

**TC.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PROTETİK DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI**

**PLAZMA POLİMERİZASYON TEKNİĞİ İLE FARKLI YÜZEY
KARARLILIĞI OLUŞTURULAN TİP 4 TİTANYUM İMPLANT
MATERYALİNE 2 FARKLI YÜZEY ENERJİSİNE SAHİP ORAL
STREPTOKOKLARIN İN VİTRO ADEZYONUNUN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Ayça ÖZKAN

Ankara 2011



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

Öğrencinin adı Soyadı : AYÇA ÖZKAN
Anabilim Dalı : PROTETİK DİŞ TEDAVİSİ
Program Adı : PROTETİK DİŞ TEDAVİSİ DOKTORA PROGRAMI
Sınav Tarihi : 18.07.2011
Tez Konusu : “Plazma Polimerizasyon Tekniği ile Farklı Yüzey Kararlılığı Oluşturulan Tip 4 Titanyum İmplant Materyaline 2 Farklı Yüzey Enerjisine Sahip Oral Streptokokun İn Vitro Adezyonunun İncelenmesi”

29/07/2011 tarih ve 099 sayılı Enstitü Yönetim Kurulu Kararı ile

Yukarıda belirtilen tez konusu 18/07/2011 tarihinde yapılan Tez Savunma sınavı sonucunda söz konusu tezin;

Düzeltilmesine :

Kabulüne : ✓

Reddine :

Oybirliği / Oyçokluğu ile karar verilmiştir.

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Pervin İMİRZALIOĞLU

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ:

1.Prof. Dr. Pervin İMİRZALIOĞLU

2.Doç. Dr. Selim ERKUT

3.Prof. Dr. Kemal ÜNSAL

4.Prof. Dr. Bülent DAYANGAÇ

5.Doç. Dr. Hilal GÖKTAŞ

YEDEK ÜYELER:

1.Prof. Dr. Hakan TERZİOĞLU

2.Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışmanın oluşturulmasından sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Pervin İmirzalıoğlu'na,

Doktora eğitimimde büyük emekleri olan Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Doktora tezimin mikrobiyoloji bölümündeki çalışmaları sırasında yardımları için Doç. Dr. Müge Demirbilek'e

Doktora tezimin konusunun belirlenmesi ve çalışmalarım esnasında büyük katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Dilek Çökeliler'e

Doktora eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim bilgi ve deneyimleriyle bana ışık tutan değerli hocalarıma,

Birlikte çalışmaktan zevk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmam boyunca, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarıma ve özellikle sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| TEŞEKKÜRLER..... | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| KISALTMALAR VE SİMGELER..... | v |
| GRAFİKLER DİZİNİ..... | viii |
| ÖZET..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. Dental İmplantların Tarihçesi ve Gelişimi..... | 4 |
| 2.2 Dental İmplantın Transmukozaal Kısımları..... | 6 |
| 2.3 Dental İmplantlarda Kullanılan Materyaller..... | 7 |
| 2.3.1 Titanyum..... | 8 |
| 2.4 Titanyumun Yüzey işlemleri..... | 9 |
| 2.4.1 Plazma Polimerizasyon Yöntemi..... | 10 |
| 2.4.2 Plazmanın yapısı..... | 10 |
| 2.4.3 Plazma polimerizasyonuna etki eden faktörler..... | 11 |
| 2.5 Yüzey Karakterizasyon Yöntemleri..... | 12 |
| 2.5.1 Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AKM)..... | 12 |
| 2.5.2 Kimyasal analiz için elektron spektroskopisi (XPS veya ESCA)..... | 12 |
| 2.5.3 Temas Açısı Ölçümü ve Yüzey Enerjilerinin Saptanması..... | 13 |
| 2.5.4 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)..... | 13 |
| 2.6 Biyofilm..... | 13 |
| 2.6.1 Biyofilm oluşum evreleri..... | 14 |
| 2.6.2 Dental İmplantlarda Biyofilm oluşumu..... | 15 |
| 2.6.3 Dental İmplantların Yüzey Özellikleri ve Bakteriyeel Tutulumuna Etkisi..... | 16 |
| 2.6.4 Bakteriyeel adezyonu ve biyofilm oluşumunu azaltmak için titanyum yüzey modifikasyonları..... | 17 |
| 2.7 Streptococcus mutans..... | 18 |
| 2.8 Streptococcus sanguis..... | 19 |
| 2.9 Peri-implant mukositis ve perüimplantitis mikrobiyolojisi..... | 19 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 22 |
| 3.1. Yüzeylerin Hazırlanması..... | 22 |
| 3.1.1. Zımparalama ve Parlatma İşlemleri..... | 23 |
| 3.2 Plazma polimerizasyon yöntemiyle yüzey modifikasyonu..... | 23 |
| 3.3 Yüzey Karakterizasyonu..... | 25 |
| 3.3.1 AKM ile yüzey topografisinin incelenmesi..... | 26 |
| 3.3.2 XPS (ESCA) ile yüzey kimyasının incelenmesi..... | 27 |
| 3.3.3 Temas Açısı Ölçümleri..... | 28 |
| 3.4 Mikrobiyolojik İncelemeler..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.1 Besiyerlerinin Hazırlanması | 29 |
| 3.4.2 Araştırmada Kullanılan Bakteriler | 29 |
| 3.4.3 Bakterilerin hazırlanması | 29 |
| 3.4.4 Biyofilm oluşturulması | 29 |
| 3.4.5 Deneyde Kullanılacak Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması | 30 |
| 3.5 İstatistiksel Analiz | 31 |
| 4. BULGULAR..... | 32 |
| 4.1. <i>Yüzey Pürüzlülüğü ve Kaplama Kalınlığı Ölçüm Sonuçları</i> | 32 |
| 4.1.1 Örneklerin Tükürükte Bekletilmeden Önceki AKM Görüntüleri | 33 |
| 4.1.2 Örneklerin Tükürükte Bekletildikten Sonraki AKM Görüntüleri | 34 |
| 4.2 <i>Temas açısı Ölçümlerinin Sonuçları</i> | 35 |
| 4.2.1 Örneklerin Tükürükte Bekletilmeden Önceki Temas açısı ölçümleri | 35 |
| 4.2.2 Örneklerin tükürükte bekletildikten sonra temas açısı ölçümleri | 36 |
| 4.3 <i>XPS analizleri (Yüzeylerin kimyasal değişimleri)</i> | 37 |
| 4.4 <i>İstatistiksel Değerlendirme</i> | 38 |
| 5. TARTIŞMA..... | 43 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 51 |
| KAYNAKLAR..... | 53 |

KISALTMALAR VE SİMGELER

nm: nanometre

µm: mikrometre

°C: santigrat derece

K: Kelvin

PVD: fiziksel buhar biriktirme

ATCC: American Type Culture Center

XPS: X-ışını destekli fotoelektron spektroskopisi

AKM: Atomik kuvvet mikroskobu

ESCA: Electron Spectroscopy for Chemical Analysis

R_a: ortalama yüzey pürüzlülük parametresi

R_{max}: maksimum yüzey pürüzlülük parametresi

Mpa: megapaskal

Gpa: Gigapaskal

SYE: serbest yüzey enerjisi

Ti: Titanyum

Cfu/ml: koloniforming unit/mililitre

CpTi: saf titanyum

MSA: mitis salivarius agar

TSB: triptik soy broth

TSA: triptik soy agar

FEP: floroetilen-propilen

MUA: 11-merkaptoundekanoik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1:Osteointegre implant | 4 |
| Şekil 2: Mandibulada Taş İmplant..... | 5 |
| Şekil 3: Kemik seviyesi implantların protetik parçalarındaki transmukozal kısımlar. X: protetik alt yapı parçası üzerinde bulunan transmukozal kısımlar [28]..... | 7 |
| Şekil 4: Kesme cihazı (Accutom-50, Struers Ltd, Lanarkshire, İngiltere) | 22 |
| Şekil 5:Parlatma cihazı | 23 |
| Şekil 6:Plazma depozisyon cihazı..... | 25 |
| Şekil 7: Depozisyon sonrası örnekler | 25 |
| Şekil 8:AKM cihazı | 27 |
| Şekil 9: XPS cihazı (Thermo, K-Alpha - Monochromated high-performance XPS spectrometer) | 27 |
| Şekil 10: Temas açısı ölçüm cihazı (OCA 20 contact angle system, Dataphysics, Germany) | 28 |
| Şekil 11: Temas açısı ölçüm düzeneği..... | 28 |
| Şekil 12: Besiyerinin hazırlanması | 30 |
| Şekil 13 :(A): Bakteri süspansiyonlarının 10 katlı sulandırılması. (B):10 kat sulandırılan bakteri süspansiyonunun TSA'a ekilmesi..... | 30 |
| Şekil 14:1. deney grubu Ra=0.085 µm. Kalınlık= 66 nm Şekil 15: 2. deney grubu Ra=0.066 µm. Kalınlık=39 nm..... | 33 |
| Şekil 16: 3. deney grubu Ra=0.042 µm. Kalınlık=114 nm Şekil 17: 4. deney grubu Ra:0.057 µm. Kalınlık=97 nm | 33 |
| Şekil 18: 1. deney grubu Ra=0.098 µm kalınlık=50 nm Şekil 19: 2. deney grubu Ra=0.074 µm. Kalınlık=25 nm..... | 34 |
| Şekil 20: 3. deney grubu Ra=0.047 µm. Kalınlık=97 nm Şekil 21: 4. deney grubu Ra=0.066 µm. Kalınlık=50 nm..... | 34 |
| Şekil 22:1. deney grubu temas açısı ölçümü=12.1 | 35 |
| Şekil 23: 2. deney grubu temas açısı ölçümü=16.5 | 35 |
| Şekil 24: 3. deney grubu temas ölçümü=49.7..... | 36 |
| Şekil 25: 4. deney grubu temas açısı ölçümü=66 | 36 |
| Şekil 26: 1. deney grubu temas açısı ölçümü= 55.9 | 36 |
| Şekil 27: 2. deney grubu temas açısı ölçümü=37.5 | 37 |
| Şekil 28: 3. deney grubu temas açısı ölçümü=69.7 | 37 |
| Şekil 29: 4. deney grubu temas açısı ölçümleri=58.9..... | 37 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1: CpTi ve Ti alaşımlarının % ağırlık bileşenleri | 8 |
| Tablo 2: Kullanılan yapay tükürük formülü | 26 |
| Tablo 3:Yapay tükürük ile etkileşim öncesi ve sonrası pürüzlülük ve film kalınlığı sonuçları..... | 32 |
| Tablo 4: Temas açısı analizleri | 35 |
| Tablo 5: Örneklerin yapay tükürük ile etkileşim öncesi ve sonrası % element bileşimi | 38 |
| Tablo 6: Kontrol Grubu ve Deney Grupları için S. Mutans ve S.Sanguis Bakterileri Tanımlayıcı İstatistikleri..... | 38 |
| Tablo 7: Kontrol Grupları İçin S. Mutans ve S. Sanguis Bakterileri Arasındaki Farklılığın İncelenmesi | 39 |
| Tablo 8: S. Mutans Bakterileri için Kontrol Grubu ile Deney Grupları Arasındaki Farklılıkların İncelenmesi | 40 |
| Tablo 9: S. Mutans Bakterileri için Deney Grupları Arasındaki Farklılığın İncelenmesi | 41 |
| Tablo 10: S. Sanguis Bakterileri için Kontrol Grubu ile Deney Grupları Arasındaki Farklılıkların İncelenmesi | 41 |
| Tablo 11: S. Sanguis Bakterileri için Deney Grupları Arasındaki Farklılığın İncelenmesi | 42 |

GRAFİKLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Grafik 1: Kontrol Grubu ve Deney Grupları için Ortalama S. Mutans ve S.Sanguis Bakterileri Sayıları | 39 |
| Grafik 2: Kontrol Grupları İçin S. Mutans İle S. Sanguis Bakteri Sayıları | 39 |

ÖZET

Çalışmamızda tiyol içerikli monomer ile plazma polimerizasyon yönteminin, implant materyali olarak sıklıkla kullanılan tip 4 saf titanyum üzerine uygulanabilirliği ve yüzey özelliklerinin değiştirilmesiyle biyofilm ve bakteri tutulmasına etkisi incelenmiştir.

Çalışmamızda tip 4 titanyum metali kullanılmıştır. 6 mm çapında, 2 mm kalınlığında olmak üzere 88 adet titanyum disk hazırlanmış, bütün örnekler elmas solusyonu ile polisaj işlemleri uygulanmıştır. Oluşturulan grupların her birinde 22 adet titanyum disk bulunmaktadır. Örneklerden 88 tanesi farklı koşullarda plazma polimerizasyon yöntemiyle modifiye edilmiştir. Kontrol grubu 22 adet polisajlı Ti disklerden oluşmaktadır. Her gruptan rastgele 2 örnek seçilerek yapay salya içinde bekletilmiştir. Örneklerin tükürük öncesi ve sonrası yüzey analizleri XPS, AKM ve temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Yüzey pürüzlülükleri ve oluşan film tabakasının kalınlığı AKM cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Temas açısı ölçümleri için OCA 20 temas açısı ölçüm sistemi kullanılarak damlacık profil fotoğrafları çekilmiştir. OCA temas açısı programı ve bilgisayar kullanılarak fotoğrafların incelemesi yapılmıştır. 20 örnekten oluşan her grup 2 alt gruba ayrıldı ve örnekler *S. mutans* ve *S. sanguis* grubu streptokok içeren süspansiyon içerisinde 72 saat inkübe edilmiştir. Yüzeyler üzerinde nicel inceleme koloniforming unit yöntemi ile yüzeye yapışan canlı bakteriler sayılarak yapılmıştır.

Plazma polimerizasyon uygulanan örneklerde, cilalı titanyum yüzeyinden daha düşük yüzey pürüzlülük değeri görülmüştür. Temas açısı ölçümlerine dayanarak cilalı titanyum yüzeyine göre daha hidrofilik bir yüzey meydana geldiği tespit edilmiştir. Yüzey kaplaması uygulanan örneklerde bakteri tutulumundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

S. mutans ve *S. sanguis*in yüzeye bağlanması değerlendirildiğinde, yüzey kaplaması yapılan bazı örneklerde beklenen aksine plak oluşumunda belirgin azalma görülmüştür. Bakteri tutulumundaki bu beklenmeyen azalma, daha çok reaktif titanyum oksit yüzeyinin maskelenmesi ile açıklanmış, yüzey enerjisi ile ilişkilendirilememiştir. Aynı zamanda Ti oksit tabakanın örtülü olması ve stabil, çözünmeyen bir yüzeyin oluşturulması gibi etkenlerin yüzey enerjisi faktöründen daha etkili olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Titanyum, yüzey kaplama, yüzey topografisi, yüzey kimyası, bakteriyel tutulum

ABSTRACT

The aim of this in vitro study was to evaluate the applicability of the plasma polymerization technique with monomer containing thiol functional group on frequently used titanium implant biomaterial surfaces and the effect of the surface modification on microorganism adhesion.

The study was performed using grade 4 commercial type (cp-Ti) pure titanium. A hundred and ten samples in 6 mm diameter and 2 mm height were prepared and each sample surfaces were metallographically polished with a diamond paste. 88 of these samples were modified with the plasma polymerization technique under different conditions. Control group was polished Ti surfaces consisted of 22 samples. In each group 2 samples selected randomly and immersed in artificial saliva. Before and after immersion samples surface analyzed with XPS, AFM, and contact angle measurements. Surface roughness and film thickness were determined by using atomic force microscopy. Contact angle measurements were performed with the sessile drop method using the OCA 20 contact angle system. Thereby, a video camera equipped with an image analyser visualizes the shape of the drop and the contact angle. The corresponding picture is saved in the computer and the contact angle is determined by software. 20 samples of each group divided 2 subgroups and incubated 72 hours with *S. mutans* and *S. sanguis* bacteria. Quantitative analysis of living bacteria adhered surfaces was performed using a colonyforming unit counting(CFU/ml).

The study determined that plasma polymerized sample surfaces were smoother than the uncoated sample surfaces. Also, improvements in the hydrophilic character on modified titanium were determined by the contact angle measurements. The reduction of microorganism adhesion was significant on coated surfaces.

In evaluation of adhesion of *S. mutans* and *S. sanguis*, contrary to expectations significant reduction of biofilm formation was seen on some of the samples. The unexpected reduction of bacterial adhesion was explained by covered reactive Ti oxide surface, not related with surface energy. Also factors like covered Ti oxide surface and formation of stable, insoluble surfaces were reported more effective than surface energy.

Keywords: Titanium, surface coating, surface topography, surface chemistry, bacterial adhesion

1. GİRİŞ

Erken dönem implant başarısızlıklarında cerrahi travma, bakteriyel kontaminasyon, mevcut kemiğin kalitesi, yaş, diabet, menapoz dönemi ve hormon eksiklikleri sorumlu gösterilirken, geç dönem başarısızlıklardan daha çok implant bölgesindeki mikrobiyolojik oluşumlar ve konak cevabı arasındaki denge bozukluğu sorumlu tutulmuştur [1].

Yeni süren bir dişte bakteriler hızlı bir şekilde kolonize olmaktadır ve oral kavitedeki diğer sert dokuların bakteriyel adezyon ve kolonizasyon için ortam oluşturduğu kabul edilmektedir. Ancak implant yüzeyleri ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim hakkında yeterli bilgi mevcut değildir [2]. Yapılan çalışmalara göre bakteriyel adezyon ve kolonizasyonu, mikroorganizmanın tipi, konsantrasyonu, büyüme fazı ve materyalin yüzey özellikleri etkilemektedir [3].

Bakterilerin implant yüzeylerine başlangıç adezyonu ve kolonizasyonu enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır [4, 5]. Erken plak oluşumunda farklı implant materyallerinin bakterilerin seçici geçirgenliğini tetikleyici olabildiği bildirilmiştir. Ağız içine yerleştirilen farklı implant materyalleri ile yapılan bir in vivo çalışmada başlangıç olarak streptokokların kolonize olduğu rapor edilmiş ve plak oluşturan bakteri sayısının implant materyallerinin yüzey özelliklerine bağlı olduğu belirtilmiştir [6]. İntraoral sert dokularda Actinomyces türlerinin ve streptokokların erken dönemde kolonize olduğu, daha sonraki bakteri kolonileri için ortam hazırladığı bilinmektedir [7]. Fusobacterium, Capnocytophaga ve Prevotella türleri periodontal enfeksiyonlarda rol oynamaktadır ve streptokoklara tutunmaktadırlar. Bu yüzden başlangıç olarak tutunan bakteri sayısının azaltılması ve bununla beraber plak oluşumunun azaltılarak yumuşak doku enfeksiyonlarının azaltılması için implant yüzeylerinin geliştirilmesi gerekmektedir[8].

Grössner-Schreiber'in in vivo çalışmalarında TiN , ZrN ve saf Ti kaplama yapılarak, örnekler ağız içinde 60 saat bekletilmiştir. Oluşan biofilmler analiz edildiğinde Streptokokların baskın olduğu, Aktinomiçes türlerine rastlanmadığı görülmüştür. Titanyum materyallerine göre, seramik materyalinde ya da seramik kaplamalarda bakteri tutulumunun daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda titanyum sert kaplamalardaki farklı bakteri sayısına sebep olan fiziko-kimyasal nedenler

tam olarak bilinmese de implant kaplamalarının peri-implant yumuşak doku inflamasyonlarını azalttığı düşünülmektedir [8].

Başlangıç bakteriyel adezyon spesifik ve spesifik olmayan etkileşimlerin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır [9]. Bakterilerin katı yüzeylere tutunması serbest yüzey enerjisi (SYE), hidrofobiklik, yüzey kimyası, yüzey yükü, pürüzlülüğü ve protein varlığı gibi faktörlere bağlıdır. Materyalin serbest yüzey enerjisi ve plak tutma kapasitesi arasında belirgin bir korelasyon bulunmakla beraber, yüksek yüzey enerjisine sahip materyallerin bakteriyel tutunmaya daha elverişli olduğu gösterilmiştir [10]. Düşük SYE'ye sahip materyallerle etkileşen mikroorganizmaların nispeten düşük SYE'ye sahip olduğu gösterilmiştir [11]. Oluşan pelikülün ağız içine açılan dental restoratif materyallerin orijinal yüzey özelliklerini değiştirdiği gösterilmiş ve birçok materyalin SYE'ndeki farklılıkları azalttığı görülmüştür [12]. Quirynen ve Bollen, mikroorganizmaların pelikül kaplı madde üzerine tutulumunun materyalin SYE'den etkilendiğini göstermiştir [13].

