



Atmosferik Soğuk Plazma İle  
Titanyum Dental İmplant  
Malzemelerinde Elde Edilen Yüzey  
Özelliklerinin Stabilitesinin  
Değerlendirilmesi

Biyomedikal Teknolojiler Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Gencay Yasav

ORCID 0000-0002-3955-5017

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Utku Kürşat Ercan

Eylül 2021

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi **Gencay Yasav** tarafından hazırlanan **Atmosferik Soğuk Plazma İle Titanyum Dental İmplant Malzemelerinde Elde Edilen Yüzey Özelliklerinin Stabilitésinin Değerlendirilmesi** başlıklı bu çalışma tarafımızca okunmuş olup, yapılan savunma sınavı sonucunda kapsam ve nitelik açısından başarılı bulunarak jürimiz tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**ONAYLAYANLAR:**

**Tez Danışmanı:** **Doç. Dr. Utku Kürşat Ercan** .....  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Eş Danışman:** **Doç. Dr. Ozan Karaman** .....  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Jüri Üyeleri:**

**Dr. Öğr. Üyesi Nermin Topaloğlu Avşar** .....  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Doç. Dr. Şükrü Enhoş** .....  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Prof. Dr. Aydın Akan** .....  
İzmir Ekonomi Üniversitesi

**Savunma Tarihi: 02.09.2021**

# Yazarlık Beyanı

Ben, **Gencay Yasav**, başlığı **Atmosferik Soğuk Plazma İle Titanyum Dental İmplant Malzemelerinde Elde Edilen Yüzey Özelliklerinin Stabilesinin Değerlendirilmesi** olan bu tezimin ve tezin içinde sunulan bilgilerin şahsıma ait olduğunu beyan ederim. Ayrıca:

- Bu çalışmanın bütünü veya esası bu üniversitede Yüksek Lisans derecesi elde etmek üzere çalıştığım süre içinde gerçekleştirilmiştir.
- Daha önce bu tezin herhangi bir kısmı başka bir derece veya yeterlik almak üzere bu üniversiteye veya başka bir kuruma sunulduysa bu açık biçimde ifade edilmiştir.
- Başkalarının yayımlanmış çalışmalarına başvurduğum durumlarda bu çalışmalara açık biçimde atıfta bulundum.
- Başkalarının çalışmalarından alıntıladığımda kaynağı her zaman belirttim. Tezin bu alıntılar dışında kalan kısmı tümüyle benim kendi çalışmamdır.
- Kayda değer yardım aldığım bütün kaynaklara teşekkür ettim.
- Tezde başkalarıyla birlikte gerçekleştirilen çalışmalar varsa onların katkısını ve kendi yaptıklarımı tam olarak açıkladım.

İmza:

---

Tarih:

02.09.2021

---

# Atmosferik Soğuk Plazma İle Titanyum Dental İmplant Malzemelerinde Elde Edilen Yüzey Özelliklerinin Stabilitesinin Değerlendirilmesi

## ÖZ

Diş implantlarının sayısı giderek artmakta ve peri-implantitis diş hekimliğinde yaygın bir sorun haline gelmektedir. Başarılı implant tedavisi, hızlı, güvenli ve öngörülebilir osseointegrasyona dayanır. Kemik-implant etkileşimini geliştirmek için çeşitli yüzey modifikasyonları yapılmıştır. ASP (Atmosferik Soğuk Plazma) maddenin dördüncü hali olup iyonize bir gazdır. ASP atmosferik basınçta, oda sıcaklığında yüksek manyetik alan uygulanması sonucu elde edilebilir. ASP'nin tıpta birçok uygulaması mevcuttur ve bunlardan biriside dental implantlardır. ASP muamelesinin implantlarda gerek yüzey pürüzlülüğünü gerekse yüzey hidrofilitisini arttırarak hücre yapışmasını ve proliferasyonunu arttırdığı yani osseointegrasyon süresini kısalttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda diş hekimliğinde implant ve implantasyon bölgesinde de sterilasyonu sağlamaktadır. Bu çalışmada ASP muamelesi sonrası titanyum implant malzemelerindeki yüzey özelliklerinin farklı saklama koşullarına da bağlı kalarak ne kadar süre ile muhafaza edildiği değerlendirilmiştir. Bu bağlamda ASP muamelesi sonrası salin, oda koşulları ve inert ortamda; 1 ay, 3 ay, 6 ay, 1 yıl ve 2 yıl süre ile muhafaza edilen titanyum disklerde çeşitli yüzey karakterizasyon ve hücrel çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ASP muamelesinin yüzey pürüzlülüğünde herhangi bir değişiklik yapmazken hidrofilitiyi arttırarak serum fizyolojik (salin) içerisinde 2 yıl boyunca saklanan titanyum disklerdeki hücre canlılığının hala devam ettiği gözlemlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Atmosferik soğuk plazma; Tıbbi plazma; Dental implant; Osseointegrasyon; Biyomedikal mühendisliği.

# Evaluation of the Stability of Surface Properties Obtained in Titanium Dental Implant Materials by Cold Atmospheric Plasma

## Abstract

The number of dental implants is increasing and peri-implantitis is becoming a common problem in dentistry. Successful implant treatment relies on fast, safe and predictable osseointegration. Various surface modifications such as etching, hydroxyapatite coating, sandblasting, sol-gel, plasma spray have been made to improve the bone-implant interaction. CAP (Cold Atmospheric Plasma) is the fourth state of matter and is an ionized gas. CAP can be obtained at atmospheric pressure, at room temperature, by applying a high magnetic field. ASP has many applications in medicine and one of them is dental implants. It has been observed that ASP treatment increases cell adhesion and proliferation by increasing the surface roughness and surface hydrophilicity of the implants, that is, it has been shorted the osseointegration time. It also provides sterilization in the implant and implantation area in dentistry. In this study, it was evaluated how long the surface properties of titanium implant materials are preserved after ASP treatment, depending on different storage conditions. In this context, various surface characterization and cellular studies were carried out on titanium discs kept for certain periods of time under certain storage conditions after ASP treatment. According to the results obtained, it was observed that while the ASP treatment did not make any changes in the surface roughness, it increased the hydrophilicity and kept the cell viability in the titanium discs stored for 2 years in serum physiological (saline).

**Keywords:** Cold atmospheric plasma; Plasma medicine; Dental implant; Osseointegration; Biomedical Engineering.

*Aileme*

# Teşekkür

İlk olarak, çalışmalarım boyunca çok kıymetli rehberliği, desteği ve sabrı için danışmanım Doç. Dr. Utku Kürşat Ercan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalara süresince değerli vaktini ayırdığı için Doç. Dr. Ozan Karaman'a teşekkür ederim.

Bu tezi 2018-ÖDL-MÜMF-0019 proje numarasıyla destekleyen İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Ayrıca deneyler sırasındaki yardımlarından dolayı Ar. Gör. Gizem Dilara Özdemir ve Ar. Gör. Günnur Onak'a teşekkür ederim.

İzmir'deki hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen Münevver Bilginer, Ferhat Oğuzalp, Fadime Kübra Budak ve Ayşe Çomak'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman desteklerini hissettiğim aileme, annem Vesiye Yasav, babam Yusuf Yasav, kardeşim Selinay Yasav ve kıymetli amcam Ramazan Yasav'a teşvikleri ve anlayışları için teşekkür ederim.

Eylül 2021

Gencay Yasav

# İçindekiler

Yazarlık Beyanı .....	ii
Öz .....	iii
Abstract .....	iv
Teşekkür .....	vi
Şekiller Listesi .....	x
Kısaltmalar Listesi .....	xiii
Semboller Listesi .....	xv
<b>1 Giriş .....</b>	<b>1</b>
1.1 Atmosferik Soğuk Plazma .....	1
1.1.1 Dielektrik Bariyer Deşarj (DBD) Plazma Sistemi .....	4
1.1.2 Plazma Kimyası .....	6
1.1.3 Tıbbi Plazma .....	7
1.1.3.1 Plazmanın Antimikrobiyal Etkinliği .....	8
1.1.3.2 Pıhtılaşma .....	10
1.1.3.3 Yara İyileşmesi .....	11
1.1.3.4 Plazmanın Antikanser Etkinliği .....	13
1.1.3.5 Plazmanın Dental Uygulamaları .....	14
1.2 Dental İmplantlar .....	15
1.2.1 Osseointegrasyon .....	17
1.3 Çalışmanın Amacı .....	18



<b>2 Gereç ve Yöntem .....</b>	<b>19</b>
2.1 Titanyum Disklerin Hazırlanması .....	19
2.2 Plazma Uygulaması .....	19
2.2.1 Optimum Plazma Uygulama Süresinin Belirlenmesi .....	20
2.3 Yüzey Karakterizasyonu .....	21
2.3.1 Hızlandırılmış Yaşlandırma .....	21
2.3.2 Yüzey Pürüzlülüğü Ölçümü .....	22
2.3.3 Protein Adsorpsiyonu .....	23
2.3.4 X-Işını Kırınımı .....	25
2.3.5 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi .....	25
2.3.6 Taramalı Elektron Mikroskopisi .....	25
2.4 In vitro Testler .....	26
2.4.1 Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi .....	26
2.4.2 Hücre Morfolojisinin İncelenmesi .....	27
2.5 İstatistiksel Analiz .....	28
<b>3 Sonuçlar .....</b>	<b>29</b>
3.1 Optimum Plazma Uygulama Süresinin Belirlenmesi .....	29
3.2 Temas Açısının Değerlendirilmesi .....	30
3.3 Yüzey Pürüzlülüğünün Değerlendirilmesi .....	30
3.4 Protein Adsorpsiyonu .....	31
3.5 X-Işını Kırınımı .....	32

3.6 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi .....	33
3.7 Taramalı Elektron Mikroskopisi (TEM) .....	34
3.8 Hücre Canlılığının Belirlenmesi .....	35
3.9 Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi .....	36
<b>4 Tartışma ve Sonuç .....</b>	<b>38</b>
Kaynaklar .....	42
Ek.....	56
Özgeçmiş .....	57

# Şekiller Listesi

Şekil 1.1	Çeşitli sıcaklık ve yoğunluk aralıklarında plazmanın varlığı [2].....	1
Şekil 1.2	Plazma sınıflandırması [6] .....	2
Şekil 1.3	Plazma türleri: bariyer deşarj(1), korona(2), mikrop plazma dizileri(3), plazma jet(4), kayan ark(5), ark jet(6), meşale(7), ark(8) [6] .....	2
Şekil 1.4	Bilim, teknoloji ve endüstrinin çeşitli alanlarındaki termal olmayan plazma uygulamaları [16] .....	4
Şekil 1.5	Dielektrik Bariyer Deşarj(DBD) plazma konfigürasyonları [24] .....	5
Şekil 1.6	Canlı doku ile doğrudan temas halinde olan Yüzen Elektrot Dielektrik Bariyer Deşarj (FE-DBD) plazmasının fotoğrafı [26] .....	6
Şekil 1.7	Atmosferik soğuk plazma muamelesi olmadan ve 5 dakika muameleden sonra 1 saat temas süresinin ardından bakteriyel hücrelerin taramalı elektron mikroskopu görüntüleri: <i>P. aeruginosa</i> (a, b), <i>V. paraheamolyticus</i> (c, d), <i>E. coli</i> (e, f), <i>L. monocytogenes</i> (g, h) ve <i>S. aureus</i> (i, j). Büyütme: × 25.000. Çalışma gazı bileşimi: 90:10 argon/ oksijen oranı. Beyaz oklar, bakteri hücreleri üzerindeki önemli hasarları gösterir [45] .....	9
Şekil 1.8	ASP'nin antimikrobiyal etkinliğinin mekanizmaları [49] .....	10
Şekil 1.9	(a) Kontrol ve plazma ile muamele edilen yaralarda 3, 7, 10 ve 14. günlerdeki tam kalınlıktaki deri yaralarının ve sonraki yara küçülmesinin temsili fotoğrafları. Ölçek çubuğu: 1 cm. (b) Kontrol ve plazma ile muamele edilen yaralardaki yara alanının ölçümü. Ortalama ± TEM, *p <0.005, **p <0.001 [77] ...	13
Şekil 1.10	Doğal diş(sol) ve implant(sağ) karşılaştırılması [99] .....	16
Şekil 1.11	Titanyum ve alaşımlarının mekanik özellikleri [104].....	16

