğini ancak toksik etkiler oluşturmadığını göstermiştir (23). Yapılan in vitro çalışmalar titanyumun mutajenik ve diğer toksik etkilerinin olmadığını göstermektedir (28, 29, 30, 31).

Metalik implantların biyolojik uyumu, metal salınımı ve protein bağlama kapasitesi gibi yüzey özelliklerine bağlıdır. Krom-kobalt (Co-Cr-Mo) ve titanyum implantların karşılaştırıldığı çalışmada, krom salımının titanyuma göre daha fazla olduğu gösterilmiş ve iki yüzeyin protein bağlanma ve konformasyon mekanizmalarında farklılıklar olduğu bildirilmiştir (32). Metal ve alaşımının tipine bağlı biyofilmin kompozisyonu ve metal iyon salınımı, implant alaşımların biyoreaktivitesini belirlemektedir. Titanyum metalinin üstün biyoyumluluğu, düşük iyon salımına ve vücut sıvıları ile karşılaştığı zaman yüzeyinde meydana gelen protein konformasyonuna bağlıdır.

İmplant materyallerinin yüzey özellikleri bu materyallere karşı gelişen biyolojik cevapta etkin rol oynamaktadır. İmplantlarla ilgili temel güncel problem, implant-doku ara yüzünün özelliğidir. Yüzey özelliklerini belirleyen parametreler ise kimyasal özellikler, kristalizasyon, heterojenite, pürüzlülük ve ıslanabilirliktir. Her bir parametre biyolojik cevap üzerinde önem taşımaktadır. Titanyum implantların yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi için hidroksiapatit kaplaması, lazer ve plazma uygulaması, iyon implantasyonu gibi işlemler uygulanmaktadır (33).

2.3. Osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon nedir?

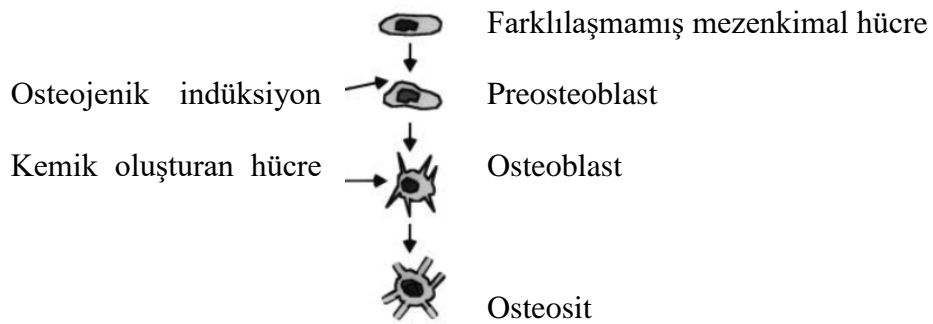
Osseoindüksiyon, osseogenezisin başlamasına yol açan aşamadır. Bu aşamada olgunlaşmamış hücreler uyarılarak preosteoblast hücrelere dönüşmesi sağlanır. Kemikte gelişen hasar sonrası kemik iyileşmesi büyük oranda bu aşamaya bağlıdır.

Kemik ve komşu dokular; osteoblast, osteoklast ve osteosit gibi farklılaşmış kemik hücrelerinin yanı sıra çok sayıda farklılaşmamış hücre de içermektedir. Bu farklılaşmamış hücreler, kemik iyileşmesi ve osteointegrasyon için oldukça önemlidir çünkü osteoprojenitör hücrelere, zamanla da kemik hücrelerine dönüşebilmektedirler (34). Doğru stimulus ile farklılaşmamış mezenkim hücreleri, kemik oluşumunu başlatan preosteoblastlara dönüşebilir (Şekil2-1) (35).

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

İmplant yüzeyinde kemik oluşumu farklılaşan kemik hücrelerinin aktivitesine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu hücreler daha önceden var olan, travma ile aktive olan osteoblastlardan ya da osteoindüksiyon sonucu oluşan primitif mezenkimal hücrelerden köken alabilmektedir (35). Dolayısıyla osteokondüksiyon, bir önceki aşama olan osteoindüksiyon ile direkt olarak ilişkilidir. Kemik oluşunda çeşitli kemik büyüme faktörleri (BGF) önemli rol oynamaktadır. Bu BGF'lerden hemen hemen hepsi; insulin-like büyüme faktörü (IGF I-II), fibroblast büyüme faktörü (FGF), PDGF ve TGF- β içermektedir. Büyüme faktörleri hücre sinyal ajanları olarak görev yapan küçük proteinlerdir (36).

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



Şekil 2- 1:Yeni oluşan kemik hücreleri (35)

2.4. Osseointegrasyon

Geçtiğimiz 40 yılda dental implantların dişsiz ağızların tedavisinde önemli bir alternatif haline gelmiştir. 1950’li yıllarda subperiosteal implantların kullanımı, 1960’lı yıllarda yerini endosseoz implantlara bırakmıştır. Bu implantlar, kemik ile arasında stabilizasyonu artırabilecek başka bir madde bulunmaksızın primer stabilite sağlayacak hassaslıkta çene kemiği içine yerleştirilir.

Osseointegrasyon, ilk olarak Branemark ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Albrektsson ve arkadaşları tarafından canlı kemik ve implant yüzeyi arasındaki devamlı, direkt temas olarak tanımlanmıştır. Osseointegrasyonun histolojik olarak tanımı ise şöyledir; implant yüzeyinin kemik tarafından arasında fibröz doku bulunmaksızın direkt olarak bağlanmasıdır. Fakat bu histolojik tanımların klinik olarak belirlenmesi zordur. Bu sebeple osseointegrasyon prensibi biyomekanik bir fenomen olarak değerlendirmekte ve klinik olarak fonksiyonel yükleme sırasında asemptomatik rijit fikse alloplastik implant materyalleri osseointegre olarak kabul etmektedir (36).

Osseointegrasyon, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon ile direkt ilişkili bir kavramdır. Örneğin toksik olan bir materyal osteokondüksiyona izin vermeyeceği için osseointegrasyon da söz konusu olamaz. İmplant-kemik yüzeyi direkt kontakta olmayıp arayüzde kalınlığı 40-500 nm arasında olan amorf bir tabaka olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada 17 yıllık takip sonrasında sökülen implantların ancak %70-80 osseointegre olduğu gösterilmiştir (37, 38). Son yıllarda yapılan çalışmalar ise bu bağlantı yüzeyini artırmak, osseointegrasyon süresini azaltmak üzerine yoğunlaşmıştır.

Dental implantların klinik başarısı erken osseointegrasyon kabiliyetleri ile direkt olarak ilişkilidir. Yüzey topografileri ve geometrileri implantların uzun ve kısa dönem başarıları açısından kritik önem taşımaktadır. Bu parametreler hassas cerrahi tekniklerle yakından ilişkili olup, başarılı erken klinik sonuç için ön koşuldur (39).

İmplantasyondan hemen sonra implant yüzeyi biyolojik sıvılar ve dokularla direkt temas halindedir. Titanyum yüzeyinde direkt kemik apozisyonu, dental implantların erken yüklenmesi için çok önemlidir.

İmplantasyondan sonra iki tip cevap vardır. İlkinde, implantın etrafında fibröz bir yumuşak doku kapsülünün oluşmasıdır. Bu fibröz doku kapsülü, uygun biyomekanik fiksasyonu sağlamamakta ve dental implantın klinik başarısızlığına yol açmaktadır. İkinci tip kemik cevabı, araya giren bir bağ dokusu tabakası olmadan doğrudan kemik-

implant teması ile ilgilidir. Bu cevap, osseointegrasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu biyolojik fiksasyon implant destekli protezlerin ve uzun vadeli başarılarının bir ön koşulu olarak kabul edilir. Titanyum implantlarda osseointegrasyon oranı ve kalitesi yüzey özelliklerine bağlıdır. Yüzey özellikleri, hidrofilit ve yüzey pürüzlülüğü, implant-doku etkileşimi ve osseointegrasyonda rol oynayan parametrelerdir (40).

2.5. Yüzey topografisinin osseointegrasyona etkisi

İmplant yüzeyinin özellikleriyle kemik arasında ilişki yıllardır biyomateryal bilimi tarafından en çok araştırılan konulardan biridir. Çalışmalar, yüzey topografisi ve yüzeyin fizikokimyasal yapısı gibi başlıca iki yüzey özelliğinin doku ile implant arasında gerçekleşen olayları yönlendirdiğini vurgulamaktadır (41, 42).

Son yıllarda, araştırmalar, osseointegrasyonu optimize edebilmek ve hızlandırabilmek için bu yüzey özelliklerinde bir takım modifikasyonlar yapmak üzere yoğunlaşmıştır. Araştırmacılar doku cevabını artıracak yüzey özelliklerinin gerekliliğinin üzerinde durmaktadırlar (43,44). Fakat yüzey morfolojisinde yapılan düzenlemeler çoğunlukla yüzey kimyasında da bir takım değişimlere sebep olduğu için birbirlerinden bağımsız değerlendirilmeleri zorlaşmaktadır.

Zhao ve ark. 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada yüzey mikrotopografisi ve yüksek yüzey enerjisinin sinerjistik çalışarak osteoblast cevabını artırdığının altını çizmişlerdir (45).

Kim ve ark. 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada ise nanotopografik yüzey modifikasyonlarının osteojenik marker seviyelerinde belirgin bir artış gösterdiğini belirtmişlerdir (46).

Primer kültüre edilmiş insan osteoblastik hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda, pürüzlü yüzeylerde elde edilen düşük hücre bağlanma ve çoğalma değerlerinin yanında, yüzey pürüzlülüğünün artışına bağlı hücre çoğalmasındaki artışı gösteren çalışmalar da mevcuttur (47). Bazı araştırmacılar, çalışmalar arasındaki bu farkları kullanılan farklı hücre modellerine bağlamakta ve pürüzlülük hakkında bir sonuca varılmasını zorlaştırdığını belirtmektedirler (48). Yine de birçok çalışmanın ve sistematik derlemelerin vardığı ortak görüş, orta seviyede bir yüzey pürüzlülüğünün implant çevresinde gerçekleşen osteogenez üzerinde olumlu etkileri olduğudur (49). Ayrıca

pürüzlü yüzeylerin hem trombosit hem de monosit bağlanmasını arttırdığı gösterilmiştir (50, 51).

Hayvan çalışmalarını değerlendirdiğimizde de benzer çelişkili sonuçlar karşımıza çıkmaktadır. Bazı çalışmalar, artan yüzey pürüzlülüğünün kemik implant kontağında bir artış meydana getirdiğini gösterirken (52), diğer çalışmalar ise pürüzlülük ve osseointegrasyonun kalitesi arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır (53).

Shalabi ve ark. (54), yüzey pürüzlülüğünün implant çevresindeki iyileşme ve tork direnci üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmada, 470 adet *in vivo* araştırmanın sistematik derlemesinde yüzey pürüzlülüğü ile implantı dışarı çekme kuvveti arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Fakat, derlemenin yapıldığı tarihe kadar yürütülen çalışmaların heterojenitesine rağmen, verilerin istatistiksel analizinin pürüzlülük ile kemik-implant teması arasındaki pozitif bir ilişkiyi destekler nitelikte olduğunu belirtmişlerdir.

2.6. Yüzey modifikasyon işlemleri

Biyomateryal yüzeyinde yapılan pürüzlülük ve morfolojik modifikasyonların doku ve hücrelerin implanta olan cevabında etkili olabilecekleri düşünülmektedir. Pürüzlü kaplamalar başlangıçta mekanik stabiliteyi arttırmaya yönelik olarak planlanmışlardır. Hayvan deneyleri, pürüzlü yüzeyler ile cilalı olanların rotasyon testi ile karşılaştırılmalı incelenmesinde pürüzlü olanların daha yüksek tork değerlerine dirençli olduğu gösterilmiştir. Fakat yine bu deneylerde pürüzlü alanların çok az bir bölümünün kemikle dolduğu da ortaya çıkmıştır (55).

İmplant yüzey pürüzlülüğü, konak dokuların hücresel davranışı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (56, 57). Titanyum yüzey topografisi hücre ataşmanı, hücre yönlendirmesi, yayma, proliferasyon, farklılaşma ve protein sekresyonunu değiştirmektedir. Özellikle, titanyum yüzeyinin pürüzlülüğü, insan osteoblastları ile yapılan kemik-ilişkili hücre dışı matriks proteinlerinin üretimini indüklediği bildirilmiştir (57).

Saf titanyum implantların torna cihazı ile işlenmesinden sonraki 1000 nm pürüzlü yüzeye sahip hali ile, platin elektrod karşısında 540 ml metanol, 350ml N-bütanol ve 60 ml perklorik asit banyosunda 22.5 V elektrik akımına tabi tutularak

oksidasyon yapılarak 10nm pürüzlülüğe indirgenen implantlar tavşan femurlarında 6 haftalık iyileşmeden sonra, sökme torkları açısından kıyaslandıklarında oksidasyon yapılanlar istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek değerler ile çıkartılabılmış, fakat histolojik ve morfometrik analizlerde önemli fark gözlenmemiştir (58).

Pürüzlülüğün fazla olması implant ile kemik arasındaki mekanik bağlantıyı artırmakla birlikte iyonik sızıntıyı artıracığından periimplantitis için büyük bir risk oluşturmaktadır (59). Bu nedenle ortalama pürüzlülük değerinin 1–2 µm ile sınırlı tutulması gerekmektedir (60). Teorik olarak ideal bir yüzeyin 4 µm çaplı yarım daire şeklinde 1,5 µm derinliğinde olması önerilmektedir (61). Birçok çalışma bu aralıktaki yüzey pürüzlülüğünün diğer yüzey topografilerine göre kemik-implant arasındaki teması ve yerinden çıkarıcı tork kuvvetlerine karşı direnci artırdığını göstermiştir (62, 63)

2.6.1. Machined Yüzey

Direkt olarak freze cihazından çıkan implantların yüzey yapısı şeklindedir. Machined yüzeyli implantlarda, implantın uzun aksı boyunca 0.1µm derinlik ve genişlikte dairesel paralel çizgiler en yaygın bulgulardır.

2.6.2. Plazma sprej kaplama yöntemi

Plazma sprejleme tekniği genellikle hidroksiapatit (HA) ve titanyum (Ti) gibi kalın bir yığılma tabakası içermektedir. Kaplama işlemi termal olarak eritilmiş materyallerin implant yüzeyine püskürtülmesi şeklindedir. Plazma sprej esas itibarıyla yüzey pürüzlülüğünü artırarak implantların yüzey alanını artırmaktadır (64)

Metal implantlar temel olarak hidroksiapatitten (HA) oluşan kalsiyum (Ca) ve fosfat (PO₄) tabakaları ile kaplanır. İmplantın yerleştirilmesinden sonra, periimplant bölgesine kalsiyum fosfat salınımı vücut sıvılarının doyumunu artırır ve implant yüzeyi üzerine biyolojik bir apatit çöker. Biyolojik apatit tabakası, osteojenik hücre tutunması ve büyümesi için endojen proteinler içeren bir matris olarak kullanılabilir. İmplant çevresindeki kemiğin iyileşme süreci bu nedenle bu biyolojik apatit katmanı tarafından geliştirilir. Kemik dokusuna titanyum implantların biyolojik fiksasyonu

kalsiyum fosfat kaplama varlığında daha hızlıdır. Kaplanmamış titanyum implantlarla kıyaslandığında uzun vadede bu Ca ve fosfor (P) kaplamaların klinik başarıyı artırdığı bilinmektedir (65, 66, 67).