İmplant materyallerinin yüzey karakteristiğinin plak oluşumunu in vitro olarak etkilediği gösterilmiştir [14]. Yüzey enerjisi ve yüzey pürüzlülüğü gibi parametreler plak oluşumunda etkilidir. Yüzey pürüzlülüğü serbest yüzey enerjisinden daha önemlidir [6]. Bu yüzden ideal implant yüzeyinin bakteri kolonizasyonuna direnç sağlayabilmesi ve plak birikimini engellemesi için epitelyal tıkamayı oluşturmaya izin verecek kadar pürüzsüz olmalıdır [15].

Oral kavitede implantlar etrafında, biyofilm oluşturan fırsatçı bakteriler kolonize olmaktadır. Biyofilmin sebep olduğu hastalıklar sadece oral kavitede görülmezler [8]. Potera, [16] insanları etkileyen hastalıkların % 65'inde biyofilm içinde yaşayan organizmaların etkili olduğunu söylemektedir. Enfekte olan implantlar sistemik enfeksiyonlar için rezervuar görevi görebilmektedir.

Dental implantlarda bakteri tutulumunu azaltmak amacıyla titanyum yüzeyine uygulanan çeşitli kaplama teknikleri bulunmaktadır [1, 15, 17].

Plazma polimerizasyon tekniği, plazmadaki organik bileşiğin polimerize olduğu ve bir madde üzerine çöktüğü kaplama yöntemidir. Plazma, maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinden oldukça farklı özelliklere sahip olması nedeniyle maddenin dördüncü hali olarak tanımlanır. Plazma polimerizasyon yönteminin en önemli avantajı uniform

ve ince kaplamalar elde edilebilmesidir. Uygun plazma yüzey işlemleriyle; optik yansımaya, adezyon, sürtünme katsayısı, yüzey enerjisi, geçirgenlik, yüzey iletkenliği gibi yeni özellikler elde edilebilir [18].

Dental implantların transmukozal kısımları üzerinde bakteriyel tutulumunu azaltmak amacıyla yüzeyde ince tabaka oluşturulmasını inceleyen literatürdeki çalışmada modifikasyon yöntemi olarak fiziksel buhar biriktirme yöntemi uygulanarak titanyum, TiN ve ZrN sert ve ince tabakaları ile kaplanmıştır. Örneklerin yüzeyinde *S. sanguis* ve *S. mutans* bakterilerinin kolonizasyonu incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında oluşan belirgin farkta, yüzey enerjisi ve yüzey pürüzlülüğünün değil, yüzeydeki titanyum dioksit tabakasının etkisi olduğu, bu tabakanın biyopolimer molekülleri ile iyonik ve hidrojen bağları kuran reaktif bir yüzey olarak davrandığı belirtilerek bakteri kolonizasyonundaki azalma kaplamaların bu reaktif yüzeyi örtmesiyle ilişkilendirilmiştir [15].

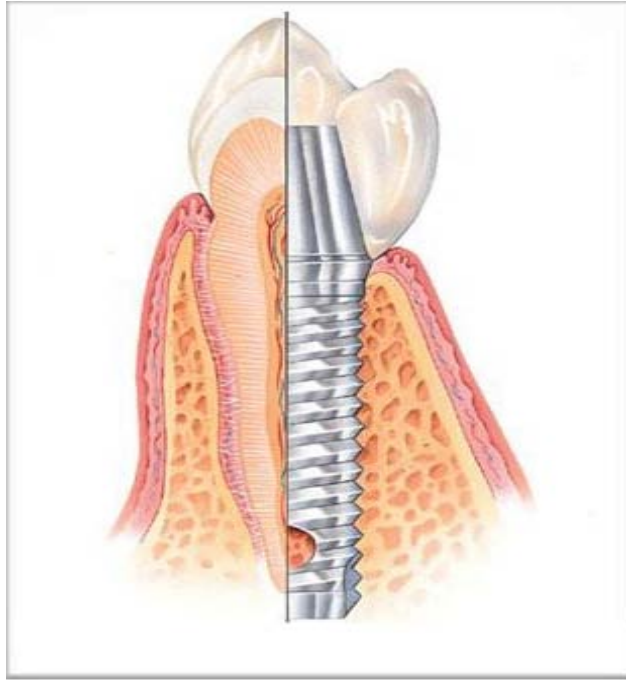
TiO₂ yüzeyinde hidroksil grupları bulunmaktadır. Biyolojik ortamda ve fizyolojik pH değerlerinde bu yüzeyin negatif yüklendiği, bu durumun iyon ve biyomoleküllerin daha kolay bağlanmasına ve plak oluşumuna neden olacağı bildirilmiştir [19]. Yapılan bir tez çalışmasında [20], tiyol içerikli monomer ile yapılan yüzey kaplamasının bakteri kolonizasyonunu azaltan kuvvetli etkisi, Gröner' in çalışmasında belirtildiği gibi TiO₂ reaktif yüzeyin maskelenmesi sonucunda kararlı bir yüzey meydana gelmesi ile açıklanmıştır.

Bu çalışmada amaç tiyol içerikli monomer ile plazma polimerizasyon yöntemi kullanılarak yüzey özellikleri değiştirilen tip 4 titanyumun yüzey kararlılığındaki değişimin gözlenmesi ve biyofilm ve bakteriyel tutulumuna etkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dental İmplantların Tarihçesi ve Gelişimi

Protez terimleri sözlüğüne göre ‘Ağız içi implantları; sabit veya hareketli protezler için mukoza ve/veya periost altına yerleştirilen, kemik içinden veya üzerinden proteze destek ve retansiyon sağlamak için kullanılan protetik alloplastik materyal / materyallerdir’. Bir başka deyişle osteointegre ağız içi implant sistemi çiğneme ve ısırma hareketleri sırasında oluşan kuvvetleri çene içerisinde dağıtacak protezlerle bağlantıyı sağlayan vidalardan oluşmuştur (Şekil 1).



Şekil 1:Osteointegre implant

Diş hekimliğinde implantlara ait ilk bulgu, ilk çağ dönemine ait bir Honduron iskeletinde mandibular keser diş yerine kullanılmış taş implant (Şekil 2) olarak tarihe geçmiştir [21, 22].



Şekil 2: Mandibulada Taş İmplant

Gerçek anlamda diş hekimliğinde ilk implant 18. Yüzyılın başında, altından üretilmiş kök formunda vidalardır. Daha sonraki zamanlarda, gümüş, platin, guta-perka, lastik ve porselen gibi çok çeşitli materyallerden yapılmış implantların varlığı bildirilmiştir. Bu implantlar çekim yapıldıktan sonra alveol soketine doğrudan yerleştirilmişlerdir. Bu yüzyılın sonunda lokal anesteziğin ve türbinlerin kullanılmaya başlanması ile implantoloji farklı bir boyut kazanmış ve ilk olarak implant yuvası hazırlanmıştır. Bu dönem içerisinde çoğu yetersiz ya da başarısızlıkla sonuçlanan birçok deneme yapılmıştır. Bilimsel anlamda implantoloji konusunda ilk adım, ağız içi radyografilerin kullanılmaya başlanmasıyla atılmış ve çene kemiği içine yerleştirilen implantın radyolojik olarak sonuçları gözler önüne serilmiştir [23].

İlerleyen tarihlerde eksik dişin yerine, yapay maddelerden bir diş koyarak proteze destek sağlama fikri geliştirilmiş ve modern implantolojinin temel taşları yerleştirilmiştir. 1937 yılında Müller, 1941 yılında Dahl total protez kullanamayan dişsiz hastalarına subperiostal implantlar uygulamışlardır. Bu metod diğer birçok araştırmacı tarafından kabul görmüş ve modern dünyada yaklaşık 20 yıl kadar kullanılmıştır [23].

Branemark ve arkadaşlarının 1960'larda başlattıkları çalışmalar implantolojinin gerçek temellerini oluşturmaktadır. Branemark yara iyileşmesi ve kemik ile yumuşak dokuların reolojisine odaklanmış ilk mikroskobik çalışmalar osteointegrasyon kavramının gelişmesine yön vermiştir [24]. Titanyum vidaların diş hekimliğindeki restorasyonlar için destek olarak kullanılması ilk olarak köpekler üzerinde yapılan bir çalışmayla tanımlanmıştır.

Mikroskopik seviyede osteointegrasyonu, Brånemark ve arkadaşları ‘Yaşayan sağlıklı kemik ile yük taşıyan implant yüzeyi arasındaki direkt yapısal ve fonksiyonel bağlantı’ olarak tanımlamışlardır[24]. Brånemark’ın özgün ‘od modum’ kavramı dişsiz mandibulada, foraminal bölgeye, dört – altı 3,75mm’lik standart implant yerleştirilmesini öngörür (25).

Ağız içi implantları çok kısa sürede büyük bir gelişme göstermiş ve osteointegrasyon kavramı deneysel kullanımdan rutin klinik kullanıma geçmiştir. Bilim adamları yapay bir materyali hiç bir patolojik semptom oluşturmadan biyolojik bir sistem içine yerleştirme ve fonksiyonel yüklenme durumunda da kemik içinde rijit bağlantıyı sağlama konusunda başarılı olmuşlardır [25].

Son dönemlerde yapılan çalışmalarla implant vücut kısmına yapılan yüzey kaplamalarıyla osseointegrasyonla ilgili problemlerinin çoğu çözülmüştür. Ancak yumuşak doku bariyeri oluşması ve devamlılığının korunması için implantın transmukozal kısımlarının mekanik ve fiziksel özelliklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar halen devam etmektedir [15, 26, 27].

2.2 Dental İmplantın Transmukozal Kısımları

Yumuşak doku bariyerinin devamlılığı için implantın transmukozal parçaları büyük önem taşır.

Transmukozal kısım:

1. Krest modülü
2. Boyun bölgesi
3. İyileşme başlığı parçalarından oluşmaktadır.

Krest modülü, 2 aşamalı sistemlerde implant gövdesinde protetik parçayı tutan kısım olarak tasarlanmıştır ve implant gövdesinden transosteal alana geçiş yapan bölgedir. Dayanak, krest modülünde yer alan platforma oturmaktadır. Rotasyona karşı koyan elemanlar (eksternal hegzagon) bu platformda yer almakta veya implant gövdesine doğru uzanmaktadır (internal hegzagon, morse taper) [22].

İmplant krest modülünün üst kısmı, boyun bölgesi ile devam eder ve stresin ciddi boyutlarda olduğu krest tepesinde biyomekanik destek sağlar. Metal boyun bölgesi, bu kısma kadar kemiğin fonksiyonel olarak yeniden şekillenmesine izin verir.

İki aşamalı sistemlerde osseointegrasyon tamamlandıktan sonra, implantın üzerini açmak ve transmukozal kısma bağlanmasını sağlamak için ikinci aşama cerrahisi yapılır. Bu transmukozal kısma permukozal uzanım denir çünkü bu kısım, implantın yumuşak doku üzerine uzanmasını ve implant çevresinde bir permukozal tıkanmanın oluşumunu sağlar. İkinci aşama cerrahisiyle yerleştirilen iyileşme başlığı, yumuşak dokunun ilk iyileşmesini sağlar. Tek aşamalı sistemlerde iyileşme başlığı implant yerleştirirken takılır ve permukozal tıkanmanın supragingival olabilmesi için servikal boyun kısmı yeterli yükseklikte olan implant tasarımları tercih edilir [22].

Son dönemde piyasaya sürülen kemik seviyesi implantlarla tüm bu transmukozal parçaların protetik alt yapıya taşındığı görülmektedir (Şekil 3). Bu sistemlerde implant vücut kısmı; implant stabilitesini artıracak şekilde tamamen pürüzlü yüzeye sahiptir. Kemik içerisinde kalan kısım ise, mikrobiyal plak retansiyonunu engellemek için hazırlanmıştır. Mukozal ataçmanın oluştuğu cilalı yüzeylerin tamamı protetik parçalar üzerinde bulunmaktadır.



Şekil 3: Kemik seviyesi implantların protetik parçalarındaki transmukozal kısımlar. X: protetik alt yapı parçası üzerinde bulunan transmukozal kısımlar [28]

2.3 Dental İmplantlarda Kullanılan Materyaller

Dental implantların yapımında seramikler, polimerler, metaller gibi çok çeşitli maddeler kullanılmıştır [29].

İmplant uygulamalarında monokristal safir, alüminyum oksit ve Ti6Al4V alaşımların yanı sıra en çok kullanılan materyal saf titanyum olmuştur. Yüze özelliğine göre ele alındığında cilalı saf titanyum, titanyum plazma sprey veya hidroksiapatit kaplı implantlar karşımıza çıkmaktadır.

Al₂O₃, paslanmaz çelik vb. birçok materyal ile başlangıçta osseointegrasyonu elde etmek mümkündür [30]. Önemli olan yüklenecek bu materyallerin fiziko-kimyasal yapısal özelliklerini devam ettirmeleridir. Örneğin paslanmaz çelik vücut sıvıları ile temas halinde olması durumunda korozivdir. Albrectsson ve arkadaşları, ticari saf titanyumun (Cp Ti) bir kaç yüz angström kalınlığında proteoglikan bir tabaka ile çevrili olduğunu göstermiştir. Titanyum oksit yüzeyi implant için koruyucu bir tabakadır. Tantalum, niyobyum gibi metallerin de vücutta titanyum gibi kabul gördükleri bilinmektedir ancak bu alanda uzun döneme ait bilimsel verileri olan ve en iyi dökümente edilmiş metal, titanyumdur [31].

2.3.1 Titanyum

Dental implantların üretiminde genellikle ticari saf titanyum (Ti) ve Ti6Al4V alaşımı kullanılır. Oksijen içerikleri farklılık gösteren dört tip saf titanyum bulunur [32]. (Tablo 1). En fazla oksijen içereni %0,4 ile CpTi tip 4 tür. İçerikte bulunan nitrojen, karbon, hidrojen ve demir oranları titanyum tipleri arası büyük farklar göstermez. Minör elementlerin oranlarındaki ufak değişiklikler alaşımların mekanik ve korozyon özelliklerini belirgin biçimde değiştirebilir [33].

| | N | C | H | Fe | O | Al | V | Ti |
|------------|------|------|-------|------|------|---------|---------|-------|
| CpTi, Tip1 | 0.03 | 0.1 | 0.015 | 0.02 | 0.18 | - | - | Denge |
| CpTi, Tip2 | 0.03 | 0.1 | 0.015 | 0.03 | 0.25 | - | - | Denge |
| CpTi, Tip3 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.03 | 0.35 | - | - | Denge |
| CpTi, Tip4 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.05 | 0.40 | - | - | Denge |
| Ti6Al4V | 0.05 | 0.08 | 0.012 | 0.25 | 0.13 | 5.5-6.5 | 3.5-4.5 | Denge |

Tablo 1: CpTi ve Ti alaşımlarının % ağırlık bileşenleri

Titanyum 4.54 gr/cm^3 yoğunluğa sahip nispeten hafif bir metaldir. Bu yoğunluk alüminyum (2.71 gr/cm^3) ve demirin (7.87 gr/cm^3) arasında ortadadır. Titanyum demirden (1536°C) daha yüksek ergime sıcaklığına (1668°C) ve demir ve alüminyum değerleri arasında ortada bir elastisite modülüne (16.8×10^{10} inç) sahiptir.

2.4 Titanyumun Yüzey işlemleri

İmplant çevresindeki yumuşak dokunun sağlığı ve kalitesi birçok faktörden etkilenir. Birçok implant sisteminde, implant ve protez birleşim yerindeki küçük mikroboşluklar yumuşak doku sağlığını bozabilir. İmplantın transmukozal birleşiminde kullanılan materyalin kemik ve yumuşak doku reaksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir [34].

Transmukozal kısmın implantın başarısında etkili olabilmesi için yeterli epitelyal ve bağ doku ataçmanını sağlaması ve bakteriyel adezyonu azaltması gerekir. Bu yüzden implantın bu bölgesinin yüzey karakteri ve kimyasal kompozisyonu çok önemlidir. Özellikle, birçok çalışma yüzey pürüzlülüğü ve bakteriyel adezyon arasında pozitif bir ilişki olduğunu ve yüzey pürüzlülüğünün yumuşak doku bariyerinin devamlılığını oldukça etkilediğini göstermiştir. İmplantların biyouyumluluğu ve osteojenik kapasitesini artırmak için gerekliliği kanıtlanmış yüzey modifikasyonlarının, implant çevresi yumuşak doku cevabını kontrol etmede rolü olup olmadığını görmek için araştırmalar yapılmaktadır [35].

Yoshinari et al, iyon implantasyonu, oksidasyon ve iyon kaplama gibi kuru işlemlerle yapılmış yüzey modifikasyonlarının antibakteriyel aktivitede belirgin bir iyileşme meydana getirdiğini bildirmiştir [36].

Yüzey pürüzlülüğü dışında, Ti yüzeylerin antibakteriyel etkinliğinin olmaması bakteriyel büyüme için uygun ortam oluşturur. Bu da yüzey modifikasyonlarına ihtiyaç duyulmasının diğer bir nedenidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, TiN ve ZrN gibi sert yüzey kaplamalarıyla transmukozal kısım yüzeylerinin fiziksel özellikleri ve antibakteriyel etkinliklerinin geliştirilmeye çalışıldığı gösterilmiştir[36].

Çökeliler' in in vitro çalışmasında[37], titanyum üzerinde ilk defa denenen, –OH ve –SH grupları içeren tiyol içerikli monomerin tip 2 saf titanyum üzerinde başarıyla polimerleştirilebildiği ve kararlı bir yüzey oluşturduğu görülmüştür.

Tiyol bileşiklerinin oda sıcaklığında katı olması nedeniyle bu sistemlerden ancak “yüksek akım yük boşalım sistem”inde tiyol plazma ortamının oluşturulması başarılmış ve tüm kimyasallar ile modifikasyon çalışmaları bu sistemde gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal yapı olarak 11 karbonlu zincirin uç grupları olarak -COOH ve -SH gruplarına sahiptir [38]. Literatürdeki çalışmalarda, MUA altına olan ilgisi dolayısıyla kendiliğinden altın yüzeye bağlanma özelliğinden yararlanmak üzere seçilen bir tiyol bileşiğidir. Bu çalışmada ise farklı bir yaklaşım olarak tiyol plazması ile titanyum yüzey modifikasyonu hedeflenmiştir. Titanyum yüzeylerde ince ve kararlı yapılar elde etmek amacıyla plazma polimerizasyonu kullanılmıştır.

Altın üzerinde yapılan -COOH uçlu SAM çalışmalarında, alkil zincir uzunluğunun konformasyonda farklılığa yol açtığı, uzun zincirli MUA'nın kısa zincirli 6-merkaptotiazol-2-iltizotiyonik asit'e göre daha düzenli tekli katmanlar oluşturduğu bildirilmiş olması nedeniyle MUA tercih edilmiştir [38].

2.4.1 Plazma Polimerizasyon Yöntemi

Plazma maddenin dördüncü hali olarak tanımlanır. Plazma modifikasyonu ile bozulma, aşınma, oksidasyon ve çapraz bağlanma gibi yüzeyin çok ince bir tabakasında oluşan yapısal değişimler sonucunda modifiye edilmemiş yüzeylerden tamamen farklı özelliklere sahip yeni yüzeyler elde edilmektedir. [39].

2.4.2 Plazmanın yapısı

Plazma yüksek sıcaklıklarda kuvvetli elektrik veya manyetik alanların etkisi ile oluşur. Güçlü bir elektriksel boşalım da plazma oluşturabilir. Plazma ortamında enerji kazanan serbest elektronlar, ortamdaki diğer atomlar ve moleküllere çarparak enerjilerini transfer ederler. Bunların da birbirleriyle reaksiyona girmeleri sonucu ortamda çok değişik tür ve sayıda yeni moleküller, atomlar, radikaller, iyonlar oluşur [40, 41]. Sıcak plazmada ortamda esas olarak çok sayıda iyon vardır. Soğuk plazmada ise diğer elemanlardan da önemli bir miktarda bulunur. Plazma gaz sıcaklığına bağlı olarak yüksek sıcaklık plazması ve düşük sıcaklık plazması olarak 2'ye ayrılır.