Şekil 1.12	Diş implantlarının osseointegrasyonu için zaman çizelgesi [106].....	17
Şekil 2.1	Dielektrik Bariyer Deşarj(DBD) Elektrot.....	20
Şekil 2.2	60° de Ti dislerin hızlandırılmış yaşlandırma grafiği.....	22
Şekil 2.3	Protein adsorpsiyonunun belirlenmesinde kullanılan standart .....	24
Şekil 2.4	Absorbans- hücre sayısı kalibrasyon eğrisi.....	27
Şekil 3.1	Temas açısı- plazma uygulama süresi grafiği. Belirtilen gruplar arasındaki karşılaştırma için *P<0.05.....	29
Şekil 3.2	Temas açısının saklama koşulları ve sürelerine bağlı değişimi. Belirtilen gruplar arasındaki karşılaştırma için *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005.....	30
Şekil 3.3	Ti disklerin saklama koşullarına bağlı yüzey pürüzlülüğü değişimi. Belirtilen gruplar için P>0.05.....	31
Şekil 3.4	Ti disklerin saklama koşullarına bağlı protein konsantrasyonu değişimi. Belirtilen gruplar arasındaki karşılaştırma için P>0.05. ....	32
Şekil 3.5	Kontrol ve belirlenen diğer grupların X-ışını kırınım diyagramları .....	33
Şekil 3.6	Kontrol ve belirlenen diğer grupların C, O ve Ti atomik yüzdeleri.....	34
Şekil 3.7	Ti yüzeylerin TEM fotoğrafları: kontrol(a); 0.gün plazma uygulaması(b); oda koşulları(1 ay)(c); inert ortam(1 ay)(d); salin(1 ay)(e); salin(2 yıl)(f). Ölçek=10µm .....	35
Şekil 3.8	Kontrol ve plazma ile muamele edilen grupların hücre sayısının inkübasyon süresine bağlı değişimi. Belirtilen gruplar arasındaki karşılaştırma için P=0.05. ....	36
Şekil 3.9	Deney gruplarının mikroskopik görüntüleri: (a) Kontrol, (b) 0. Gün plazma uygulaması, (c) oda koşulları (1 ay), (d) inert ortam (1 ay), salin (2 yıl).....	37

# Tablolar Listesi

Tablo 3.1 Kontrol ve belirlenen grupların bağlanma enerjileri.....	34
--	----

# Kısaltmalar Listesi

AC	Alternatif akım
APK	Argon plazma koagülasyon
ASP	Atmosferik soğuk plazma
BCA	Bisinkoninik asit
KİT	Kemik implant teması
BSA	Sığır serum albümini
C	Karbon
CO	Karbonmonoksit
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
Cu <sup>+2</sup>	Bakır iyonu
Cu <sup>+1</sup>	Bakır katyonu
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DBD	Dielekrik bariyer deşarj
DNA	Deoksiribonükleik asit
FBS	Fetal sığır serumu
FE-DBD	Yüzen(Floating) elektrot-dielekrik bariyer deşarj
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
IL-1	İnterlökin
ITBD	Dişler arası kemik yoğunluğu (Interthread bone density)
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium
NO	Nitrit oksit
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit

$\text{NO}_3^-$	Nitrat
$\text{NO}_x$	Nitrik oksit
$\text{O}_3$	Ozon
$\text{O}$	Atomik oksijen
$^1\text{O}_2$	Tekli oksijen
$^*\text{O}_2$	Yarı kararlı oksijen
$\cdot\text{OH}$	Hidroksil radikali
$\text{ONOO}^-$	Peroksinitrit
PBS	Fosfat tamponlu salin
RDG	Arginin-glisin aspartik asit
RNT	Reaktif nitrojen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
TDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
TEM	Taranalı elektron mikroskopisi
$T_e$	Elektron sıcaklığı
$T_g$	Gaz sıcaklığı
TGF- $\beta$	Transforme edici büyüme faktörü
$\text{TiO}_2$	Titanyumdioksit
Ti	Titanyum
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör
UV	Ultraviyole
XPS	X- ışını fotoelektron spektroskopisi
XRD	X- ışını kırınımı

# Semboller Listesi

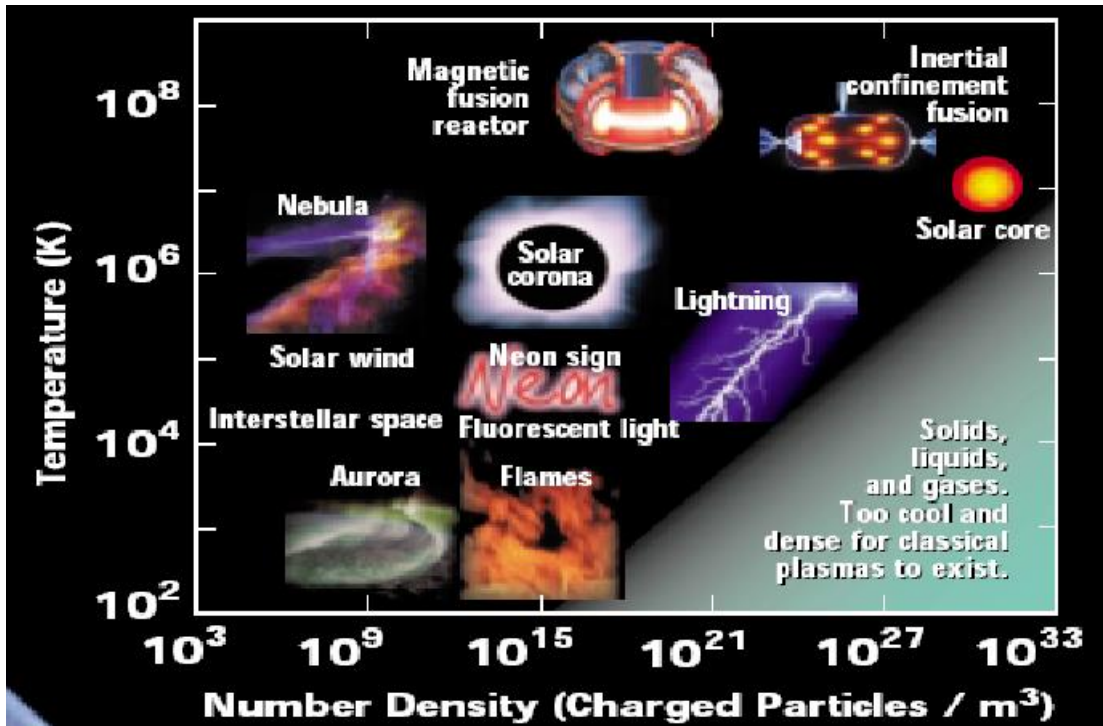
$^{\circ}\text{C}$	Derece
$2\theta$	Derece
$eV$	Elektron volt
$kV_{rms}$	Etkin kilovolt
$kHz$	Kilohertz
$kV$	Kilovolt
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
$\text{mL}$	Mililitre
$\text{mm}$	Milimetre
$\text{mm}^2$	Milimetre kare
$\text{nm}$	Nanometre
$\text{rpm}$	Dakikadaki devir sayısı



# 1 Giriş

## 1.1 Atmosferik Soğuk Plazma

Plazma, iyonlar, elektronlar, nötr parçacıklar, ultraviyole ışınımı, serbest radikaller ve kimyasal olarak reaktif nötr parçacıklardan oluşan elektriksel olarak nötr, tamamen ya da kısmen iyonize bir gazdır [1]. İlk kez Amerikalı kimyager Irving Langmuir tarafından. 1920' lerde tanımlanmıştır. Bilinen evrenin %99' u plazma haldedir. Plazma doğada güneş koronası, güneş rüzgarı, nebula, Dünya'nın iyonosferi ve Aurora Borealis gibi birçok biçimde bulunur [Şekil 1.1].



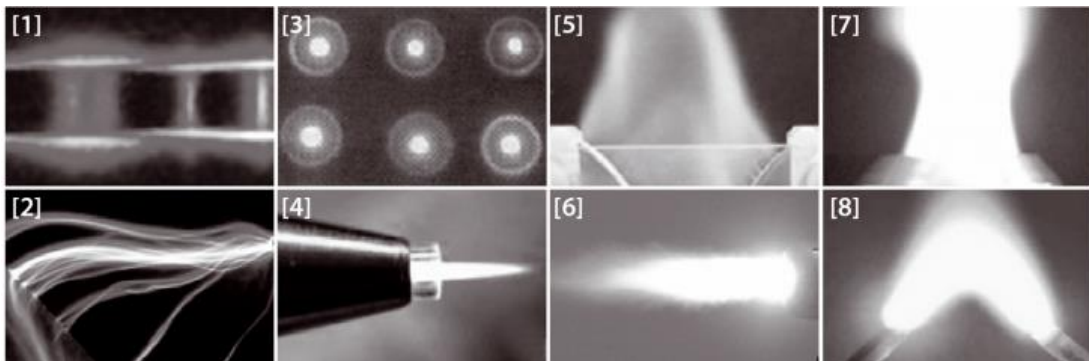
Şekil 1.1: Çeşitli sıcaklık ve yoğunluk aralıklarında plazmanın varlığı [2]

Şekil 1.2’de görüldüğü gibi plazma üretildiği sıcaklık ve koşullara göre soğuk plazma olarak da adlandırılan termal olmayan ve termal plazma olarak sınıflandırılabilir [3]–[5]. Termal olmayan plazmada gazın tamamen iyonlaşması nedeniyle gaz sıcaklığı elektron sıcaklığına eşittir ( $T_e=T_g$ ). Bu tür plazma çok yüksek sıcaklıklara ulaşır ve örneğin termonükleer füzyon reaksiyonlarında yer alır. Tersine termal olmayan plazma, termodinamik dengeden uzak, zayıf bir iyonize gazdır. Elektron sıcaklığı 1-10 eV iken, elektronlar harici olarak uygulanan bir elektrik alanından kazandıkları kinetik enerjinin tamamını daha büyük parçacıklara aktaramazlar ve bu nedenle gazın sıcaklığı düşük kalır ( $T_e \gg T_g$ ).

Termal Olmayan Plazmalar		Termal Plazmalar
"Soğuk" Termal Olmayan Plazma	Geleneksel "Sıcak" Plazmalar	
$T_i \approx T_g \approx 300 \dots 400 \text{ K}$ $T_i \ll T_e < 10^5 \text{ K (10 eV)}$	$T_i \ll T_e \leq 10^4 \dots 10^5 \text{ K}$ $T_i \approx T_g \leq 4 \cdot 10^3 \text{ K}$	$T_i \approx T_g \approx T_e$ $T_x < 5 \cdot 10^3 \dots 10^4 \text{ K}$

Şekil 1.2: Plazma sınıflandırması [6]