Plazma sprej kaplama ile ilgili en büyük endişelerden biri titanyum implant yüzeyinden kaplamanın delaminasyon olasılığı ve bunun sonucu olarak kaplamanın kemik dokusuna iyi bağlanmış olmasına rağmen başarısızlığın meydana gelmesidir. Dental implantların boyutu uygun olmadığında plazma sprej etkinliği istenilen seviyeye ulaşmadığından kaplama delaminasyonu rapor edilmiştir. Kaplamanın gevşemesi, özellikle yoğun kemik içine yerleştirilmiş olan implantlar da rapor edilmiştir (68, 69, 70)

2.6.3. Asitle pürüzlendirme yöntemi

Yapılan araştırmalarda asitle pürüzlendirme yönteminin implant yüzeyinde oluşan kemik miktarını artırdığı gösterilmiştir. Asitle pürüzlendirme yöntemi, hidroklorik asit/sülfirik asit (HCL/H₂SO₄) ile ya da %2 Hidroflorik asit (HF) /%10 nitrik asit banyosu ile yapılabilmektedir. Asitle pürüzlendirme tekniğinde aşındırma oranının kullanılan asit tipine ve konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (71).

Deneysel çalışmalar yüksek sıcaklıkta asitle pürüzlendirmenin titanyum plazma sprej (TPS) yüzeylere oranla homojen bir mikro pürüzlü bir yüzey ve daha yüksek kemik implant teması oluşturduğunu göstermiştir (72, 73).

Asitle pürüzlendirme yöntemi yüzey alanını artırmanın yanında metal yüzey üzerindeki artık maddelerin giderilmesini sağlayarak da kemik-implant bağlantısının iyileşmesinde rol oynamaktadır (74, 75).

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar tavşan femurlarına yerleştirdikleri cilalı Ti ve HCL/H₂SO₄ ile asitlenerek pürüzlendirilmiş 3.25x4 mm'lik implantları tork testine tabi tutmuşlardır. İki aylık iyileşme dönemi sonunda osteotite ve cilalı Ti için 20.5 Ncm ve 4.95 Ncm değerleri saptanmış; asitle pürüzlü yüzey için 4 kat daha fazla olan tork direncinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya konarak; pürüzlü yüzeylerin kemiğe bağlanmayı arttırdığı sonucuna varılmıştır (76).

Buser ve ark. 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada; asitle pürüzlendirme ve kumlama yapılan implantların sökülmesinde belirgin olarak çok daha yüksek tork uygulanması gerektiği bildirilmiştir (77). Ayrıca Cochran ve ark. asit pürüzlendirme ve kumlama yöntemlerinin uygulandığı implantlarda yüklenme öncesi ve sonrası boyun bölgesi kemik rezorpsiyonlarında azalma olduğunu bildirmiştir (74).

Bununla birlikte, kimyasal işlemler titanyumun mekanik özelliklerini azaltabilir. Örneğin, asitle pürüzlendirme hidrojen sertleşmesine neden olup yüzey üzerinde mikro çatlaklar yaratarak implantların yorulma direncini azaltabilmektedir (78).

2.6.4. Kumlanmış ve Asitle Pürüzlendirilmiş (SLA) yüzeyler

SLA, iri grenli partiküllerle kumlanmış yüzeye ardından kuvvetli bir asit uygulayarak yüzeyi pürüzlendirmek için kullanılır. SLA tekniği, TPS kaplamalara alternatif olarak, daha iyi bir yüzey kimyası ve topografisi elde etmek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu işlem makro pürüzlülük ve mikro çukurlar elde etmek osseointegrasyonun yanı sıra yüzey pürüzlülüğünü artırmak için grit kumlama ve asitle aşındırmanın ardarda kombinasyonu şeklinde uygulanır (79, 80). Histomorfometrik çalışmalar ve biyomekanik testler, daha yüksek ters tork değerleri göstermiştir (81, 82, 83). Bu deneysel sonuçlardan sonra, klinik çalışmalarda SLA implantlar, implantların yerleştirilmesinden sonra 6 hafta gibi kısa sürelerde erken yüklenme için kullanılmaya başlanmıştır. Bu implantların 3 yıllık klinik muayenelerinde %99 civarında başarı oranları gösterilmiştir (84, 85).

SLA implant yüzeyleri, Straumann tarafından 1997'de kumlanmış ve asitlenmiş titanyum yüzeyleri olarak piyasaya sürülmüştür. SLA yüzey, yüzey kaplama yöntemi değildir. Büyük kum tanelerinin implant yüzeyine püskürtülmesi ile makro pürüzlülük oluşturulur. Asidin yüzeye uygulanmasıyla 2-4 µm derinliğinde mikro çukurlar elde edilir. SLA implant yüzeyleri orta derece pürüzlü yüzeylerdir. Pürüzlülük derecesi implant yüzeyi boyunca aynıdır. Yapılan bir çalışmada, osteoblast benzeri hücrelerdeki alkalin fosfataz aktivitesinin TPS yüzeylere göre SLA yüzeylerde daha fazla olduğu gösterilmiştir (75).

2.6.5. Mikro-ark oksidasyon yöntemi (MAO)

Bu yöntem, yüksek voltaj altındaki elektrolit solusyonu kullanılan, metal veya seramik gibi pürüzlü yüzeylerin kaplanması için geliştirilmiş ileri elektrokimyasal bir tekniktir. MAO yöntemi Ca ve fosfor (P) iyonlarının elektrolit kompozisyon ve konsantrasyonunun kontrol edilmesiyle yüzeyin kaplanmasıdır (86, 87). Biyomedikal uygulamalar açısından bu işlemin önemi; MAO işlemi sırasında elektrolitteki Ca ve PO₃ iyonlarının seramik tabaka içine girerek titanyum gibi alaşımların bioaktivite potansiyelini arttırabilmesidir (88, 89).

MAO işlemi sırasında, elektrolite daldırılmış Ti örnek üzerine pozitif voltaj uygulanarak titanyumun anodizasyonu sonucu yüzeyde oksit tabakası oluşturulur. Uygulanan voltaj belli bir noktaya kadar artırıldığında oksit tabakada bozulmanın (yalıtkan madde bozulması) başladığı noktada mikro-ark gözlenmektedir. Yalıtkan madde bozulmasının olduğu anda Ti iyonları ve elektrolitteki OH iyonları ters yönde hareket etmeye başlayarak en kısa zamanda bozulan oksit tabakayı tamir ederler. Bu yeni oluşan tabaka sıkıca tutunmuş pöröz yapıdadır ki bu form biyoaktif yüzeyler için oldukça avantajlı bir durumdur (85, 87,90)

Son yıllarda Ti implantların biyolojik cevabının iyileştirilmesi konusunda yapılan çalışmalarda MAO yöntemi, yüzey modifikasyonu için en iyi yöntemlerden biri olarak nitelendirilmiştir (91)

2.7. Hücre-İmplant Etkileşimi ve Hücre Modelleri

Günümüzde yapılan araştırmaların amacı kontrollü ve hızlı iyileşmeyi sağlayan implant biyomateryallerinin geliştirilmesidir. İmplantların vücuda yerleştirilmesinden sonra meydana gelen etkileşimler osseointegrasyonun başarısını direkt olarak etkilemektedir. Normal yara iyileşme mekanizmasına ek olarak endoosseöz implantların kemik ile bağlantısının uygun biyomekanik özellikleri karşılayacak kadar iyi olması gerekmektedir. Bu nedenle, yeni üretilen implant veya implant yüzeylerinin kemik-implant arayüzünde meydana gelen etkileşimleri ve kullanılan biyomateryallerin kemik-hücre etkileşiminin değerlendirilmesi çok önemlidir (92). Bu nedenle çalışmalar

implantasyon sonrası gerçekleşen mekanizmalar üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu amaçla yürütülen in vitro ve in vivo deneyler ortopedik ve dental materyal biliminin temelini oluşturmaktadır.

In vivo deneyler, bir implant materyalinin toksisitesini, biyouyumluluğunu, kemik apozisyonunu, mekanik yeterliliğini ve iskeletsel fonksiyonun sağlanması açısından değerlendirmek için ideal model olarak kabul edilmektedir (93). Böylece implante edilecek bir biyomateryalin terapötik etkisi rahatça değerlendirilebilmektedir. İmplant-kemik arayüzündeki apozisyonunun incelenmesi sonucu, materyalin osseointegrasyondaki başarısı klinik kullanım öncesi ortaya konulabilmektedir. Ayrıca çalışmaların diğer bir önemli avantajı ise biyomateryalin, osteoblast fenotipinin ifadesindeki etkisinin değerlendirilebilme imkanındır. Günümüzde, materyal çalışmalarında osseointegrasyonun değerlendirilmesi için çeşitli hayvan modelleri ve farklı implantasyon bölgeleri kullanılmaktadır. Köpek, koyun, keçi, domuz ve tavşan en sık kullanılan modeller olarak kabul edilmektedir (94, 95).

İn vivo çalışmalardaki etik sıkıntılar ve yüksek maliyetler, implant materyallerinin ve yeni implant yüzeylerinin hücre etkileşimlerinin değerlendirmesinde ilk olarak in vitro çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Sitotoksik materyallerin değerlendirmesinde gereksiz hayvan kullanımını engellemek için, in vitro deneylerin uygulanımı tercih edilmektedir. Böylece, hayvan deneylerine geçmeden materyallerin sitotoksikite ve biyouyumlulukları hücre kültürü metodları vasıtasıyla incelenebilmektedir (96).

Hücre kültüründe, yeterli miktara ulaşıldığı zaman kültür kaplarından enzimatik olarak kaldırılan hücrelerin değerlendirilecek biyomateryal yüzeylerine ekilmesi ve hücrelerin yüzeylerde sergiledikleri bağlanma, çoğalma, özelleşme ve matriks üretimi gibi davranışların değerlendirilmesi in vitro testlerin temelini oluşturmaktadır (97, 98). Çeşitli osteoblast kültür modellerindeki tür farklılıkları, in vitro kemik hücresi kültürlerinde zamana bağlı olarak meydana gelen fenotipik değişim, üç boyutlu matriks organizasyonunun kaybı, in vivo deneylerde gözlemlenen mekanik kuvvetlerin ve biyolojik faktörlerin eksikliği ve in vitro deneylerden elde edilen sonuçların bazen in vivo sonuçlardan farklı olması gibi sınırlamalar in vitro deneyler için dezavantaj teşkil etmektedir (99, 100). Ancak, doğru hücre modelleri ve kültür teknikleri uygulandığında, test edilen implant materyalleri hakkında çok önemli bilgiler elde edilebilmektedir.

İn vivo deneylerde implantasyon sonrası gerçekleşen hücresel mekanizmaları taklit edebilmek için doğru in vitro çalışma protokollerine ve uygun hücre modellerine gereksinim vardır. Doku kültürü tekniklerinin gelişimi ile birlikte, osteojenik potansiyele sahip hücrelerin izolasyonu ve yetiştirilmesinde büyük aşamalar kaydedilmiştir. Kemik eksplant kültürleri, fetal sıçan kalvaryaya kaynaklı osteoblast kolonileri, primer mezenkimal stromal koloniler, transforme veya transforme edilmemiş hücre dizileri ve immortalize osteoblast dizileri en sık kullanılan osteojenik hücre modelleridir (96, 101, 102, 103). Bu hücreler, implant materyalleri ile kombine edilerek morfolojik (ışık, geçirimli, taramalı elektron mikroskobu), histokimyasal, biyokimyasal (enzim testleri, radyoimmün testler, reseptör bağlanma testleri, immünotokimya) deneyler ve moleküler biyoloji yaklaşımları (*in situ* hibridizasyon, revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, nothern blot analizi) yardımıyla değerlendirilmektedir (96, 104, 105). Böylece yüzeye bağlı meydana gelen hücresel yanıt incelenebilmekte ve yüzeyin osteojenik aktivite üzerine etkisi ortaya konulabilmektedir.

2.8. Hücre modelleri

Günümüzde kullanılan çeşitli hücre kültürü modellerinin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajı bulunmaktadır. Örneğin, kemik eksplant kültürlerinde görülen heterojenite ve kültür süresine bağlı osteoblast fenotip kaybı, fetal kalvaryal osteoblast topluluklarda görülen sayı yetersizliği ve tümör kaynaklı osteoblastik hücre dizilerinin çoğalma ve özelleşme özelliklerinde görülen varyasyonlar gibi çeşitli dezavantajlar uygulanan hücre modellerinin güvenilirliğini kısıtlamaktadır (96). Bu sebeple, in vitro ve in vivo deneyler arasında farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu farklılıklar, daha önce çeşitli araştırmacı tarafından kritize edilmiş ve in vivo çalışmaları taklit etme yeteneğine sahip doğru hücre modellerinin kullanılması gerekliliği ortaya konulmuştur (100, 37).

2.8.1. Kemik eksplant hücre kültürleri

Kemik kökenli hücreler, fetal sıçan kalvaria ve yapışık kemik iliği stromal kültürlerinin kullanımı, osteoblastların in vitro olarak çoğalması ve farklılaşması hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Bununla birlikte, bu modellerin hepsinde heterojen hücre popülasyonları bulunur ve alt kültürle, daha fazla çoğalma kabiliyeti olan hücreler kültürde çoğalarak ve birincil kültürün orijinal özelliklerini değiştirebilmektedir (113,114, 115,116).

2.8.2. Transforme ve transforme edilmemiş hücre dizileri

Sıçan osteosarkomasından (UMR serileri ve ROS serileri) elde edilen osteoblast benzeri hücre dizilerinin geliştirilmesi, homojen, fenotipik olarak kararlı, kültürde yayılımı ve bakımı daha kolay hücre dizileri elde edilmesini sağlamış ve dönüştürülmemiş osteoblastların özelliklerinin çoğunu telafi ederek oluşan problemlerin elimine edilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, bu hücreler, tümörden türetildikleri, dönüştürüldükleri ve anormal bir genotip gösterdikleri için, homojen olayan çoğalma, farklılaşma ilişkisine sahip oldukları için, uzun süreli kültürde fenotipik instabilite sergiledikleri için; bu osteoblast benzeri hücreler, dönüştürülmemiş osteoblast popülasyonunun gerçek fenotipini tam olarak yansıtamazlar. Alternatif bir yaklaşım ise; alkalin fosfataz aktivitesi, kollajen I üretimi ve nodül formasyonu da dahil olmak üzere birçok osteoblast fenotipine spesifik özellik gösteren, sınırlı seyreltme ile yenidoğan fare (MC3T3E1) ve fetal sıçan kalvaryal popülasyonlarından (RCJ) klonal osteoblast benzeri hücrelerin üretilmesidir. Fare benzeri hücrelerin, fenotipik olarak işe yarsız bir hale gelmesini önlemek için hücre kültürlerinin belli ve kontrollü koşullar altında kültürü gerekmektedir (111, 112, 113, 114, 96).

2.8.3. İmmortalize hücre dizileri

Fare ve sıçan klonal hücre dizilerinin çoğunda görülen fenotipik istikrarsızlık ve tür farklılıkları nedeniyle, transforme edilmiş yetişkin osteoblast hücre dizileri geliştirilmiştir (117, 118). Houghton ve ark. (119), bir adipositik veya osteoblastik

hücreye farklılaşabilen iki uçlu öncü hücreleri içeren insan stromal hücre dizisinin, sıcaklığa duyarlı bir onkogen ile ölümsüzleştirilebileceğini bildirmişlerdir.

Bu şekilde üretilen hücre dizileri materyal bilimcilerinin araştırmaları için oldukça önemlidir.

2.8.4. Primer kemik iliği hücre kültürleri

Primer kemik iliği kültürleri, kısa deneysel periodlar içerisinde kemik matriksi üretebilen ve özelleşme potansiyeli bulunan osteojenik hücre kolonilerine sahiptir (120). Vücutta bu osteoprogenitör hücreler sınırlı sayıda bulunmaktadır. Fakat ihtiyaç durumunda mezenkimal kök hücreler özelleşmeye uğrayarak osteojenik hücre ihtiyacını karşılamaktadır. Mezenkimal hücrelerin kemik iliğinden izolasyonu ve kültür ortamında osteojenik fenotipe doğru özelleşmesi sonucu osteoprogenitör koloniler elde edilmektedir. Bu in vitro kültür metodunun en büyük avantajı, özelleşme imkanı olan osteoprogenitör hücrelerin yüzeylerdeki davranışlarının değerlendirilebilme olasılığı ve yüzey yapısının hücre özelleşmesi üzerine etkisinin belirlenebilmesidir (121).