Yüksek sıcaklık plazmasında gaz sıcaklığı 10^6K 'den fazladır. Güneş sisteminde meydana gelen patlamalar yüksek sıcaklık plazmasına örnek verilebilir.

Düşük sıcaklık plazmasında gaz sıcaklığı 10^6 K'den daha düşüktür. (i) Sıcak plazma; gaz sıcaklığı 1000 K'den daha fazla olup 10^4 K civarındadır. Lamba ışması, elektrik arkı sıcak plazmaya örnek verilebilir. (ii) Soğuk plazma; gaz sıcaklığı 1000 K'den daha düşüktür. Normal şartlarda 300-400 K civarındadır. Elektron sıcaklığı 104-105 K (1-10 eV) ulaşırken, iyon sıcaklığı ise oda sıcaklığına yakındır. Bu nedenle bu plazmalara soğuk plazma denmektedir Düşük basınçta gerçekleşen yük boşalım plazmaları soğuk plazmaya örnektir [40, 42]. ($K \approx eV \times 11,604.5$)

Plazma polimerizasyonunda, özellikleri değiştirilecek materyal yüzeyinde oluşan polimerin kimyasal yapısı, birikim miktarı (kalınlığı) ve bunların homojenitesini etkileyen birçok parametre vardır. Ayrıca plazma polimerizasyonu tekniğinde kullanılan monomerlerin kolaylıkla polimerize olabilen çift bağlar gibi reaktif fonksiyonel gruplara sahip olmaları gerekir.[43].

2.4.3 Plazma polimerizasyonuna etki eden faktörler

Reaktör geometrisi yüzeye biriken polimerin kimyasal yapısını ve kalınlığını ve dolayısıyla kaplamanın homojenitesini etkileyen önemli hususlardan biridir. Reaktörün tübüler, dikdörtgen kesitli veya diğer şekilli olması monomerin reaktör içinden akış dinamiğini etkiler.

Monomer akış hızının hem birikim miktarını hem de dolaylı olarak biriken polimer kimyasını değiştirdiği bildirilmiştir. Monomerin akış hızının artmasıyla genellikle birikim doğrusal olarak azalır. Düşük monomer besleme hızlarında, konvektif akım terimlerinin etkisinin azalmasıyla difüzyonun baskın olacağı durumda reaktöre beslenen tüm monomerin polimerize olarak yüzeyde birikmesi mümkün olabilmektedir.

Genellikle boşalım gücü arttıkça polimer birikim miktarı artar. Elektriksel boşalım reaktör içinde tamamen gerçekleştikten sonra ilave edilen voltajın serbest radikallerin üretimini arttırmadığı, böyle durumlarda monomerin akış miktarının polimer birikimini belirleyen parametre olarak önem kazandığı not edilmelidir.

Plazma polimerizasyonunda yatışkan duruma ulaşıldıktan sonra sürenin artmasıyla yalnızca kaplama kalınlığının arttığı, polimerizasyon hızı ve yüzeyde biriken yığın yapısında önemli bir değişiklik olmadığı söylenebilir.

Gerek organik gerekse organo-metalik bileşiklerin plazma ile polimerleşme mekanizmaları ve polimerleşme kriterleri oldukça karışıktır. Plazma

polimerizasyonunda polimer bir seri karmaşık reaksiyonlar sonucunda oluşmaktadır. Bu nedenle gerek polimer oluşturma hızı gerekse oluşan polimerin çeşitli özellikleri, elektriksel boşalma ile ilgili çeşitli koşullara bağlıdır. Bu durumda deney değişkenleri arasında;

1) uygulanan elektriksel boşalma ile ilgili boşalmanın gücü, frekansı, monomer basıncı, monomer akış hızı gibi değişkenler

2) elektriksel boşalmanın uygulandığı reaksiyon kabı (reaktör) ile ilgili değişkenler

3) polimerin üzerine kapladığı ortamın yeri, şekil yapısı gibi bazı unsurlar rol oynamaktadır [44].

2.5 Yüzey Karakterizasyon Yöntemleri

Plazma ile yüzey modifikasyonu yapılan malzemelerin uygulamalı olarak denenmesi yanında plazma sonrası yüzey özelliklerinin analiz edilmesi de gerekmektedir.

2.5.1 Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AKM)

AKM taramalı prob mikroskopisi grubunda yer alan en bilinen yüzey inceleme tekniğidir. Sistem temel olarak birkaç atomdan oluşan bir iğnenin piezo elektrik kontrol elemanları aracılığıyla yüzeye çok yakın olarak incelenecek yüzey üzerinde 3 boyutlu hareket ettirilmesine dayanır. İğnenin ucundaki bozulmalar bir lazer ışığı tarafından algılanarak büyütülür AKM yardımıyla yüzey topografisi nanometre seviyesinde belirlenmiş olur [45] .

İmplant araştırmalarında genellikle yüksekliği tanımlayan parametreler kullanılmaktadır. R_a en çok kullanılan yüzey pürüzlülük parametresidir. R_a , ortalama yüzey pürüzlülüğü veya incelenen kısmın yüzeyine uyan bir düzleme olan tüm noktaların ortalama sapmasıdır.[46].

2.5.2 Kimyasal analiz için elektron spektroskopisi (XPS veya ESCA)

Atom ya da moleküllerin X-ışını bombardımanı sırasında atomdan ya da molekülden fırlatılan elektronun kinetik enerjisinin ölçülmesi esasına dayanır. XPS genellikle katı örneklerin yüzey analizlerinde kullanılır. Yüzey özellikleri ile içyapısı aynı olan maddeler için maddenin nitel analizi yapılabilir. Ancak maddenin yüzeyinin

ve iç yapısının farklı olduğu durumda yüzey argon iyonlarıyla bombardıman edilerek aşındırılır ve iç kesimleri açığa çıkarılarak analizi yapılır. [47, 48].

2.5.3 Temas Açısı Ölçümü ve Yüzey Enerjilerinin Saptanması

Temas açısı ölçümü yüzey yükü, yüzey hidrofilitesi veya hidrofobitesi ve yüzey enerjisi hakkında fikir veren bir yöntemdir. Temas açısı, bir katı malzeme yatay eksenine ile bu malzemenin temas halinde olduğu sıvı veya buhar ara yüzünün üst kısmı arasında kalan açıdır. Temas açısı iç açı ve dış açı olarak ölçülebilmektedir.

Temas açısı, yüzey üzerine su damlatma işlemi gerçekleştirildikten sonra meydana gelen açının profil fotoğrafı çekilip, bu fotoğrafın bilgisayar analizi yapılarak ölçülür. Temas açısı ölçümü için gerekli profil fotoğrafında temas eksenine ve açılarının hesaplanacağı kesimlerin net olması önemlidir [49].

Malzeme yüzeyi ile üzerine damlatılan saf su damlası arasındaki temas açısı yüzeyin hidrofilik/hidrofobik özelliği hakkında bilgi verir. Bir sıvının katı yüzey üzerinde yayılmasına ve yüzeyi belli oranda kaplamasına ıslatma, katı yüzeyin herhangi bir sıvı tarafından belli oranda kaplanmasına ıslanma, bu olayın gerçekleşme derecesine ise ıslatabilirlik veya ıslanabilirlik denir. Su temasına yatkınlığı olan ve su ile yaptığı temas açısı 90°'den küçük olan materyallere hidrofilik, su temasına yatkınlığı olmayan ve su ile yaptığı temas açısı 90°'den büyük olan materyallere ise hidrofobik materyal denir [49].

2.5.4 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Yüzey topografisi; morfolojisi ve ayrıca bu yüzeylere ekilen hücrelerin morfolojilerini nicel olarak değerlendiren bir diğer yöntemdir. Elektronların nesneden geçmediği bir elektron mikroskobu çeşididir. Bu mikroskopta yüksek gerilimle hızlandırılan elektronlar ince demetler halinde toplanarak nesne yüzeyine çarpmaktadır. Nesne üzerindeki bir noktanın ayırdığı primer ve sekonder kırılmış elektronlar dedektör yardımıyla toplanmaktadır. Değişik noktalardan gelen bu sapmalar katot tüpünün ekranı üzerinde görüntüyü oluşturmaktadır [50].

2.6 Biyofilm

Donlan[51], biyofilmi irreversibl olarak bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuş, kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülü, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest

dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar bulunan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamıştır.

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm oluşumunda hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir [51]

Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar, buldukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlarda biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen rezistans ve irreversibl yapışma gibi özellikler bulunmamaktadır. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakterilerin de zamanla matriksten koparak ayrıldıkları, dolaşıma geçtikleri ve planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm rezistans karakterlerini taşıdığı bildirilmiştir [52].

□İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilmektedir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler oluşturduğu ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir [53].

2.6.1 Biyofilm oluşum evreleri

Biyofilm oluşumu beş evrede gerçekleşmektedir

1. Tutunma

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir olaydır. Tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için, kendilerinin bu yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları gereklidir. Bakteriler bu çevresel uyarıları fenotipik değişikliklere çevirebilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, “quorum sensing” sistemi denilen başka bir haberleşme sisteminden gelen yanıtla bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri,

ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Yüzeğe tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar.

2. Yapışma

Bakterilerin yüzeğe yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir.

3. Toplanma

Bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler.

4. Olgun Biyofilm

Mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler.

5. Kopma veya Ayrılma Evresi

Bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucudur[54].

2.6.2 Dental İmplantlarda Biyofilm oluşumu

Dental implantlardaki mikrobiyal kolonizasyon ve biyofilm oluşumu dişlerdeğine çok benzerdir. Dental implantlar üzerinde kolonize olan türler sağlıklı dişeti ve gingivitis alanlarında bulunan kolonilerle aynı türlerdir. Yapılan çalışmalara göre implantın yüzey özellikleri erken bakteriyel adezyonu etkilerken bakteriyel flora veya plak maturasyonunu etkilememektedir [55].

Osseointegrasyonu tamamlanan bir implantın transmukozal dayanak kısmı ağız kavitesine açıldıktan sonra α -amilaz ve serum albumin gibi makromoleküllerin selektif emilimi aracılığıyla implant yüzeyinde edinsel bir pelikül oluşmaktadır [56]. Bu pelikül tükürük elemanları dışında bakteriyel ve konakçının dokularını da içermekte ve implantın oral kaviteye açılmasıyla birlikte 30 dk. içinde bakteriyel kolonizasyon için bir substrat görevi görmektedir [57]. Bazı yazarlara göre doğal dişlere kıyasla dental

implantlardaki edinsel pelikülün albumin adsorpsiyonunun daha düşük olması sebebiyle dental implantlarda plak oluşumu daha azdır [58].

Biofilm mikroorganizmaların metabolik olarak birbirini etkilediği organize bir yapıdır. Edinsel pelikül oluşuktan sonra hücreden-hücreye adezyon ile başlangıç kolonileri ve sonrasında sekonder kolonilerle implant yüzeyinde bakteriyel tutulum oluşmaktadır. Biyofilmler birçok bakterinin, büyümeleri için tercih ettikleri bir metoddur. Çünkü besin alışverişi ve bakteriyel topluluğun rekabetçi mikroorganizmalardan korunması için kolaylık sağlar [58].

2.6.3 Dental İmplantların Yüzey Özellikleri ve Bakteriyel Tutulum Etkisi

İmplantların yüzey özellikleri, pürüzlülüğü ve serbest yüzey enerjisi (SYE) biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Çünkü implantlar bakterilerin hızlı bir şekilde tutunması ve gelişmeleri için temel oluşturmaktadır [59].

S. sanguis, *A. viscosus* ve *P. gingivalis*'in Ti yüzeylerde bakteriyel tutulumu SEM altında incelendiğinde, pürüzlü yüzeylerde daha fazla bakteriyel tutulum gözlenirken düz yüzeylerde daha az bakteriyel tutulum rastlanmıştır [14].

Modifiye Ti yüzeylerin ıslanabilirlik, pürüzlülük ve sterilizasyonunun primer bakteriyel kolonizasyona etkisine bakıldığında, pürüzlü ya da hidrofobik olan yüzeylerde kolonizasyonun fazla olduğu görülmüştür. Kuru sterilizasyonun yüzeyde düzensizliklere sebep olması nedeniyle yüzeyin hidrofobik hale geldiği ve böylece bakteri tutulumunu arttırdığı sonucuna varılmıştır [2].

Ti implant yüzeyleri termal oksidasyon ve lazer radyasyonu kullanılarak TiN ve ZrN ile modifiye edildikten sonra yüzeydeki bakteriyel tutulumu inceleyen in vitro çalışmada, saf Ti yüzeylere kıyasla modifiye yüzeylerdeki bakteri tutulumunun daha az olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada kaplanmış ve kaplanmamış Ti yüzeyler kıyaslandığında kaplama yapılan yüzeyde bakteriyel tutulumun azaldığı doğrulanmıştır. Sonuçta TiN ve ZrN gibi sert kaplamaların başlangıçta tutunan bakteri sayısını azalttığı anlaşılmıştır [55].

Biyofilm oluşumu sadece yüzey pürüzlülüğü ve karakteristiğinden etkilenmemektedir. Ayrıca implant materyalinin yüzey kimyası ve SYE'si de bakteriyel adezyonda büyük rol oynamaktadır. Serbest yüzey enerjisinin supragingival ve subgingival plak mikrobiyolojisine etkisini inceleyen bir in vivo çalışmada titanyum

dayanak ve floretoilen-propilen (FEP) kaplama yapılan dayanaklar üzerinde tutunan bakteriler sayılmış, titanyum dayanak üzerinde tutunan koloni miktarı, FEP kaplama yapılan dayanak üzerinde tutunan koloni miktarından 5 kat fazla bulunmuştur. Bu çalışmaya göre implant ve dayanak materyalinin SYE'si bakteri tipi ve kolonizasyon hızını etkilemektedir. Substratın SYE'sinin yanında tutunan bakterinin fiziko-kimyasal yüzey özellikleri de dayanak ve implant yüzeylerinde mikrobiyal kolonizasyon ve biyofilm maturasyonunu etkileyebilir [55, 60].

Bir in vitro çalışmada 8 farklı tükürük kaplı protetik ve implant materyali ve mine yüzeyi üzerinde substratın SYE'sinin ve bakteriyel yüzey karakteristiği gibi substratın polar ve nonpolar elemanlarının etkisi incelenmiştir. Sonuçlara göre en düşük kolonizasyonun mine örnekleri üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Farklı substratlar üzerinde tutunan en düşük bakteri sayısının hidrofilik bakteri türlerinde olduğu görülmüştür. Tutunan bakteri sayısı, bakterinin yüzey özellikleri ve substrat arasındaki ilişkinin analizine göre bakteriyel tutunma, substratın SYE'sinin nonpolar komponenti ve çözücünün adezyonu arasında korelasyon olduğu görülmüştür. Substratın niteliğiyle beraber bakteriyel türlerin niteliği, bakteriyel adezyon miktarını etkileyebilmektedir. Böylece implant materyalinin SYE'si ve kolonize olan bakterilerin asidik-bazık yüzey özelliklerinin implant yüzeyinde biyofilm oluşumunu etkilediği anlaşılmıştır. [55]. Tükürük proteinlerinin varlığında implant materyaline tutunan bakteri türlerinin fiziko-kimyasal yüzey özelliklerinin bakteriyel tutulumdaki rolünü değerlendiren Mabboux et al da [61] bu bulguları doğrulamaktadır. Aynı yüzey pürüzlülüğüne sahip tükürük kaplı 2 farklı implant materyalinde (grade 2 saf Ti ve Ti alaşım) 2 farklı bakteri türünün (hidrofilik ve hidrofobik) adezyonu incelenmiş ve bakterinin yüzey özelliklerinin yanı sıra materyalin SYE'sinin de bakteriyel adezyonu ve implant materyaline retansiyonu etkilediği görülmüştür [61].

2.6.4 Bakteriyel adezyonu ve biyofilm oluşumunu azaltmak için titanyum yüzey modifikasyonları

Özellikle titanyum, nikel, demir, vanadium gibi saf metaller bakteriostatik etkiye sahip olmaları nedeniyle bakteri büyümesini inhibe etme özelliğine sahiptirler. 7 metalin antibakteriyel özelliklerinin incelendiği bir çalışmada antibakteriyel etkinliğin sıralaması altın>titanyum>kobalt>vanadyum>alüminyum>krom>demir olarak belirtilmiştir [62]. Başka çalışmalarda da titanyumun belirgin olarak bakteriostatik

etkisinin olmadığı belirtilmiştir [63, 64]. Co-Cr splintlere yerleştirilen titanyum, hidroksiapatit ve amalgam parçalarıyla yapılan in vivo çalışmada bakteriyel kolonizasyonun kalitatif ve kantitatif farklılıkları değerlendirilmiş ve titanyumun erken kolonizasyonda in vivo olarak belirgin bir fark yaratmadığı sonucuna varılmıştır [63].

Çinko oksit ve titanyum oksit örneklerin stafilokoklar ve osteoblastlar için adeziv ve antimikrobiyal özellikleri karşılaştırılmıştır. Çinko oksitin seçilmesinin sebebi malzemenin antimikrobiyal özellikte olmasıdır. Titanyum oksitin seçilmesinin sebebi ise titanyum implantlarda in vivo olarak oluşan bir tabaka olmasıdır. Sonuç olarak nano seviyedeki çinko oksit ve titanyum oksitin stafilokokal hücrelerin adezyonunu azalttığı ve osteoblast adezyonunu arttırdığı görülmüştür. Titanyum implantlar üzerinde nano seviyede çinko oksit gibi kaplamalar biyofilm oluşumunun azaltılmasında önemli rol oynamaktadır. Fotokatalitik bakterisidal nano seviye titanyum oksit tabaka ultraviyole radyasyon ile aydınlatıldığında OH, HO₂ ve H₂O₂ gibi antibakteriyel aktif-oksijen türleri salındığı görülmüştür[65, 66]. Titanyum dental implantlar üzerinde titanyum oksit gibi nano kaplamaların erken bakteriyel kolonizasyonu azaltabileceği düşünülmüştür [55].

2.7 Streptococcus mutans

S. mutans 1924'te Clarke tarafından çürük lezyonlarından izole edilmiştir [67]. Bu streptokok grubu karakteristik olarak, hareketsiz, katalaz negatif, kısa ve orta uzunlukta zincirler oluşturan gram pozitif koklar şeklinde tanımlanmıştır. Mitis Salivarius Agar (MSA) üzerinde konveks koloniler oluşturmaktadır. Bu koloniler opak olup, yüzeyleri buzlu camı andırır. Ancak kültür ortamına bağlı olarak koloni morfolojileri çok değişkenlik göstermektedir. S. mutans pH 5 de metabolik açıdan aktive olur. Bu pH pek çok bakterinin yaşayamayacağı kadar asidik bir pH'dır [68]. S. mutans yüksek yüzey enerjisine sahip (hidrofilik) bir bakteridir [69].

S. mutansın hücre yapısı ve metabolizmasına bakıldığında hücre duvarı kalın olup metilen mavisiyle boyanabilir ve peptoglikan ve teikoik asit içerir. Polisakkarit yapıda kapsülü vardır. S. mutans diş yüzeylerine yapışarak biyofilm oluşturabilir [70]. Diş yüzeyindeki pelikula hücre yüzeyindeki proteinleri sayesinde yapışır. Mine yüzeyine dekstan kapsülü sayesinde tutunur ve 300-500 kadar hücre içeren biyofilm oluşturur. Bakteriyel büyüme için gerekli olan enerjiyi früktozu fermante ederek sağlar.

Oluşturduğu biyofilm içinde laktik asit üreterek mine yüzeyini dekalsifiye eder ve çürük oluşumuna neden olur [71].

2.8 Streptococcus sanguis

White ve Niven tarafından endokarditli hastaların kanından izole edilen α -hemolitik streptokoklardır. *S. sanguis* gerçek yaşam alanı oral flora olup özellikle dental plaktır [72]. *S. sanguis* yüzey özellikleri açısından değerlendirildiğinde hidrofobik bir bakteridir[61].

S. sanguis'in hücre yapısı ve metabolizmasına bakıldığında Gram (+) olup peptoglikan yapıda hücre duvarına sahiptir ve teikoik asit içerir. Bu bakteri biyosentez, glikogenezis ve şekerin ve karbonhidratların fermantasyonu için birçok enzime sahiptir. Bu enzimler glikogeneziste kullanılarak, bakterinin amino asitleri früktoz-6-fosfat'a dönüştürmesini sağlar ve bakteri tarafından hücre duvarındaki peptoglikan yapıyı oluşturulur [73].