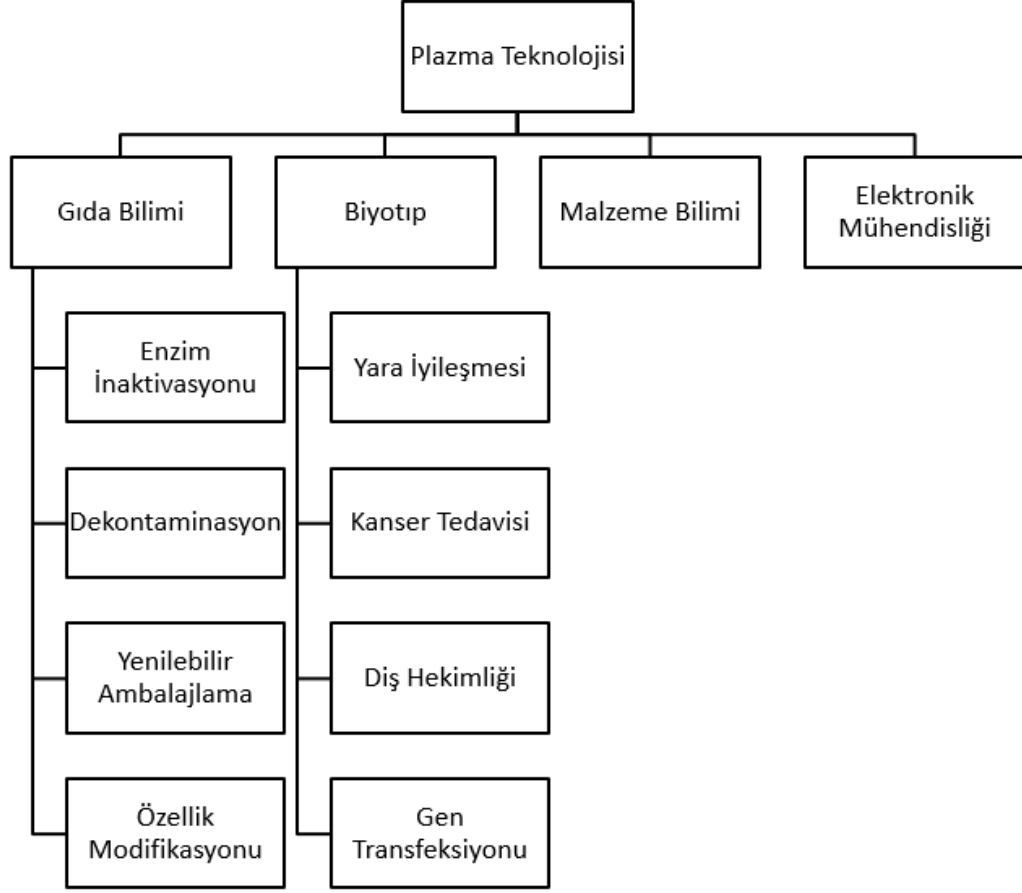
Atmosferik soğuk plazma (ASP), oda sıcaklığında veya yakın sıcaklıkta kaldığı, termal olmayan bir plazmadır [7]. Nötr gaz sıcaklıklarındaki farklılıklar ile ilgili olarak, termal plazmalar, kaynak, kesme veya püskürtme gibi ısıl işlemin gerekli olduğu uygulamalar için yaygın olarak uygulanır [7],[8]. Şekil 1.3’deki gibi korona deşarjı, DBD (Dielektrik Bariyer Deşarj), atmosferik basınçlı plazma jeti, elektron ışınları, plazma iğnesi, mikrodalga deşarjları, alternatif akım (AC) altında çalışan veya darbeli dahil olmak üzere plazma üretmek için çeşitli elektrik güç kaynakları geliştirilmiştir [7],[9]–[11].



Şekil 1.3: Plazma türleri: bariyer deşarj(1), korona(2), mikroplazma dizileri(3), plazma jet(4), kayan ark(5), ark jet(6), meşale(7), ark(8) [6]

Genel olarak ASP cihazları elektrot konfigürasyon özelliklerine ve tedavi için kullanım şekillerine göre direkt, indirekt ve hibrit plazma kaynakları olarak sınıflandırılabilir. Direkt plazma kaynaklarında hedef alan ve doku karşı elektrot olarak kullanılır ve elektrik devresini entegre eder. Direkt plazma muamelesinde muamele edilen malzeme doğrudan plazma deşarjına maruz kalır. İndirekt plazma kaynaklarında plazmayı oluşturmak için iki elektrottan yararlanır ve bir gaz akışı yoluyla hedefe plazma ürünlerinin bu gaz akışı ile ulaştırılması sağlanır. Hibrit plazma kaynakları ise oluşturulan akım hedef alanı geçmediği için dolaylı, plazma üretim tekniği ile doğrudan plazma kaynakların özelliğini birleştirir [12],[13].

ASP uygulamaları elektrik mühendisliğinden gıda sektörüne malzeme biliminde biyotıbbaya kadar birçok alanda kullanılmaktadır [Şekil 1.4]. Günlük hayatta bilgisayar çipleri, plazma televizyon, floresan ve yüksek yoğunluklu deşarj lambaları, plazma ile muamele edilmiş tekstil ve polimer kaynaklama, su ve hava temizleme gibi birçok üründe karşımıza çıkar [14],[15]. Bu tezde de plazmanın biyomedikal alanında dental uygulamaları ile ilgili çalışılmıştır.

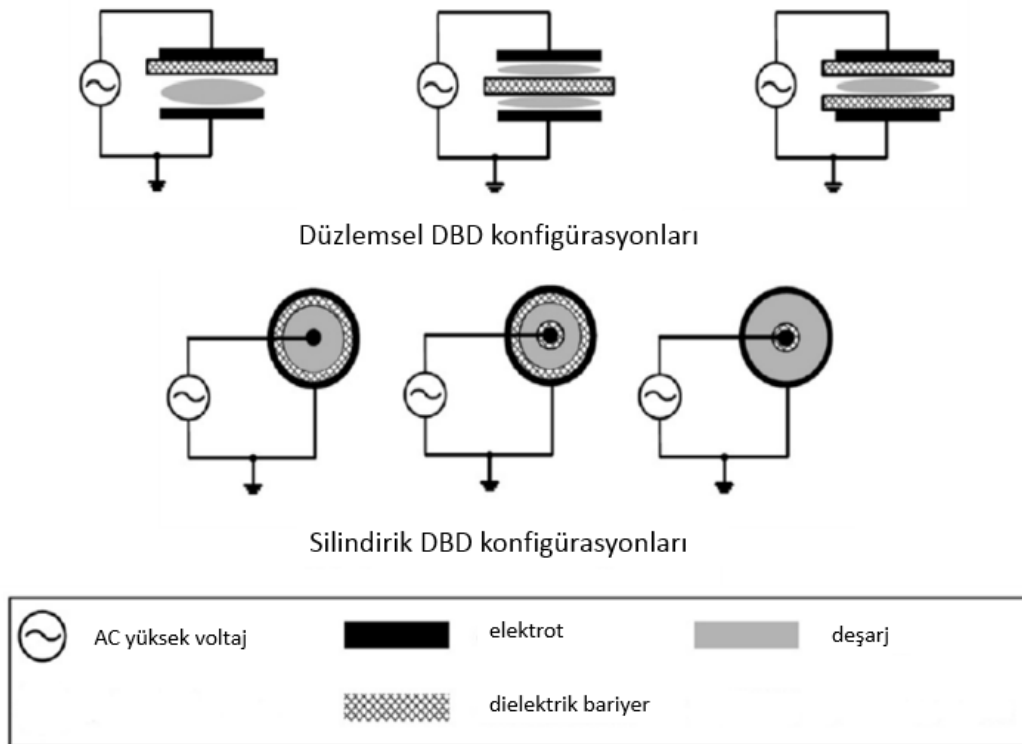


Şekil 1.4: Bilim, teknoloji ve endüstrinin çeşitli alanlarındaki termal olmayan plazma uygulamaları [16]

### 1.1.1 Dielektrik Bariyer Deşarj (DBD) Plazma Sistemi

DBD, cam, kuartz, seramik, epoksi resin gibi yalıtkan bir dielektrik malzeme ile ayrılmış iki elektrot arasındaki AC deşarjıdır ve besleme gazı olarak çoğunlukla atmosferik hava [17],[18] kullanılır. Bu deşarjlar 0,05-500 kHz frekans aralığında ve 1-100kV<sub>rms</sub> voltaj aralığında çalıştırılır. DBD, en az biri dielektrik malzeme ile kaplanmış iki metal elektrot arasında üretilir ve DBD konfigürasyonları düzlemsel ve silindirik olmak üzere ikiye ayrılır [Şekil 1.5]. Ayrıca elektrotların her ikisinde dielektrik malzemeyle yalıtılmışsa yüzey dielektrik bariyer deşarj olarak adlandırılır ve elektrot yüzeylerinde sadece mikro-deşarj üretir. Eğer elektrotların sadece biri dielektrik malzeme ile yalıtılmışsa hacimsel dielektrik bariyer deşarjı olarak adlandırılır ve plazma elektrotlar arasında üretilir. Burada kullanılan dielektrik malzemeler hem filamentlerde spark oluşumunu engeller hem de mikro deşarjları tüm

elektrot alanına dağıtır. Ayrıca dielektrik malzemenin cinsi farklı türlerin yoğunluğu ve enerji seviyesi gibi deşarj ölçülerini etkiler [19]. DBD, yüzey işleme [20], polimerlerin plazma destekli kimyasal buhar birikimi [21], bakteri inaktivasyonu [22], CO ve NO<sub>x</sub>'ten çıkan egzoz dumanlarını temizleyerek kirlilik kontrolünde, biyomedikal cihazların sterilizasyonunda [23] ve atık su arıtma gibi endüstride geniş bir uygulamaya sahiptir.



Şekil 1.5: Dielektrik Bariyer Deşarj(DBD) plazma konfigürasyonları [24]

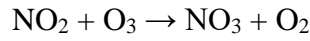
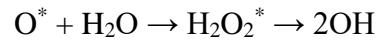
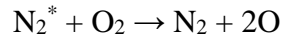
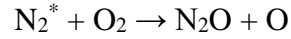
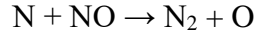
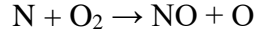
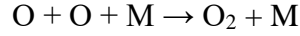
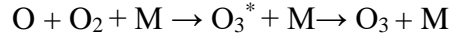
DBD plazmayı canlı dokuya uygulayabilmek için yüzen (floating) elektrot-dielektrik bariyer deşarj(FE-DBD) plazma geliştirilmiştir. Yüzey dielektrik bariyer deşarj plazmadaki toprak elektrodunun yerini canlı doku alır ve doku ile elektrot arasında plazma oluşur [Şekil 1.6]. Yani doku/hücreler karşı elektrot olarak çalışır. FE-DBD plazma canlı dokuların yüzeyine yerleştirilmede esnek olduğu ve termal hasar yaratmadığı için canlı doku ve biyolojik sistemlere doğrudan muameleye izin verir. Üretilen mikro deşarjlar, canlı doku veya cilt yüzeyinde ortaya çıkar ve tıbbi tedavide böylelikle tıbbi tedavide kullanılır. Özellikle belirli kan proteinleri üzerindeki seçici etkilerin tetiklemesi ile kan pıhtılaşmasını indüklediği gösterilmiştir [25].



Şekil 1.6: Canlı doku ile doğrudan temas halinde olan Yüzen Elektrot Dielektrik Bariyer Deşarj (FE-DBD) plazmasının fotoğrafı [26]

### 1.1.2 Plazma Kimyası

Plazma üretimi esnasında ozon( $O_3$ ), atomik oksijen (O), süperoksit ( $O_2^-$ ), tekli oksijen ( $^1O_2$ ), yarı kararlı oksijen( $^*O_2$ ), hidroksil radikali( $\cdot OH$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi kısa ömürlü reaktif oksijen türleri, nitrik oksit (NO), nitrit ( $NO_2^-$ ), nitrat ( $NO_3^-$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi reaktif nitrojen türlerine ek olarak UV gibi enerjik fotonlar, yüklü ve yüksüz parçacıklar gibi birçok aktif tür üretilir. Hepsi sinerjik olarak katkıda bulunan kimyasal olarak reaktif bu plazma bileşikleri, temel plazma kimyasını oldukça karmaşık hale getirir. Ancak bu türlerin oluşumu ise şu şekilde açıklanabilir; elektrotlar arasında bulunan gazda elektrik alan veya elektrik enerjisi uygulandığında elektronlar daha yüksek enerjili elde edilsin diye biriktirilir. Bu elektronların ortam gaz atomları ve molekülleri ile çarpışması ve sonuçta ortam gazının elektron kaybetmesi nedeniyle pozitif yüklü atomik ve moleküler iyon oluşumu meydana gelir. Plazma üretimi esnasında açığa çıkan bu türler ASP'nin biyolojik aktivitesinin temel parçasıdır. Plazma deşarjında meydana gelen bazı değişimler aşağıdaki gibi açıklanabilir:



Özellikle ROT, birçok biyolojik makromolekül ile reaksiyona girerek oksidatif yapısal modifikasyona ve biyolojik işlevlerinin kaybına neden olabilir [27]. Hücresel düzeyde, ROT büyüme, apoptoz ve diğer sinyal süreçlerini düzenler [28]. Ayrıca, ROT, ölümcül strese karşı bakteriyel yanıtta en önemli ajanlar olarak ortaya çıkmaktadır. Halen süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalının etkileri incelenmektedir.