Kemik iliğinin stroması, iyi organize olmuş bir mezenkimal hücre ağından ve hematopoez için yapısal ve fonksiyonel destek sağlayan hücre dışı matriksten meydana gelir. Kemik iliğinde mezenkimal hücrelerin varlığı, ilk olarak Friendenstein ve ark. (122) ve Owen ve ark. (123) tarafından gösterilmiştir. Kemik iliğinin stromal komponenti fibroblastik hücre (CFU-F) kolonilerine sahiptir. Bu CFU-F hücrelerinin kültüre yerleştirildiklerinde osteojenik, kondrojenik, adipojenik, nörojenik ve fibroblastik özelleşme meydana getirebildikleri gösterilmiştir (125). Haynesworth ve ark. (126), bu hücreler için ilk olarak “kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri” terimini kullanmışlardır. Bu multipotansiyel kök hücrelerin farklı özelleşme yollarına yönelmesi çeşitli lokal ve sistemik faktörler tarafından yönlendirilmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik özelleşmesi, sentetik bir glukokortikoid olan deksametazon ve kemik morfojenik proteinleri gibi çeşitli faktörler tarafından yönlendirilmektedir (126, 127). Sıçan kemik iliğinden mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve deksametazon, askorbik asit ve β -gliserofosfat gibi dış faktörler içeren besiyerinde kültür sonucunda osteojenik hücre kolonileri elde edilmektedir (128). Böylece hücrelerin mezenkimal orijinden osteoblasta giden özelleşme aşamalarında

sentezledikleri transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, kemik matris proteinleri ve diğer çeşitli moleküllerin değerlendirilmesi yapılabilmekte ve bu değerlendirme sonucu kemik iliği kök hücre kültürü hakkında detaylı bilgiler sağlanmaktadır.

İmplant yüzeyine osteoprogenitor hücre göçü ve hücrenin yüzeyde çoğalması ve daha olgun bir fenotipe osteojenik özelleşme kabiliyeti, yüzeyin başarısını değerlendirmede önemli bulgular sağlamaktadır. Bu mekanizmayı çok iyi taklit edebilen kemik iliği mezankimal kök hücre kültürü, implant yüzeylerinin değerlendirilmesinde başarılı ve önemli veriler sağlayan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır ve literatürde bu kültür metodunun diğer osteojenik hücre modellerine üstünlüğü savunulmaktadır (100).

2.9. Bor

Bor elementi, periyodik sistemin üçüncü grubunun başında bulunmaktadır. Atom numarası 5, atom ağırlığı 10.82, özgül ağırlığı 2.84, ergime noktası $2190 \pm 20^\circ\text{C}$ 'dir. Non-metal bir element olan borun üç adet dış elektronu mevcut olup silisyum ile benzerlik göstermektedir. Doğada bor saf halde bulunmayıp, oksijenle birleşerek, bor tuzları şeklinde veya silikatlar halinde bulunur. Doğada başta borik asit ve boraks olmak üzere iki yüze yakın bor bileşiği bulunmaktadır. Bor'un, 1900'lerden beri bitkiler için gerekli temel maddelerden olduğu bilinmektedir ancak insan ve hayvan organizmaları için önemi hala tam olarak bilinmemektedir. Bitki metabolizmasının yanı sıra bazı mikroorganizmalar için de temel maddelerdendir. Hatta bu sebeple autoinducer-2 (1), ve boromisin ve aplasmomisin gibi bazı antibiyotiklerin yapısına katılmıştır. (2) .

Bor içerikli ilk doğal biyomolekül, *Streptomyces antibioticus*'un bir suşundan elde edilen 'boromisin' adı verilen bir antibiyotiktir. Boromisinin, gram (+), belirli bazı mantarlar ve protozoalara karşı etkili olduğu ancak gram (-) bakterilere karşı etkisiz olduğu belirtilmiştir. Borik asit esterlerinin, klinikte kullanılan eritromisin, gentamisin ve streptomisin gibi antibiyotikler ile kıyaslanabilir olduğu rapor edilmiştir Bor, oldukça geniş bakteri, mantar ve maya spektrumuna karşı etkili bir antimikrobiyaldir (3, 4). Memeliler üzerinde en bilinen temel etkisi ise kemik ve diş gelişiminde oynadığı roldür. Bor yoksunluğunun aynı zamanda diş çekimi sonrası hemen başlayan alveoler kemik tamirini de bozduğu bulunmuştur. Bor içeren diyetle beslenen fareler (3mg/kg) daha az

bor içeren diyetle beslenen farelerle (0.07mg/kg) karşılaştırıldığında, diş çekildikten 14 gün sonra kemik oluşumundaki farkedilir azalmadan dolayı alveoler kemik iyileşmesinde bozulma görülmüştür (5).

B eksikliğinin kemik Ca ve P konsantrasyonuna etkisi olmadığı bilinmektedir. Fakat, kemik yapımı, kemik aktivitesi, osteoblast ve osteoklast diferansiasyonu üzerine etkili mineral element konsantrasyonu üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. B, organizmaların ana mikrobeyinlerinden biri olmakla beraber, osteogenezis ve kemik yapımında önemli bir rol oynamaktadır (129, 130, 131). Kemik sağlığı için B, kalsiyum, protein, magnezyum vb. element ve vitaminlerin diet ile alınması çok önemlidir. Eksikliklerinde kemik kaybı ve kemik yapılanmasında azalma görülebilir (132, 133, 130).

B, steroid hormonları ile etkileşime girebilmekle beraber, kalsiyum kaybının ve kemik demineralizasyonunun önlenmesinde önemli bir elementtir. Menapoz döneminde ve sonrasındaki kadınlarda B takviyesinin belirgin bir şekilde idrarla kalsiyum ve magnezyum atılımını azalttığı, serum estradiol seviyesini, kalsiyum emilimini artırdığı belirtilmektedir (129, 134).

Ying ve ark. tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada, B'un osteojenik farklılaşmayı uyararak kemikleşmeyi artırdığı belirtilmiştir (135).

Huang ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada MAO yöntemiyle Ti yüzeyinde B-TiO₂ film oluşturmuş ve bu filmin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktivitesi karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda B-TiO₂ film yüzeyinin TiO₂ filminden morfolojik olarak farklı olmadığı, yüzeydeki TiO₂ filme B infiltrasyonunun hidrofilik özelliği ve biyoaktiviteyi artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda bu konuda daha fazla in-vitro ve in-vivo çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır (136).

2.10. Gamma ışınları ile sterilizasyon

Gamma Işınlama tesisi ışınlama kaynağının bulunduğu hücre, ürün taşıyıcı konveyör ve depolama alanı olmak üzere başlıca üç birimden oluşmaktadır. Işınlama tesisinin kalbi gamma enerjisini sağlayan Co-60 kaynağıdır. Işınlama cihazlarında kullanılan Co-60, doğada bulunan ve metalik hale getirilmiş kararlı Co-59 izotopunun reaktörlerde nötron bombardımanına tabi tutulması sonucu yapay olarak elde edilmektedir (137). Bu şekilde kararsız hale gelmiş olan Co-60 çekirdekleri bozunarak bir beta parçacığı ile enerjileri 1.17 MeV ve 1.33 MeV olan iki gama ışını yayarak kararlı Ni-60 elementine dönüşmektedir. Beta parçacıkları kaynak kapsülünde tutulmaları nedeniyle ışınlama işlemi, sadece çok girici olan gama ışınları ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 2-1) (138).

Gama ışınlama cihazlarında kullanılan Co-60 kaynakları genellikle çubuklar şeklinde olup, dış etkenlerden korunması ve sızıntının önlenmesi için iki kat paslanmaz çelik kapsül içerisine konulmuştur. Co-60' ın yarı ömrü 5.3 yıl olup, aktivitesi yaklaşık olarak yılda %10 kadar azalmaktadır. Işınlama cihazına yerleştirilen kaynak çubukları 15-20 yıl kadar kullanıldıktan sonra üretici firmalar tarafından geriye alınmaktadır. Işınlama hücreleri genellikle 1.8 - 2.0 m kalınlığında betonla zırhlanmış olup, cihaz çalışmadığı zaman kaynaklar su dolu havuzda veya zırhlı kaplarda depolanmaktadır (139).

Gama ışınlama yöntemiyle sterilizasyon, güvenilir, kullanışlı ve giderek yaygınlaşan alternatif sterilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu amaç için, Co-60 kaynağından yayınlanan gama ışınlarından faydalanılır (Şekil 2-2).

Gama ışınları iyonlayıcı ışın türündedir. İyonlayıcı ışınlar madde ile etkileşim yaptığında atomlardan elektron koparabilirler. Bu işleme iyonizasyon denilmektedir.

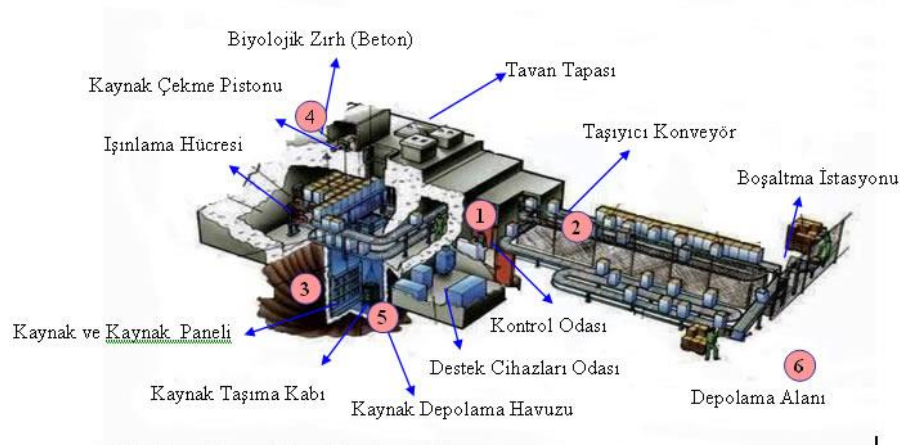
Serbest elektronlar kimyasal reaksiyonlara katılabilir veya canlı organizmalardan DNA moleküllerini koparabilirler. Bu işlem bakteri, parazit, küf, maya, mantar gibi organizmaları ışınlama ile öldürmenin temelini oluşturur.

Özellikleri:

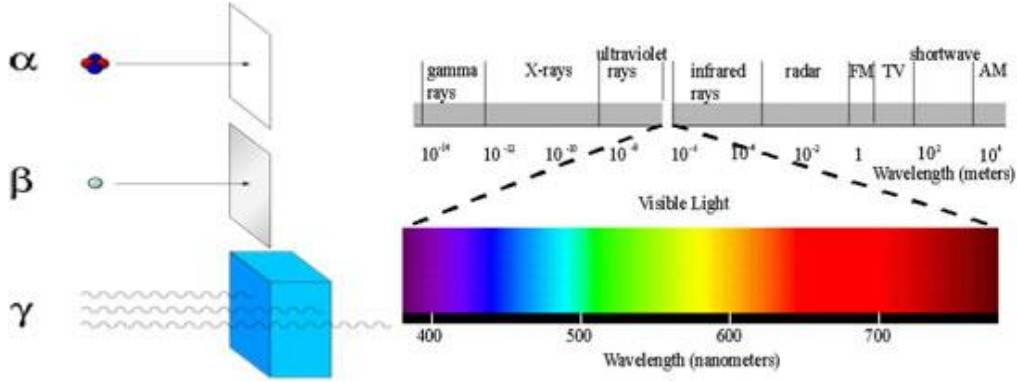
- İyonlaştırıcı ışın türüdür. Madde içerisinden geçerken atom veya moleküllerden elektron koparabilirler. Bunun sonucu elektrik yüklü parçacıklar yani iyonlar meydana gelir.

- Diğer ışın türlerine göre daha yüksek enerjili olduğu için madde içerisindeki penetrasyonu yüksektir.
- Elektromanyetik spektrumun en kısa dalga boylu ve en yüksek enerji seviyesinde bulunur.
- Gama ışınları, kütsüz, yüksüz olup ışık hızıyla yayılırlar.

Gama ışınları, genellikle biyomateryallerin ve medikal aletlerin sterilizasyonunda kullanılmaktadır. Gama ışınları, sahip oldukları iyonize yüksek enerji sayesinde toksik kalıntı bırakmayarak dna hasarı yaratabilmektedir. İyi penetrasyon derinliği sebebiyle kalın paketlenmiş ürünlerin sterilizasyonunda kullanımları çok uygundur (140).



Şekil 2- 2: Co-60 ışınlama cihazı



Şekil 2- 3: Gama ışınları

2.11. ALP Enzim etkinliğinin önemi

Alkalen fosfataz (ALP) sert doku formasyonun önemli bir bileşeni olmakla beraber mineralize doku hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Sert dokuların ve mineral metabolizmasının biyolojisi hakkında daha fazla şey öğrendikçe, ALP'nin osteojenik aktivite için bir belirteç olarak rolü sürekli olarak kesinlenmiştir. Aksine, ALP'nin sert dokularda nasıl işlediğinin ayrıntılı mekanizması sıklıkla tartışmalıdır. Son 2 yılda, ALP ve sert dokular hakkında bilgi içeren 280'den fazla yayın ortaya çıkmıştır. Bunlardan 200'den fazlası, ALP'nin, sert doku hücresi farklılaşması veya enzim kan düzeylerinin ölçülerinin bir gösterge olarak kullanılmasını desteklemektedir. (142).

ALP'nin mineralizasyondaki rolünü anlamamanın bir anahtarı, osteoblastik farklılaşma ve büyüme plakası kıkırdak kalsifikasyonu sırasında genlerin aşamalı ekspresyonu çalışmaları ile sağlanır. Her iki dokuda, kemik ve kalsifiye edici kıkırdakta, ALP gelişimin erken döneminde ortaya çıkar ve yakında hücre yüzeyinde ve matriks vesiküllerinde gözlenir. ALP kalsifikasyon sürecinde ifade edilen ilk belirteçler arasındadır. Bu nedenle, ALP'nin erken mineralizasyon dönemi için önemli bir gösterge olduğu kanıtlanmıştır (143). Kemik yapımı, serumdaki kemik-spesifik alkalen fosfataz

(ALP) seviyesi ile değerlendirilebilir. ALP, genel olarak osteoblastlar tarafından üretilen bir enzimdir. Yarılanma ömrü uzundur ve renal yol ile atılmaz (144,145).

Kemiğe spesifik alkale fosfataz, en sık kullanılan kemik yapım belirleyicilerindendir (146). Osteoblastların membranında lokalize bir enzimdir ve osteoblastlardan salgılanarak dolaşıma katılır. Osteoblast fonksiyonu, kemik yapımı ve mineralizasyonu gösterir. Bu çalışmalara paralel olarak çalışmamızda da erken dönemde osteoblast farklılaşmasını ALP enzim seviyesi ile ölçmeyi amaçlamaktayız.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Bor'un titanyum yüzeyine kaplanarak yeni bir yüzey elde edilmesi amaçlanmıştır. Bor içeren titanyum yüzeyler üzerine osteoblast hücre ekimi yapılarak 3., 7. ve 14. günlerde hücre ekimini takiben t=0, t=6,t=8, t=43, ve t=46. dakikalarda ALP enzim seviyesi ölçülmüştür.

3.1. Deney grupları

Çalışmamızda titanyum diskler her grupta 6'şar örnek olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. 1 grup ise kontrol grubudur. Bu grupta Ti disk kullanılmadan, petri kabına hücre ekimi yapılmıştır. Deney grupları şu şekilde planlanmıştır:

1. grup : Kontrol grubu olarak oluşturulmuş bu grupta petri kabına hücre ekimi yapılmış fakat titanyum disk yerleştirilmemiştir.