S. sanguis direkt olarak diş yüzeyine bağlanarak diğer bakterilerin kolonize olmasını sağlar. Böylece dental plak oluşur ve periodontal problemler ve çürük oluşumuna katkıda bulunur [73]. *S. sanguis* kan dolaşımına katılarak kalp kapakçığında hasar meydana getirir ve enfektif endokardite sebep olur [74].

Hücre yoğunluğu, besin varlığı ve ph gibi çevresel faktörler *S. mutans* ve *S. sanguis* arasındaki etkileşimi etkiler. *S. sanguis* tarafından üretilen hidrojen peroksit arttığında *S. mutans* üremesi azalır. Besinden zengin bir ortamda hidrojen peroksit üretimi *S. sanguis* tarafından durdurulur ve hücre büyümesi için gerekli olan enerji üretimi başlatılır. Eğer ortamda yeterince besin yoksa veya ortamın ph'ı düşmüş ise hidrojen peroksit üretimi başlatılır ve *S. mutans*'a karşı yaşam mücadelesi devam ettirilir. Böyle bir ortam *S. sanguis* ve *S. mutans*'ın birbirleriyle yaşamasını kontrol altında tutmaktadır [75].

2.9 Peri-implant mukositis ve periimplantitis mikrobiyolojisi

Çürükler ve periodontal hastalıklar gibi periimplant mukositis ve periimplantitis de plak kaynaklı hastalıklardır [76]. Dokularla uygunluğu nedeniyle implant materyali olarak kullanılan Ti, bakteriyel adezyon için uygun ortam oluşturabilmektedir [77]. Bugüne kadar Ti yüzeylere yapışan bakterilerin oluşturduğu

dental plağı ışık ve elektron mikroskoplarıyla ve bakteri kültürleriyle inceleyen birçok in vivo ve in vitro çalışma mevcuttur [10, 61, 63, 64, 66, 78].

Dental plak, oral kavitede sert dokular üzerine biriken, 500 üzerinde bakteri türü içeren karmaşık mikrobiyal biyofilm tabakasıdır. 1950'lerin sonlarına kadar plak oluşumunun tek bir şekilde olduğu kabul edilirken, daha sonra yapılan birçok çalışma dental plağın uniform bir yapı olmadığını, dıştan dişe, bölgeden bölgeye değiştiğini göstermiştir [79]. Ancak türler lokal çevresel faktörlere göre değişse de, kolonizasyon paterninin her zaman aynı olduğu görülmüştür [80]. Bakteriler biyofilm tabakası içerisinde farklı özellikler gösterebilirler. Genellikle ağız içerisindeki patojenlerin etkili olabilmesi için fiziksel, metabolik veya fizyolojik etkileşimlerle meydana gelen değişiklikler olması gerekir. Türler arasındaki fiziksel, metabolik ve fizyolojik etkileşimler sırasında bazı organizmaların metabolik ürünleri diğer bazı bakterilerin daha fazla büyümesini sağlarken, bazılarının yaşamasını engeller. Bakteriyel kolonizasyon ve büyüme sıklıkla tek yönlüdür ve bazı bakteriler kolonize olabilmek için diğer mikroorganizmaların hazırladığı ortama ihtiyaç duyarlar [76]. Periodontal araştırmalar, büyük kısmını gram negatif anaerobik bakterilerin oluşturduğu olgunlaşmış mikrobiyal plağın, ilk koloniler olan fakültatif bakterilerin oluşturduğu çevresel faktörlere bağlı olduğunu göstermiştir[77].

VanLoosdrecht et al [81], dental plak oluşumunda mikrobiyal adezyonun 2 aşamada meydana geldiğini göstermiştir. Burada ilk aşama olan, mikroorganizmaların yüzeye yapıştığı geri dönüşümlü emilimi; mikroorganizmaların yüzeye sıkıca yapışmasını sağlayan geri dönüşümsüz emilim izler. Daha sonra aynı yazarlar 1990 yılında yayınladıkları derlemede nemli ortamda mikrobiyal adezyonun 4 aşamalı olduğunu belirtmişlerdir. İlk aşamada bakteriler diş yüzeyine taşınırken, ikinci aşamada ilk geri dönüşümlü adezyon meydana gelir. İkinci aşama yüzeylerin mikroskobik, fizikokimyasal özelliklerine ve yapışan mikroorganizmalara bağlıdır. Geri dönüşümlü adezyon kuvvetlerinin üstesinden gelinirse bu mikrobiyal yüzeyler sıkı ataçmanın oluşmasında belirleyici hale gelir ve bu da üçüncü aşamayı oluşturur. Bu sıkı ataçmanı dördüncü aşama olan dental plağın en üst seviyesi olan yüzey kolonizasyonu ve biyofilm oluşumu takip eder. Diş yüzeyine mikrobiyal adezyon, plak oluşumunun başlangıcında genel bir önceliktir. Ancak dental plağın büyümesinde dominant rolü mikrobiyal çoğalma oluşturur.

Oral streptokoklar hareketsiz yapılara yapışabilen bir grup mikroorganizmadır [69, 82, 83]. Zincir veya çiftler halinde düzenlenmiş, katalaz negatif özellik gösteren küresel pozitif koklardır. Plak olgunlaştıkça kokal kompozisyondan filamentoz kompozisyona geçiş gösterirler [84]. Kimyasal yüzey kompozisyonu hücre yüzeyi hidrofilliği ve yükleriyle açıklanabilir [85-88]. Fizikokimyasal etkileşim kuvvetleriyle kontrol edilen streptokokların bu ilk adezyonu, olgun biyofilm gelişiminde yalnızca bir basamaktır [81]. İlk kolonilerin adezyonu ve olgunlaştırıcı film komponentlerinin adsorbsiyonundan sonraki birçok devam eden olayla son mikrobiyal kompozisyon ve olgunlaşmış biyofilm yapısı oluşur [4, 89, 90]. Bu olaylar; türler arası bağlanma, biosüfaktan salınımı, organizmalar arasında metabolik avantajların oluşması gibi olayları içerir [89, 91]. Daha sonraki aşamalar daha geniş zamanda meydana geldiği için biyofilm oluşumundaki ilk bakterilerin adezyonunun önemi sıklıkla göz ardı edilir [92]. Oysa streptokoklar aktinomiçeslerin optimal büyümesi için anaerobik mikro ortamı oluşturur [93]. Bakteriler arasındaki bu bağlanma genellikle elektostatik ve asit-baz dengesine bağlı olarak meydana gelir [94]. Ritz et al. [95], çalışmalarında plak oluşumunda dominant öncü türlerin streptokoklar olduğunu sonrasında bunlara aktinomiçeslerin eklendiğini ve plağın yüksek miktarlardaki Gram negatif anaerob filamentoz organizmaların da adezyonuyla daha olgun bir yapı haline dönüştüğünü göstermiştir. In vivo çalışmalarda *S.sanguis*in biyofilm oluşumunda gerçek öncü organizma, *S. mutans*ın ise dental çürüklerin major etyolojik ajanı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çalışmalar sonucunda *S.sanguis*'in *S.mutans*'a göre daha iyi yapıştığı görülmüştür [96].

Literatürde plazma polimerizasyon yöntemiyle yüzey özellikleri değiştirilen Ti yüzeylerde *S. Sanguis* ve *S. Mutans* adezyonunun ve bakteri yüzey enerjisinin adezyona etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada amaç tiyol içerikli monomer ile plazma polimerizasyon yöntemi kullanılarak yüzey özellikleri değiştirilen tip 4 titanyumun yüzey kararlılığındaki değişimin gözlenmesi ve biyofilm ve bakteriyel tutulumuna etkisinin araştırılmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma iki bölümden oluşmaktadır. Birinci bölüm plazma polimerizasyonu ile yüzey modifikasyonu işlemini ve yüzeyde oluşan kaplamanın karakterizasyonunu içermektedir. Çalışmanın ikinci bölümünde kaplama yapılan örneklerin mikrobiyolojik incelemeleri yapılmıştır. Deney gruplarını oluşturmak için aynı ebatlarda ve bakteri tutulumu için eşik değer olan $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ yüzey pürüzlülük değerinin altında 88 adet titanyum disk hazırlandı ve her grupta 22 tane olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Her grup farklı akım(güç) polimerizasyon parametresi ile karakterize edildi. Kontrol grubu için $R_a = 0,2 \mu\text{m}$ yüzey pürüzlülük değerinin altında 22 adet polisajlı Ti disk hazırlandı. Grupların her birinden rastgele 2 örnek seçildi ve bu örnekler yüzey topografisi, kimyası, pürüzlülüğü ve temas açısı ölçümleri için kullanıldı. Bu ölçümler yapay tükürükte bekletilmeden önce ve bekletildikten sonra tekrarlanarak yüzeydeki kaplamanın kalitesi kıyaslanmıştır. Yapay tükürük kullanılmasının sebebi plazma polimerizasyon tekniği ile yüzey karakterizasyonu sonucu oluşan ince film tabakasının ağız içi şartlardaki davranışını analiz etmektir. Her bir grupta kalan 20 örneğin 10 tanesi S. mutans, diğer 10 tanesi S. sanguis ile uygun besiyerlerinde inkübe edilerek örnek yüzeylerinde biyofilm oluşturuldu ve üreyen canlı koloniler CFU/ml cinsinden sayıldı.

3.1. Yüzeylerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında, Bilkent Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) laboratuvarında, 6 mm çapında ve 2 mm kalınlığında toplam 110 adet Tip 4 saf titanyumdan disk şeklinde örnekler kesilerek hazırlandı (Şekil 3).



Şekil 4: Kesme cihazı (Accutom-50, Struers Ltd, Lanarkshire, İngiltere)

Örnekler zımparalama ve parlatma işlemleri sırasında kolay tutabilmek ve her örneğe standart uygulama yapabilmek amacıyla akrilik rezinden elde edilen silindirik kalıpların içerisine gömüldü.

3.1.1. Zımparalama ve Parlatma İşlemleri

Toplam 110 adet örneğin zımparalama ve parlatma işlemleri, parlatma cihazı (LaboPol-5, Struers Ltd, Lanarkshire, İngiltere) üreticisinin titanyum metali için önerileri doğrultusunda Bilkent Unam laboratuvarında gerçekleştirildi.

Kaba zımparalama işlemi, silisyum karbit aşındırıcı kağıt (320 grid) ile yapılmış, ince zımparalama işlemi örneklere eşit kuvvet uygulayan numune tutucu ucu bulunan cihazda 9µm' lik aşındırıcı elmas solüsyonu kullanılarak 150 N kuvvet altında 5 dakikada gerçekleştirildi.

Zımparalanan örnekler SiO₂ solüsyonu (OP-S, 0.04µm) ile 5 dakika süreyle parlatıldı (Şekil 4).



Şekil 5:Parlatma cihazı

3.2 Plazma polimerizasyon yöntemiyle yüzey modifikasyonu

Örnekler kaplama işleminden önce akrilik rezin içerisinden çıkarıldı ve ultrasonik banyoda aseton içerisinde 20 dk süreyle yıkanarak aşındırıcı parçacık artıklarından arındırıldı.

Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği laboratuvarında tiyol-hidroksil grup içeren 11-merkaptoundekanoik asit monomeri, yüksek akım kesikli ışına tekniğiyle farklı koşullarda plazma polimerizasyonu uygulanarak örnek yüzeyleri üzerinde polimerleştirildi.

Daha önceki deneylerden ve hava ile temastan kaynaklanan kirliliği ortadan kaldırmak amacıyla plazma polimerizasyonuna başlamadan önce gaz girişinden sisteme argon gazı verilerek vakumlandı. Kaplama sürecine geçmek için argon gazı sisteme tekrar verilip, vakum etkisi yaratıldı. Toz halindeki monomer hollow katod içerisinde yerleştirilerek argon plazmasında buharlaştırılması sağlandı. Buhar fazına gecen monomer plazma ile etkileştirilerek, yüksek voltaj altında plazması oluşturuldu [97]. Plazma halini almış monomer partikülleri, kararsız yapılarını kararlı hale getirebilmek için reaktör içerisindeki kararlı malzeme üzerine yük boşalımı gerçekleştirerek denge durumuna ulaşması sağlandı. Bu sayede malzeme yüzeyinde kaplama oluşturuldu. İşlemin sonunda yeni oluşan grupların stabilizasyonu için, örnekler 10 dk. vakumda bekletildi.

Yüzey modifikasyonu için kullanılan akım değerleri değiştirilerek 4 farklı parametre elde edildi.

1. deney grubu için depozisyon koşulları:

Süre: 10 dakika

DC: 1.5 kV

Darbeli: 19 kV

Basınç: 0.4 mbar

Frekans: 5 Hz

2. deney grubu için depozisyon koşulları:

Süre: 10 dakika

DC: 2 kV

Darbeli: 19 kV

Basınç: 0.4 mbar

Frekans: 5 Hz

3. deney grubu için depozisyon koşulları:

Süre: 10 dakika

DC: 2.5 kV

Darbeli: 19 kV

Basınç: 0.4 mbar

Frekans: 5 Hz

4. deney grubu için yüzey karakterizasyonundan önce Ti diskler 100°C'ye kadar ısıtıldıktan sonra kaplama işlemi gerçekleştirildi. Isıtma işlemi sonrası depozisyon koşulları:

4. deney grubu için depozisyon koşulları:

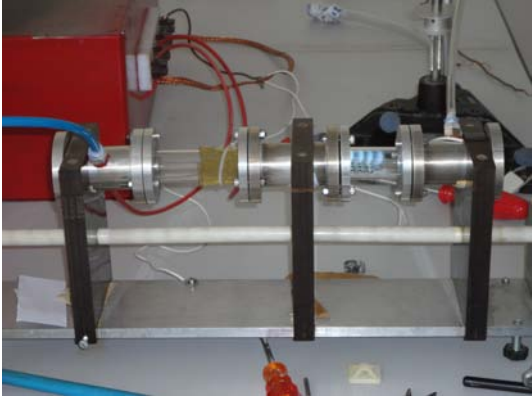
Süre: 10 dakika

DC: 2.5 kV

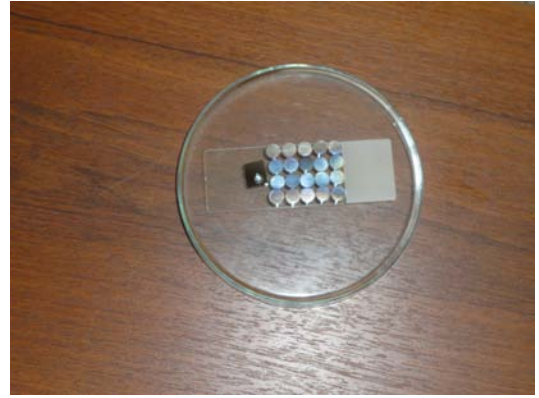
Darbeli: 19 kV

Basınç: 0.4 mbar

Frekans: 5 Hz



Şekil 6:Plazma depozisyon cihazı



Şekil 7: Depozisyon sonrası örnekler

3.3 Yüzey Karakterizasyonu

Plazma polimerizasyon yöntemiyle hazırlanan 88 adet titanyum disk, her grupta 22 tane olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Her grup farklı akım(güç) polimerizasyon parametresi ile modifiye edildi. Kontrol grubundan ve deney gruplarının her birinden rastgele 2 örnek seçildi ve bu örnekler yüzey topografisi, kimyası, pürüzlülüğü ve temas açısı ölçümleri için kullanıldı. Bu ölçümler yapay tükürükte [98] bekletilmeden önce ve bekletildikten sonra (3 sa 37°C'de) tekrarlanarak yüzeyde oluşan kaplama kalitesi kıyaslanmıştır. Yapay tükürük kullanılmasının sebebi plazma polimerizasyon tekniği ile

yüzey karakterizasyonu sonucu oluşan ince film tabakasının ağız içi şartlardaki davranışını analiz etmektir.

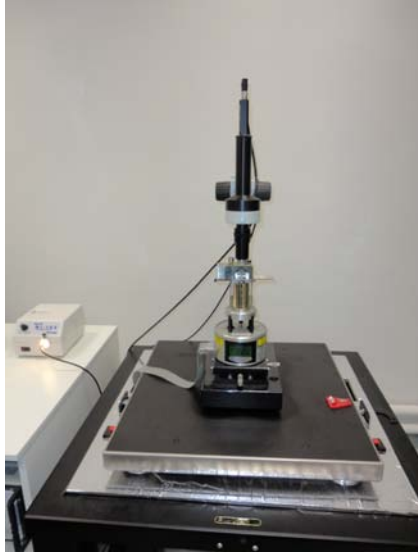
| KİMYASAL | MİKTAR/LİTRE |
|--|-----------------------|
| NaCl | 1.2800 g |
| MgCl ₂ (6H ₂ O) | 0.125 g |
| KCl | 0.095 g |
| CH ₃ COOK | 1.508 g |
| CaCl ₂ | 0.167 g |
| K ₃ PO ₄ (3H ₂ O) | 0.386 g |
| H ₃ PO ₄ | 0.05ml |
| NaF | 0.42 g – 4.2 g – 21 g |

Tablo 2: Kullanılan yapay tükürük formülü

Bu çalışma kapsamında yüzey analizleri gerçekleştirilirken sırasıyla AKM, XPS, temas açısı ölçümü kullanılarak işlem görmüş deney örneklerinin yüzeyleri tanımlanmıştır.

3.3.1 AKM ile yüzey topografisinin incelenmesi

Titanyum ince filmlerin yüzey topografik incelemeleri atomik kuvvet mikroskobu altında ODTÜ Merkezi laboratuvarında gerçekleştirildi. (Vecoo MultiMode V) Ortalama yüzey pürüzlülük değerlerini belirlemek için, inceleme için her gruptan seçilen 2 örnek üzerinde 20 µm' luk alanın Ra değerleri kaydedildi.



Şekil 8:AKM cihazı

Deney gruplarından ayrı olarak hazırlanmış ve her kaplama parametresiyle elde edilmiş birer örnek üzerinde kaplama kalınlıkları belirlenmiştir. Titanyum referans yüzey üzerinde kimyasal maske (seluloz asetat) kullanılarak kaplanmamış ve kaplı olarak iki yüzey hazırlanarak iki yüzey arasındaki yükseklik farkı tespit edilerek kalınlık ölçümü yapılmıştır.

3.3.2 XPS (ESCA) ile yüzey kimyasının incelenmesi

Ti örneklerin en dış yüzeyinde oluşan filmlerin kimyasal analizi Bilkent Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) laboratuvarındaki XPS cihazı (Thermo, K-Alpha - Monochromated high-performance XPS spectrometer) ile yapılmıştır.



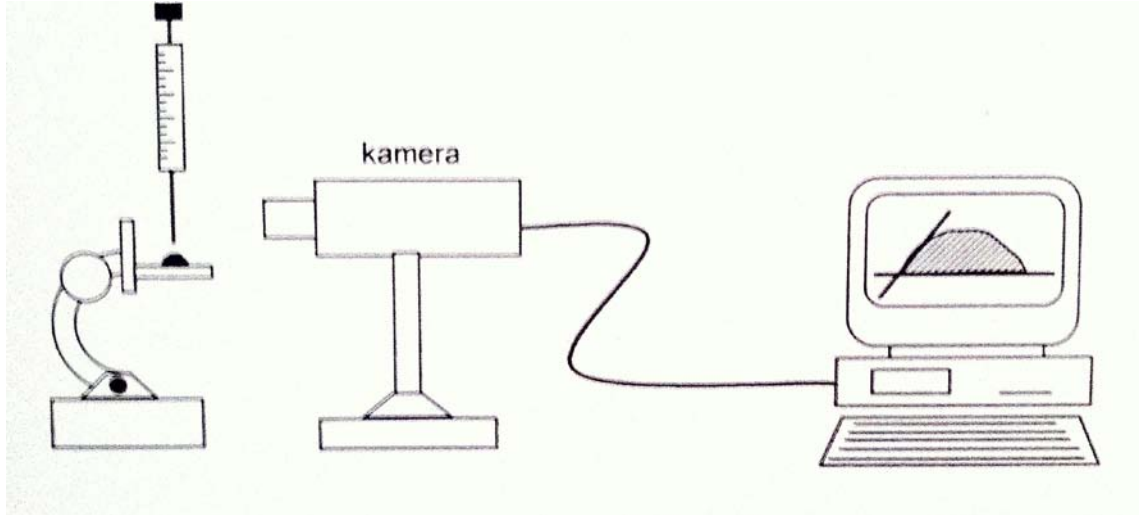
Şekil 9: XPS cihazı (Thermo, K-Alpha - Monochromated high-performance XPS spectrometer)

3.3.3 Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı ölçümleri için, yüzey üzerinde yayılan 0,05 ml su damlacığının profil fotoğrafları çekilerek bilgisayarda çözümlendi. (SCA 20 Software for OCA, Dataphysics, Germany)



Şekil 10: Temas açısı ölçüm cihazı (OCA 20 contact angle system, Dataphysics, Germany)



Şekil 11: Temas açısı ölçüm düzeneği

3.4 Mikrobiyolojik İncelemeler

3.4.1 Besiyerlerinin Hazırlanması

Triptik Soy Buyyon (TSB)

Bacto Tyryptic Soy Buyyon (DIFCO) 30g.