RNT, canlı sistemler için hem zararlı hem de faydalı olabilir. Düşük konsantrasyonlarda, RNT sinyalleşmede düzenleyici bir aracı olarak önemli bir rol oynayabilir. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda, RNT canlı organizmalar için zararlı olabilir ve önemli hücresel molekülleri inaktive edebilir [29]. Nitrik oksit, fizyolojik süreçlerin önemli bir düzenleyicisidir ve süperoksit ile reaksiyonun son ürünü olarak nitrit peroksit üretir [30],[31].

### 1.1.3 Tıbbi Plazma

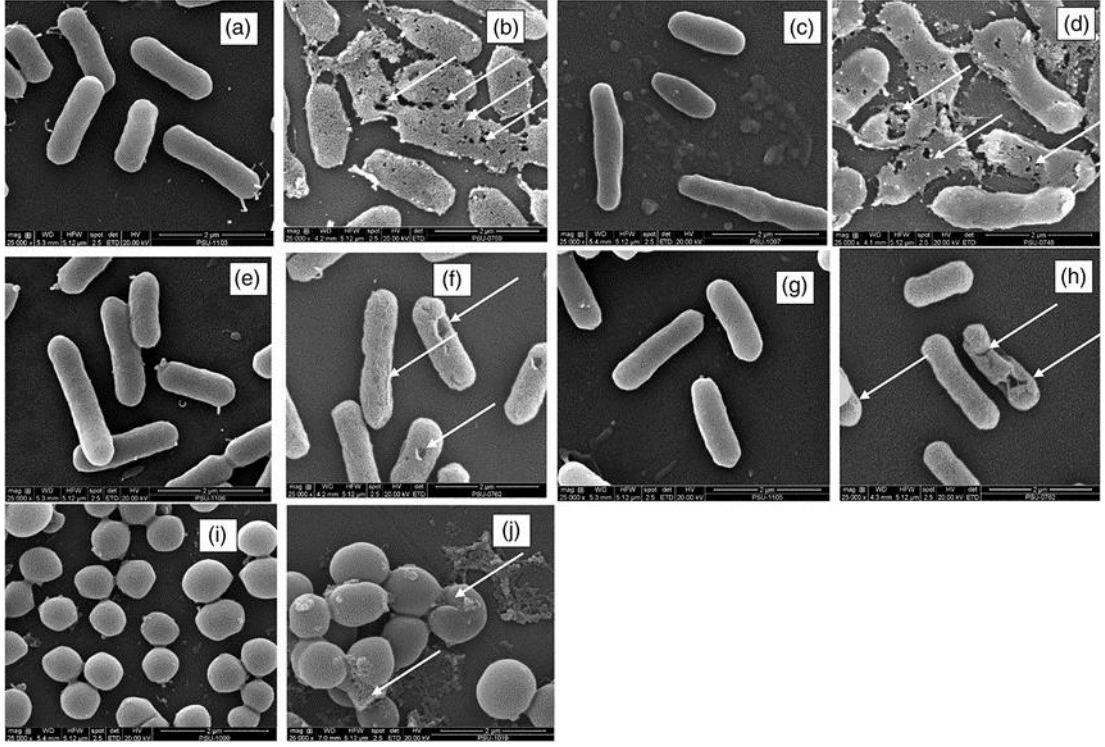
Plazma tıbbı, plazma fiziği ve klinik tıbbı birleştiren yenilikçi bir araştırma alanıdır. Esas olarak terapötik ortamlarda atmosferik soğuk plazma (ASP) uygulamasına odaklanmıştır. Plazmanın çeşitli kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) oluşturulması yoluyla oksidatif ve nitratif stresleri arttırmak için kullanılabilen ve sonucunda seçici olarak kanser hücrelerini öldüren çeşitli reaktif türler üretir [32],[33]. Sağlıklı hücrelerde ise ASP uygulamasının hücre

proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir [34]. Dermatolojide de plazma tıbbı yüzey modifikasyonu ve sterilizasyonu için ve ayrıca enfekte ve iltihaplı cilt hastalıklarının tedavisi için kullanılmıştır [35],[36].Ayrıca yapılan çalışmalarda , plazmanın tıpta dental ekipman gibi potansiyel klinik uygulamalarını ve implant tedavisine ek olarak kan pıhtılaşmasını ve yara iyileşmesini terapötik olarak geliştirdiğini göstermiştir [37],[38].

### 1.1.3.1 Plazmanın Antimikrobiyal Etkinliği

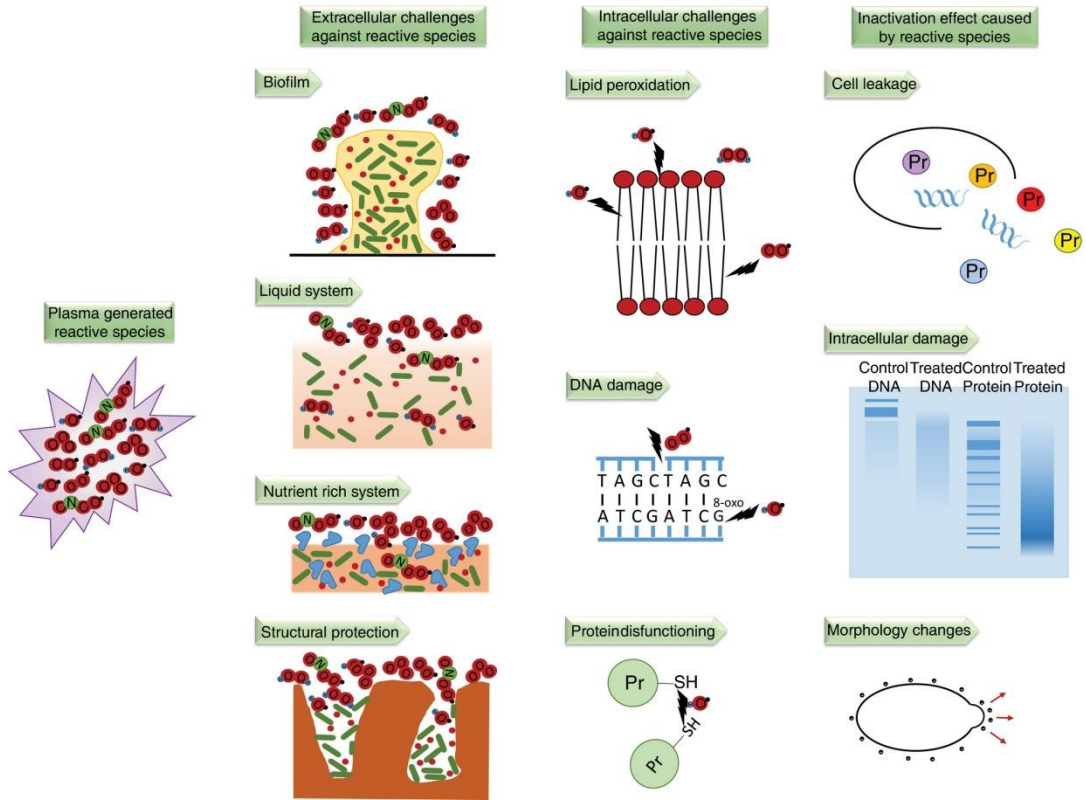
ASP tıpta dezenfeksiyon [39], kronik yaraların tedavisi [40], diş hekimliğinde kanalların sterilizasyonunda [41] ve endüstride gıda dezenfeksiyonu olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır. Tüm bu alanlardaki sterilizasyonu ASP uygulaması sonucu açığa çıkan pozitif ve negatif iyonlar, nötr atomlar, reaktif moleküller, yarı kararlı radikaller ve fotonlar yapmaktadır. Bu bileşenler mikroorganizmaları öldürmek için ve biyofilm matrisini bozmak için sinerjik olarak çalışabilirler [42]. ROT ve RNT mikroorganizmalarda, lipid peroksidasyonu, hücre duvarı erozyonu, hücre zarı bozulması, DNA ve RNA'da hasarı ve apoptoza neden olabilir [43],[44]. şelil 1.7'de de çeşitli patojen hücrelerinin membranlarının ASP uygulaması sonucundaki değişimi görölmektedir.





Şekil 1.7: Atmosferik soğuk plazma muamelesi olmadan ve 5 dakika muameleden sonra 1 saat temas süresinin ardından bakteriyel hücrelerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri: *P. aeruginosa* (a, b), *V. parahaemolyticus* (c, d), *E. coli* (e, f), *L. monocytogenes* (g, h) ve *S. aureus* (i, j). Büyütme:  $\times 25.000$ . Çalışma gazı bileşimi: 90:10 argon/ oksijen oranı. Beyaz oklar, bakteri hücreleri üzerindeki önemli hasarları gösterir [45]

Gerçekten de gösterildiği gibi plazma tarafından üretilen yüklü parçacıklar ve RNT, bakteri hücrelerinin duvarlarının, kaplamalarının ve zarlarının bütünlüğünü büyük ölçüde bozabilir [46]–[48]. Son yıllarda ASP sterilizasyonun olası reaksiyonlarını anlamak için pek çok adım atılmasına rağmen sürecin büyük kısmı belirsizliğini korumaktadır çünkü bu süreç çok çeşitli mekanizmaları içerir.



Şekil 1.8: ASP'nin antimikrobiyal etkinliğinin mekanizmaları [49]

### 1.1.3.2 Pıhtılaşma

Plazma tıbbında araştırılan bir diğer konu kan pıhtılaşması ve hemostaz uygulamalarıdır [50]. ASP muamelesi ile açığa çıkan reaktif oksijen türleri (ROT) kan pıhtılaşmasında önemli bir basamak olan eritrosit-trombosit etkileşimlerinin aktivasyonlarını tetikler [51] ve trombosit fonksiyonu ve agregasyonu bu türlerden etkilenir [52],[53]. Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile ASP'nin termal doku hasarı olmadan kan pıhtılaşmasını uyarmada etkisi olduğu gözlemlenmiştir ancak temeldeki biyokimyasal mekanizmalar [54] anlaşılammıştır. Yapılan bir çalışmada DBD uygulamasının sitratlı tam kan numunelerini direkt uygulanması aracılığıyla 15 saniyede pıhtılaştırabileceğini gösterilmiştir, bu plazma muamelesi olmayan kan numunesi için 15 dakikadan çok daha kısa sürer [51],[55]. Bir diğer çalışmada ise hava plazma spreynin taşıdığı bol oksijen sayesinde sodyum sitratla antikoagüle edilmiş tam kan numunelerini 20 saniye daha kısa bir sürede pıhtılaştırabileceği gösterilmiştir, plazma muamelesi yapılmayan kan numunesi için 30 dakikadan daha az sürer [56]–[60]. Yine bir başka çalışmada ise argon ve helyum plazmanın ardışık

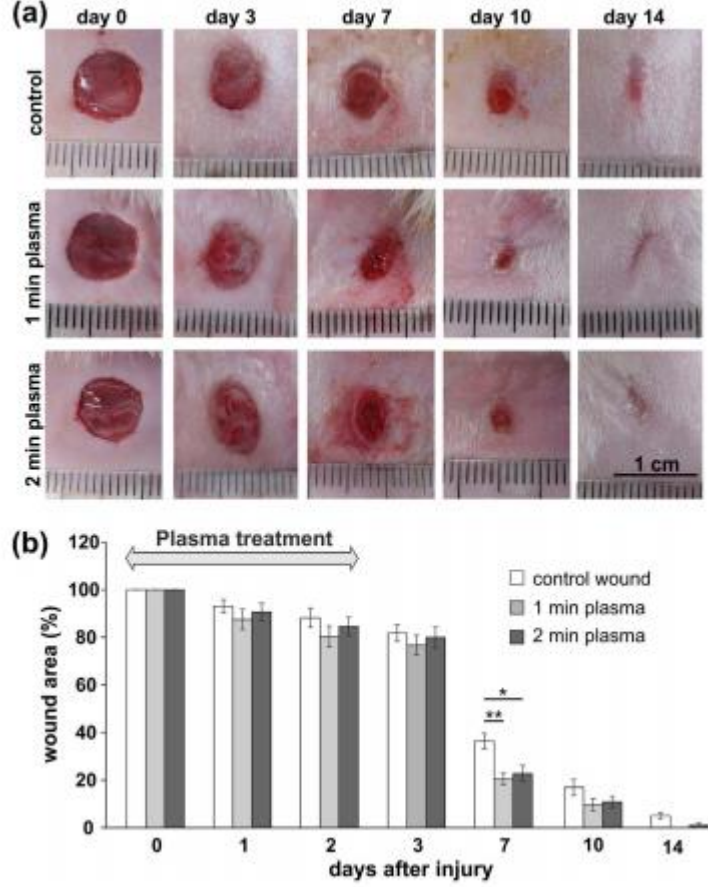
olarak uygulandığı plazma iğnesi ile muamele edilen hayvan yarasında önce pıhtılaşma sonrasında ise yara kapanmasının uyarıldığı gözlemlenmiştir [61]. Tüm bu çalışmalarda da gözlemlendiği gibi ASP uygulanmasının kanamayı durdurup, pıhtı oluşumunu indüklerken [55],[51] aynı zamanda da sterilize etme kabiliyetine sahiptir.