2. grup (Boş AE) n=6: Asitle pürüzlendirilmiş titanyum disklerin üzerine hücre ekimi yapılmamıştır.

3. grup (Boş MS) n=6: Machine surface titanyum disklerin üzerine hücre ekimi yapılmamıştır.

4. grup (B) n=6: Bor ile kaplanmış titanyum diskler üzerine hücre ekimi yapılmıştır.

5. grup (AE) n=6: Asitle pürüzlendirilmiş titanyum disklerin üzerine hücre ekimi yapılmıştır.

6. grup (MS) n=6: Machine surface titanyum disklerin üzerine hücre ekimi yapılmıştır.

3.2. Titanyum disklerin hazırlanması

6 mm çapındaki medikal grade 5 titanyum (Part info: 121DD3MCE01968) çubuk CNC cihazında (Hanwha XP16S, South Korea) 10000 devir/dak hızda işlenerek, 3.5 mm kalınlıkta ve 6 mm çapında toplam 30 adet titanyum disk elde edildi.

3.2.1. Titanyum disk yüzeylerinin hazırlanması

Yüzeylerin üretimi İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesinde gerçekleştirilmiştir.

Yüzeylerini temizlemek için, titanyum diskler sırasıyla 15 dakika aseton, 15 dakika isopropil alkol ve 20 dakika distile su içerisinde ultrasonik temizleme cihazında bekletilmiştir. Yüzey işlemlerine kadar geçen süre içerisinde kontaminasyonu engellemek için numuneler, sterilizasyon paketleri içerisinde saklanmıştır.

İşlenmemiş yüzeyli diskler CNC makinesinden çıktığı haliyle korunmuştur.

Asitle pürüzlendirilmiş yüzey oluşturmak için 12 adet örnek oda sıcaklığında hidroklorik ve sülfürik asit karışımından oluşan çözeltide (% 1 HF + % 30 HNO₃) 60 dakika boyunca dağlanmıştır.

6 adet titanyum diskin ise mikro ark oksidasyon yöntemi ile yüzeylerinde B-TiO₂ film oluşturulmuştur.

3.2.2. Mikro-ark oksidasyon (MAO) yöntemi ile disk yüzeylerinin kaplanması

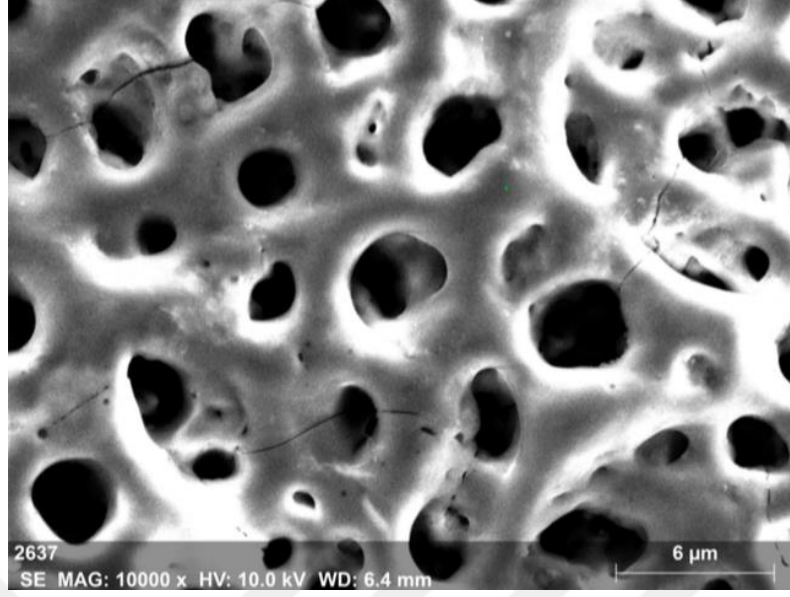
Ti diskler etil alkol ile temizlendikten sonra mikro-ark oksidasyonu için anot, katod olarak paslanmaz çelik tabaka, elektrolit içeren cam kap ve güç kaynağından oluşan sistemde elektrolit içerisine yerleştirildi. Elektrolit içerisinde 24 g/L sodyum tetraborat (NaH₂PO₄ 2H₂O) ve 10 gr/L kalsiyum asetat monohidrat (Ca(CH₃COO)₂ H₂O) bulunmaktadır. Çalışmamızda B-TiO₂ film oluşturmak için elektrolit içerisine, 0.02 mol/L disodyum tetraborat (Na₂B₄O₇ 10H₂O) eklenmiştir. MAO işlemi sırasında 400 V, 50 Hz frekans, 10% periyot ile 3 dk boyunca uygulama yapıldı. (Şekil 3-1). MAO işlemi sonrası örnekler deionize su ile yıkanıp kurutuldu.



Şekil 3- 1: Mikro ark oksidasyon cihazı (İTÜ metalurji mühendisliği ABD)

3.3. Yüzeylerin SEM ile incelenmesi

Disk yüzeyleri, Koç Üniversitesi Hücre Yüzey Araştırma Merkezi'nde (KUYTAM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımıyla görüntülenmiştir. Bu amaçla Saha Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu ZEİSS ULTRA PLUS ve taramalı elektron mikroskobu ZEİSS EVO LS15 ile 10 kV 'da çalıştırılmıştır Yüzey, 10.000 büyütmede görüntülenmiştir (Şekil 3-2).



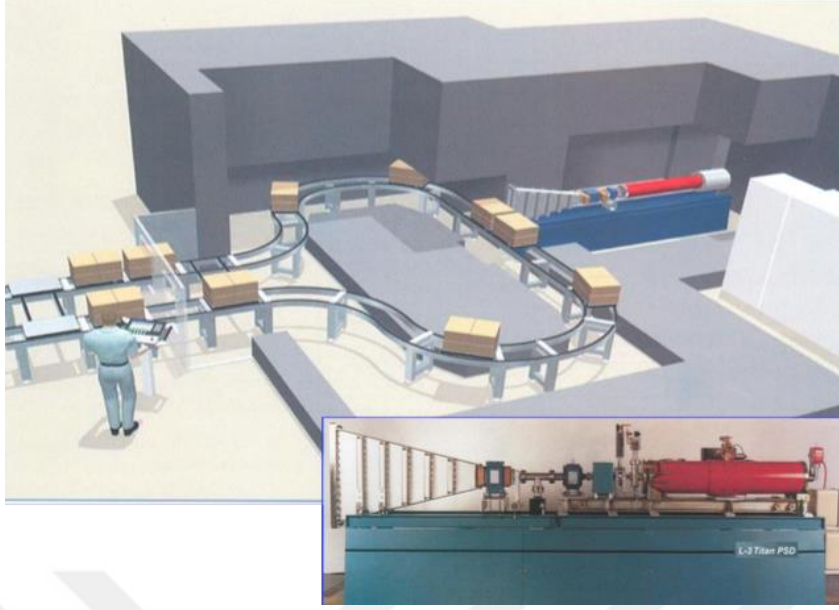
Şekil 3- 2: Bor ile kaplı titanyum disk yüzeylerinin SEM görüntüsü

3.4. Örneklerin sterilizasyonu

Ti diskler üzerine yapılan uygulamalardan sonra tüm örnekler ultrasonik cihaz ile temizlenerek paketlenildi (Şekil 3-3). Paketler gama ışınlaması ile 25kGy ışın 12 saat uygulanarak steril edildi (Şekil 3-4).



Şekil 3- 3: Örneklerin ultrasonik cihaz ile temizlenmesi



Şekil 3- 4: Gamma ışınları sistemi

3.5. Osteoblast Hücre Kültürü

Çalışmamızda osteoblast hücreleri (Saos-2, insan tümör kaynaklı) kullanılmıştır. Bu kapsamda 1 vial pasaj 10 osteoblast hücresi sıvı azottan alınarak (-196 °C) 37 °C'lik su banyosunda eritilmiştir. Eritilen hücreler içerisinde besiyeri (McCoy + %15 FCS + %1 antibiyotik) bulunan 15 ml'lik tüplere alınmış ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından üst sıvı aspire edilmiş ve altta kalan hücre peleti besiyeri ile sulandırılarak 100 mm çapındaki petri kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin petri yüzeyini kaplamasının (konfluent) ardından hücreler pasajlanmış ve yeniden ekilmiştir. Pasajlama işleminde; konfluent olan petrilerden eski besiyeri aspire edilmiş ve DPBS ile yıkanmıştır. DPSN'in aspire edilmesinden sonra %0.25 Trypsin-EDTA konulmuş ve 2-3 dk 37°C % CO₂ inkübatörde bekletilmiştir. Sürenin sonunda hücrelerin petri yüzeyinden kalkma durumları mikroskop ile kontrol edilmiş ve tripsinin iki katı kadar besiyeri uygulanmıştır. Hücreler pipetlenerek homojen hale getirilmiş ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından hücre peleti sulandırılarak ekim gerçekleştirilmiştir.

Deney gruplarını hazırlamak için; yukarıda açıklanan protokol ile hücreler pasajlanmıştır. Santrifüj sonrasında hücre peleti 1ml besiyeri ile sulandırılmış ve hücre

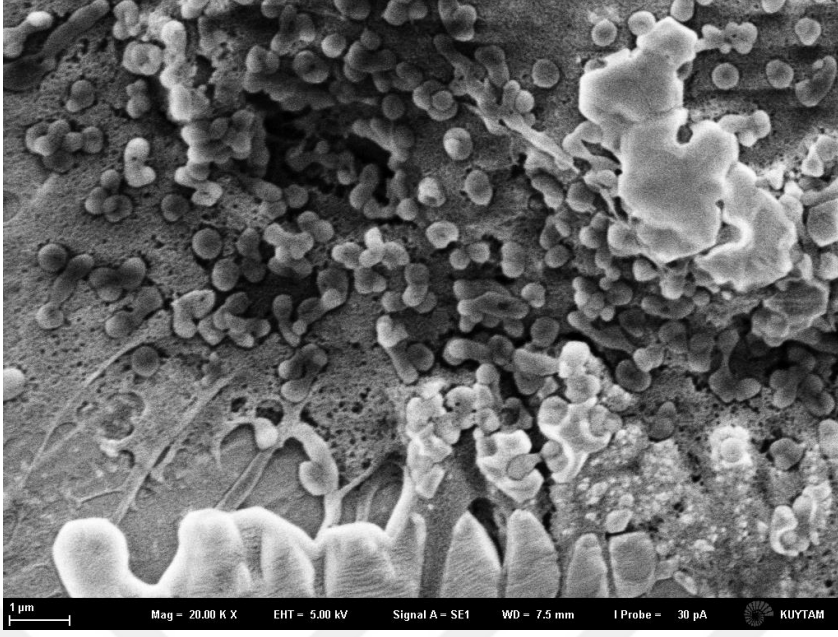
sayımları %4'lük Tripan blue boyası ile gerçekleştirildi. Sayılan hücreler diskler üzerine direkt olarak ekildi. Alkalen fosfataz (ALP) ölçümleri için 1000 hücre/disk olacak şekilde hücreler ekilerek 3,7 ve 14 günlük gruplar oluşturuldu (Şekil 3-5).



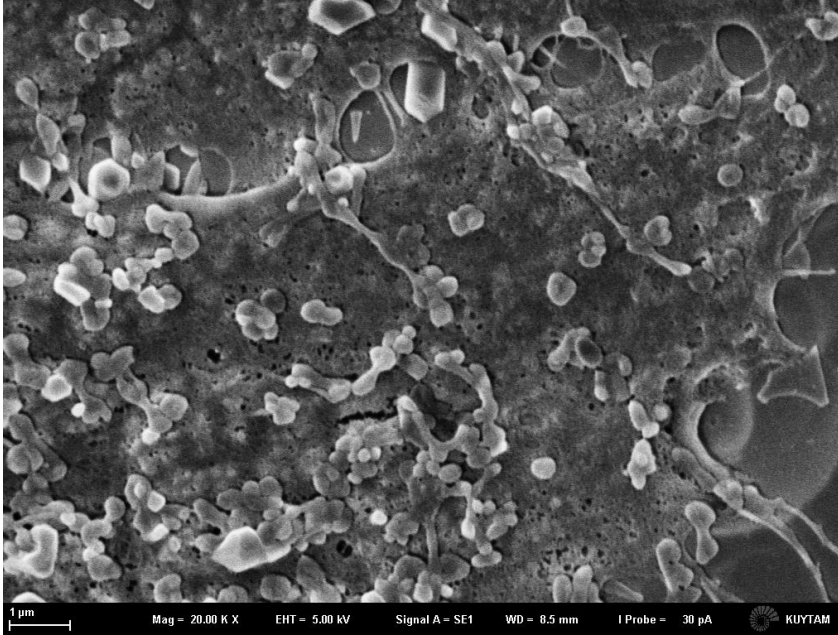
Şekil 3- 5: Diskler üzerine hücre ekimi yapıldı.

3.6. SEM örneklerinin hazırlanması

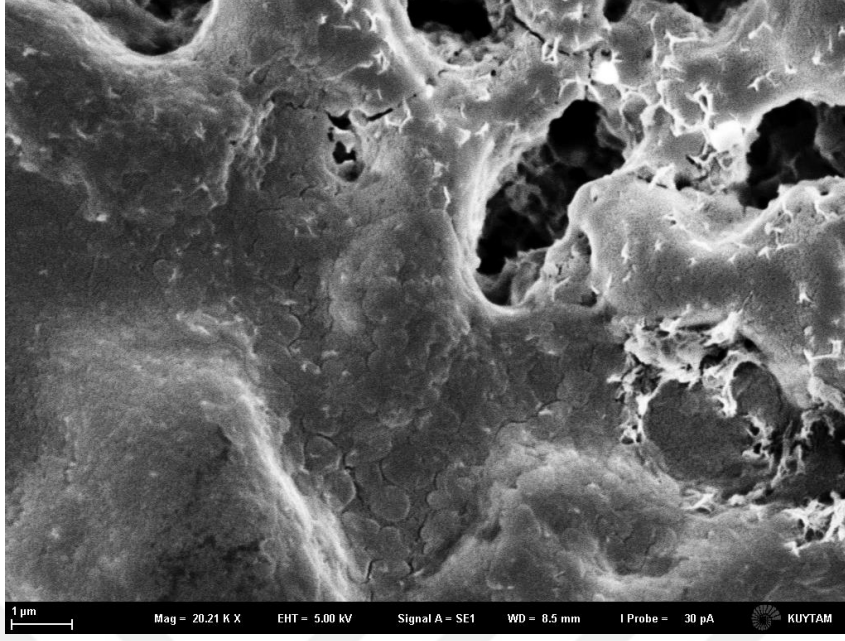
Örnekler üzerine hücre ekimleri yapıldıktan 3, 7 ve 14 gün sonra hücreler fikse edilmiştir. Fiksasyon için; besiyerinin uzaklaştırılmasını takiben PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkamayı takiben PBS içerisinde hazırlanmış olan %2.5 Gluteraldehit solusyonu ile hücreler +4°C 1 saat boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında hücreler, PBS ile yıkanmış ve yine PBS içerisinde KUYTAM'a SEM incelenmesi için teslim edilmiştir. Diskler üzerinde hücreler 20.000 büyütmede tespit edilmiştir. (Şekil 3-6, 3-7, 3-8).