Distile su 1000ml

Manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi.

% 5 sakkarozlu TSB

Bacto Tyryptic Soy Broth (DIFCO) 30g.

Sakkaroz (MERCK) 50g.

Distile su 1000ml.

Manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi.

3.4.2 Araştırmada Kullanılan Bakteriler

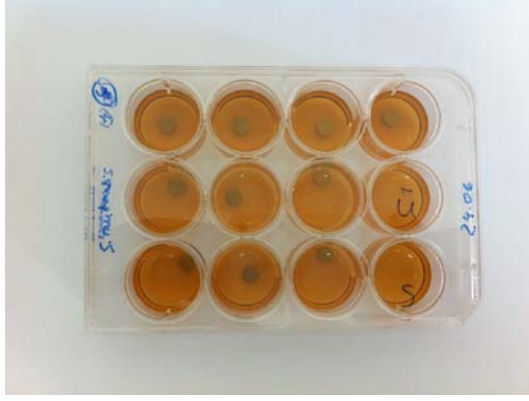
Çalışmada bakteri örneği olarak Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi koleksiyonundan temin edilen 'Streptococcus mutans' ATCC 25175 ve 'Streptococcus sanguis' ATCC 29667 kullanıldı.

3.4.3 Bakterilerin hazırlanması

Standart suşlar Triptik Soy Buyyon (TSB) içinde % 10 CO₂ li ortamda (mum söndürme kavanozunda) 37°C'de 24 saat bekletilerek kültürleri hazırlandı. Standart suşları sakkarozla alıştırmak için, 24 saatlik kültürlerinden % 5 sakkarozlu TSB'ye % 10 CO₂'li ortamda 37°C'lik etüvde 1 hafta süreyle her gün taze besiyerine aktarılarak pasaj yapıldı.

3.4.4 Biyofilm oluşturulması

Başkent Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarında 0.5-1 ml. triptik soy broth (TSB) içinde süspanse edilen suşun % 5 koyun kanlı TSB' a yoğun ekimleri yapıldı ve 37⁰C' de mikroaerofilik ortamda 72 saat inkübe edildi.



Şekil 12: Besiyerinin hazırlanması

3.4.5 Deneyde Kullanılacak Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Sakkarozla alıştırmış bakteri kültürlerinden 100 ml % 5 sakkarozlu TSB içine aktararak 0.5 MacFarland bulanıklık tüpüne göre bir bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu bakteri süspansiyonundan 10 katlı sulandırmalar yapıldı. Uygun sulandırmalardan (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4}) 0.01'er ml alınarak Triptic soy agar'a ekim yapıldı (Şekil 12) ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda besiyeri yüzeyinde oluşan koloniler sayılarak koloni sayısı (cfu/ml)= (koloni sayısı/sulandırma oranı x inokulum miktarı) olarak hesaplandı.



A



B

Şekil 13 :(A): Bakteri süspansiyonlarının 10 katlı sulandırılması. (B):10 kat sulandırılan bakteri süspansiyonunun TSA'a ekilmesi

3.5 İstatistiksel Analiz

Elde edilmiş olan veriler "IBM SPSS Statistic 19" ve "Statistica 8,0" istatistik paket programlarına aktarılmış ve bu programlar aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Öncelikle elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortaya konulmuştur. Daha sonra kontrol grubu ile deney grupları arasındaki ikili karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu karşılaştırmalarda, veriler normal dağılım göstermediğinden, Mann Whitney U Testi kullanılmıştır.

Ayrıca deney gruplarının kendi içindeki çoklu karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu karşılaştırmalarda da, veriler normal dağılım göstermediğinden, Kruskal Wallis Testi uygulanmıştır. Kruskal Wallis Testi sonucunda fark çıkan grupları belirlemek amacıyla Tukey çoklu karşılaştırma testinden faydalanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Yüzey Pürüzlülüğü ve Kaplama Kalınlığı Ölçüm Sonuçları

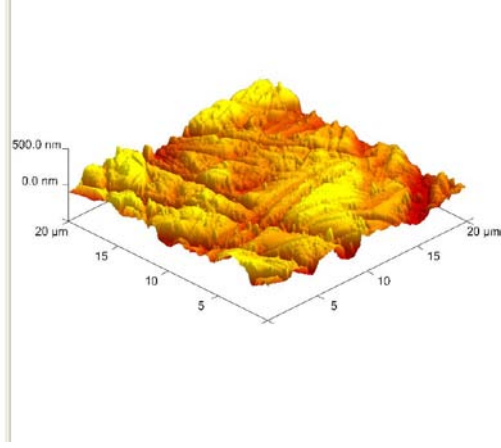
Titanyum örnekler zımparalama ve cilalama işlemleri sonrasında 4 gruba ayrılarak, her gruba plazma polimerizasyon yöntemi ile yüzey kaplama işlemi uygulandı. Daha önceden belirlenen 2 örnekte birinde kaplama kalınlığının belirlenmesi için yüzeyine 'selüloz asetat' damlatılarak altının kaplanmaması sağlandı. Böylece kaplanan ve kaplanmayan alan arasındaki kaplama kalınlık farkı AKM ile tespit edildi. Örneklerin tükürükte bekletilmeden önce ve bekletildikten sonra yüzey topografik incelemeleri AKM ile rastgele 20 µm'luk üç noktadan gerçekleştirildi ve yüzey pürüzlülük değeri bu 3 noktanın ortalaması olarak belirlendi.

Örnekler 3 saat 37° C'lik etüvde tükürük içinde bekletildikten sonra tekrar yüzey pürüzlülük ve kaplama kalınlıkları AKM'de belirlendi. Tükürük öncesi ve sonrası kaplama yüzeyinde pürüzlülük artışı ve kalınlık azalması kaplama materyalinde kayıp olarak kabul edildi. 2. grupta yapılan kaplama yapay tükürükte bekletildikten sonra gözle görülen yüzey kaybı olduğu için kalınlık ölçümü yapılamamıştır.

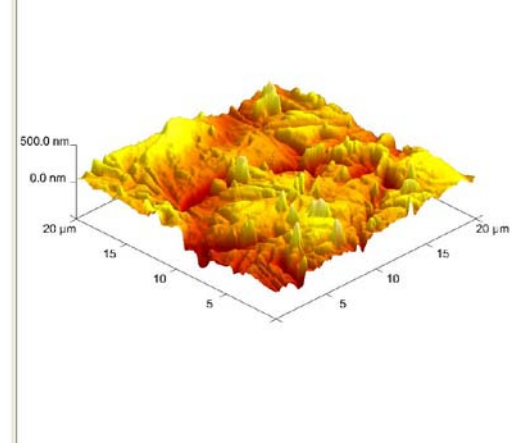
| 20 x 20 µm | Tükürükten önce | | Tükürükten sonra | |
|-------------|-----------------|---------------|------------------|---------------|
| | Ra (µm) | Kalınlık (nm) | Ra (µm) | Kalınlık (nm) |
| Kaplanmamış | 0.083 | - | 0.087 | - |
| 1. grup | 0.085 | 66 | 0.098 | 50 |
| 2. grup | 0.066 | 39 | 0.069 | - |
| 3. grup | 0.042 | 114 | 0.047 | 97 |
| 4. grup | 0.057 | 97 | 0.066 | 50 |

Tablo 3:Yapay tükürük ile etkileşim öncesi ve sonrası pürüzlülük ve film kalınlığı sonuçları

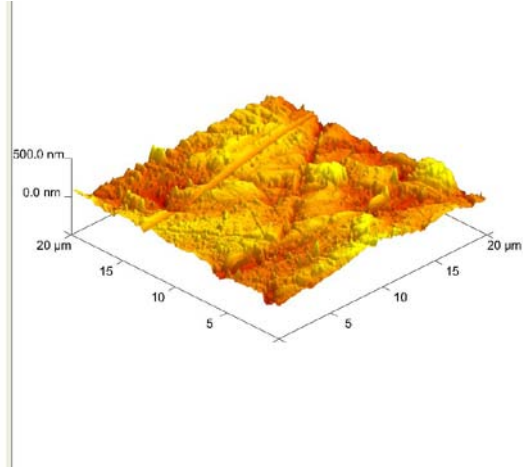
4.1.1 Örneklerin Tükrükte Bekletilmeden Önceki AKM Görüntüleri



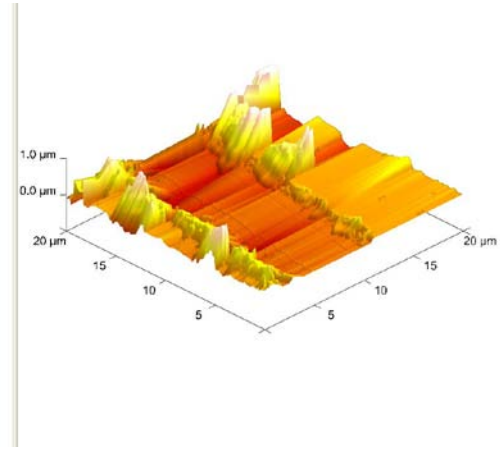
Şekil 14: 1. deney grubu $R_a=0.085 \mu\text{m}$. Kalınlık= 66 nm



Şekil 15: 2. deney grubu $R_a=0.066 \mu\text{m}$. Kalınlık=39 nm

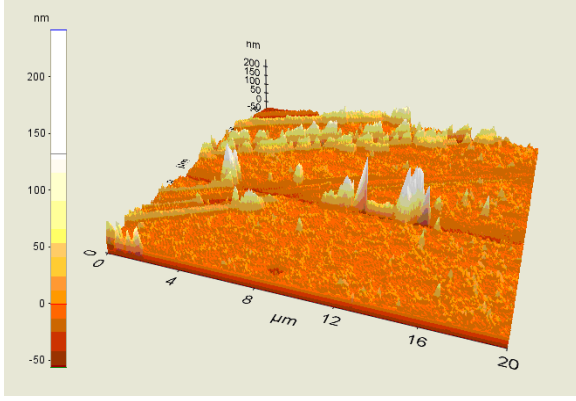


Şekil 16: 3. deney grubu $R_a=0.042 \mu\text{m}$. Kalınlık=114 nm

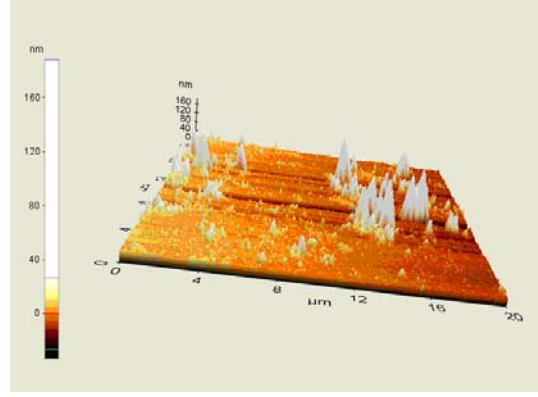


Şekil 17: 4. deney grubu $R_a:0.057 \mu\text{m}$. Kalınlık=97 nm

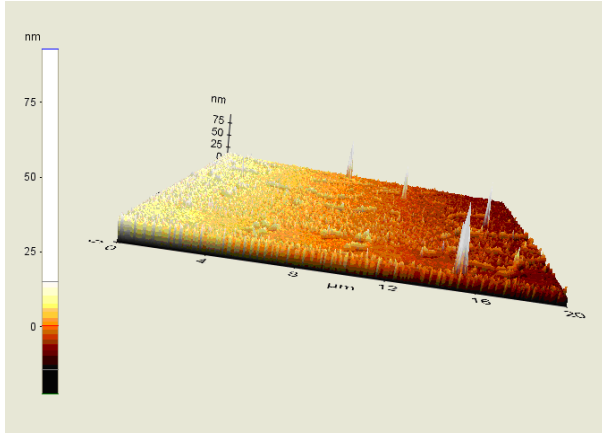
4.1.2 Örneklerin Tükürükte Bekletildikten Sonraki AKM Görüntüleri



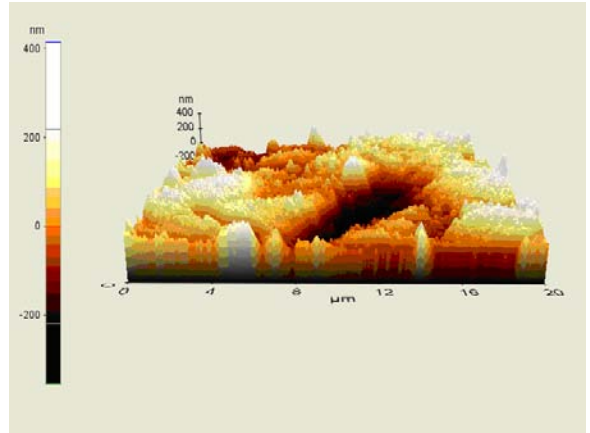
Şekil 18: 1. deney grubu $R_a=0.098 \mu\text{m}$ kalınlık=50 nm



Şekil 19: 2. deney grubu $R_a=0.074 \mu\text{m}$. Kalınlık=25 nm



Şekil 20: 3. deney grubu $R_a=0.047 \mu\text{m}$. Kalınlık=97 nm



Şekil 21: 4. deney grubu $R_a=0.066 \mu\text{m}$. Kalınlık=50 nm

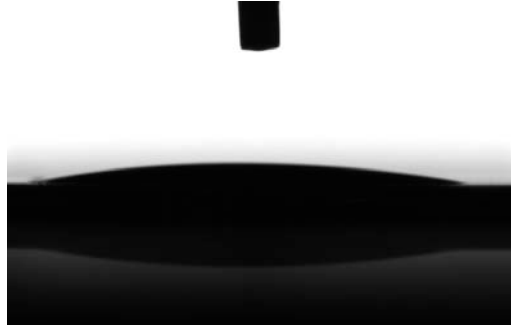
4.2 Temas açısı Ölçümlerinin Sonuçları

Temas açısı ölçümleri yüzeye distile su ile damlatma tekniği ile gerçekleştirilmiştir.

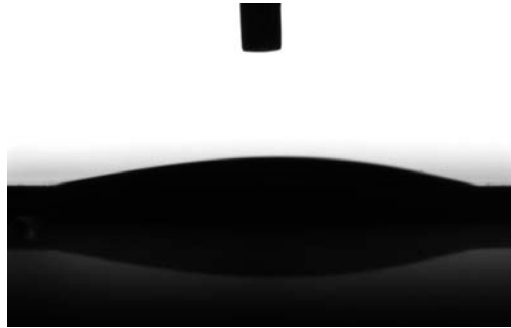
| | Tükürükten önce (°) | Tükürükten sonra (°) |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1. grup | 12.1 | 55.9 |
| 2. grup | 16.5 | 37.5 |
| 3. grup | 49.7 | 69.7 |
| 4. grup | 66 | 58.9 |
| Kaplanmamış titanyum | 18.6 | 24.8 |

Tablo 4: Temas açısı analizleri

4.2.1 Örneklerin Tükürükte Bekletilmeden Önceki Temas açısı ölçümleri



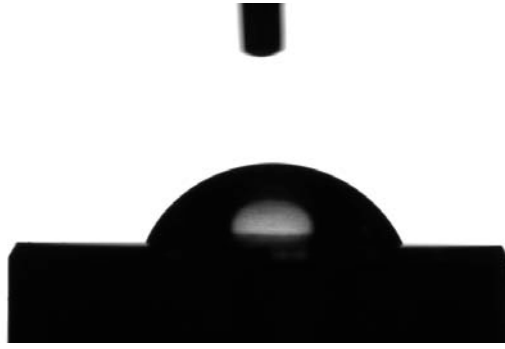
Şekil 22:1. deney grubu temas açısı ölçümü=12.1



Şekil 23: 2. deney grubu temas açısı ölçümü=16.5



Şekil 24: 3. deney grubu temas ölçümü=49.7



Şekil 25: 4. deney grubu temas açısı ölçümü=66

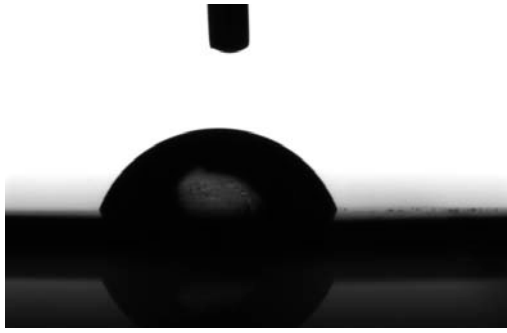
4.2.2 Örneklerin tükürükte bekletildikten sonra temas açısı ölçümleri



Şekil 26: 1. deney grubu temas açısı ölçümü= 55.9



Şekil 27: 2. deney grubu temas açısı ölçümü=37.5



Şekil 28: 3. deney grubu temas açısı ölçümü=69.7



Şekil 29: 4. deney grubu temas açısı ölçümleri=58.9

4.3 XPS analizleri (Yüzeylerin kimyasal değişimleri)

Her gruptan 2 örneğin fiziksel değişimlerinin yanı sıra yüzeylerinin kimyasal yapısı da incelenmiştir. Yüzeyde bulunan N, C, O, S atomlarının yüzdeleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

| Atomik yüzdelere | Tükürükten önce (%) | | | | Tükürükten sonra (%) | | | |
|------------------|---------------------|--------------|--------------|------|----------------------|--------------|--------------|------|
| | Ti | C | O | S | Ti | C | O | S |
| 1. örnek | 0.24 | 84.37 | 13.47 | 1.92 | 0.25 | 82.98 | 15.8 | 0.97 |
| 2. örnek | 2.03 | 77.38 | 18.28 | 2.31 | - | - | - | - |
| 3. örnek | 0.37 | 83.13 | 14.72 | 1.78 | 0.43 | 80.89 | 17.64 | 1.04 |
| 4. örnek | 0.41 | 83.77 | 13.84 | 1.98 | 0.53 | 82.61 | 16.2 | 0.66 |
| Kaplanmamış Ti | 5.91 | 58.32 | 35.77 | - | 5.16 | 68.63 | 26.21 | - |

Tablo 5: Örneklerin yapay tükürük ile etkileşim öncesi ve sonrası % element bileşimi

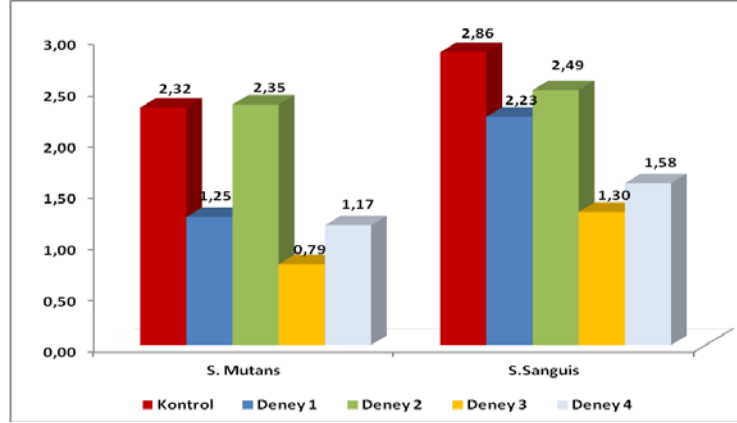
4.4 İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilmiş olan veriler "IBM SPSS Statistic 19" ve "Statistica 8,0" istatistik paket programlarına aktarılmış ve bu programlar aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu ve deney gruplarının kıyaslanmasında Mann Whitney U testi, deney gruplarının birbiriyle kıyaslanmasında Ki-Kare testi kullanılmıştır.

| Bakteri Türü | Grup | \bar{X} | Std. Sapma | Min. | Maks. | Aralık |
|------------------|---------------|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| S. Mutans | Kontrol(n=10) | 2,32 x10 ⁴ | 0,199 x10 ⁴ | 2,1 x10 ⁴ | 2,6 x10 ⁴ | 0,5 x10 ⁴ |
| | Deney 1(n=10) | 1,25 x10 ⁴ | 0,085 x10 ⁴ | 1,2 x10 ⁴ | 1,4 x10 ⁴ | 0,2 x10 ⁴ |
| | Deney 2(n=10) | 2,35 x10 ⁴ | 0,222 x10 ⁴ | 2,1 x10 ⁴ | 2,7 x10 ⁴ | 0,6 x10 ⁴ |
| | Deney 3(n=10) | 0,79 x10 ⁴ | 0,137 x10 ⁴ | 0,6 x10 ⁴ | 1,0 x10 ⁴ | 0,4 x10 ⁴ |
| | Deney 4(n=10) | 1,17 x10 ⁴ | 0,106 x10 ⁴ | 1,0 x10 ⁴ | 1,3 x10 ⁴ | 0,3 x10 ⁴ |
| S.Sanguis | Kontrol(n=10) | 2,86 x10 ⁴ | 0,127 x10 ⁴ | 2,7 x10 ⁴ | 3,0 x10 ⁴ | 0,3 x10 ⁴ |
| | Deney 1(n=10) | 2,23 x10 ⁴ | 0,231 x10 ⁴ | 1,9 x10 ⁴ | 2,6 x10 ⁴ | 0,7 x10 ⁴ |
| | Deney 2(n=10) | 2,49 x10 ⁴ | 0,166 x10 ⁴ | 2,3 x10 ⁴ | 2,8 x10 ⁴ | 0,5 x10 ⁴ |
| | Deney 3(n=10) | 1,30 x10 ⁴ | 0,116 x10 ⁴ | 1,1 x10 ⁴ | 1,4 x10 ⁴ | 0,3 x10 ⁴ |
| | Deney 4(n=10) | 1,58 x10 ⁴ | 0,132 x10 ⁴ | 1,4 x10 ⁴ | 1,7 x10 ⁴ | 0,3 x10 ⁴ |

Tablo 6: Kontrol Grubu ve Deney Grupları için S. Mutans ve S.Sanguis Bakterileri Tanımlayıcı İstatistikleri.