Tüm bu in vitro ve in vivo deneylerin haricinde klinikte de uygulaması olan argon gaz deşarjlarının bir uygulaması olan argon plazma koagülasyon(APK), genel cerrahi [62] başta olmak üzere, laparoskopi [63], torakoskopi [64], jinekoloji [65] cerrahi başta olmak üzere pek çok alanda yıllardır kullanılan bir elektrokoagülasyon yöntemidir. APK'nun kan damarlarının ve insan dokusunun pıhtılaşmasında etkili olduğu kanıtlanmıştır. APK dokuda temassız ve yüzeysel termal etkilere [66] sahip olduğu için elektrocerrahide çoğunlukla tercih sebebidir

### 1.1.3.3 Yara İyileşmesi

Yara, herhangi bir travma sonucu dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıdır ve doku hasar derinliğine göre erozyon, ülser ve fissür olarak tanımlanır. Yara iyileşmesi ise bütünlüğü bozulan dokunun düzenli ve sıralı, hücresel, biyokimyasal ve fizyolojik olaylar sonucunda yeni doku oluşturmasına denir. Yara iyileşmesi sırasıyla birbirini takip eden hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodeling olmak üzere 4 fazdan oluşur. Hemostaz; yaralanmadan hemen sonra bölgedeki kanamayı durdurmak için oluşan ilk fizyolojik yanıttır. Trombosit agregasyonu, degranülasyon, vasküler daralma ve son olarak fibrin oluşumuyla sonuçlanır [67]. Hemostazda pıhtılaşma için önemli olan TDGF, TGF- $\beta$ , FGF gibi büyüme faktörleri salgılanır [68]. İnflamasyon; mikroorganizmalardan kaynaklanır ve ilk olarak yaraya nötrofillerin infiltrasyonu gerçekteşir ardından makrofajlar ve lökositler gelir[69]. Lökosit göçleri TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 ve faktör-IV gibi büyüme faktörleri tarafından uyarılır[70]. Nötrofil ve lökositler bakterilerileri yok ederken makrofajlar büyüme faktörlerinin salgılanmasını sağlarlar. Proliferasyon inflamasyon ile örtüşmektedir ve yeni kan damarlarının oluştuğu anjiyojenez, hücre dışı matris birikimi için kolajen sentezi ve yeniden epitelizasyondan oluşur [71]. Remodeling ise yara iyileşmesinin son aşaması olarak bilinir ve kolajen ve vasküler yapının yeniden yapılanmasını içerir [72]. Tüm yara iyileşmeleri bu fazları içerir ancak akut ve kronik yara olması bağlı olarak onarım süresi ve iyileşme sürekliliği değişebilir.

ASP' nin antimikrobiyal aktivitesinden dolayı klinikte yaralarda ve dokularda mikrobiyal yük azalmasıyla gösterilmiştir [73],[74]. Kronik diyabetik farelerin yaralarında yapılan çalışmada helyum atmosferik basınç-DBD plazma jet muamelesinin anjiyojenez aktivitesini desteklediği, yara dokusu oluşumunu sınırladığı, kolajen oluşumunu hızlandırdığı ve sonuçta kronik yara iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna ulaşılmıştır [75]. Sprague-Dawley (SD) farelerinin sırtlarına 2x2 cm'lik yaralar oluşturularak yapılan deneyde ise kısa süreli ve düşük doz termal olmayan plazma jet yara tedavisinin, hayati organ toksisitesi olmadan farelerde yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir [76]. ASP 'nın sıçanlarda tam kalınlıktaki akut deri yara modelinin iyileşmesi üzerindeki etkisi incelenmiştir ve iyileşmenin erken evresinde (1-3.gün) gruplar arasında yara kapanmasında bir fark bulunmamasına rağmen, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında Şekil 1.9 hem 1 dakika hem de 2 dakika boyunca plazma muamelesinin 7. günde yara kapanmasını anlamlı şekilde iyileştirdiği ve 14.günde yaralar tamamen kapatıldığı gözlemlenmiştir [77]. Bu çalışmaların sonuçları, ASP muamelesi sonrası yara iyileşmesinin sadece mikrobiyal yük azalmasına değil, aynı zamanda doku rejenerasyonunun doğrudan uyarılmasına da bağlı olduğunu göstermektedir [78].



Şekil 1.9: (a) Kontrol ve plazma ile muamele edilen yaralarda 3, 7, 10 ve 14. günlerdeki tam kalınlıktaki deri yaralarının ve sonraki yara küçülmesinin temsili fotoğrafları. Ölçek çubuğu: 1 cm. (b) Kontrol ve plazma ile muamele edilen yaralardaki yara alanının ölçümü. Ortalama  $\pm$  TEM, \*p < 0.005, \*\*p < 0.001 [77]

#### 1.1.3.4 Plazmanın Antikanser Etkinliği

ASP' nin antilanser özelliği başta karaciğer kanseri hücreleri, akciğer kanseri hücreleri, glioma hücreleri, cilt kanseri hücreleri, rahim ağzı kanseri hücreleri, kemik kanseri hücreleri, myeloma hücreleri, melanom hüceleri, mesane kanseri hücreleri olmak üzere birçok kanser hücresiyle yapılan in vivo ve in vitro deneylerle kanıtlanmıştır [50],[79]–[88]. ASP tarafından üretilen reaktif türlerinin DNA hasarını tetikleyerek [89] tümör hücresi apoptozunun [33],[90] ana nedeni olabileceği öne sürülmüş olsa da ASP ile tümör hücreleri arasındaki etkileşim mekanizması hala belirsizdir.

ASP, hem in vitro hem de in vivo olarak çeşitli kanser hücre tiplerini etkili bir şekilde ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Murin pankreas kanseri hücreli tümör modeli

kullanılarak ASP' nın peritoneal metastatik lezyonlar üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmada hem in vitro hem in vivo testler yapılmıştır. Hem plazma hem de plazma ile muamele edilmiş çözeltiliye maruz kalma, hücre canlılığını ve 6606PDA kanser hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde azaltırken, fare fibroblastları daha az etkilenmiştir. ASP ile muamele edilmiş ortamın tekrarlanan intraperitoneal tedavisi, manyetik rezonans görüntüleme ile belirlendiği üzere in vivo tümör büyümesini ve tümör kütesinin azalttı [91].

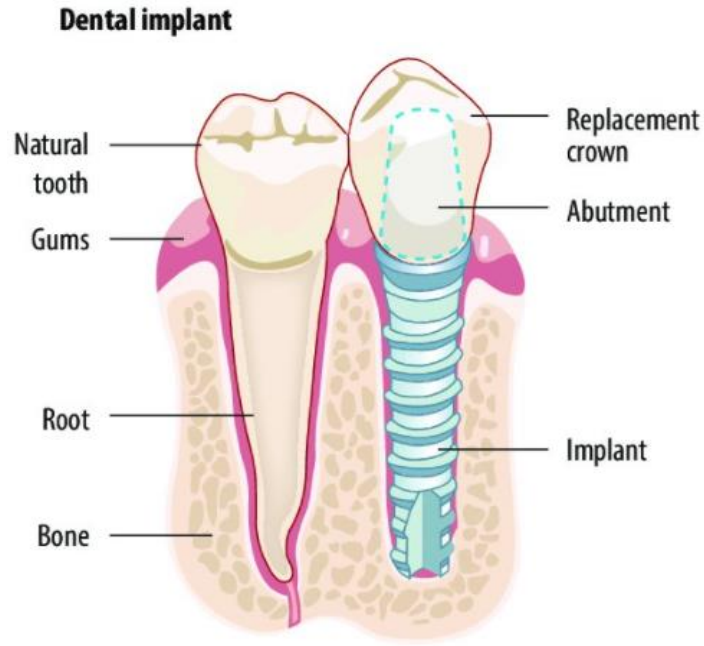
### 1.1.3.5 Plazmanın Dental Uygulamaları

ASP' nın dental implantlarda biyouyumluluk, yüzey iyileştirme ve temizleme etkinliği üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlayan birçok çalışma yapılmıştır. Plazma uygulamasının ve peptit konjuge edilmiş Ti disklerin etkinliğinin incelendiği çalışmada kontrol, ASP ile muamele edilmiş, RGD(arginin-glisin-aspartik asit) peptit kaplı ve ASP ile muamele edilmiş+ RGD peptit kaplı Ti diskler olmak üzere 4 farklı grup kullanılmıştır. Yapılan çalışmada RGD+ASP' nın, hücre yapışmasını ve çoğalmasını önemli ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir [92]. Zirkonya disklerle yapılan bir çalışmada ise He-ASP jetinin, yüzey topografyasını değiştirmeden hidrofilitiyi arttırdığı ve yüzey kimyası değişikliği ile bakteri üremesini ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir [93]. Plazma kaynağı olarak kINPen Med ve implant malzemesi olarak ise Ti kullanıldığı 16 domuz üzerinde yapılan in vivo çalışma sonucunda ASP, yüzey morfolojisinde kayda değer bir değişikliğe yol açmamıştır. Yerleştirmeden önce ASP uygulaması daha yüksek KİT(kemik implant teması) ve ITBD (Dişler arası kemik yoğunluğu) (Interthread bone density) ile sonuçlanmıştır, ancak daha hızlı veya daha güçlü kemik yapışması ve mineralizasyon sağlamamıştır [94]. Bir diğer in vivo çalışma da ise kINPen plazma kaynağı olarak kullanıldığı, yetişkin erkek beagle köpekleri üzerinde yapılan çalışmada ASP' nın, çevre dokularla daha yüksek düzeyde temas sağlayarak, pürüzlü Ti yüzeyleri çevresinde daha hızlı ve daha yüksek miktarda kemik oluşmasını sağladığı kanıtlanmıştır [95]. İn vitro ve in vivo modellerin gösterdiği antimikrobiyal ve yüzey modifikasyonunda plazma potansiyeli, peri-implantitis tedavisinde ASP' yı umut verici bir seçenek olarak göstermektedir.

## 1.2 Dental İmplantlar

İlk dental implantların kullanılması Eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. O dönemde deniz kabuğu ve taş sonrasında ise soy metallerin kullanılmasıyla [96] başlasa da bu alandaki en önemli gelişme Per-Ingvar Brånemark'ın yaptığı deneyler sonucunda titanyumun paslanmaz çeliğe oranla kemiğe daha iyi tutunduğunu gözlemlemesi [97] ve dental implantları geliştirilmesi ve pazarlanması için bir şirket kurması olmuştur [98], [99].

Dental implantlar, dişin doğal kökünün yerini alması ve diş protezinin takılmasına imkan tanınması için kemiğe yerleştirilir [Şekil 1.10]. Dental implantın biyomalzemesinin alerjenik reaksiyona ve dokuda toksisiteye sebep olmaması gerekir ayrıca biyomalzemenin doku ile uyumluluğuda implantasyonda dikkat edilmesi gereken en önemli konudur. Dental implant malzemesi olarak polimerler, seramikler, metaller ve bunların çeşitli kombinasyonları olarak kompozitler kullanılmıştır. Polimerik malzemelerin kemik entegrasyonunun olmaması, yüksek yükleme kuvvetleri altında çalışma sırasında mekanik kırılmalara yatkın hale getiren düşük mukavemet özellikleri ve ters immünolojik tepkilere sebebiyet vermesinden dolayı, kullanımları kaplama malzemeleri ve diş protezlerine bağlı şok emici parçalar olarak kısıtlamıştır [100], [101]. Hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat, biyoglass, alüminyum oksit gibi seramikler düşük mukavemetlerine karşılık mükemmel biyoyumlu biyomalzeme olmaları sebebiyle tüm implant üretimi veya kaplama olarak kullanılmaktadırlar [102],[103]. Metalik biyomalzemeler ise düşük korozyon direnci, yüksek yoğunluk gibi dezavantajlarına rağmen güçlü, sert ve kolay şekillendirilebilir özellikleri ile dental implant olarak kullanılmışlardır [104],[105]. Metal dental implant olarak geçmişten günümüze altın, paslanmaz çelik, kobalt-krom alaşımları, titanyum ve alaşımları gibi birçok metal ve alaşımları kullanıldı [105]. Bu metalik biyomalzemeler arasında özellikleri gereği en çok tercih edilen ise titanyum ve titanyum alaşımlarıdır [101].