Şekil 3- 6: MS diskleri hücre ekimi sonrası 20.000 büyütmede SEM analizi



Şekil 3- 7: AE diskleri hücre ekimi sonrası 20.000 büyütmede SEM analizi



Şekil 3- 8: Bor kaplı diskler hücre ekimi sonrası 20.000 büyütmede SEM analizi

3.7. Titanyum Yüzeylerde Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Belirlenmesi

ALP ölçümünde QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit (Bioassay Systems, Hayward, USA) kullanılmıştır. Bu Kit, biyolojik örneklerde, işlem gerektirmeksizin, ALP aktivitesini direkt olarak ölçmek için tasarlanmıştır (Şekil 3-9). Geliştirilmiş yöntemde, ALP tarafından sarı renkli bir ürüne hidrolize edilen p-nitrofenil fosfattan (405 nm'de maksimum absorban) yararlanır. Reaksiyon oranı, enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. Analizler üreticinin önerisi doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

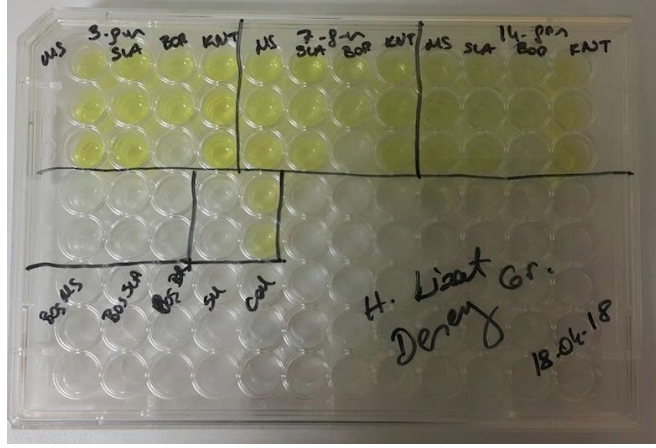
Diskler üzerine hücrelerin ekimlerini takiben 3, 7 ve 14 gün boyunca 37°C, %5 CO₂'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonu takiben besiyeri aspire edilmiş ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından hücrelerin üzerine 200 µl distile su içerisinde hazırlanan %0.2 Triton X-100 solüsyonu eklenerek 20 dk oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde tutulmuştur. Sürenin sonunda hücre lizatlarından 50 µl alınarak 96 kuyulu petriye aktarılarak üzerlerine 150 µl working solüsyonu eklenmiştir (Şekil 3-10). ALP

ölçümleri mikropate okuyucuda 405Nm referans dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Working solusyonu eklenmesini takiben Elisa Reader cihazı (Şekil 3- 11) ilk yapılan okuma T:0 olarak adlandırılmıştır. Sonrasında 6. dakikada yapılan okuma T: 6, 8, 43 ve 46. dakikalarda yapılan okumalar sırasıyla T:8, T:43, T: 46 olarak adlandırılmıştır. ALP aktivitesinin IU/L= $\mu\text{mol}/(\text{L}.\text{min})$ biriminden hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\frac{(\text{OD}_{\text{samplet}} - \text{OD}_{\text{sample0}}) . \text{Reaction Vol}}{(\text{OD}_{\text{calibrator}} - \text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}) . \text{Sample Vol}} \times 35.3$$



Şekil 3- 9: QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit



Şekil 3- 10: Hücre lizatlarının kuyucuklara yerleştirilmesi



Şekil 3- 11: ELİSA Reader Cihazı

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Her bir grubun kendi içinde zamana göre karşılaştırılmasında Friedman testi kullanılmıştır. Zaman içindeki değişimi anlamlı bulunan $P < 0,05$ gruplarda bu farklılığın hangi zamanlarda arasında olduğunu tespit etmek için Wilcoxon testi kullanılmıştır. P değeri Bonferroni düzeltmesi yapılarak yorumlanmıştır. Gruplar arasında belirli günlerdeki fark Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı günlerde, farkın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için Mann-Whitney U testi yapılmıştır. P değerleri Bonferroni düzeltmesi yapılarak yorumlanmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Üçüncü Gün ALP ölçümlerinin değerlendirilmesi

Her bir grubun üçüncü gün ALP değerlerinin karşılaştırılması tablo 4-1, 4-2, 4-3'te gösterilmiştir.

- Kontrol grubu için t6ve t43 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. $p= 0,06$ $p>0,05$
- AE grubu için t6ve t43 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır $p=0,027$ $p<0,05$
- MS için p değeri bonferroni düzeltmesi yapılarak yorumlandığından fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır $p>0,05$
- Bor grubu için t6ve t43 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır $p=0,027$ $p<0,05$

0, 6, 43 ve 46. dakikalarda ALP ölçüm seviyesinin gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

- T6 için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak ikili karşılaştırmalar bonferroni düzeltmesi ile yorumlandığında gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır $p>0,05$.
- T8 için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak ikili karşılaştırmalar bonferroni düzeltmesi ile yorumlandığında gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır $p>0,05$.
- T43 için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak ikili karşılaştırmalar bonferroni düzeltmesi ile yorumlandığında gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır $p>0,05$.
- T46 için boş AE ve B grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur $p= 0,034$ ($p<0,05$) (Tablo 4-4).

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
t6 3. gün-t8 3. gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t6 3. gün-t46 3.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t6 3. gün-t43 3.gün	-3,000	1,054	-2,846	,004	,027
t8 3. gün-t46 3.gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t8 3. gün-t43 3.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t46 3.gün-t43 3.gün	1,000	1,054	,949	,343	1,000

Tablo 4- 1:B grubu için t6 ve t43 değerleri

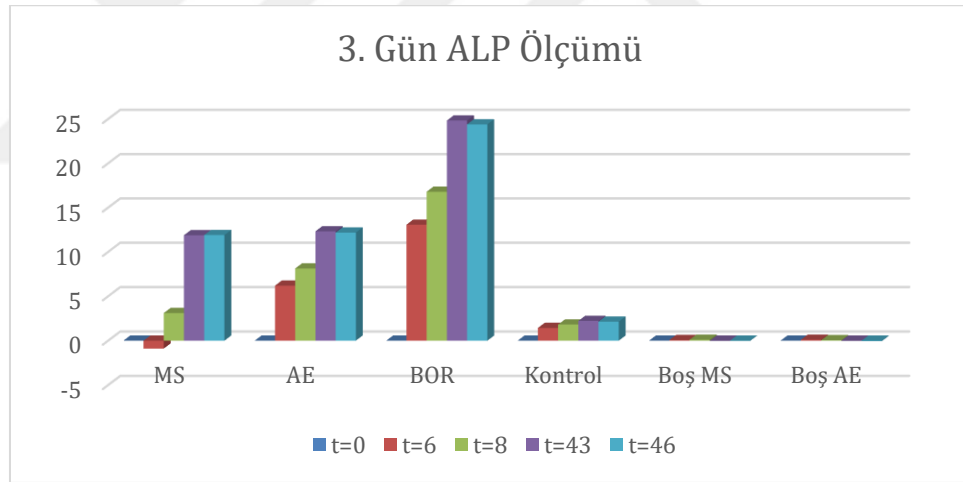
Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
t6 3. gün-t8 3. gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t6 3. gün-t46 3.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t6 3. gün-t43 3.gün	-3,000	1,054	-2,846	,004	,027
t8 3. gün-t46 3.gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t8 3. gün-t43 3.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t46 3.gün-t43 3.gün	1,000	1,054	,949	,343	1,000

Tablo 4- 2: AE için t6 ve t43 değerleri

Each row shows the sample average rain.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
t0 3.gün-t6 3.gün	,000	1,291	,000	1,000	1,000
t0 3.gün-t8 3.gün	-1,000	1,291	-,775	,439	1,000
t0 3.gün-t43 3.gün	-2,333	1,291	-1,807	,071	,707
t0 3.gün-t46 3.gün	-3,333	1,291	-2,582	,010	,098
t6 3.gün-t8 3.gün	-1,000	1,291	-,775	,439	1,000
t6 3.gün-t43 3.gün	-2,333	1,291	-1,807	,071	,707
t6 3.gün-t46 3.gün	-3,333	1,291	-2,582	,010	,098
t8 3.gün-t43 3.gün	-1,333	1,291	-1,033	,302	1,000
t8 3.gün-t46 3.gün	-2,333	1,291	-1,807	,071	,707
t43 3.gün-t46 3.gün	-1,000	1,291	-,775	,439	1,000

Tablo 4- 3: MS grubu 3. gün ALP değerleri



Örneklerin (ortalama) ALP aktiviteleri

	MS	AE	BOR	Kontrol	Boş MS	Boş AE
t=0	0	0	0	0	0	0
t=6	-0,90	6,19	13,06	1,44	0,07	0,10
t=8	3,11	8,13	16,78	1,82	0,10	0,05
t=43	11,88	12,32	24,83	2,22	-0,02	-0,03
t=46	11,90	12,17	24,39	2,14	-0,03	-0,05

Tablo 4- 4: Üçüncü gün için grupların ALP değerleri

4.2. Yedinci Gün ALP ölçümlerinin değerlendirilmesi

Yedinci gün ALP ölçümlerinin her bir grubun kendi içinde istatistiksel değerlendirilmesinde;

- Kontrol, MS ve AE gruplarındaki örneklerin ALP değerleri kendi içinde zamana göre değerlendirildiğinde karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı $p>0,05$, ancak, Bor için t6 ve t43 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır $p=0,027$ $p<0,05$ (Tablo 4-5, 4-6)

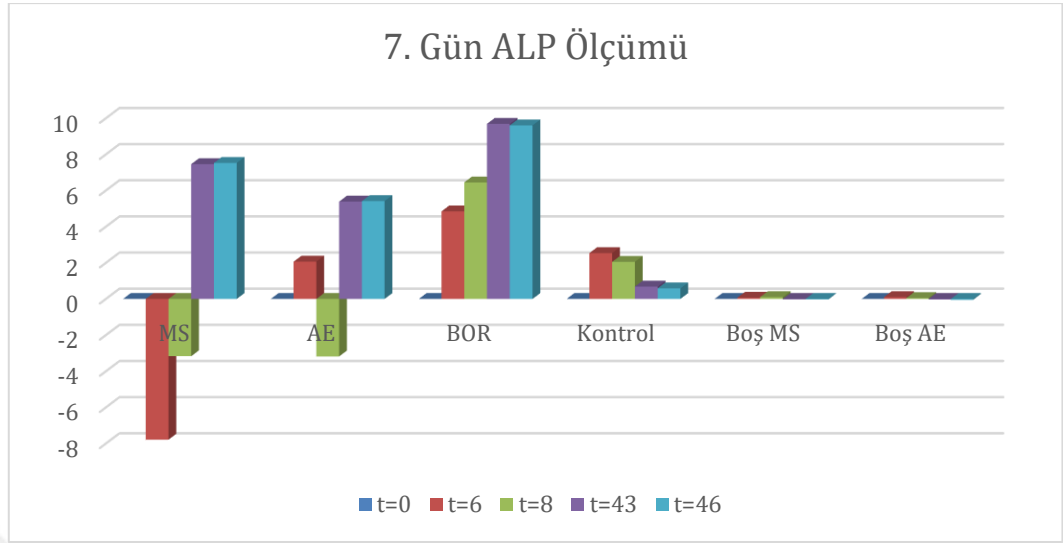
Gruplar arası karşılaştırmada belirli zamana göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı $p>0,05$ (Tablo 4-7).

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
t6 7. gün-t8 7. gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t6 7. gün-t46 7.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t6 7. gün-t43 7.gün	-3,000	1,054	-2,846	,004	,027
t8 7. gün-t46 7.gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t8 7. gün-t43 7.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t46 7.gün-t43 7.gün	1,000	1,054	,949	,343	1,000

Tablo 4- 5: B grubu için t6 ve t43 değerleri

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
t6 7. gün-t8 7. gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t6 7. gün-t43 7.gün	-2,333	1,054	-2,214	,027	,161
t6 7. gün-t46 7.gün	-2,667	1,054	-2,530	,011	,068
t8 7. gün-t43 7.gün	-1,333	1,054	-1,265	,206	1,000
t8 7. gün-t46 7.gün	-1,667	1,054	-1,581	,114	,683
t43 7.gün-t46 7.gün	-,333	1,054	-,316	,752	1,000

Tablo 4- 6: MS için 7. gün ALP değerleri



Örneklerin (ortalama) ALP aktiviteleri

	MS	AE	BOR	Kontrol	Boş MS	Boş AE
t=0	0	0	0	0	0	0
t=6	-7,79	2,06	4,85	2,54	0,07	0,10
t=8	-3,16	-3,18	6,45	2,05	0,10	0,05
t=43	7,46	5,39	9,69	0,69	-0,02	-0,03
t=46	7,52	5,42	9,60	0,59	-0,03	-0,05

Tablo 4- 7: Yedinci gün ortalama ALP değerleri

4.3. Ondördüncü Günde ALP ölçümlerinin değerlendirilmesi

Ondördüncü gün ortalama ALP değerleri Tablo 4-11 ve Şekil 4-3'te gösterilmiştir. Ham veriler ise Tablo 4-12, 4-13, 4-14'te gösterilmiştir.

- MS, AE ve B grubu için t6ve t43 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır $p=0,027$ $p<0,05$ (Tablo 4-8, 4-9, 4-10).

Gruplar arası 14. Gün ALP değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde;

- T6, T8, T43'de istatistiksel olarak anlamlı ALP ölçümleri izlenmezken ($p>0,05$), T46 için boş AE ve bor grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,034$ $p<0,05$).

Each node shows the sample average rank.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
t6 14. gün-t8 14. gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t6 14. gün-t46 14.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t6 14. gün-t43 14.gün	-3,000	1,054	-2,846	,004	,027
t8 14. gün-t46 14.gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t8 14. gün-t43 14.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t46 14.gün-t43 14.gün	1,000	1,054	,949	,343	1,000

Tablo 4- 8: B grubu için t6ve t43 değerleri.

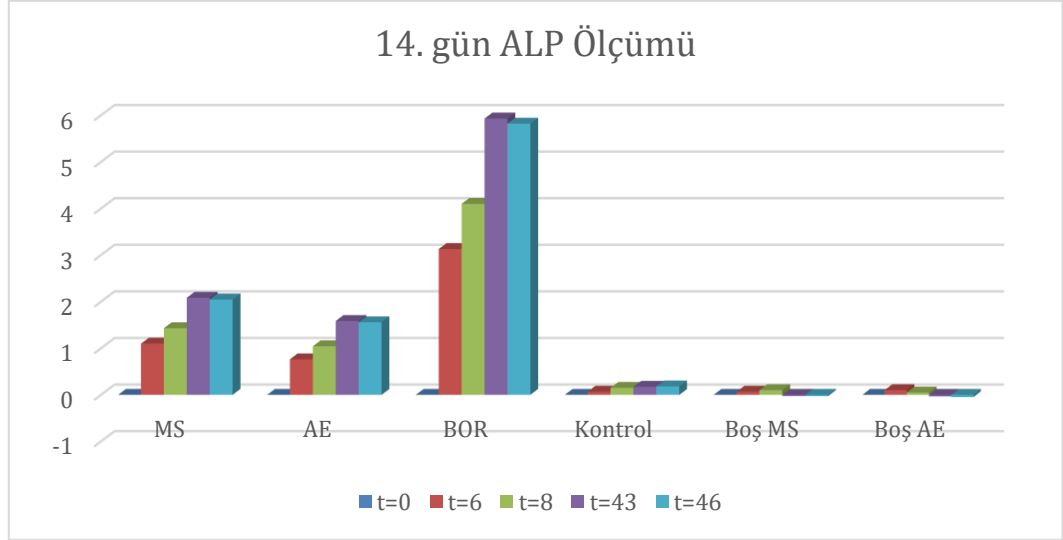
Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
t6 14. gün-t8 14. gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t6 14. gün-t46 14.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t6 14. gün-t43 14.gün	-3,000	1,054	-2,846	,004	,027
t8 14. gün-t46 14.gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t8 14. gün-t43 14.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t46 14.gün-t43 14.gün	1,000	1,054	,949	,343	1,000

Tablo 4- 9: MS grubu için t6ve t43 değerleri.