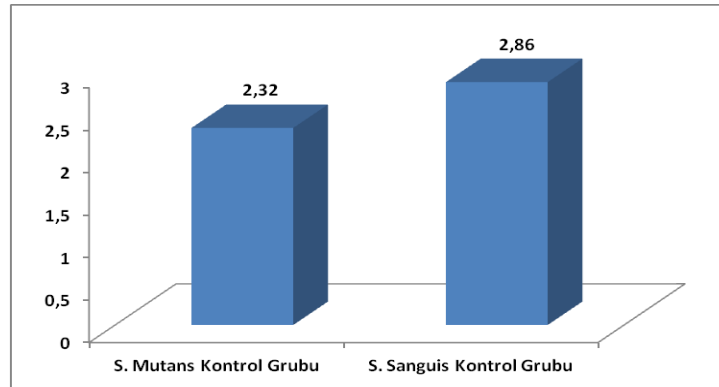


Grafik 1: Kontrol Grubu ve Deneý Grupları için Ortalama S. Mutans ve S.Sanguis Bakterileri Sayıları.

| Bakteri | N | Ortalama | Std. Sapma | Ortalama Sıra | Toplam Sıra | Mann Whitney U | P |
|------------|----|----------|------------|---------------|-------------|----------------|-----------------|
| S. Mutans | 10 | 2,32 | 0,199 | 5,50 | 55,00 | 0,000 | 0,000*** |
| S. Sanguis | 10 | 2,86 | 0,127 | 15,50 | 155,00 | | |

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Tablo 7: Kontrol Grupları için S. Mutans ve S. Sanguis Bakterileri Arasındaki Farklılığın İncelenmesi



Grafik 2: Kontrol Grupları için S. Mutans İle S. Sanguis Bakteri Sayıları

Kontrol grupları için S. Mutans ile S. Sanguis bakterisi üreme miktarları arasında farklılık olup olmadığını incelemek için uygulanan Mann Whitney U testi sonucunda; anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (U:0,000, $p < 0,001$). Buna göre; S. Mutans kontrol grubunda üreyen bakteri sayısı S. Sanguis kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktür.

| Grup | N | Ortalama | Std. Sapma | Ortalama Sıra | Toplam Sıra | Mann Whitney U | P |
|-------------------------|----|----------|------------|---------------|-------------|----------------|-----------------|
| Kontrol | 10 | 2,32 | 0,199 | 15,50 | 155,00 | 0,000 | 0,000*** |
| Deney 1 (1,5 kW) | 10 | 1,25 | 0,085 | 5,50 | 55,00 | | |
| Kontrol | 10 | 2,32 | 0,199 | 10,15 | 101,50 | 46,5 | 0,787 |
| Deney 2 (2 kW) | 10 | 2,35 | 0,222 | 10,85 | 108,50 | | |
| Kontrol | 10 | 2,32 | 0,199 | 15,50 | 155,00 | 0,000 | 0,000*** |
| Deney 3 (2,5 kW) | 10 | 0,79 | 0,137 | 5,50 | 55,00 | | |
| Kontrol | 10 | 2,32 | 0,199 | 15,50 | 155,00 | 0,000 | 0,000*** |
| Deney 4 (2,5 kW+ısıtma) | 10 | 1,17 | 0,106 | 5,50 | 55,00 | | |

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001

Tablo 8: S. Mutans Bakterileri için Kontrol Grubu ile Deney Grupları Arasındaki Farklılıkların İncelenmesi

S. Mutans bakterisi üreme miktarları arasında kontrol grubu ve deney grupları arasında farklılık olup olmadığını incelemek için uygulanan Mann Whitney U testi sonucunda; 1. deney grubunda; anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (U:0,000, p<0,001). Buna göre; 1,5 kV akımın verildiği deney grubunda üreyen bakteri sayısı kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktür. 2. deney grubunda anlamlı farklılık bulunmadığı sonucuna ulaşılmıştır (U:46,5, p>0,05). 3. deney grubunda anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (U:0,000, p<0,001). Buna göre; 2,5 kV akımın verildiği deney grubunda üreyen bakteri sayısı kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktür. 4. deney grubunda anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (U:0,000, p<0,001). Buna göre; 2,5 kV akımın ve ısının verildiği deney grubunda üreyen bakteri sayısı kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktür.

| Grup | N | Ortalama | Std. Sapma | Ortalama Sıra | Kruskal Wallis Ki-Kare | P | Fark |
|-------------------------|----|----------|------------|---------------|------------------------|-----------------|--------------------------|
| Deney 1 (1,5 kW) | 10 | 1,25 | 0,085 | 22,55 | 33,938 | 0,000*** | 3-1,2,4 2-1,4 |
| Deney 2 (2 kW) | 10 | 2,35 | 0,222 | 35,50 | | | |
| Deney 3 (2,5 kW) | 10 | 0,79 | 0,137 | 5,55 | | | |
| Deney 4 (2,5 kW+ısıtma) | 10 | 1,17 | 0,106 | 18,40 | | | |

Tablo 9: S. Mutans Bakterileri için Deney Grupları Arasındaki Farklılığın İncelenmesi

Deney grupları arasında S. Mutans bakterisi üreme miktarları arasında farklılık olup olmadığını incelemek için uygulanan Kruskal Wallis Testi sonucunda; anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (Ki-Kare:33,938, $p<0,001$). Buna göre; 2,5 kV akımın verildiği 3. Deney grubunda üreyen bakteri sayısı diğer deney gruplarından anlamlı derecede daha düşük iken 1,5 kV akımın verildiği 2. Deney grubunda üreyen bakteri sayısı diğer deney gruplarından anlamlı derecede daha yüksektir.

| Grup | N | Ortalama | Std. Sapma | Ortalama Sıra | Toplam Sıra | Mann Whitney U | P |
|-------------------------|----|----------|------------|---------------|-------------|----------------|-----------------|
| Kontrol | 10 | 2,86 | 0,127 | 15,50 | 155,00 | 0,000 | 0,000*** |
| Deney 1 (1,5 kW) | 10 | 2,23 | 0,231 | 5,50 | 55,00 | | |
| Kontrol | 10 | 2,86 | 0,127 | 15,00 | 150,00 | 5,000 | 0,001** |
| Deney 2 (2 kW) | 10 | 2,49 | 0,166 | 6,00 | 60,00 | | |
| Kontrol | 10 | 2,86 | 0,127 | 15,50 | 155,00 | 0,000 | 0,000*** |
| Deney 3 (2,5 kW) | 10 | 1,30 | 0,116 | 5,50 | 55,00 | | |
| Kontrol | 10 | 2,86 | 0,127 | 15,50 | 155,00 | 0,000 | 0,000*** |
| Deney 4 (2,5 kW+ısıtma) | 10 | 1,58 | 0,132 | 5,50 | 55,00 | | |

*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$

Tablo 10: S. Sanguis Bakterileri için Kontrol Grubu ile Deney Grupları Arasındaki Farklılıkların İncelenmesi

S. Sanguis bakterisi üreme miktarları arasında kontrol grubu ve deney grupları arasında farklılık olup olmadığını incelemek için uygulanan Mann Whitney U testi sonucunda; 1. deney grubu için anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (U:0,000, p<0,001). Buna göre; 1,5 kV akımın verildiği deney grubunda üreyen bakteri sayısı kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktür. 2. deney grubu için ; anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (U:5,000, p<0,01). Buna göre; 2 kV akımın verildiği deney grubunda üreyen bakteri sayısı kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktür. 3. deney grubu için anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (U:0,000, p<0,001). Buna göre; 2,5 kV akımın verildiği deney grubunda üreyen bakteri sayısı kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktür. 4. deney grubu için anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (U:0,000, p<0,001). Buna göre; 2,5 kV akımın ve ısının verildiği deney grubunda üreyen bakteri sayısı kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktür.

| Grup | N | Ortalama | Std. Sapma | Ortalama Sıra | Kruskal Wallis Ki-Kare | P | Fark |
|-------------------------|----|----------|------------|---------------|------------------------|-----------------|--|
| Deney 1 (1,5 kW) | 10 | 2,23 | 0,231 | 27,40 | | | |
| Deney 2 (2 kW) | 10 | 2,49 | 0,166 | 33,60 | | | |
| Deney 3 (2,5 kW) | 10 | 1,30 | 0,116 | 6,10 | 33,902 | 0,000*** | 3-1,2,4 2-1,4 1-4 |
| Deney 4 (2,5 kW+ısıtma) | 10 | 1,58 | 0,132 | 14,90 | | | |

*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001

Tablo 11: S. Sanguis Bakterileri için Deney Grupları Arasındaki Farklılığın İncelenmesi

Deney grupları arasında S. Sanguis bakterisi üreme miktarları arasında farklılık olup olmadığını incelemek için uygulanan Kruskal Wallis Testi sonucunda; anlamlı farklılık bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (Ki-Kare:33,902, p<0,001). Buna göre; 2,5 kV akımın verildiği 3. Deney grubunda üreyen bakteri sayısı diğer deney gruplarından anlamlı derecede daha düşük iken 1,5 kV akımın verildiği 2. Deney grubunda üreyen bakteri sayısı diğer deney gruplarından anlamlı derecede daha yüksektir. Ayrıca 2,5 kV akımın ve ısının verildiği 4. Deney grubunda üreyen bakteri sayısı 1,5 kV akımın verildiği 1. Deney grubundan anlamlı derecede daha düşüktür. 3. deney grubu ve 4. deney grubu kıyaslandığında aralarına anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Diş eksikliklerinin giderilmesinde geleneksel protetik uygulamaların yanı sıra implant uygulamalarının giderek günümüzde geçerlilik kazanmaya başladığı bilinmektedir. İmplant kalıcılığının en önemli faktörlerinden biri bölgede biyofilm birikiminin engellenmesidir. İlk olarak 1965 yılında Loe ve arkadaşlarının deneysel araştırmaları sonucu gingivitis ve periodontitisin ana nedeninin biyofilm olduğu gösterilmiştir [99]. Periodontitis ile periimplantitis arasındaki benzerlik ise klinik, histolojik ve mikrobiyolojik değişikliklerin değerlendirildiği birçok çalışmayla ortaya koyulmuştur [100-102]

İmplant çevresinde kollajen bağlantısı gerçekleşebilen bir sement tabakası olmayışı nedeniyle yıkım sonucu apikale doğru ilerleyen epitelyal göçün doğal dişten daha hızlı olduğu gösterilmiştir [103]. Bu sebeple implant dayanağının mikrobiyal akümülyasyon ve kolonizasyona izin verip vermemesi, implantın uzun dönem başarısı için çok önemlidir.

Yumuşak doku ataçmanının uzun dönem korunması implant transmukozal kısımlarının yüzey özelliklerine ve bu bölgelere yapışan bakteri miktarına bağlıdır. Çalışmamızın ilk kısmında in vitro ortamda, implant transmukozal kısımlarında kullanılacak yüzey kaplamalarının S.mutans ve S.sanguis birikimine olan etkisi incelenmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalar, farklı yüzey kaplama materyalleri üzerine yapışan bakteri sayısının azaltılmasında asıl belirleyicilerin, yüzey pürüzlülüğü ve serbest yüzey enerjisi gibi özellikler olduğunu kanıtlamıştır [61, 104, 105]. Yoshinari et al. [36] iyon implantasyonu, oksidasyon ve iyon kaplama gibi kuru işleme yapılmış yüzey modifikasyonlarının, antibakteriyel aktiviteyi belirgin şekilde artırdığını bildirmiştir.

Çalışmamızda test materyali olarak tip 4 titanyum tercih edilmiştir. İmplant üreticileri tarafından kullanılan titanyum genel olarak saf titanyum ve titanyum alaşımları olmak üzere 2 kategoride bulunmaktadır. Saf titanyumun mekanik ve fiziksel özellikleri birbirinden farklılık gösteren 4 çeşidi (grade 1-4) bulunmaktadır. Tip 1 titanyumun elastisite modülü 102 Gpa iken, 4. tip titanyumda bu oran %2 artarak 104 Gpa ya yükselmiştir, eğilme dayanımı ise 170 Mpa dan 483 Mpa ya yükselmiştir. Fiziksel özelliklerdeki bu değişim, yapısında, diğerlerine göre daha fazla bulunan oksijenin, kristal yapıya titanyum iyonlarını sıkıştırarak katılması ve gerilim oluşturmaları

ile açıklanmıştır. Tip 4 özellikle dayanıklılığı daha fazla olduğu için tercih edilmektedir[106].

Örneklerin yüzey topografik değerlendirmesi ve pürüzlülük ölçümleri AKM kullanılarak yapılmıştır. Yüzey kimyasının ölçümü için XPS (ESCA) kullanılarak yapılmıştır. Titanyum yüzey pürüzlülüğünün ölçümünde SEM, profilometre ve AKM yöntemleri kullanılmaktadır. Titanyum yüzeylerinin AKM ile aydınlatılarak incelenmesi, daha büyük bir çözünme ve üç boyutlu bir görüntü elde edilmesini sağlar. AKM, profilometre ve SEM değerlendirmelerine kıyasla daha fazla detay verir. AKM cihazıyla yapılan çalışmalarda SEM'in aksine yüzey önceden kaplanmadan direk olarak inceleme yapılabilir. AKM, 3 boyutlu, topografik bir yüzey görüntüsü elde etmekle birlikte yüzey pürüzlülüğü parametrelerini rakamsal olarak da verebilir. Ancak tarama yapılan 20x20 µm'luk saha olması ve diğer yöntemlere göre daha küçük bir alan olması nedeniyle, tekrarlanan ölçümlerde aynı sahayı yeniden bulmak zor olabilir [43]. Bu yüzden çalışmanın bu kısmında AKM ile yapılan her ölçüm (tükürük öncesi ve sonrası) 3 farklı alandan yapılarak ortalamaları alınmıştır.

Çalışmada kaplama sonrası örneklerin yüzeyinde oluşan yeni film kalınlığının ölçümünde AKM kullanılmıştır. AKM kullanıldığında, titanyum referans yüzey üzerinde kimyasal maske (selüloz asetat) kullanılarak kaplanmamış ve kaplı olarak iki yüzey hazırlanarak yüzeyler arasındaki yükseklik farkı kaplama kalınlığının belirlenmesini sağlamıştır.

Yeni süren bir dişte oral bakteriler çok hızlı kolonize olmaktadır. 8 farklı protetik materyalde ve mine yüzeyin tükürükle kaplanmasından sonra streptokokal tutunmaya etkisini ve substratın SYE'sinin, bakteriyel yüzey karakteristiği gibi polar ve non-polar elemanlarının bakteriyel tutunmaya etkisini inceleyen bir çalışmada örneklerin tükürükle kaplanma koşulları 1 sa 37⁰C olarak belirlenmiş ve örnekler tükürükte bekletildikten sonra distile suyla yıkanmıştır [60]. Rosentrit et al, çeşitli dental seramikleri 2 sa 37⁰C'de pelikül oluşturmak amacıyla yapay tükürükle kapladıktan sonra oral streptokokların adezyonu değerlendirilmiştir [107]. Çalışmamızda kaplama yapılan örneklerin tükürük öncesi ve sonrası analizleri yapılmıştır. Uygulanan kaplama materyalinin yüzey stabilizasyonunu belirlemek için örnekler 3 sa 37⁰C'lik etüv ortamında yapay tükürük içinde bekletildikten sonra distile

suyla 3 kez yıkama yapılmış ve AKM, XPS ve temas açısı ölçümleri tekrarlanarak yüzeydeki kaplamanın kalitesi ve/veya kaybı değerlendirilmiştir.

İmplant çevresinde mikrobiyal plak akümülyasyonu konusuna değinen bilimsel çalışmalarda, biyofilm yapısının bu bölgelerde de oluştuğı ve kalıcılığı halinde implant başarısızlıklarına sebep olduğu belirtilmiştir. Kolonizasyon öncül mikroorganizmaların çoğalması ve az da olsa yeni mikroorganizmaların adezyonu ile devam etmektedir [1]. Pelikül, implant komponent yüzeyleri ile öncelikle *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. oralis* gibi erken dönem mikroorganizmalar arasındaki bağlantıyı kurar. Bu mikroorganizmalar, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Treponema denticola* gibi periimplantitise yol açabilecek periodontal patojenlerin bölgeye adezyonu için gerekli koşulları sağlarlar [108].

Osseointegrasyonu tamamlanan bir implantın transmukozal dayanak kısmı ağız kavitesine açıldıktan sonra -amilaz ve serum albumin gibi makromoleküllerin selektif emilimi aracılığıyla implant yüzeyinde edinsel bir pelikül oluşmaktadır [38]. Bu pelikül tükürük elemanları dışında bakteriyel ve konakçının dokularını da içermekte ve implantın oral kaviteye açılmasıyla birlikte 30 dk. içinde bakteriyel kolonizasyon için bir substrat görevi görmektedir [39]. Çalışmamızda *S. mutans* ve *S. sanguis*'e ait biyofilm oluşturmak için Ti örnekler 72 saat besiyerinde bekletilmiştir ve titanyum üzerinde yeni oluşturulan yüzeyin, erken dönem mikroorganizmaların başlangıç bağlantısına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla dişlerde ve protetik restorasyonlarda plak oluşumunda en fazla bulunan bakteri olan *S. mutans* kullanılmıştır [109]. *Streptococcus mutans* ağızdaki tüm katı yüzeylere, diş dokusuna, restoratif materyaller üzerine yüksek yapışma kapasitesine sahiptir. Ayrıca *S. mutans*lar asidojenik ve asidurik özelliklerinden dolayı virulan bakteriler arasında yer alırlar [110]. Özellikle streptokokların pelikül içinde bulunmaları, enfeksiyona sebep olabilecek diğer kolonilerin de bu bölgeye göç ederek yerleşmesini sağlar [108].