Şekil 1.10: Doğal diş(sol) ve implant(sağ) karşılaştırılması [99]

Titanyum iyi bir mekanik stabilite, düşük yoğunluğa( $4.5\text{g/cm}^3$ ), yüksek mukavemete, düşük elastisite modülüne [106] ve iyi bir biyouyumluluğa [107] sahiptir ve ayrıca alerjenik değildir [108]. Biyouyumluluğunun iyi olmasının sebebi ise implante edilen doku ile arasında anında  $\text{TiO}_2$  benzeri bir tabaka oluşturması ve sonuçta da iyi bir korozyon direncinin oluşmasıdır [109]. Korozyon direnci implantın doku ile kimyasal etkileşime girerek sitoksik etki engellediği için implantasyon işlemi için çok önemlidir. Titanyumun bu özellikleri çeşitli elementlerle alaşımları hazırlanarak daha da kullanışlı hale getirilmiştir(Ti-6Al-4V, Ni-Ti vs.). Günümüzde ise dental implantasyonda en çok kullanılan Grade-5(Ti-6-Al-4V) diğer titanyum alaşımlarına oran daha iyi mekanik özellikleri ile ön plana çıkmaktadır [Şekil 1.11].

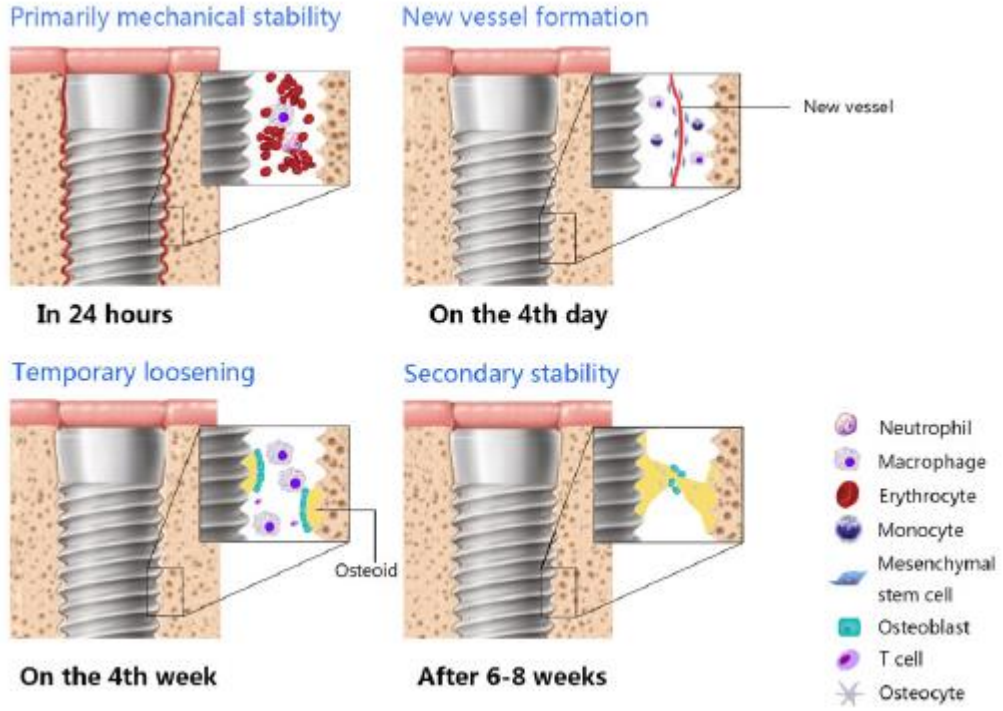
Özellik	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Ti6Al4V	Ti13Nb13Zr
Gerilme direnci (MPa)	240	345	450	550	860	1030
Akma dayanımı (0.2% ofset) (MPa)	170	275	380	485	795	900
Uzanim (MPa)	24	20	18	15	10	15
Alanın azaltılması (MPa)	30	30	30	25	25	45

Şekil 1.11: Titanyum ve alaşımlarının mekanik özellikleri [104]



## 1.2.1 Osseointegrasyon

Osseointegrasyon terimi ilk kez Per-Ingvar Brånemark tarafından kemik hücrelerinin dental implantın yüzeyine entegre edildiği ve sonuç olarak çene kemiği tarafından mekanik olarak sabitlendiği kemik-implant entegrasyonunu ifade etmek için kullanıldı. Bu dental implant ile kemik arasındaki mekanik kilitleme, oral yüklenmeye karşı implantın dayanımına yardımcı olur [110]. İyileşme süreci, implant kemiğe yerleştirildikten hemen sonra başlar ve implant üzeri osteoblast hücreleri ile tamamen kaplı görüne kadar devam eder [Şekil 1.12]. Bu süreçte osteoblastlar implant yüzeyine tutunur ve fibröz doku olmaksızın doğrudan kemik-implant arayüzü oluşur. Bu arayüze osseointegrasyon denir.



Şekil 1.12: Diş implantlarının osseointegrasyonu için zaman çizelgesi [106]

Osseointegrasyonun iyileştirilmesi bir anlamda implantların uzun vadede başarısının artırılması anlamına gelmektedir. Osseointegrasyonun kalitesini ve hızını biyomalzeme bileşimi, implant genişliği, uzunluğu ve geometrisi, biyomekanik faktörler, yüzey özellikleri, hastanın tıbbi durumu, kemik kalitesi gibi birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliğe bağlıdır [98],[103],[100].

### 1.3 Çalışmanın Amacı

Titanyum gibi biyomalzemelerin diş hekimliği ve ortopedik implantlarda kullanımı oldukça yaygındır. Osseointegrasyon ise canlı doku ile implant malzemesi arasındaki bütünlüğün bir ölçüsüdür. İmplant tedavisinde osseointegrasyon süresinin uzaması implant başarısını olumsuz etkilemektedir. Bu bakımdan osseointegrasyon süresinin kısaltılması önem arz etmektedir. Osseointegrasyon süresini kısaltmak, implant yüzey özelliklerini değiştirmek ve daha iyi pürüzlülük elde etmek için implant malzemelerine çeşitli uygulamalar yapılmaktadır. Kumlama ve asitle aşındırma, anodlama veya hidroksiapatit kaplama gibi mekanik ve kimyasal işlemler, Ti implantlarının yüzeylerini modifiye etmek için kullanılır, osteogenezi ve dolayısıyla erken osseointegrasyonu teşvik eder. Bu mekanik ve kimyasal yöntemlere ek olarak, ASP ve UV tedavisi de erken osseointegrasyon elde etmek için kullanılmıştır.

Bu çalışmanın amacı ise atmosferik soğuk plazma uygulamasının, farklı saklama koşullarında titanyum implant yüzeyinde uzun vadeli etkilerini belirlemektir.

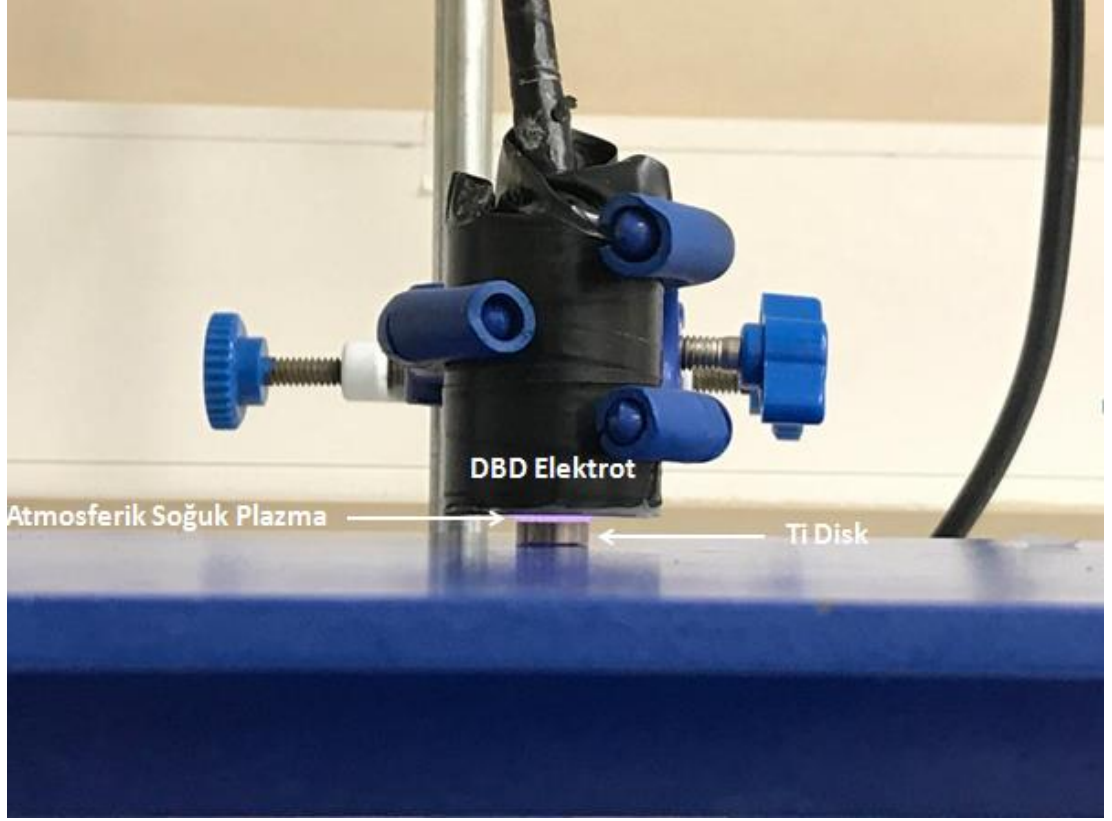
## 2 Gereç ve Yöntem

### 2.1 Titanyum Disklerin Hazırlanması

Titanyum numunesi olarak 10 mm çapında ve 3 mm yüksekliğinde Medikal Grade-5 Ti(Ti6Al4V) kullanıldı. Ti diskler 6 saat % 70 etil alkol içinde tutuldu, sonra bir kez steril deiyonize su ile yıkandı ve 24 saat UV altında bırakıldı sonuç olarak Ti diskler steril olarak kullanıma hazır hale getirildi. Bu çalışmada kullanılan Ti diskler Metrosan End. ve Elk. Mek. Cihazlar ve Tıbbi Malz. San. Tic. Ltd. Şti. tarafından bedelsiz olarak karşılandı.

### 2.2 Plazma Uygulaması

DBD elektrotu, 10 mm kalınlığında bir bakır plakanın 1 mm kalınlığında bir cam slide ile kaplanmasıyla oluşturulmuştur. Bakır plaka bir polietilen hazneye yerleştirildi ve yüksek voltajlı bir elektrik kablosu ile güç kaynağına bağlandı. DBD plazma, 20 kHz' de, 30 kV' da ve 1 mm deşarj aralığıyla çalıştırılan özel yapım bir mikrosaniye darbeli güç kaynağı tarafından üretildi. Steril Ti disklere Şekil 2.1' de gösterilen Dielektrik Bariyer Deşarj (DBD) plazma ile optimize edilen süre boyunca muamele edildi.