Each node shows the sample average rank.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
t6 14. gün-t8 14. gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t6 14. gün-t46 14.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t6 14. gün-t43 14.gün	-3,000	1,054	-2,846	,004	,027
t8 14. gün-t46 14.gün	-1,000	1,054	-,949	,343	1,000
t8 14. gün-t43 14.gün	-2,000	1,054	-1,897	,058	,347
t46 14.gün-t43 14.gün	1,000	1,054	,949	,343	1,000

Tablo 4- 10: AE grubu için t6ve t43 değerleri



Örneklerin (ortalama) ALP aktiviteleri

	MS	AE	BOR	Kontrol	Boş MS	Boş AE
t=0	0	0	0	0	0	0
t=6	1,10	0,76	3,13	0,07	0,07	0,10
t=8	1,43	1,04	4,10	0,15	0,10	0,05
t=43	2,08	1,59	5,93	0,17	-0,02	-0,03
t=46	2,05	1,56	5,82	0,18	-0,03	-0,05

Tablo 4- 11: Ondördüncü gün grupların ALP değerleri.

grup		t6 3. gün	t8 3. gün	t43 3.gün	t46 3.gün	P values ^b
BOR	N	6	6	6	6	0,029*
	Mean	13,0629	16,7831	24,8270	24,3875	
	Std. Deviation	1,42520	1,53703	2,28198	2,01802	
	Median	12,5242	16,1602	23,8263	23,5867	
	Minimum	11,99	15,66	23,22	22,89	
	Maximum	14,68	18,53	27,44	26,68	
MS	N	6	6	6	6	0,042*
	Mean	-,8978	3,1142	11,8750	11,8986	
	Std. Deviation	13,80440	10,70953	4,32521	4,28965	
	Median	5,1847	6,9691	11,3699	11,3351	
	Minimum	-16,70	-8,99	7,82	7,92	
	Maximum	8,82	11,36	16,43	16,44	
AE	N	6	6	6	6	0,029*
	Mean	6,1948	8,1306	12,3198	12,1745	
	Std. Deviation	,79386	,95951	,93934	,94936	
	Median	5,9928	7,8781	11,8655	11,7177	
	Minimum	5,52	7,32	11,69	11,54	
	Maximum	7,07	9,19	13,40	13,27	
kontrol	N	6	6	6	6	0,457
	Mean	1,4365	1,8180	2,2238	2,1413	
	Std. Deviation	1,26390	1,57040	1,92852	1,85060	
	Median	1,6834	2,1715	3,1260	3,0874	
	Minimum	,07	,10	,01	,01	
	Maximum	2,56	3,18	3,54	3,33	
boş MS	N	6	6	6	6	0,187
	Mean	,0673	,1010	-,0238	-,0267	
	Std. Deviation	,09523	,00000	,00674	,01258	
	Median	,0673	,1010	-,0238	-,0267	
	Minimum	,00	,10	-,03	-,04	
	Maximum	,13	,10	-,02	-,02	
Boş AE	N	6	6	6	6	0,157
	Mean	,1010	,0505	-,0334	-,0489	
	Std. Deviation	,14284	,07142	,04717	,01887	
	Median	,1010	,0505	-,0334	-,0489	
	Minimum	,00	,00	-,07	-,06	
	Maximum	,20	,10	,00	-,04	
P values ^a		0,057	0,051	0,016*	0,016*	

^a Kruskal-Wallis test results ^b Friedman Test results * p<0,05 statistically significant.

Tablo 4- 12: Üçüncü gün ALP ölçüm verileri

Grup		t6 7. gün	t8 7. gün	t43 7.gün	t46 7.gün	P value ^b
Bor	N	6	6	6	6	0,029*
	Mean	4,8481	6,4467	9,6862	9,6031	
	Std. Deviation	1,58772	2,02841	2,92781	2,87153	
	Median	5,2521	6,8700	10,5503	10,5077	
	Minimum	3,10	4,24	6,42	6,39	
	Maximum	6,19	8,23	12,08	11,91	
MS	N	6	6	6	6	0,042*
	Mean	-7,7883	-3,1647	7,4624	7,5241	
	Std. Deviation	22,12270	16,81563	4,20398	4,07687	
	Median	4,6461	6,0601	9,3208	9,2710	
	Minimum	-33,33	-22,57	2,65	2,86	
	Maximum	5,32	7,02	10,42	10,44	
AE	N	6	6	6	6	0,060
	Mean	2,0649	-3,1815	5,3879	5,4155	
	Std. Deviation	4,64428	16,05359	7,23295	7,03832	
	Median	2,9627	3,9391	5,8994	5,8366	
	Minimum	-2,96	-21,56	-2,09	-1,82	
	Maximum	6,19	8,08	12,35	12,23	
kontrol	N	6	6	6	6	0,801
	Mean	2,5363	2,0537	,6862	,5872	
	Std. Deviation	3,87528	2,86848	,63441	,50110	
	Median	,5387	,6565	,7815	,7830	
	Minimum	,07	,15	,01	,02	
	Maximum	7,00	5,35	1,27	,96	
boş MS	N	6	6	6	6	0,187
	Mean	,0673	,1000	-,0238	-,0267	
	Std. Deviation	,09523	,00000	,00674	,01258	
	Median	,0673	,1000	-,0238	-,0267	
	Minimum	,00	,10	-,03	-,04	
	Maximum	,13	,10	-,02	-,02	
boş AE	N	6	6	6	6	0,157
	Mean	,1010	,0500	-,0334	-,0489	
	Std. Deviation	,14284	,07071	,04717	,01887	
	Median	,1010	,0500	-,0334	-,0489	
	Minimum	,00	,00	-,07	-,06	
	Maximum	,20	,10	,00	-,04	
	P value ^a	0,528	0,345	0,113	0,109	

^a Kruskal-Wallis test results ^b Friedman Test results * p<0,05 statistically significant.

Tablo 4- 13: Yedinci Gün ALP ölçüm verileri

grup		t6 14. gün	t8 14. gün	t43 14.gün	t46 14.gün	P value ^b
bor	N	6	6	6	6	0,029*
	Mean	4,1298	5,1006	6,9287	6,8153	
	Std. Deviation	,14017	,48175	1,42283	1,37983	
	Median	4,1747	5,3531	7,6530	7,5716	
	Minimum	3,97	4,55	5,29	5,22	
	Maximum	4,24	5,40	7,84	7,65	
MS	N	6	6	6	6	0,029*
	Mean	1,0998	1,4309	2,0840	2,0464	
	Std. Deviation	,20571	,28716	,48281	,45948	
	Median	1,1447	1,5150	2,2778	2,2421	
	Minimum	,88	1,11	1,53	1,52	
	Maximum	1,28	1,67	2,44	2,38	
AE	N	6	6	6	6	0,029*
	Mean	,7631	1,0437	1,5852	1,5570	
	Std. Deviation	,40587	,58966	,84722	,83260	
	Median	,8080	1,1615	1,6774	1,6638	
	Minimum	,34	,40	,70	,68	
	Maximum	1,14	1,57	2,38	2,33	
kontrol	N	6	6	6	6	0,457
	Mean	,0673	,1515	,1747	,1809	
	Std. Deviation	,26934	,30300	,19678	,20021	
	Median	,0673	,1515	,0858	,0979	
	Minimum	-,20	-,15	,04	,04	
	Maximum	,34	,45	,40	,41	
boş MS	N	6	6	6	6	0,187
	Mean	,0673	,1010	-,0238	-,0267	
	Std. Deviation	,09523	,00000	,00674	,01258	
	Median	,0673	,1010	-,0238	-,0267	
	Minimum	,00	,10	-,03	-,04	
	Maximum	,13	,10	-,02	-,02	
boş AE	N	6	6	6	6	0,157
	Mean	,1010	,0505	-,0334	-,0489	
	Std. Deviation	,14284	,07142	,04717	,01887	
	Median	,1010	,0505	-,0334	-,0489	
	Minimum	,00	,00	-,07	-,06	
	Maximum	,20	,10	,00	-,04	
	P value ^a	0,023*	0,026*	0,016*	0,016*	

^a Kruskal-Wallis test results ^b Friedman Test results * p<0,05 statistically significant

Tablo 4- 14: Ondördüncü gün ALP ölçüm verileri

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan implant yüzey çalışmalarında amaç, osseointegrasyon süresini kısaltabilecek, daha kuvvetli osseointegrasyon sağlayabilecek bir yüzey geliştirmektir.

Metal içerikli biyomateryaller arasında titanyum (Ti) ve alaşımları; düşük özgül ağırlık, yüksek mukavemet yeteneği, sertlik, iyi tokluk, yüksek korozyona direnç ve iyi biyouyumluluk özelliklerinden dolayı doğal olarak tercih edilen ve günümüzde yaygın olarak biyomedikal alanda kullanılan bir malzemedir.

Titanyum ve alaşımları popüler bir malzeme olmasına rağmen, sahip oldukları zayıf tribolojik (sürtünme, aşınma ve yağlama) özelliklerinin, fonksiyonel koşullarda yüke maruz kalan dental implantın başarı oranını azalttığı görülmektedir. Titanyum ve alaşımlarının aşınma mekanizması, implantın başarısızlığında rol oynayan partikülleri serbest bırakan debris tabakası üretmektedir. (147,148). Bu zayıf özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla biyomedikal alanda elektrokimyasal arıtma, termo-kimyasal yüzey işlemleri, yüzeyin farklı osteoindüktif materyallerle kaplanması gibi farklı işlemlerle yüzey modifikasyonları tasarlanmaktadır. (149, 150, 151).

Bu tez çalışmasında da B ile yüzey modifikasyonu tasarısı hedeflenmiştir. Çalışmamızı tasarlarken B'nin titanyum ve alaşımlarının tanecik gelişimini kısıtlayıp, titanyum ve alaşımlarının ince taneli mikroyapısını stabil hale getirdiğini gösteren literatürler örnek olarak alınmıştır. Yüzey modifikasyonu temelli bu çalışmamızda B' u tercih etmemizin bir diğer nedeni de alaşımlar içine eklenen veya üzerine işlenen B'un osteoblastların canlılığı üzerinde minimal etkisinin olduğunun gösterilmesidir (152, 153). Bu amaçla çalışmamızın başında B ile kapladığımız disklere sitotoksosite testi uygulandı. Sitotoksosite testinde bor kaplı disk örneği üzerine osteoblast hücreleri ekildi ve WST-1 canlılık analizi yapıldı. Sonuç olarak B kaplanmış titanyum disk ekstraksiyon metoduyla yapılan canlılık testine göre sitotoksik etki göstermemiştir. Bu bulgu diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Genel olarak osteoblastik hücreler sayılarını arttırdıktan sonra hücre dışı matris salgılamaya başlarlar. Matris üretimini yüksek seviyelerde ALP üretimi ve matris modifikasyonu ile karakterize edilen farklılaşma fazı takip eder (154). Alkalen fosfataz, hücre membranına bağlı olarak bulunan ve aktivitesi osteoblastik farklılaşma belirteci

olarak kullanılan bir enzimdir. ALP enzimi pirofosfatları fosfata çevirerek HA kristallerinin oluşumunu desteklemektedir ve sert doku oluşumunun önemli bir bileşenidir (155). ALP enzimi kemik oluşumu süresince sentezlenir. Kemik hücre dışı matriksinde minerallerin birikmesi sonucu osteoblastların osteositlere dönüşmesi ile aktivasyonu azalmaktadır (145).

Sitotoksisite testinin temeliyle başlayan deneysel çalışmamızın devamında osteoblastik aktiviteyi gösteren belirteçlerden biri olan alkalen fosfataz (ALP) spesifik aktivite testi uygulanmıştır. Yüzey kimyası ve pürüzlülüğünün hücre özelleşmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesinde ALP tayini osteoblastların erken dönem farklılaşmasının önemli bir belirteci kabul edilmektedir. Tez çalışmamız kapsamında, Ti disklere ekilen hücrelerin osteojenik farklılaşmalarının kontrolü amacıyla ALP analizi hücre kültürünün 3, 7 ve 14. günlerinde incelenmiştir. Günümüze kadar yapılan in-vitro çalışmalardan elde edilen genel sonuçlarda, pürüzlü yüzeylerde kültüre edilen hücrelerin tornalanmış veya cilalanmış düz yüzeylere göre daha fazla ALP sentezledikleri gösterilmiştir. Bizim de çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da B grubunun diğer gruplara göre daha yüksek seviyede ALP enzim seviyesi göstermesinin yüzey pürüzlülüğüne bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Gorustovich ve arkadaşlarının (133), B ile modifiye edilmiş biyoaktif seramiklerin biyouyumluluklarını inceledikleri çalışmada; borla modifiye edilmiş partiküllerin fare tibiasındaki kemik iliğinde yeni kemik oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. B'un protein ile ilişkili mineralize dokuda mRNA düzenlemesi ve osteoblastik hücreler üzerinde doza bağlı olarak düzenleyici rol oynadığı bildirilmiştir. Bor kullanımının kemik formasyonunu stimüle etmesi doku mühendisliğinde yüzey kaplama materyali olarak kullanılabilir hale getirmektedir (156).

Benderdour ve arkadaşlarının B'un yara iyileşmesindeki rolünü incelemek için fibroblast kullandıkları çalışmada, B'un fibroblastlar üzerinde toksik etki yapmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca B'un endotelial hücreler gibi diğer hücreleri de kan damarları oluşumu için stimüle ettiğini ve B ile tedavinin sonrasında anjiyogenez gözlemlendiğini bildirmişlerdir (157). Yapılan çalışmalar ışığında çalışmamızda Bor, titanyum disklerin

yüzeylerine kaplanmıştır, ve osteoblast aktivitesi diğer standart kabul edilen yüzeylerle karşılaştırılmıştır.

Huang ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada MAO yöntemiyle Ti yüzeyinde B-TiO₂ film oluşturmuş ve bu filmin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktivitesi karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda B-TiO₂ film yüzeyinin TiO₂ filminden morfolojik olarak farklı olmadığı, yüzeydeki TiO₂ filme B infiltrasyonunun hidrofilik özelliği ve biyoaktiviteyi artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda bu konuda daha fazla in-vitro ve in-vivo çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır(136). Tez çalışmamızda bu çalışmaya paralel olarak MAO yöntemiyle B-TiO₂ film oluşturulan Ti disk yüzeyindeki osteoblastik aktivitenin, işlenmemiş ve asitle pürüzlendirme yöntemi uygulanmış diskler ile karşılaştırılmalı incelenmiştir.

Huang ve arkadaşlarının, in-vitro hücre kültürü çalışmalarında; B kaplı TiO₂ diskleri üzerindeki hücre çoğalma oranında 5. günden sonra saf TiO₂ disk örneklerindeki hücre çoğalma oranına göre düşüş gözlemlemişlerdir. 5 günden sonraki hücre büyümesindeki gecikme ise osteoblast hücrelerinin B kaplı TiO₂ yüzeyinde daha erken farklılaşmasına bağlamışlardır (136). Çalışmamızda 7. gün ALP ölçümleri değerlendirildiğinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Genel olarak 3. günden 14. güne doğru ALP düzeylerinde azalma gözlenmiştir, hücre farklılaşması yapılan diğer çalışmaların aktivite azalmasındaki yorumları bizim çalışmamız için de örnek teşkil etmektedir. Çalışmamızda ALP aktivitesindeki azalmanın hücre farklılaşmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Kawahara ve ark., titanyum yüzeyleri cilalama işlemi, farklı konsantrasyonlarda hidroklorik asitle dağlama ve 0,25-0,50 µm alumina partikülleri ile kumlama işlemi takiben hidroklorik asitle dağlama prosedürlerine tabi tutarak farklı pürüzlülüklerde yüzeyler elde etmişlerdir. Beagle köpeklerinin kemik iliklerinden elde ettikleri osteojenik kök hücre ve hematopoetik kök hücrelerden meydana gelen hücre grubunu bu yüzeylerde kültüre etmişler ve meydana gelen osteojenik mekanizmaları değerlendirmişlerdir. Yüzey pürüzlülüğünün artışına bağlı hücre sayısı ve DNA içeriğinde azalma gözlemlenirken, ALP spesifik aktivitesi ve osteoklasin seviyeleri anlamlı olarak artmıştır (158).