Ritz et al.[95] çalışmalarında plak oluşumunda dominant öncü türlerin streptokoklar olduğunu sonrasında bunlara aktinomiçeslerin eklendiğini ve plağın yüksek miktarlardaki Gram negatif anaerob filamentoz organizmaların da adezyonuyla daha olgun bir yapı haline dönüştüğünü göstermiştir. In vivo çalışmalarda *S. sanguis*in gerçek öncü organizmalar, *S. mutans*ın dental çürüklerin major etyolojik ajanı olduğu

gösterilmiştir. Ayrıca çalışmalar sonucunda S.sanguis'in S.mutans'a göre daha iyi yapıştığı görülmüştür [96].

Mikrobiyolojik çalışmalarda yüzeyde oluşan biyofilm tabakasını incelemek için SEM, floresan mikroskobu, ışık mikroskobu ve nicel inceleme için yine bu görüntüleme yöntemleriyle mm² alana düşen koloni sayısı sayılabilir. Diğer bir yöntem ise sert yüzeylerde oluşan biyofilmin yüzeyden sökülerek koloni sayımı yapılması yöntemidir.

Kramer, zirkonyum oksit, alüminyum oksit, oksitleyici sıvı ile anodize edilmiş titanyum ve cilalı titanyum yüzeylerinin ağız içinde plak oluşumunu değerlendirdiği çalışmasında en fazla plak tutulumunun cilalı titanyum yüzeyinde olduğunu belirtmiştir [111].

Buharlaştırma, saçılma teknikleri ile fiziksel buhar biriktirme uygulanan diğer kaplama yöntemlerinde işlem birçok basamakta ve uzun sürede (24 saat gibi) gerçekleştirilmektedir. Oysa plazma polimerizasyon yönteminde prepolimer sentezi, kaplama solüsyonunun hazırlanması, kaplama, kurutma gibi işlemler tek basamakta gerçekleştirilebildiğinden, 1 saatten daha kısa sürede sonuç alınmaktadır [112].

Düşük sıcaklık plazma polimerizasyonu yönteminin en önemli avantajlarından biri de malzemenin sadece en dışta bulunan tabakalarının modifikasyondan etkilenmesidir. Böylece, modifiye edilen maddelerin yığın özellikleri değişmeden yüzey özellikleri kontrollü bir şekilde değiştirilebilmektedir [113].

Morra et al,[114] çalışmalarında, titanyum yüzeyinde etilen plazma yoluyla hidrokarbon tabakası oluşturarak, yüzeyin homojenliği, retansiyonu ve plak oluşumu üzerinde olumlu sonuçlar elde etmişlerdir.

Vargas et al [115], dental implantlar üzerinde monomer kullanmadan yük boşalım tekniği uygulamışlardır. Bu çalışmada argon gazının plazma haline gelip yüzeydeki organik kirlilikleri temizlediği, yüzey enerjisini artırarak ıslanabilirliği ve dolayısıyla doku adezyon kabiliyetini güçlendirdiği gözlenmiştir.

İnorganik yüzeyler üzerinde, plazma kullanarak polimerik film oluşturulan Johnson ve arkadaşlarının çalışmasında [116], hücre adezyonu bakımından olumlu sonuçlar bildirilmiştir.

Çökeliler' in in vitro çalışmasında[37], titanyum üzerinde ilk defa denenen, –OH ve –SH grupları içeren tiyol içerikli monomerin tip 2 saf titanyum üzerinde başarıyla polimerleştirilebildiği ve kararlı bir yüzey oluşturduğu görülmüştür. Yüzeyi modifiye edilen örneklerde, ortopedik implantlarda enfeksiyon riski oluşturan Staphylococcus epidermis' in yüzeye bağlanmasının azaldığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda yüzey modifikasyon yöntemi olarak yük boşalımı ile düşük sıcaklıkta plazma polimerizasyon yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntemle, inorganik titanyum yüzeyi üzerinde organik ince bir film oluşturulmaktadır. Literatürde, bu çalışmada kullanılan plazma polimerizasyon yüzey kaplama yönteminin dental malzemeler üzerinde uygulanabilirliğinin ve sonuçlarının incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada plazma polimerizasyon yöntemiyle elde edilen yüzeyin, dental implantlarda transmukozal bölgede erken dönem mikroorganizmaların bağlanması üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada kullanılan yöntemin en önemli avantajı uniform ve ince kaplamalar elde edilebilmesidir. Bu nedenle bu yöntem, hassas olarak üretilmiş implant-dayanak bağlantısı bozulmadan dayanağın dişeti ile komşu olan yüzeyine uygulanabilir. Plazma ortamında polimerleştirilmiş tabakalar boşluksuz ve çapraz bağlıdır. Bu sebeple çözünmez, termal dengeli, kararlı ve mekanik dayanımı yüksek yapılar meydana gelir [117].

Bu çalışmada ince bir tabaka oluşturmak için Çökeliler' in çalışmasındaki süreler göz önüne alınmıştır. Çalışmalarında 15 dk depozisyon uygulamasının sonucunda ortalama 66 nm film kalınlığı oluşturulmuştur [37]. Genellikle plazma depozisyon boşalım gücü arttıkça polimer birikim miktarı artmaktadır[118]. Bu çalışmada farklı kalınlıklar ve yüzey pürüzlülüğü değerleri elde etmek amacıyla 4 farklı akım parametresi kullanılmıştır. Optimum boşalım gücü parametresine, hazırlanan filmin yapay tükürükte bekletilmesinden sonra film kalınlığındaki değişimi, yüzey topografisi değişimi, kimyasal yüzey değişimi sonuçlarına göre karar verilebilir. Ayrıca film topografisi, yüzey kimyası ve film kalınlık etmenlerinin mikrobiyolojik sonuçlara etkisinin değerlendirilmesi sağlanmıştır. Buna göre en az bakteri üremesi görülen 3. grupta belirlenen film kalınlığı ve pürüzlülük değerlerine göre optimum boşalım gücü 2.5kV olarak belirlenebilir.

Ti yüzeylerin bakteri yapışmasına uygun olduğu bilinmektedir. Ti yüzeyinde oluşan oksit tabaka tükürük ile reaksiyona girerek, bakterilerin yapışabildiği pelikül oluşumuna neden olur. Bu yüzden, oksit tabakanın sert kaplama materyalleriyle maskelenmesi, Ti yüzeylere bakteri birikimini azaltmak için iyi bir seçenektir [15].

Köklü'nün yaptığı tez çalışmasında *S. mutans*'ın yüzeye bağlanması değerlendirildiğinde, yüzey kaplaması yapılan tüm örneklerde plak oluşumunda belirgin azalma görülmüştür. Bakteri tutulumundaki azalma yüzey pürüzlülüğü ve daha çok reaktif titanyum oksit yüzeyinin maskelenmesi ile açıklanmıştır [20].

Çalışmamızda yüzey kaplaması yapılan örneklerde kontrol grubuna göre daha az sayıda bakteri tutulumu olduğu görülmüştür.

Yüzey pürüzlülüğü azaldıkça bakteri tutulumunun azalacağı birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamızda da en pürüzlü yüzeye sahip olan kontrol grubunda en fazla bakteri üremesi görülmüştür. Yapılan çalışmalarda $Ra:0,2$ 'nin altındaki yüzey pürüzlülüğünün bakteri tutulumunda fark yaratmayacağı ortaya koyulmasına rağmen bizim çalışmamızda bakteri kolonizasyonu açısından fark oluşmuştur. Ancak tüm örneklerde yüzey pürüzlülüğü değerlerinin $Ra < 0,2\mu m$ olması nedeniyle bakteri üremesindeki bu farklılığın yalnızca yüzey pürüzlülüğünden kaynaklanmadığı ve yüzey enerjisi, kimyası, stabilitesi gibi faktörlerin de etken olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan tiyol içerikli monomer kaplamalar, implant yüzeyinin kimyasal kompozisyonu değiştirerek daha stabil bir tabaka oluşturabilir ve bu tabaka antibakteriyal özellik gösterebilir [15].

S. mutans için bakteri tutulumuna bakıldığında 3. grupta üremenin diğer gruplara göre daha az olduğu görülmüştür. 3. grubun temas açısı $49,7^\circ$ dir. 1. ve 2. grubun temas açıları sırasıyla $12,1^\circ$ ve $16,5^\circ$ 'tur. Deney grupları arasında yüzey enerjilerinin farklı olmasının sebebi monomerde bulunan $-S$ ve $-OH$ uçlarının substrat üzerindeki konumuna bağlı olabilir. $-S$ ucu hidrofobik olup $-OH$ ucu hidrofilik özelliktedir. Buna göre hidrofilik özellik gösteren 1. ve 2. gruplarda en dış tabakada $-OH$ açık uçlarının bulunabileceği ve $-S$ uçlarının titanyum ile bağlantı yaptığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca temas açısı ölçümleri akım parametresinin değiştirilmesinin monomerin polimerleşirken çapraz bağ yerleşimini etkileyebileceğini göstermiştir. Bakteri adezyonu ve yüzey enerjisi ilişkilendirildiğinde 1 ve 2. grupta bakteri üremesi 3.

gruba göre daha fazladır ve 1. ve 2. grup oldukça hidrofilik yüzeye sahiptir. Böylece 1-2. grupta mutansın daha fazla üremesinin sebebi bakterinin ve yüzeyin hidrofilik olmasına bağlanabilir.

Bakterilerin türlerine göre değişen kendi yüzey enerjilerinin, katı yüzeye tutunmalarına etkisinin incelendiği Uyen ve arkadaşlarının çalışmasında [69], düşük yüzey serbest enerjisine sahip bakterilerin (örn: *S. mitis*) düşük enerjili katılara, yüksek yüzey serbest enerjisine sahip bakterilerin (örn: *S. mutans*) yüksek serbest enerjili yüzeylere daha fazla bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir.

Hidrofobik olan *S. sanguis*, kontrol grubuna göre daha hidrofobik yüzeye sahip olan 3. grupta *S. mutans*a göre daha fazla üremiştir. *S. sanguis*in *S. mutans*a göre daha fazla üremesi yine hidrofobik yüzeye yapışma yeteneğinin daha fazla olmasına bağlanabilir [96]. Öte yandan *S. mutans* ve *S. sanguis* kıyaslandığında ise kontrol grubunda *S. sanguis*, *S. mutans* grubuna göre yüzey enerjisi ile açıklanamayacak şekilde daha fazla üremiştir yani *S. sanguis*in hidrofobik bir bakteri olduğu göz önüne alınırsa hidrofilik yüzeye sahip olan kontrol grubunda *S. sanguis*in koloni sayısı *S. mutans*a göre daha fazladır. Yine hidrofilik yüzeye sahip olan *S. mutans*ın, *S. sanguis*e göre, hidrofilik yüzeye sahip olan 1. grupta daha fazla üremesi beklenirken tam tersi olacak şekilde daha az üremiştir. Bu durumun yüzey kimyasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. XPS analizlerine bakıldığında tüm gruplarda sülfür atomlarının olması örnekler üzerinde kaplama monomerinin polimer haline geldiği ve yüzeyde kaplama materyalinin olduğunu kanıtlamaktadır. Polimerizasyon aşamasında güç (akım) parametresinin farklı olması tüm gruplarda kalınlık, temas açısı ve pürüzlülük değerlerini farklı kılmaktadır. Akımın 2.5kV olduğu 3. grupta yüzey özelliklerinin daha kararlı olduğu, ayrıca tükürük sonrası kaybının diğer gruplara göre minimum olduğu düşünülürse bakteri besiyeri ve biyofilm tabakasından daha az etkilenmiş olması, yüzey kaybının minimum olması ve Ti oksit tabakayı hala örtüyor olması bakteri adezyonundaki azalmanın sebebi olabilir. Sonuç olarak Ti yüzeyde oluşturulan stabil, çözünmeyen ve Ti oksit tabakanın örtülü olması gibi etkenlerin yüzey enerjisi faktöründen daha etkili olabileceği görülmektedir.

AKM cihazıyla kalınlık ve pürüzlülük değerlendirildiğinde her grupta tükürük sonrası pürüzlülüğün arttığı ve kalınlığın azaldığı görülmektedir. Kalınlık azalması %14,9 kayıp ile en az 3. grupta görülmüştür. Buna göre yüzey stabilizasyonunun en iyi

olduğu grup 3. gruptur. 3. gruptaki örnekler üzerinde yapılan koloni sayımlarında en az üremenin olduğu tespit edilmiştir. Bu durum yüzeydeki bakteri kolonizasyonun oluşturduğu biyofilm tabakasının, kaplama film tabakasına minimum zarar vermesi ile ilişkilendirilebilir. Akımın 2kV olduğu 2. örnek grubunda yüzey pürüzlülüğü açısından kontrol grubuna göre azalma olmuşsa da yapay tükürük sonrası kalınlık değişiminde gözle görülecek kadar kayıp yaşanmıştır. Bu durum %100 kayıp olarak kabul edilmiştir. Ayrıca 2. örnek grubu kararlılık açısından değerlendirildiğinde yüzeyde element kaybı olması, en az kararlığa sahip olduğunu göstermektedir, nitekim tüm deney grupları arasında bu kaplama parametresine sahip örneklerde en fazla bakteri adezyonu görülmüştür yine de kontrol grubuna göre adezyonun az görülmesi tükürükle işlemin sonrasında kaplamanın tümüyle ortadan kalkmamasına bağlanmıştır

3. ve 4. gruplar ön ısıtma parametresi açısından farklılık göstermektedir. 3. grupta sadece 2.5kV akımla kaplama yapılmış, 4. grupta ise ön ısıtma sonrası aynı akımla kaplama yapılmıştır. Her 2 grubun bakteri kolonizasyonuna bakıldığında ise koloni sayısında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. 100°C'lik ön ısıtma işleminin plazma polimerizasyonunda bir katalizör görevi görmediği anlaşılmıştır. Ancak ısıtmanın yetersiz olması ya da ısıtma yapıldıktan sonra reaktöre transfer sırasında soğuma söz konusu olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu in vitro çalışmada, tiyol içerikli monomer ile plazma polimerizasyon yönteminin, implant materyali olarak sıklıkla kullanılan tip 4 saf titanyum üzerine uygulanabilirliği ve yüzey özelliklerinin değiştirilmesiyle bakteri tutulmasına etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Kaplanan yüzeyin fiziksel özellikleri AKM, XPS, temas açısı testi ile biyofilm oluşumu üzerine etkisi ise oluşan canlı *S. Mutans* ve *S. sanguis* kolonileri sayılarak incelenmiştir. Çalışmanın deneysel koşulları çerçevesinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Plazma polimerizasyon yöntemiyle tiyol içerikli monomerin polimerleştirildiği yüzeyler ve cilalı Ti disklerin yüzey topografileri AKM ile karşılaştırıldığında polimer kaplı yüzeyin diğer örneklerle göre belirgin derecede pürüzsüz olduğu görülmektedir.

Düşük yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak yüzey kaplaması yapılan diskler üzerine yapışan *S.mutans* ve *S.sanguis* miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir. Bakteri üremesindeki bu farklılığın yalnızca yüzey pürüzlülüğünden kaynaklanmadığı ve yüzey enerjisi, kimyası, stabilitesi gibi faktörlerin de etken olabileceği gösterilmiştir.

S. mutans ve *S. sanguis*in yüzeye bağlanması değerlendirildiğinde, yüzey kaplaması yapılan bazı örneklerde beklenen aksine plak oluşumunda belirgin azalma görülmüştür. Bakteri tutulumundaki bu beklenmeyen azalma, daha çok reaktif titanyum oksit yüzeyinin maskelenmesi ile açıklanmış, yüzey enerjisi ile ilişkilendirilememiştir. Aynı zamanda Ti yüzeyde oluşturulan stabil, çözünmeyen ve Ti oksit tabakanın örtülü olması gibi etkenlerin yüzey enerjisi faktöründen daha etkili olabileceği gösterilmiştir.

Farklı akım parametreleriyle kaplanan Ti disklerden 2.5 kV akımla kaplanan 3. deney grubunda 3 sa, 37°'lik tükürük ortamından sonra daha kararlı bir yüzeyin oluştuğu görülmüştür. Ancak tükürük içinde bekletilen kaplanmış yüzeylerin kararlılık tayininde bu sürenin yetersiz olabileceği ve ileri çalışmalarla ağız içi şartları daha iyi taklit edilmesi gerektiği belirtilmelidir.

Plazma polimerizasyon yönteminde ön ısıtmanın prosedür için bir katalizör görevi göreceği düşünülmese rağmen uygulanan ısının yüzeyde daha kaliteli film tabaka elde edilmesinde herhangi bir etkisinin görülmediği anlaşılmıştır.

Bu çalışmanın sınırlamaları dâhilinde plazma polimerizasyon kaplama yöntemiyle kararlı antibakteriyel yüzeyler oluşturulabileceği ve implant sağkalım oranının artırılabilceği sonucuna varılmıştır, ancak mekanik deneylere ve in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. QUIRYNEN, M., M. DE SOETE, D. VAN STEENBERGHE, *Infectious risks for oral implants: a review of the literature*. Clinical oral implants research, 2002. **13**(1): p. 1-19.
2. DRAKE, D.R., J. PAUL, J.C. KELLER, *Primary bacterial colonization of implant surfaces*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 1999. **14**(2): p. 226-32.
3. WOLINSKY, L.E., P.M. DE CAMARGO, J.C. ERARD, M.G. NEWMAN, *A study of in vitro attachment of Streptococcus sanguis and Actinomyces viscosus to saliva-treated titanium*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 1989. **4**(1): p. 27-31.
4. GRISTINA, A.G., *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration*. Science, 1987. **237**(4822): p. 1588-95.
5. PALMER, R.J., JR., S.M. GORDON, J.O. CISAR, P.E. KOLENBRANDER, *Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque*. Journal of bacteriology, 2003. **185**(11): p. 3400-9.
6. NAKAZATO, G., H. TSUCHIYA, M. SATO, M. YAMAUCHI, *In vivo plaque formation on implant materials*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 1989. **4**(4): p. 321-6.
7. SOCRANSKY, S.S., A.D. HAFFAJEE, M.A. CUGINI, C. SMITH, R.L. KENT, JR., *Microbial complexes in subgingival plaque*. Journal of clinical periodontology, 1998. **25**(2): p. 134-44.
8. GROESSNER-SCHREIBER, B., M. HANNIG, A. DUCK, M. GRIEPENTROG, D.F. WENDEROTH, *Do different implant surfaces exposed*

in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities?
European journal of oral sciences, 2004. **112**(6): p. 516-22.

9. BOS, R., H.C. VAN DER MEI, H.J. BUSSCHER, *Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study*. FEMS microbiology reviews, 1999. **23**(2): p. 179-230.
10. VAN DIJK, J., F. HERKSTROTTER, H. BUSSCHER, A. WEERKAMP, H. JANSEN, J. ARENDS, *Surface-free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs*. Journal of clinical periodontology, 1987. **14**(5): p. 300-4.
11. SCHRADER, M.E. ,G.I. LOEB, *Modern approaches to wettability : theory and applications*1992: Plenum. xxiii,451p.
12. SIPAHI, C., N. ANIL, E. BAYRAMLI, *The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials*. Journal of dentistry, 2001. **29**(3): p. 197-204.
13. QUIRYNEN, M. ,C.M. BOLLEN, *The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature*. Journal of clinical periodontology, 1995. **22**(1): p. 1-14.
14. WU-YUAN, C.D., K.J. EGANHOUSE, J.C. KELLER, K.S. WALTERS, *Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study*. The Journal of oral implantology, 1995. **21**(3): p. 207-13.
15. GROSSNER-SCHREIBER, B., M. GRIEPENTROG, I. HAUSTEIN, W.D. MULLER, K.P. LANGE, H. BRIEDIGKEIT, U.B. GOBEL, *Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study*. Clinical oral implants research, 2001. **12**(6): p. 543-51.
16. POTERA, C., *Forging a link between biofilms and disease*. Science, 1999. **283**(5409): p. 1837, 1839.