Şekil 2.1: Dielektrik Bariyer Deşarj(DBD) Elektrot

### 2.2.1 Optimum Plazma Uygulama Süresinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak plazma uygulama süresini belirlemek için steril Ti disklere 0, 30, 40, 50, 60 ve 90 saniye boyunca plazma uygulaması ve hemen sonrasında temas açısı ölçümü yapıldı. Temas açısı ölçümü ıslanabilirliğin Temas açısını ölçmek için disklere sabit damlatma tekniği uygulanarak optik bir tensiometre (KSV Attension Theta Lite Optical Tensiometer, Biolin Scientific, Stockholm, Sweden )kullanıldı. Her bir disk için ölçümler üç tekrar halinde yapıldı. Plazma ile muamele edilmiş disklerin yüzeyleri üzerine 4 µl distile su damlası damlatıldı. Distile su damlatılan titanyum yüzeyin fotoğrafı, cihaz üzerinde bulunun CCD kamera kullanılarak çekildi. Su damlacığı sistem tarafından analiz edildi, damlacıkların sol ve sağ taraflarından 120 adet ölçüm alındı. Temas açısı, sol ve sağ taraftaki tüm ölçümlerin ortalaması olarak verildi. ASP uygulanma süreleri boyunca titanyum disklerin temas açısı zamana bağlı olarak ölçüldü. Yapılacak ölçüm sonucu minimum temas açısı veren süre, diğer deneylerde referans süre olarak kullanıldı.

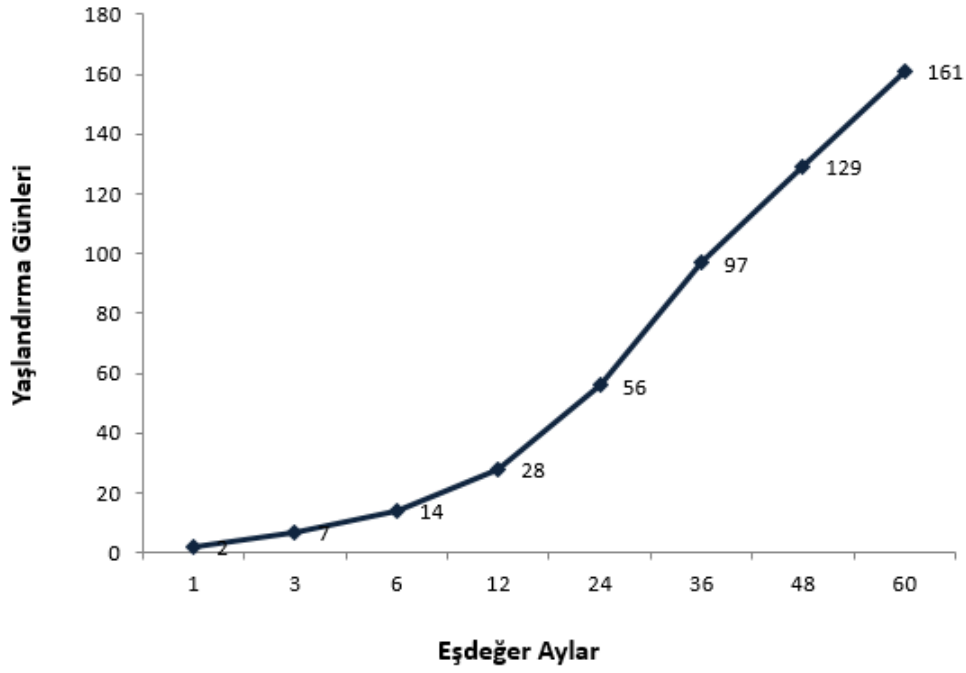
## 2.3 Yüzey Karakterizasyonu

### 2.3.1 Hızlandırılmış Yaşlandırma

Hızlandırılmış yaşlandırma testi, nesnelerin normal yaşlanma sürecini hızlandırmak için ısı, nem, oksijen vb. kullanan testtir [111]. ASP uygulaması yapılan Ti disklerin kazandıkları özelliklerin raf ömrünün değerlendirilmesi için hızlandırılmış yaşlandırma Denklem(2.1) olarak verilmiştir.

$$\text{Hızlandırılmış yaşlandırma zamanı} = \frac{RT}{Q_{10}^{[(T_{AA}-T_{RT})/10]}} \quad (2.1)$$

RT, gerçek zamanlı istenen, T<sub>AA</sub> hızlandırılmış yaşlanma sıcaklığı, T<sub>RT</sub> ortam sıcaklığı ve Q<sub>10</sub> yaşlanma faktörüdür. Bu formül aracılığıyla 60°C' de hızlandırılmış yaşlandırma tekniği kullanıldı [Şekil 2.2]. Sterilize edilen Ti diskler 60 saniye ASP uygulamasından sonra serum fizyolojik, oda koşulları ve inert ortam olmak üzere 3 farklı ortamda saklandı. Her bir saklama koşulu için 1 ay, 3 ay, 6 ay, 12 ay ve 24 ay olmak üzere 5 zaman noktası kullanıldı. Ayrıca her saklama koşulu için ASP uygulaması yapılmayan kontrol grupları da hazırlandı.



Şekil 2.2: 60° de Ti dislerin hızlandırılmış yaşlandırma grafiği

Hızlandırılmış yaşlandırma sonrasında optimum plazma uygulama süresinin belirlenmesi için yapılan temas açısı ölçümleri aynı prosedürlerde yapıldı. Her bir disk için ölçümler üç tekrar halinde yapıldı.

### 2.3.2 Yüzey Pürüzlülüğü Ölçümü

Yüzey pürüzlülüğü için 0.gün plazma uygulanan; 60 saniye ASP uygulamasından oda koşullarında 1 ay bekletilen, salin içerisinde 1 ay bekletilen, inert ortamda 1 ay bekletilen, salin içerisinde 24 ay bekletilen; ASP uygulaması yapılmayan kontrol olmak üzere 6 grup kullanıldı. Yüzey morfolojileri, profilometre (Mitutoyo SJ-210) kullanılarak incelendi. Profilometre ile mikron cinsinden yüzey pürüzlülüğü ölçülebilmektedir. Bu cihazlarda elmas stilus kullanılır ve yüzey pürüzlülüğü nümerik olarak belirlenir. Kalem, numunenin yüzeyinde ilerler ve çıktılar gösterge olarak cihazda okunur. Cihazda kalıcı bir mıknatıs alanına yerleştirilmiş indüksiyon bobini bulunmaktadır. Prob, test edilecek numune üzerinde gezerek yüzey düzensizlikleri nedeniyle aşağı- yukarı doğru hareket etmektedir ve bu hareketler, indüksiyon bobininin mıknatıs alanında hareket etmesine ve bir voltaj oluşumuna neden

olmaktadır [112]. Hareket sonucunda oluşan elektrik sinyalleri kaydedilmekte ve çıktı olarak kullanılmaktadır [113]. Algılayıcı uç (stylus) malzeme üzerine temas ettirilir ve belirlenen ölçüm mesafesi boyunca hareket ettirilerek tarama yapılır. Yüzeydeki girinti ve çıkıntılar uç vasıtasıyla tespit edilir. Ucun dik yöndeki hareketleri bir dönüştürücü aracılığıyla elektrik işaretine çevrilir. Daha sonra bu işaretler yükseltici ile büyütülür ve bir kalem vasıtasıyla çizilerek yüzey pürüzlülüğü grafiği hazırlanmış olur.

Ti disklerin yüzey pürüzlülüğü, her diskte 500  $\mu\text{m}$ 'nin üzerinde bir tarama uzunluğu ve 100  $\mu\text{m}/\text{sn}$ 'lik bir tarama hızı ile 5  $\mu\text{m}$ 'lik bir elmas ucu takip eden rastgele seçilen beş alana kaydedildi. Disklerin pürüzlülüğü, aritmetik ortalama pürüzlülük ( $R_a$ ,  $\mu\text{m}$ ) olarak sunuldu.

### 2.3.3 Protein Adsorpsiyonu

Protein adsorpsiyonu testi toplam proteinin kolorimetrik tespiti ve miktar tayini için bisinkoninik asit (BCA) bazlı bir formülasyondur. Bu yöntem, bir alkali ortamda protein tarafından  $\text{Cu}^{+2}$ 'nin  $\text{Cu}^{+1}$ 'e indirgenmesi (biüret reaksiyonu) ile bakır katyonunun ( $\text{Cu}^{+1}$ ) son derece hassas ve seçici kolorimetrik tespiti ile bisinkoninik asit içeren benzersiz bir reaktif kullanılarak birleştirir. Bu testin mor renkli reaksiyon ürünü, iki BCA molekülünün bir bakır iyonu ile şelatlanmasıyla oluşturulur. Bu suda çözünür kompleks, geniş bir çalışma aralığında (20-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) artan protein konsantrasyonları ile neredeyse doğrusal olan 562 nm'de güçlü bir absorban sergiler.

Proteinin makromoleküler yapısının, peptid bağlarının sayısının ve belirli dört amino asidin (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) varlığının BCA ile renk oluşumundan sorumludur [114]. Buna göre, protein konsantrasyonları genellikle, sığır serum albümini (BSA) gibi yaygın bir proteinin standartlarına referansla belirlenir ve rapor edilir. Proteinden bilinen konsantrasyonda bir dizi seyreltme hazırlanır ve standart eğriye dayalı olarak her bir bilinmeyen konsantrasyonu belirlenmeden önce bilinmeyenlerle birlikte test edilir.

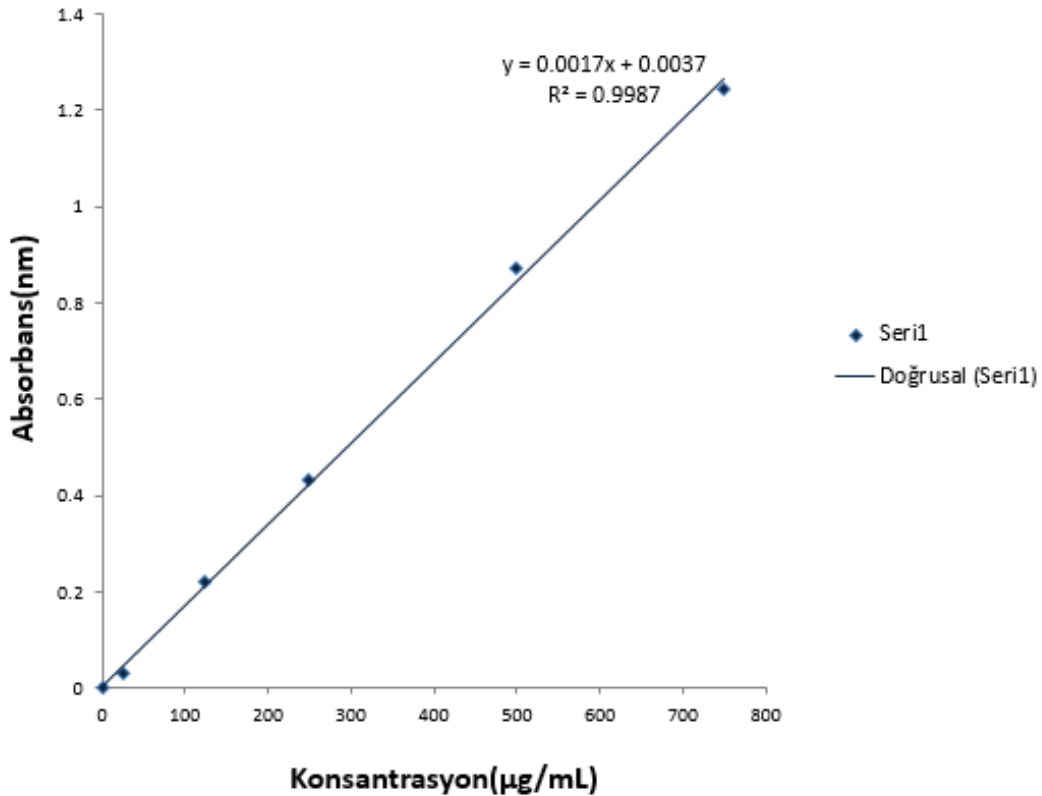
Protein standardını hazırlamak için stok solüsyonu olan 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  albümin standardı konsantrasyonu 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA ve olacak şekilde PBS ile seyreltildi. Her konsantrasyon için 3 tekrar

halinde yapıldı ve bir konsantrasyon- adsorpsiyon grafiği elde edildi [Şekil 2.4].