Zinger ve ark., titanyum yüzeyindeki mikron boyutundaki mimarinin osteoblast davranışları üzerine etkisini değerlendirmek için, farklı mikrotopografiler sahip

yüzeylerde MG63 osteoblast benzeri hücreleri değerlendirmişlerdir. Bu amaçla oluşturulan 100, 30 ve 10 µm çapında kavitelere sahip düzenli yapıda yüzeyler ve iri grenli kumlanmış ve asitle dağlanmış karmaşık yapıda SLA yüzeyler karşılaştırılmıştır. Kompleks mikrotopografiye sahip SLA yüzeyler düzenli yapıda yüzeylere göre anlamlı olarak daha fazla ALP ve osteokalsin gibi osteoblast özelleşme faktör seviyelerine sahip olmuşlardır (159). Çalışmamızda ALP seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış olsa da; ALP seviyesinin Bor grubunda daha yüksek çıkmasının daha pürüzlü yüzey yapısına bağlanabileceği düşünülmektedir.

Mikrotopografik yüzey özelliklerinin implant kemik arayüzünde kimyasal ve fizyolojik süreci stimüle etmesi ve bu sürece rehber olmasının kanıtlanması implant dizayn ve yüzey kaplamalarında yeni bir yaklaşım gereksinimini yaratmıştır. Dental implantların yüzey pürüzlülüğünü artırmak osseointegrasyonu geliştirmek amaçlıdır. Çalışmamızda Borun yarattığı yüzey pürüzlülüğü, SEM analizleriyle ortaya konulmuştur. TiO₂ disk yüzeylerinin Bor ile kaplanması sonucu yüzey pürüzlülüğünün artması ve Bor'un antimikrobiyal etkisi nedeniyle de osseointegrasyona olumlu etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda 3. günden 14. güne doğru tüm gruplarda artan ALP değerleri ölçülmüş fakat ikili karşılaştırmalar sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç tespit edilememiştir. Buna rağmen standart yüzeylerde olduğu gibi yeni bir yüzey olan B kaplı yüzeyler üzerinde de ALP değerlerinin artmış olması B'un osteoblastik aktivite üzerinde pozitif yönde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla B içeren titanyum yüzeyleri üzerinde yapılacak ileri çalışmalar ile implant osseointegrasyon sürelerinde kısalma ve daha güçlü osseointegrasyon sağlanabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda kullanılan yüzey için daha kapsamlı in vivo ve in vitro çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bor ve AE deney grubu 3. Günde kendi içlerinde değerlendirildiğinde, ALP düzeyleri arasındaki fark t6 ve t43 zaman dilimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,027$ $p<0,05$); fakat bu gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında ALP düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemişlerdir. Bor yüzeyinde ALP etkinliğinin asitle pürüzlendirilen yüzeylerdeki ALP enzim etkinliğine yakın olması, bu yüzeyin daha fazla in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenerek farklı bir implant yüzeyi olarak kullanılabilceğini düşündürmüştür.

7. Günde grupların kendi içlerinde yapılan ALP değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark t6ve t43 zaman dilimleri arasında Bor grubunda bulunmuştur. $p=0,027$ $p<0,05$. 7. Günde gruplar arasında ALP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Gruplar arasında fark bulunamamasının örnek sayısının sınırlılığına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Bor, AE ve MS deney grupları 14. Günde kendi içlerinde değerlendirildiğinde, ALP düzeyleri arasındaki fark t6 ve t43 zaman dilimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,027$ $p<0,05$). Ancak ikili karşılaştırmalar bonferroni düzeltmesi ile yorumlandığında gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır $p>0,05$. Hücre ekimi yapılan tüm gruplarda zaman içinde ALP enzim etkinliğinin artmış olmasının deney prosedürü doğrultusunda normal olduğu düşünülmektedir.

Bor ile yüzey kaplama teknolojisinin geliştirilmesi için daha çok sayıda in-vitro çalışmanın yapılmasına gerek duyulmaktadır. İn- vitro çalışmalar sonucunda ise in-vivo çalışmalara yönelerek immünohistokimya çalışmalarının yapılmasının da yeni bir materyal geliştirme açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., & Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, *415*(6871), 545.
2. Luan, Q., Desta, T., Chehab, L., Sanders, V. J., Plattner, J., & Graves, D. T. (2008). Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial. *Journal of dental research*, *87*(2), 148-152.
3. De Seta, F., Schmidt, M., Vu, B., Essmann, M., & Larsen, B. (2008). Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida* vaginitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *63*(2), 325-336.
4. Qin, G., Zong, Y., Chen, Q., Hua, D., & Tian, S. (2010). Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, *138*(1-2), 145-150.
5. Gorustovich, A. A., Steimetz, T., Nielsen, F. H., & Guglielmotti, M. B. (2008). Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *The Anatomical Record*, *291*(4), 441-447.
6. Niinomi, M. (2003). Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. *Science and technology of advanced Materials*, *4*(5), 445.
7. Albrektsson, T., Brånemark, P. I., Hansson, H. A., & Lindström, J. (1981).
8. Ratner, B. D. (1996). Biomaterials science: an interdisciplinary endeavor. In *Biomaterials science* (pp. 1-8).
9. Buser, D. (2001). Titanium for dental applications (II): implants with roughened surfaces. In *Titanium in medicine* (pp. 875-888). Springer, Berlin, Heidelberg.
10. Buser, D., Schenk, R. K., Steinemann, S., Fiorellini, J. P., Fox, C. H., & Stich, H. (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *25*(7), 889-902.

11. Elias, C. N., Oshida, Y., Lima, J. H. C., & Muller, C. A. (2008). Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 1(3), 234-242.
12. Tang, H., Prasad, K., Sanjines, R., Schmid, P. E., & Levy, F. (1994). Electrical and optical properties of TiO₂ anatase thin films. *Journal of applied physics*, 75(4), 2042-2047.
13. Sutherland, D. S., Forshaw, P. D., Allen, G. C., Brown, I. T., & Williams, K. R. (1993). Surface analysis of titanium implants. *Biomaterials*, 14(12), 893-899.
14. Branemark, P. I. (1983). Osseointegration and its experimental background. *The Journal of prosthetic dentistry*, 50(3), 399-410.
15. Muhonen, V., Heikkinen, R., Danilov, A., Jämsä, T., & Tuukkanen, J. (2007). The effect of oxide thickness on osteoblast attachment and survival on NiTi alloy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(5), 959-967.
16. Kim, K. H., Kwon, T. Y., Kim, S. Y., Kang, I. K., Kim, S., Yang, Y., & Ong, J. L. (2006). Preparation and characterization of anodized titanium surfaces and their effect on osteoblast responses. *Journal of Oral Implantology*, 32(1), 8-13.
17. Wataha, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 86(2), 203-209.
18. UZUN, İ. H., & BAYINDIR, F. (2010). Dental uygulamalarda titanyum ve özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2010(3).
19. Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22, S6-S11.
20. Lautenschlager, E. P., & Monaghan, P. (1993). Titanium and titanium alloys as dental materials. *International dental journal*, 43(3), 245-253.
21. Park, J., Bauer, S., von der Mark, K., & Schmuki, P. (2007). Nanosize and vitality: TiO₂ nanotube diameter directs cell fate. *Nano letters*, 7(6), 1686-1691.
22. Olmedo, D. G., Tasat, D., Guglielmotti, M. B., & Cabrini, R. L. (2003). Titanium transport through the blood stream. An experimental study on rats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(12), 1099-1103.
23. Urban, R. M., Jacobs, J. J., Tomlinson, M. J., Gavrilovic, J., Black, J., & Peoc'h, M. (2000). Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *JBJS*, 82(4), 457.

24. Cortada, M., Giner, L. L., Costa, S., Gil, F. J., Rodri, D., & Planell, J. A. (2000). Galvanic corrosion behavior of titanium implants coupled to dental alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11(5), 287-293
25. Valentine-Thon, E., & Schiwara, H. W. (2003). Validity of MELISA® for metal sensitivity testing. *Neuroendocrinology Letters*, 24(1/2), 57-64.
26. Esposito, M., Lausmaa, J., Hirsch, J. M., & Thomsen, P. (1999). Surface analysis of failed oral titanium implants. *Journal of biomedical materials research*, 48(4), 559-568.
27. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. *Titanium in medicine*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2001. [SEP]
28. Liu, J., Feng, X., Fryxell, G. E., Wang, L. Q., Kim, A. Y., & Gong, M. (1998). Hybrid mesoporous materials with functionalized monolayers. *Advanced Materials*, 10(2), 161-165.
29. Bächle, M., & Kohal, R. J. (2004). A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast- like MG63 cells. *Clinical Oral Implants Research*, 15(6), 683-692.
30. Koike, M., Lockwood, P. E., Wataha, J. C., & Okabe, T. (2007). Initial cytotoxicity of novel titanium alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 83(2), 327-331.
31. Faria, A. C. L., Rodrigues, R. C. S., Claro, A. P. R. A., de Mattos, M. D. G. C., & Ribeiro, R. F. (2011). Wear resistance of experimental titanium alloys for dental applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 4(8), 1873-1879.
32. Hallab, N. J., Skipor, A., & Jacobs, J. J. (2003). Interfacial kinetics of titanium- and cobalt- based implant alloys in human serum: Metal release and biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 65(3), 311-318.
33. Jackson, M. J., & Ahmed, W. (Eds.). (2007). *Surface engineered surgical tools and medical devices*. Springer Science & Business Media.
34. Young, R. W. (1963). Histophysical studies on bone cells and bone resorption. *Mechanisms of hard tissue destruction*, 471-496.
35. Frost, H. M. (1989). The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clinical orthopaedics and related research*, (248), 294-309.

36. Trippel SE, Coutts RD, Einhorn TA, Mundy GR, Rosenfeld RG (1996) Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg [Am]* 78:1272–1286
37. Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2004). Oral implant surfaces: Part 1-- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *International Journal of Prosthodontics*, 17(5).
38. Albrektsson T, Eriksson AR, Friberg B, Lekholm U, Lindahl L, Nevins M, Oikarinen V, Roos J, Sennerby L, Åstrand P (1993) Histologic investigations on 33 retrieved Nobelpharma implants. *Clinical Implants* 12:1–9 8.
39. Bhat, V., & Balaji, S. S. (2014). Surface topography of dental implants. *Nitte University Journal of Health Science*, 4(4), 46.
40. Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y. (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials*, 23(7), 844-854.
41. Schwartz, Z. (2003). Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater*, 6(24), 22-27.
42. Kieswetter, K., Schwartz, Z., Dean, D. D., & Boyan, B. D. (1996). The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 7(4), 329-345.
43. Oshida Y. *Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials*. Oxford, UK. Elsevier, 2007.
44. Puleo DA, Thomas MV. (2006). Implant surfaces. *Dent Clin North Am* 50(1),323-38.
45. ZHAO, H. M., BU, Y. Y., WANG, J. C., & LUO, B. W. (2007). Detection of seabed cobalt-rich crusts micro-topography based on single-beam ultrasonic wave [J]. *Journal of Central South University (Science and Technology)*, 5, 024.
46. Kim, H., Choi, S. H., Ryu, J. J., Koh, S. Y., Park, J. H., & Lee, I. S. (2008). The biocompatibility of SLA-treated titanium implants. *Biomedical Materials*, 3(2), 025011.
47. Mustafa, K., Wroblewski, J., Lopez, B. S., Wennerberg, A., Hultenby, K., & Arvidson, K. (2001). Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clinical oral implants research*, 12(5), 515-525.

48. Meyer, U., Buchter, A., Wiesmann, H. P., Joos, U., & Jones, D. B. (2005). Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cell Mater*, 9, 39-49.
49. Wennerberg, A., Albrektsson, L. J., & Lausmaa, J. (1996). Torque and histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants and 75µm sized particles of Al₂O₃. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30, 251-260.
50. Park, J. Y., Gemmell, C. H., & Davies, J. E. (2001). Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials*, 22(19), 2671-2682.
51. Soskolne, W. A., Cohen, S., Shapira, L., Sennerby, L., & Wennerberg, A. (2002). The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF- α and PGE₂. *Clinical oral implants research*, 13(1), 86-93.
52. Buser, D., Schenk, R. K., Steinemann, S., Fiorellini, J. P., Fox, C. H., & Stich, H. (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 25(7), 889-902.
53. Novaes Jr, A. B., Souza, S. L., de Oliveira, P. T., & Souza, A. M. (2002). Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(3).
54. Shalabi, M. M., Gortemaker, A., Hof, M. V. T., Jansen, J. A., & Creugers, N. H. J. (2006). Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *Journal of dental research*, 85(6), 496-500.
55. Gülay, U. Z. U. N., & Filiz, K. E. Y. F. (2007). İMPLANTLARIN YÜZEY ÖZELLİKLERİ VE OSSEOİNTEGRASYON. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*.
56. Brunette, D. M. (1986). Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Experimental cell research*, 164(1), 11-26.
57. Oates, B. J. (2005). *Researching information systems and computing*. Sage.

58. Carlsson, L., Röstlund, T., Albrektsson, B., & Albrektsson, T. (1988). Removal torques for polished and rough titanium implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 3(1).
59. Becker, W., Becker, B. E., Ricci, A., Bahat, O., Rosenberg, E., Rose, L. F., ... & Israelson, H. (2000). A Prospective Multicenter Clinical Trial Comparing One- and Two- Stage Titanium Screw- Shaped Fixtures with One- Stage Plasma- Sprayed Solid- Screw Fixtures. *Clinical implant dentistry and related research*, 2(3), 159-165.
60. Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2005). The impact of oral implants-past and future, 1966-2042. *J Can Dent Assoc*, 71(5), 327.
61. Hansson, S., & Norton, M. (1999). The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model. *Journal of Biomechanics*, 32(8), 829-836.
62. Wennerberg, A., Hallgren, C., Johansson, C., & Danelli, S. (1998). A histomorphometric evaluation of screw- shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clinical oral implants research*, 9(1), 11-19.
63. Wennerberg, A., Albrektsson, T., Johansson, C., & Andersson, B. (1996). Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials*, 17(1), 15-22.
64. Ong, J. L., & Chan, D. C. (2000). Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 28(5&6).
65. Azenha, M. R., Peitl, O., & Barros, V. M. D. R. (2010). Bone response to biosilicates® with different crystal phases. *Brazilian dental journal*, 21(5), 383-389.
66. Davies, J. E. (2003). Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education*, 67(8), 932-949.
67. HAYRAN, Y., AKBULUT, N., SOYLU, E., & TÜMER, M. K. (2016). İmplant Yüzey Şekillendirme Teknolojileri. *Turkiye Klinikleri Journal of Oral and Maxillofacial Surgery-Special Topics*, 2(2), 98-105.
68. Zhou, W., Liu, Z., Xu, S., Hao, P., Xu, F., & Sun, A. (2011). Long- term survivability of hydroxyapatite- coated implants: a meta- analysis. *Oral Surgery*, 4(1), 2-7.