17. JEYACHANDRAN, Y.L., S.K. NARAYANDASS, D. MANGALARAJ, C.Y. BAO, P.J. MARTIN, *The effect of surface composition of titanium films on bacterial adhesion*. Biomedical materials, 2006. **1**(1): p. L1-5.
18. BRUNSKI, J.B., D.A. PULEO, A. NANCI, *Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 2000. **15**(1): p. 15-46.
19. HEALY, K.E. ,P. DUCHEYNE, *Hydration and preferential molecular adsorption on titanium in vitro*. Biomaterials, 1992. **13**(8): p. 553-61.
20. KÖKLÜ, S., *Tiyol içerikli plazma polimerizasyon tekniği ile yüzey koşulları değiştirilmiş titanyum implant materyalinin yüzey özelliklerinin ve bakteriyel tutuluma etkisinin incelenmesi*, in *Protetik diş tedavisi2009*, Başkent Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsü.
21. BECKER, M.J., *Ancient "dental implants": a recently proposed example from France evaluated with other spurious examples*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 1999. **14**(1): p. 19-29.
22. MISCH, C.E., *Dental implant prosthetics2005*, St. Louis, Mo. ; London: Elsevier Mosby. xix, 626 p.
23. RING, M.E., *A thousand years of dental implants: a definitive history--part 1*. Compendium of continuing education in dentistry, 1995. **16**(10): p. 1060, 1062, 1064 passim.
24. BRANEMARK, P.I., R. ADELL, U. BREINE, B.O. HANSSON, J. LINDSTROM, A. OHLSSON, *Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies*. Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery, 1969. **3**(2): p. 81-100.
25. ZARB, G.A. ,A. SCHMITT, *The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: the Toronto study. Part III: Problems and*

- complications encountered*. The Journal of prosthetic dentistry, 1990. **64**(2): p. 185-94.
26. LANGE, K., M. HEROLD, L. SCHEIDELER, J. GEIS-GERSTORFER, H.P. WENDEL, G. GAUGLITZ, *Investigation of initial pellicle formation on modified titanium dioxide (TiO₂) surfaces by reflectometric interference spectroscopy (RIfS) in a model system*. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials, 2004. **20**(9): p. 814-22.
27. SCHWARZ, F., D. FERRARI, M. HERTEN, I. MIHATOVIC, M. WIELAND, M. SAGER, J. BECKER, *Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs*. Journal of periodontology, 2007. **78**(11): p. 2171-84.
28. ; Available from: <http://www.nobelbiocare.com>.
29. WATAHA, J.C., *Materials for endosseous dental implants*. Journal of oral rehabilitation, 1996. **23**(2): p. 79-90.
30. ALBREKTSSON, T., P.I. BRANEMARK, H.A. HANSSON, J. LINDSTROM, *Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man*. Acta orthopaedica Scandinavica, 1981. **52**(2): p. 155-70.
31. ALBREKTSSON, T., P. BRANEMARK, H. HANSSON, B. KASEMO, K. LARSSON, J. LINDSTRÖM, *The interface zone of inorganic implant in vivo. Titanium implants in bone*. Annals of biomedical engineering, 1983. **11**(1): p. 1-27.
32. WANG, R.R. ,A. FENTON, *Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature*. Quintessence international, 1996. **27**(6): p. 401-8.

33. DONLEY, T.G. ,W.B. GILLETTE, *Titanium endosseous implant-soft tissue interface: a literature review*. Journal of periodontology, 1991. **62**(2): p. 153-60.
34. LINDHE, J., T. KARRING, N.P. LANG, *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4th ed. ed2003, Oxford ; Malden, Mass.: Blackwell Munksgaard. xxiv, 1044 p.
35. LYNGSTADAAS SP, E.J., SPAHR A, SLABY I. , *Inducing bone growth using extracellular matrix proteins*. . The Bio-implant Interface; Improving Biomaterials and Tissue Reactions., ed. L.S. In:Ellingsen JE, editors2003, Boca Raton: CRC Press LLC.
36. YOSHINARI, M., Y. ODA, T. KATO, K. OKUDA, *Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro*. Biomaterials, 2001. **22**(14): p. 2043-8.
37. COKELILER, D., H. GOKTAS, P.D. TOSUN, S. MUTLU, *Infection free titanium alloys by stabile thiol based nanocoating*. Journal of nanoscience and nanotechnology, 2010. **10**(4): p. 2583-9.
38. ITO, E., K. KONNO, J. NOH, K. KANAI, Y. OUCHI, K. SEKI, M. HARA, *Chain length dependence of adsorption structure of COOH-terminated alkanethiol SAMs on Au(111)*. Applied Surface Science, 2005. **244**(1-4): p. 584-587.
39. H., Y., *Plasma polymerization for protective coatings and composite membranes*. Journal of Membrane Science, 1983. **18**: p. 273-284.
40. TUSEK L., N.M., WERNER C., STANA-KLEINSCHEK K., RIBITSCH V., *Surface characterisation of NH3 plasma treated polyamide 6 foils*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **195**: p. 81-95.

41. AKMAN, M.A., *Mechanical Properties of Plasma Surface Modified Calcium Carbonate/PP Composites*, in *The Graduate School of Natural and Applied Science*1993, Middle East Technical University: Ankara.
42. CANDAN, Ş., *Çelik Yüzeylerin Silikon Temelli RF Plazma Filmler ile Kaplanması*. Mühendis ve Makina, 2002. **43**(512): p. 21-27.
43. FLOSCH, D., CLAROTTI, G., GECKELER, K. E., SCHUE, F., GOPEL, W., *Characterization of plasma-treated poly (hydroxybutyrate) membrane surfaces by ESCA and contact angle measurements*. Journal of Membrane Science, 1992. **73**: p. 163-172.
44. COKELILER, D., *Aflatoksin tayini için plazma polimerizasyon yöntemi ile kütle hassas immünoşansör hazırlanması* in *GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı*2006, Hacettepe üniversitesi: Ankara.
45. MEYER, G., AND AMER, N. M., *Novel optical approach to atomic force microscopy*. App.Phy. Lett., 1998. **53**(12): p. 1045-1047.
46. WENNERBERG, A. ,T. ALBREKTSSON, *Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 2000. **15**(3): p. 331-44.
47. YILDIZ A., G.Ö., *Enstrümental Analiz Teknikleri* 1993: H.Ü yayınları A-46.
48. RATNER , B.D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN F.J. LEMONS, J.E., *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*1996, New york: Academic Pres, Inc.
49. N., A., *Dental materyallerin ıslanabilirliği*. . Hacettepe Diş hek fak. Derg., 1997. **21**: p. 84-91.
50. N., S., *Genel Histoloji*1992, İstanbul: İstanbul üniversitesi basımevi ve film merkezi.

51. DONLAN, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerging infectious diseases, 2002. **8**(9): p. 881-90.
52. DONLAN, R.M. ,J.W. COSTERTON, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clinical microbiology reviews, 2002. **15**(2): p. 167-93.
53. SUTHERLAND, I., *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 1): p. 3-9.
54. VUONG, C. ,M. OTTO, *Staphylococcus epidermidis infections*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2002. **4**(4): p. 481-9.
55. SUBRAMANI, K., R.E. JUNG, A. MOLENBERG, C.H. HAMMERLE, *Biofilm on dental implants: a review of the literature*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 2009. **24**(4): p. 616-26.
56. KOHAVI, D., A. KLINGER, D. STEINBERG, M.N. SELA, *Adsorption of salivary proteins onto prosthetic titanium components*. The Journal of prosthetic dentistry, 1995. **74**(5): p. 531-4.
57. FURST, M.M., G.E. SALVI, N.P. LANG, G.R. PERSSON, *Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants*. Clinical oral implants research, 2007. **18**(4): p. 501-8.
58. LEE, A. ,H.L. WANG, *Biofilm related to dental implants*. Implant dentistry, 2010. **19**(5): p. 387-93.
59. RIMONDINI, L., S. FARE, E. BRAMBILLA, A. FELLONI, C. CONSONNI, F. BROSSA, A. CARRASSI, *The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium*. Journal of periodontology, 1997. **68**(6): p. 556-62.

60. SARDIN, S., J.J. MORRIER, G. BENAY, O. BARSOTTI, *In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties*. Journal of oral rehabilitation, 2004. **31**(2): p. 140-8.
61. MABBOUX, F., L. PONSONNET, J.J. MORRIER, N. JAFFREZIC, O. BARSOTTI, *Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study*. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2004. **39**(4): p. 199-205.
62. BERRY, C.W., T.J. MOORE, J.A. SAFAR, C.A. HENRY, M.J. WAGNER, *Antibacterial activity of dental implant metals*. Implant dentistry, 1992. **1**(1): p. 59-65.
63. LEONHARDT, A., J. OLSSON, G. DAHLEN, *Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite, and amalgam surfaces in vivo*. Journal of dental research, 1995. **74**(9): p. 1607-12.
64. LEONHARDT, A., G. DAHLEN, *Effect of titanium on selected oral bacterial species in vitro*. European journal of oral sciences, 1995. **103**(6): p. 382-7.
65. XU, M.F., S. LIN, X.M. CHEN, Y.Z. PENG, *Studies on characteristics of nanostructure of N-TiO₂ thin films and photo-bactericidal action*. Journal of Zhejiang University. Science. B, 2006. **7**(7): p. 586-90.
66. SUKETA, N., T. SAWASE, H. KITaura, M. NAITO, K. BABA, K. NAKAYAMA, A. WENNERBERG, M. ATSUTA, *An antibacterial surface on dental implants, based on the photocatalytic bactericidal effect*. Clinical implant dentistry and related research, 2005. **7**(2): p. 105-11.
67. CLARKE, J.K., *On the bacterial factor in the aetiology of dental caries*. Br. J. Exp. Pathol., 1924. **5**: p. 141-147.

68. HAMADA, S., H.D. SLADE, *Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans*. Microbiological reviews, 1980. **44**(2): p. 331-84.
69. UYEN H. M., B.H.J., WEERKAMP A.H., ARENDS J., *Surface free energies of oral streptococci and their adhesion to solids*. . FEMS Microbiol Lett 1985. **30**: p. 103-106.
70. ZHU, L., J. KRETH, S.E. CROSS, J.K. GIMZEWSKI, W. SHI, F. QI, *Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in Streptococcus mutans*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 8): p. 2395-404.
71. TODAR, K. *Structure and Function of Bacterial Cells* Online Textbook of Bacteriology 2011; Available from:
<http://textbookofbacteriology.net/structure.html>.
72. CARLSSON, J., *Zooglea-forming streptococci, resembling Streptococcus sanguis, isolated from dental plaque in man*. Odontologisk revy, 1965. **16**(4): p. 348-58.
73. XU, P., J.M. ALVES, T. KITTEN, A. BROWN, Z. CHEN, L.S. OZAKI, P. MANQUE, X. GE, M.G. SERRANO, D. PUIU, S. HENDRICKS, Y. WANG, M.D. CHAPLIN, D. AKAN, S. PAIK, D.L. PETERSON, F.L. MACRINA, G.A. BUCK, *Genome of the opportunistic pathogen Streptococcus sanguinis*. Journal of bacteriology, 2007. **189**(8): p. 3166-75.
74. PAIK, S., L. SENTY, S. DAS, J.C. NOE, C.L. MUNRO, T. KITTEN, *Identification of virulence determinants for endocarditis in Streptococcus sanguinis by signature-tagged mutagenesis*. Infection and immunity, 2005. **73**(9): p. 6064-74.
75. KRETH, J., J. MERRITT, W. SHI, F. QI, *Competition and coexistence between Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis in the dental biofilm*. Journal of bacteriology, 2005. **187**(21): p. 7193-203.

76. SBORDONE, L. ,C. BORTOLAIA, *Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease*. Clinical oral investigations, 2003. **7**(4): p. 181-8.
77. MOMBELLI, A., *Microbiology of the dental implant*. Advances in dental research, 1993. **7**(2): p. 202-6.
78. THEILADE, E. ,J. THEILADE, *Formation and ecology of plaque at different locations in the mouth*. Scandinavian journal of dental research, 1985. **93**(2): p. 90-5.
79. MISCH, C.E., *Contemporary Implant Dentistry*. 2. Edition. ed1999, Michigan: Mosby.
80. MARSH, P.D., *Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries*. Dental clinics of North America, 1999. **43**(4): p. 599-614, v-vi.
81. VAN LOOSDRECHT, M.C., J. LYKLEMA, W. NORDE, A.J. ZEHNDER, *Influence of interfaces on microbial activity*. Microbiological reviews, 1990. **54**(1): p. 75-87.
82. BUSSCHER, H.J., A.H. WEERKAMP, H.C. VAN DER MEI, A.W. VAN PELT, H.P. DE JONG, J. ARENDS, *Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion*. Applied and environmental microbiology, 1984. **48**(5): p. 980-3.
83. VAN PELT, A.W., A.H. WEERKAMP, M.H. UYEN, H.J. BUSSCHER, H.P. DE JONG, J. ARENDS, *Adhesion of Streptococcus sanguis CH3 to polymers with different surface free energies*. Applied and environmental microbiology, 1985. **49**(5): p. 1270-5.
84. W., L., *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji*. 8. baskı Lange Medical Books ed2006: Güneş Kitapevi

85. VAN DER MEI HC, L.A., WEERKAMP AH, ROUXHET PG, BUSSCHER HJ, *Properties of oral streptococci relevant for adherence: Zeta potential, surface free energy and elemental composition*. Coll Surf, 1988a. **32**: p. 297-305.
86. VAN DER MEI HC, W.A., BUSSCHER HJ *Physico-chemical surface characteristics and adhesive properties of Streptococcus salivarius strains with defined cell surface structures*. FEMS Microbiol Lett, 1987. **40**: p. 15-19.
87. VAN DER MEI, H.C., A.J. LEONARD, A.H. WEERKAMP, P.G. ROUXHET, H.J. BUSSCHER, *Surface properties of Streptococcus salivarius HB and nonfibrillar mutants: measurement of zeta potential and elemental composition with X-ray photoelectron spectroscopy*. Journal of bacteriology, 1988. **170**(6): p. 2462-6.
88. VAN DER MEI, H.C., J. NOORDMANS, H.J. BUSSCHER, *Molecular surface characterization of oral streptococci by Fourier transform infrared spectroscopy*. Biochimica et biophysica acta, 1989. **991**(3): p. 395-8.
89. KOLENBRANDER PE, L.J., ed. *Ecological significance of coaggregation among oral bacteria*. In: *Advances in microbial ecology*. 12th Ed ed., ed. e. Marshall KC1992, Plenum Press: New York.
90. BUSSCHER, H.J. ,H.C. VAN DER MEI, *Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation*. Advances in dental research, 1997. **11**(1): p. 24-32.
91. ELLEN, R.P., H. VEISMAN, I.A. BUIVIDS, M. ROSENBERG, *Kinetics of lactose-reversible coadhesion of Actinomyces naeslundii WVU 398A and Streptococcus oralis 34 on the surface of hexadecane droplets*. Oral microbiology and immunology, 1994. **9**(6): p. 364-71.

92. BUSSCHER, H.J., R. BOS, H.C. VAN DER MEI, *Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion*. FEMS microbiology letters, 1995. **128**(3): p. 229-34.
93. MARSH PD, B.B., WATSON GK, ALLISON C, ed. *Community development in a mixed species oral biofilm*. The life and death of biofilm, ed. H.P. Wimpenny J, Gilbert P, Lappin-Scott H, editors 1995, Bioline: Cardiff.
94. BOS R, V.D.M.H., DE VRIES J, BUSSCHER HJ, *The role of physico-chemical and structural surface properties in co-adhesion of microbial pairs in a parallel plate flow chamber*. Coll SurfB: Biointerfaces, 1996. **7**: p. 101-112.
95. RITZ, H.L., *Microbial population shifts in developing human dental plaque*. Archives of oral biology, 1967. **12**(12): p. 1561-8.
96. BEIGHTON, D., H. HAYDAY, J. WALKER, *The acquisition of Streptococcus mutans by infant monkeys (Macaca fascicularis) and its relationship to the initiation of dental caries*. Journal of general microbiology, 1982. **128**(8): p. 1881-92.
97. GOKTAS, H., M. UDREA, G. OKE, A. ALACAKIR, A. DEMIR, J. LOUREIRO, *Self-confinement of a fast pulsed electron beam generated in a double discharge*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2005. **38**(16): p. 2793-2797.
98. SHANNON, I.L., *Fluoride treatment programs for high-caries-risk patients*. Clinical preventive dentistry, 1982. **4**(2): p. 11-20.
99. LOE, H., E. THEILADE, S.B. JENSEN, *Experimental Gingivitis in Man*. The Journal of periodontology, 1965. **36**: p. 177-87.
100. HICKEY, J.S., R.B. O'NEAL, M.J. SCHEIDT, S.L. STRONG, D. TURGEON, T.E. VAN DYKE, *Microbiologic characterization of ligature-induced peri-*

- implantitis in the microswine model*. Journal of periodontology, 1991. **62**(9): p. 548-53.
101. LINDHE, J., T. BERGLUNDH, I. ERICSSON, B. LILJENBERG, C. MARINELLO, *Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog*. Clinical oral implants research, 1992. **3**(1): p. 9-16.
102. LANG, N.P., U. BRAGGER, D. WALTHER, B. BEAMER, K.S. KORNMAN, *Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings*. Clinical oral implants research, 1993. **4**(1): p. 2-11.
103. BERGHLUND, T., ed. *Soft tissue interface and response to microbial challenge*. Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology, ed. K.T. In: Lang N.P, Lindhe 1999, Quintessence: Berlin. 153-174.
104. AMOROSO, P.F., R.J. ADAMS, M.G. WATERS, D.W. WILLIAMS, *Titanium surface modification and its effect on the adherence of Porphyromonas gingivalis: an in vitro study*. Clinical oral implants research, 2006. **17**(6): p. 633-7.
105. PERENI, C.I., Q. ZHAO, Y. LIU, E. ABEL, *Surface free energy effect on bacterial retention*. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2006. **48**(2): p. 143-7.
106. MCCRACKEN, M., *Dental implant materials: commercially pure titanium and titanium alloys*. Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists, 1999. **8**(1): p. 40-3.
107. ROSENTRITT, M., M. BEHR, R. BURGERS, A.J. FEILZER, S. HAHNEL, *In vitro adherence of oral streptococci to zirconia core and veneering glass-ceramics*. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials, 2009. **91**(1): p. 257-63.

108. WHITTAKER, C.J., C.M. KLIER, P.E. KOLENBRANDER, *Mechanisms of adhesion by oral bacteria*. Annual review of microbiology, 1996. **50**: p. 513-52.
109. SHAHAL, Y., D. STEINBERG, Z. HIRSCHFELD, M. BRONSHTEYN, K. KOPOLOVIC, *In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials*. Journal of oral rehabilitation, 1998. **25**(1): p. 52-8.
110. KAWAI, K. ,M. URANO, *Adherence of plaque components to different restorative materials*. Operative dentistry, 2001. **26**(4): p. 396-400.
111. KRAMER, A.W., H. GEIS GERSTORFER, J., *Plaquesammlung an implantat und prosthetischen Werkstoffen-eine klinische Studie*. Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie 1989: p. 283-286.
112. MUTLU M, S.M.B., ALP İ.H, BOYACI VE E. PIŞKIN, *Preperation of a single layer enzyme electrode by plasma polymerization technique in plasma processing of polymers*. NATO ASI series, ed. R.D.A. (ed)1997, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
113. BRUNETTE D.M, T.P., TEXTOR M, THOMSEN P. , *Titanium in medicine*2001, Heidelberg: New york:Springer-Verlag Berlin
114. MORRA, M. ,C. CASSINELLI, *Organic surface chemistry on titanium surfaces via thin film deposition*. Journal of biomedical materials research, 1997. **37**(2): p. 198-206.
115. VARGAS, E., R.E. BAIER, A.E. MEYER, *Reduced corrosion of CP Ti and Ti-6Al-4V alloy endosseous dental implants after glow-discharge treatment: a preliminary report*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 1992. **7**(3): p. 338-44.
116. JOHNSON, S.D., J.M. ANDERSON, R.E. MARCHANT, *Biocompatibility studies on plasma polymerized interface materials encompassing both*

hydrophobic and hydrophilic surfaces. Journal of biomedical materials research, 1992. **26**(7): p. 915-35.

117. HATTORI, S., TAMANO, J., MORITA S. YONEDA K, *Vacuum lithography-A completely dry lithography using plasma processing*. plasma chemistry and plasma processing, 1981. **1**: p. 261-269.
118. KAMINSKA, A., KACZMAREK, H., KOWALONEK, J., *The influence of side groups and polarity of polymers on the kind and effectiveness of their surface modification by air plasma action*,. European Polymer Journal, 2002. **38**: p. 1915-1919.