69. Tinsley, D., Watson, C. J., & Russell, J. L. (2001). A comparison of hydroxylapatite coated implant retained fixed and removable mandibular prostheses over 4 to 6 years. *Clinical Oral Implants Research*, 12(2), 159-166.
70. Li, D., Ferguson, S. J., Beutler, T., Cochran, D. L., Sittig, C., Hirt, H. P., & Buser, D. (2002). Biomechanical comparison of the sandblasted and acid- etched and the machined and acid- etched titanium surface for dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 60(2), 325-332.
71. Ban, S., Iwaya, Y., Kono, H., & Sato, H. (2006). Surface modification of titanium by etching in concentrated sulfuric acid. *Dental Materials*, 22(12), 1115-1120.
72. Novaes, A. B., Papalexiou, V., Grisi, M. F., Souza, S. S., Taba, M., & Kajiwarra, J. K. (2004). Influence of implant microstructure on the osseointegration of immediate implants placed in periodontally infected sites. *Clinical Oral Implants Research*, 15(1), 34-43.
73. Papalexiou, V., Novaes, A. B., Grisi, M. F., Souza, S. S., Taba, M., & Kajiwarra, J. K. (2004). Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. *Clinical oral implants research*, 15(1), 44-53.
74. Cochran, D. L., Nummikoski, P. V., Higginbottom, F. L., Hermann, J. S., Makins, S. R., & Buser, D. (1996). Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid- etched surface in the canine mandible: radiographic results. *Clinical Oral Implants Research*, 7(3), 240-252.
75. Martin, J. Y., Schwartz, Z., Hummert, T. W., Schraub, D. M., Simpson, J., Lankford, J., ... & Boyan, B. D. (1995). Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast- like cells (MG63). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 29(3), 389-401.
76. Klokkevold, P. R., Nishimura, R. D., Adachi, M., & Caputo, A. (1997). Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clinical oral implants research*, 8(6), 442-447.
77. Buser, D., Nydegger, T., Oxland, T., Cochran, D. L., Schenk, R. K., Hirt, H. P., ... & Nolte, L. P. (1999). Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid- etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The*

- Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, 45(2), 75-83.
78. Yokoyama, K. I., Ichikawa, T., Murakami, H., Miyamoto, Y., & Asaoka, K. (2002). Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implant. *Biomaterials*, 23(12), 2459-2465.
 79. Cho, S. A., & Park, K. T. (2003). The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials*, 24(20), 3611-3617.
 80. Kim, M. J., Kim, C. W., Lim, Y. J., & Heo, S. J. (2006). Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. *Journal of biomedical materials research Part A*, 79(4), 1023-1032.
 81. Buser, D., Schenk, R. K., Steinemann, S., Fiorellini, J. P., Fox, C. H., & Stich, H. (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 25(7), 889-902.
 82. Cochran, D. L., Schenk, R. K., Lussi, A., Higginbottom, F. L., & Buser, D. (1998). Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 40(1), 1-11.
 83. L.-H. Li, Y.-M. Kong, H.-W. Kim, Y.-W. Kim, H.-E. Kim, S.-J. Heo, J.-Y. Koak, Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation, *Biomaterials* 25 (2004) 2867–2875. ^[1]_[SEP]
 84. Loughlin, R. M. (2002). Early Loading of Sandblasted and Acid-Etched (SLA) Implants: A Prospective Split-Mouth Comparative Study. *Implant Dentistry*, 11(4), 394.
 85. Cochran, D. L., Buser, D., Ten Bruggenkate, C. M., Weingart, D., Taylor, T. M., Bernard, J. P., ... & Simpson, J. P. (2002). The use of reduced healing times on ITI® implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface. *Clinical oral implants research*, 13(2), 144-153.
 86. Ishizawa, H., Fujino, M., & Ogino, M. (1997). Histomorphometric evaluation of the thin hydroxyapatite layer formed through anodization followed by hydrothermal

- treatment. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 35(2), 199-206.
87. Ishizawa, H., & Ogino, M. (1999). Hydrothermal precipitation of hydroxyapatite on anodic titanium oxide films containing Ca and P. *Journal of materials science*, 34(23), 5893-5898.
88. Huang, Y., Wang, Y., Ning, C., Nan, K., & Han, Y. (2007). Hydroxyapatite coatings produced on commercially pure titanium by micro-arc oxidation. *Biomedical Materials*, 2(3), 196.
89. Ishizawa, H., & Ogino, M. (1995). Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 29(1), 65-72.
90. Sundararajan, G., & Krishna, L. R. (2003). Mechanisms underlying the formation of thick alumina coatings through the MAO coating technology. *Surface and Coatings Technology*, 167(2-3), 269-277.
91. Sul, Y. T., Johansson, C. B., Kang, Y., Jeon, D. G., & Albrektsson, T. (2002). Bone reactions to oxidized titanium implants with electrochemical anion sulphuric acid and phosphoric acid incorporation. *Clinical implant dentistry and related research*, 4(2), 78-87.
92. Puleo, D. A., & Nanci, A. (1999). Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*, 20(23-24), 2311-2321.
93. Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E., & Pearce, S. G. (2007). Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*, 13(1), 1-10.
94. Becker, J., Kirsch, A., Schwarz, F., Chatzinikolaidou, M., Rothamel, D., Lekovic, V., & Jennissen, H. P. (2006). Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clinical oral investigations*, 10(3), 217-224.
95. Arosarena, O. A., & Collins, W. L. (2005). Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 132(4), 592-597.
96. Oreffo, R. O. C., & Triffitt, J. T. (1999). In vitro and in vivo methods to determine the interactions of osteogenic cells with biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10(10-11), 607-611.

97. Gomi, K., Lowenberg, B., Shapiro, G., & Davies, J. E. (1993). Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials*, 14(2), 91-96.
98. Cooper, L. F. (1998). Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 80(4), 439-449.
99. Nanci, A., Zalzal, S., Gotoh, Y., & McKee, M. D. (1996). Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microscopy research and technique*, 33(2), 214-231.
100. Davies, J. E. (1996). In vitro modeling of the bone/implant interface. *The Anatomical Record*, 245(2), 426-445.
101. Maurizi, M., Binaglia, L., Donti, E., Ottaviani, F., Paludetti, G., & Donti, G. V. (1983). Morphological and functional characteristics of human temporal-bone cell cultures. *Cell and tissue research*, 229(3), 505-513.
102. Auf'mkolk, B., Hauschka, P. V., & Schwartz, E. R. (1985). Characterization of human bone cells in culture. *Calcified tissue international*, 37(3), 228-235.
103. Robey, P. G., & Termine, J. D. (1985). Human bone cells in vitro. *Calcified tissue international*, 37(5), 453-460.
104. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., ... & Walter, P. (2013). *Essential cell biology*. Garland Science.
105. ALBERTS, Bruce, et al. *Essential cell biology*. Garland Science, 2013.
106. D. R. BARD, M. J. DICKENS, A. U. SMITH and J. M. ZAREK, ^[1]_[SEP] Nature PQT (1972) 314. ^[1]_[SEP]
107. Cheung, W. Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*, 207(4426), 19-27.
108. Gallagher, J. A., Gundle, R., & Beresford, J. N. (1996). Isolation and culture of bone-forming cells (osteoblasts) from human bone. In *Human cell culture protocols* (pp. 233-262). Humana Press.
109. Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L., & Gupta, A. K. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 17(2), S77-S83.
110. AUBIN, J. E., TURKSEN, K., & HEERSCHKE, J. N. (1993). Osteoblastic cell lineage. In *Cellular and molecular biology of bone* (pp. 1-45).

111. Sudo, H., Kodama, H. A., Amagai, Y., Yamamoto, S., & Kasai, S. (1983). In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of cell biology*, 96(1), 191-198.
112. Owen, M., & Friedenstein, A. J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues*, 136, 42-60.
113. Patridge, N. C., Frampton, R. J., Eisman, J. A., Michelangeli, V. P., Elms, E., Bradley, T. R., & Martin, T. J. (1980). Receptors for 1, 25 (OH) z vitamin D3 enriched in clonal osteoblast-like rat osteogenic sarcoma ceils. *FEBS (Fed. Fur, Biochem. Soc.) Lett*, 115, 139-141.
114. Patridge, N. C., Hillyard, C. J., Nolan, R. D., & Martin, T. J. (1985). Regulation of prostaglandin production by osteoblast-rich calvarial cells. *Prostaglandins*, 30(3), 527-539.
115. Majeska, R. J., Rodan, S. B., & Rodan, G. A. (1978). Maintenance of parathyroid hormone response in clonal rat osteosarcoma lines. *Experimental cell research*, 111(2), 465-468.
116. MAJESKA, R. J., RODAN, S. B., & RODAN, G. A. (1980). Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology*, 107(5), 1494-1503.
117. Keeting, P. E., Oursler, M. J., Wiegand, K. E., Bonde, S. K., Spelsberg, T. C., & Riggs, B. L. (1992). Zeolite a increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor β production in normal adult human osteoblast- like cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(11), 1281-1289.
118. Thompson, G. J., & Puleo, D. A. (1996). Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation timecourse in vitro. *Biomaterials*, 17(20), 1949-1954.
119. Houghton, A., Oyajobi, B. O., Foster, G. A., Russell, R. G. G., & Stringer, B. M. J. (1998). Immortalization of human marrow stromal cells by retroviral transduction with a temperature sensitive oncogene: identification of bipotential precursor cells capable of directed differentiation to either an osteoblast or adipocyte phenotype. *Bone*, 22(1), 7-16.
120. Caplan, A. I. (2005). Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue engineering*, 11(7-8), 1198-1211.

121. Dieudonne, S. C., Van den Dolder, J., De Ruijter, J. E., Paldan, H., Peltola, T., Van't Hof, M. A., ... & Jansen, J. A. (2002). Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. *Biomaterials*, 23(14), 3041-3051.
122. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell proliferation*, 20(3), 263-272.
123. Owen, M. E., Cave, J., & Joyner, C. J. (1987). Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. *Journal of cell science*, 87(5), 731-738.
124. Yamaguchi, S., Kuroda, S., Kobayashi, H., Shichinohe, H., Yano, S., Hida, K., ... & Iwasaki, Y. (2006). The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC)—a preliminary study using microarray analysis. *Brain research*, 1087(1), 15-27.
125. Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13(1), 81-88
126. Hanada, K., Dennis, J. E., & Caplan, A. I. (1997). Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(10), 1606-1614.
127. Osyczka, A. M., Diefenderfer, D. L., Bhargava, G., & Leboy, P. S. (2004). Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells tissues organs*, 176(1-3), 109-119.
128. Maniopoulos, C., Sodek, J., & Melcher, A. H. (1988). Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and tissue research*, 254(2), 317-330.
129. Nielsen, F. H. (2004). Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats. *Biofactors*, 20(3), 161-171.
130. Nielsen, F. H. (2008). Is boron nutritionally relevant?. *Nutrition reviews*, 66(4), 183-191.
131. Gallardo-Williams, M. T., Chapin, R. E., King, P. E., Moser, G. J., Goldsworthy, T. L., Morrison, J. P., & Maronpot, R. R. (2004). Boron

- supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicologic pathology*, 32(1), 73-78.
132. Naghii, M. R., Torkaman, G., & Mofid, M. (2006). Effects of boron and calcium supplementation on mechanical properties of bone in rats. *Biofactors*, 28(3-4), 195-201.
133. Gorustovich, A. A., López, J. M. P., Guglielmotti, M. B., & Cabrini, R. L. (2006).
134. Beattie, J. H., & Peace, H. S. (1993). The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *British journal of nutrition*, 69(3), 871-884.
135. Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., ... & Peng, L. (2011). Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biological trace element research*, 144(1-3), 306-315.
136. Huang, Qianli, et al. "Enhanced hydrophilicity and in vitro bioactivity of porous TiO₂ film through the incorporation of boron." *Ceramics International* 41.3 (2015): 4452-4459.
137. Gopal, N. G. S., Patel, K. M., Sharma, G., Bhalla, H. L., Wills, P. A., & Hilmy, N. (1988). Guide for radiation sterilization of pharmaceuticals and decontamination of raw materials. *Radiation physics and chemistry*, 32(4), 619-622.
138. Joyce Hansen and J.L. Whitby Gamma radiation sterilization practice in the USA. Sixth international Kilmer Memorial Conference, June 1993 Brussels, Belgium.
139. Hasan ALKAN Gıda Işınlama yöntemi ile Gıdaların korunması ve Gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi, Gıda Dergisi sayı 2002-04 Nisan 2002.
140. Premnath, V. W. H. M., Harris, W. H., Jasty, M., & Merrill, E. W. (1996). Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem. *Biomaterials*, 17(18), 1741-1753.
141. Boyan, B. D., Bonewald, L. F., Paschalis, E. P., Lohmann, C. H., Rosser, J., Cochran, D. L., ... & Boskey, A. L. (2002). Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcified tissue international*, 71(6), 519-529.
142. Boyan, B. D., Lossdorfer, S., Wang, L., Zhao, G., Lohmann, C. H., Cochran, D. L., &

143. Carlsson, L. V., Albrektsson, T., & Berman, C. (1989). Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 4(3).
144. Saldaña, L., Barranco, V., González- Carrasco, J. L., Rodríguez, M., Munuera, L., & Vilaboa, N. (2007). Thermal oxidation enhances early interactions between human osteoblasts and alumina blasted Ti6Al4V alloy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81(2), 334-346.
145. Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 444-448.
146. Giavaresi, G., Fini, M., Cigada, A., Chiesa, R., Rondelli, G., Rimondini, L., ... & Giardino, R. (2003). Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. *Biomaterials*, 24(9), 1583-1594.
147. Geng, K., Lu, W., & Zhang, D. (2003). Microstructure and tensile properties of in situ synthesized (TiB+ Y2O3)/Ti composites at elevated temperature. *Materials Science and Engineering: A*, 360(1-2), 176-182.
148. Miklaszewski, A., Jurczyk, M. U., & Jurczyk, M. (2013). Microstructural Development of Ti-B Alloyed Layer for Hard Tissue Applications. *Journal of Materials Science & Technology*, 29(6), 565-572.
149. Sarma, B., & Chandran, K. R. (2011). Recent advances in surface hardening of titanium. *JOM*, 63(2), 85-92.
150. He, L., Zhang, X., & Tong, C. (2006). Surface modification of pure titanium treated with B4C at high temperature. *Surface and Coatings Technology*, 200(9), 3016-3020.
151. Jakubowicz, J., Jurczyk, K., Niespodziana, K., & Jurczyk, M. (2009). Mechanochemical synthesis of porous Ti-based nanocomposite biomaterials. *Electrochemistry Communications*, 11(2), 461-465.
152. Miklaszewski, A., Jurczyk, M. U., Jurczyk, K., & Jurczyk, M. (2011). Plasma surface modification of titanium by TiB precipitation for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology*, 206(2-3), 330-337.
153. Bahl, S., Raj, S., Vanamali, S., Suwas, S., & Chatterjee, K. (2014). Effect of boron addition and processing of Ti-6Al-4V on corrosion behaviour and biocompatibility. *Materials Technology*, 29(sup1), B64-B68.

154. Declercq, H. A., Verbeeck, R. M., De Ridder, L. I., Schacht, E. H., & Cornelissen, M. J. (2005). Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials*, 26(24), 4964-4974.
155. Stein, G. S., Lian, J. B., & Owen, T. A. (1990). Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *The FASEB journal*, 4(13), 3111-3123.
156. Hakki, S. S., Bozkurt, B. S., & Hakki, E. E. (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(4), 243-250.
157. Benderdour, M., Hess, K., Dzondo-Gadet, M., Nabet, P., Belleville, F., & Dousset, B. (1998). Boron modulates extracellular matrix and TNF α synthesis in human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 246(3), 746-751.
158. Kawahara, T., Yamamuka, M., Yuuki, A., & Ono, K. (1995). Surface morphologies and electrical properties of (Ba, Sr) TiO₃ films prepared by two-step deposition of liquid source chemical vapor deposition. *Japanese journal of applied physics*, 34(9S), 5077.
159. Zinger, O., Anselme, K., Denzer, A., Habersetzer, P., Wieland, M., Jeanfils, J., ... & Landolt, D. (2004). Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials*, 25(14), 2695-2711.

ÖZGEÇMİŞ

Hasan Onur Sorkun, 1981 yılında Eskişehir’de doğdu. Orta ve lise öğrenimini Eskişehir Anadolu Lisesi’nde, Lisans eğitimini 2000-2005 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde tamamladı. 2005 yılında Yeditepe Üniversitesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı’nda master programına başladı, 2006-2013 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı’nda doktora programını tamamladı. 2013-2015 yılları arasında Yeditepe Üniversitesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı’nda master programını tamamlayarak 2015-2018 yılları arasında doktora programını tamamladı.