Sonrasında çalışma reaktifi hazırlandı. Toplam çalışma reaktif hacmi:

$$(\# \text{ standart} + \# \text{ bilinmeyen}) \times (\# \text{ tekrar}) \times (\text{numune başına çalışma reaktif hacmi})$$

formülü ile hesaplanarak 3000 mL olarak bulundu. Sonrasında 50:1, Reaktif A:B oranında toplam hacmi 3000 mL olan çalışma reaktifi hazırlandı. Ti disklerin bulunduğu her kuyucuğun içine 200 mL çalışma reaktifi eklendi ve plakayı 30 saniye boyunca bir plaka çalkalayıcı üzerinde iyice karıştırıldı ve 37 ° C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. Plaka oda sıcaklığına soğutuldu ve her ti diskin bulunduğu kuyucuktan 200 µL 96 kuyucuklu plakaya pipetlenerek bir Synergy TM HTX çok modlu mikroparka okuyucusunda (BioTek, Winooski, VT, ABD) 562 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Her disk için elde edilen absorbans değeri standart denkeleminde yerine yazılarak konsantrasyon değeri hesaplandı.



Şekil 2.3: Protein adsorpsiyonunun belirlenmesinde kullanılan standart



### 2.3.4 X-Işını Kırınımı

XRD ölçümü plazma muamelesinin Ti diskin yüzeyini mi yoksa diskin bütünü mü etkilediğini incelemek için yapıldı. ASP uygulaması sonrasında Ti disklerde meydana gelen faz değişikliklerini kontrol grubuyla karşılaştırmak için X-ışını kırınımı( Panalytical Emparian XRD) ile karakterize edildi. XRD ölçümleri için 5°-80° 2 $\theta$  aralığında 0.01 tarama adım büyüklüğü, 1sn/ adım edinim süresi kullanılmıştır. XRD ölçümlerinin yapıldığı gruplar şu şekildedir; 0.gün plazma uygulanan, ASP uygulamasından sonra oda koşullarında 1 ay bekletilen, salin içerisinde 1 ay bekletilen, inert ortamda 1 ay bekletilen, salin içerisinde 24 ay bekletilen ve kontrol.

### 2.3.5 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

XPS analizi plazma muamelesinin Ti disklerin kimyasal bileşiminde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığını incelemek için yapıldı. Kontrol, plazma uygulanmış(0.gün), oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay),salin(1 ay) ve salin(2 yıl) gruplarının kimyasal bileşimi 60x60 mm örnekleme alanı, 50eV enerji ve 300  $\mu$ m spot boyutu parametrelerine sahip bir monokromatik Al-K $\alpha$  hattı (1486.68 eV) 180° yarımküresel analizör 128 kanallı dedektör X-ışını fotoelektron spektroskopisi kullanılarak ( XPS) (Thermo Scientific K-Alpha) ile değerlendirildi.

### 2.3.6 Taramalı Elektron Mikroskopisi

0.gün plazma uygulanan, ASP uygulamasından sonra oda koşullarında 1 ay bekletilen, salin içerisinde 1 ay bekletilen, inert ortamda 1 ay bekletilen, salin içerisinde 24 ay bekletilen ve kontrol gruplarının yüzey topografyası ve kompozisyonu bir Taramalı Elektron Mikroskopu(TEM)(Carl Zeiss 300VP, Germany) kullanılarak incelendi. İncelemeler 3 kV ve 2500X büyütmede gerçekleştirildi.

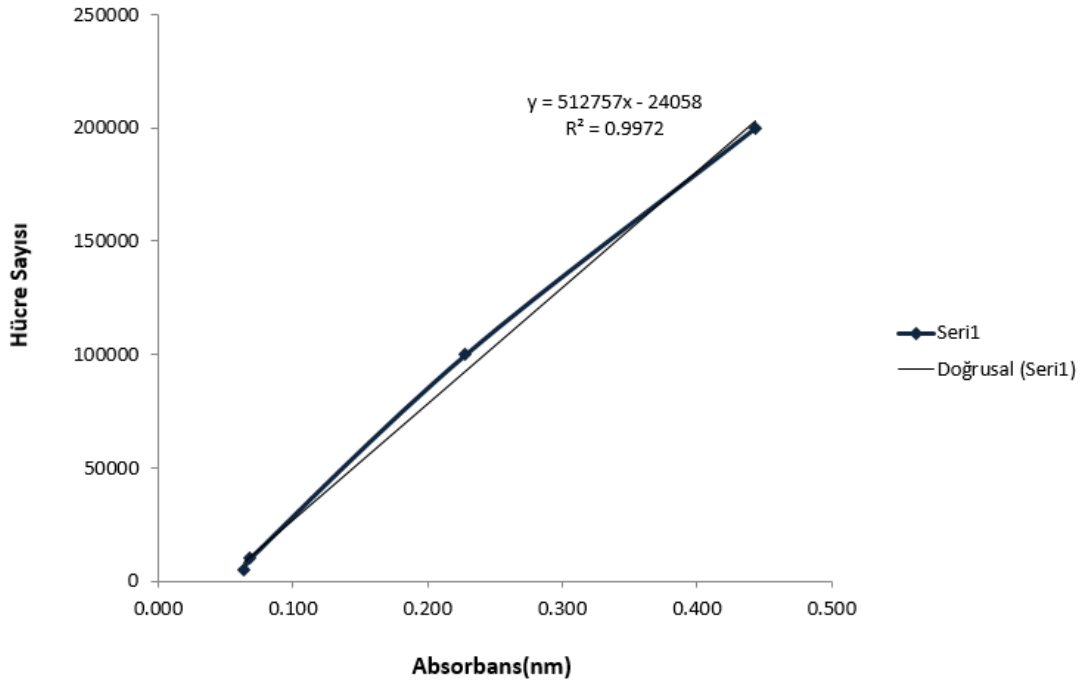
## 2.4 In vitro Testler

### 2.4.1 Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı (hMSCs) (HMSC-AD-500, CLS cell lines Service, Lot #102, Eppelheim, Germany) kullanıldı. -80°C' de donmuş hücreler içeren kriyotüp 37°C' de bir su banyosuna yerleştirildi. Hücreler, şişe içinde sadece küçük bir buz parçası kalana kadar 37°C' lik su banyosunda hafifçe döndürülerek hemen çözündürüldü. 1 mL önceden ısıtılmış büyüme ortamı, çözülmüş hücreleri içeren kriyotüp içine damla damla aktarıldı. Daha sonra hücreler, 3 mL' lik bir büyüme ortamı içeren bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücre süspansiyonu, 850 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüjlemeden sonra, süpernatant, hücre pelletini bozmadan aseptik olarak boşaltıldı. Hücre ekimi için, çözülmüş hücreler, % 20 FBS (fetal sığır serumu), %1 penisilin-streptomisin( 100 mg/ ml), %1 gentamicin ve %1 L- glutamin içeren Dulbecco Modifiye Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham içindeki standart 25 cm<sup>2</sup> polistiren hücre kültürü plakalarına ekilmiştir. Hücreler, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C' lik bir inkübatörde (Thermo Scientific™, Forma™ Steri-Cycle™ CO<sub>2</sub> Incubator) inkübe edildi ve çoğaltıldı. Kültüre alınan hücrelerin ortamı iki günde bir değiştirildi. Kültürleşmiş hücrelerin yoğunluğu %90'a ulaştığında hücreler, %0.25 Tripsin (Gibco™) çözeltisi kullanılarak 75 cm<sup>2</sup> polistiren hücre kültürü plakalarına aktarıldı. Çalışmalar süresince 7. pasajdaki hücreler kullanıldı.

Ti diskler üzerindeki hücre canlılığını değerlendirmek için MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür) kiti (iNtRON Biotechnology, 21180) kullanıldı. Hücre canlılık test grubu olarak 0. gün plazma uygulanan; 60 saniye ASP uygulamasından oda koşullarında 1 ay bekletilen, inert ortamda 1 ay bekletilen, salin içinde 24 ay bekletilen ve ASP uygulaması yapılmayan kontrol olmak üzere 5 grup kullanıldı. Hücreler, 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilen, 0.78 mm<sup>2</sup> lik yüzey alanına sahip öncesinde 60 saniye boyunca DBD plazma uygulanmış ve belirtilen koşullarda saklanmış Ti-6Al-4V disklere 10<sup>5</sup> hücre/ ml yoğunlukta ekildi. 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>' de 1, 4 ve 7 günlük inkübasyondan sonra, her diske %10 MTT (5 mg/mL konsantrasyonda) stok solüsyonu eklenmiştir. İki saat karanlıkta 37°C' de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübe edildi ve sonra süpernatantlar aspire edildi. Her diskteki formazan kristalleri, DMSO (dimetil sülfoksit) (Merck-Millipore) içinde çözüldü ve sonrasında 96 kuyucuklu

plakaya pipetlendi. Absorbans değerleri, Synergy TM HTX Çok Modlu Mikroplaka Okuyucusu (BioTek, Winooski, VT, ABD) üzerinde 540 nm'de okundu. Ölçülen absorbans değerleri ile karşılık gelen hücre sayısı işaretleterek kalibrasyon eğrisi çizildi [Şekil 2.4].



Şekil 2.4: Absorbans- hücre sayısı kalibrasyon eğrisi

## 2.4.2 Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

İnkübasyonun 7.gününde formaldehit fiksasyonu gerçekleştirildi. Hücreler 20 dakika oda sıcaklığında PBS içinde % 4 formaldehit ile inkübe edildi. Fikse edilen hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Geçirgenliği artırmak için sabit hücrelere PBS içinde % 0.1 Triton X-100 eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Bloklama solüsyonu(1% BSA- 1x PBS içinde) oda sıcaklığında 30 dakika uygulanıldı. Daha sonra fikslenmiş hücreler bulunan disklerin üzerine 70 µl TRITC-konjugant Phalloidin çalışma solüsyonundan eklendi ve hücreler oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. Hücreler 3 kez PBS ile yıkandı. Bu yıkama adımından sonra, hücreler 70 µl DAPI ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve ardından hücreler 1x PBS ile üç kez (her biri 10 dakika) yıkanması yoluyla çekirdek boyama gerçekleştirildi.

Floresan görüntüler, bir floresan mikroskobu (Axio Vert.A1, Zeiss,Germany) ile 10X magnifikasyonda görselleştirildi.

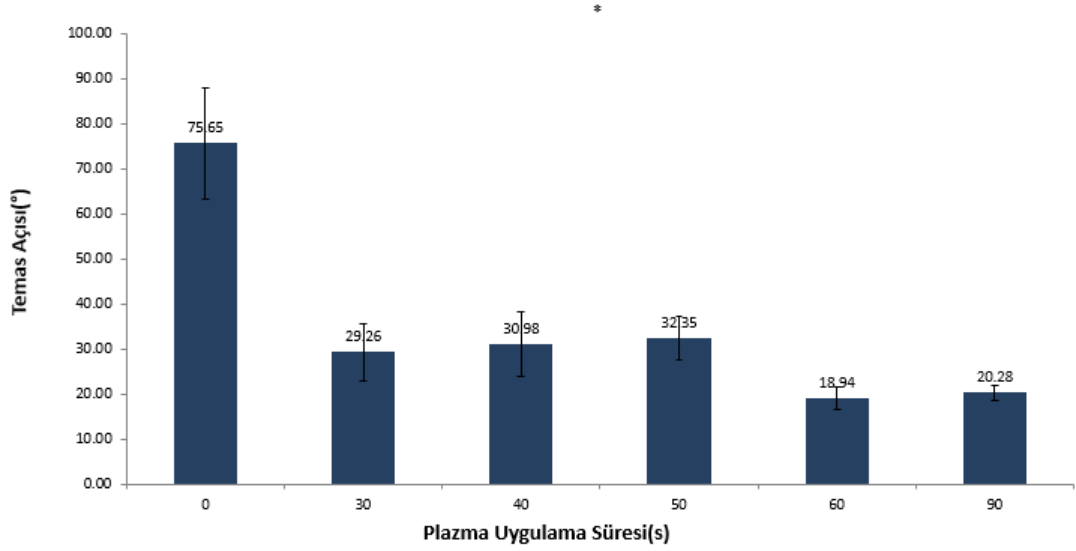
## 2.5 İstatistiksel Analiz

Çalışmanın başlangıcından itibaren yürütülen çalışmalarda tüm deney gruplarından en az üç numune test edilmiş ( $n=3$ ) ve tüm deneyler en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm sonuçların ortalama değerleri, standart sapmaları, standart hata ve t test değerleri hesaplanarak istatistiksel analiz yapıldı. Veriler için standart hata değerleri, her veri için hata çubukları olarak sunulur.

## 3 Sonuçlar

### 3.1 Optimum Plazma Uygulama Süresinin Belirlenmesi

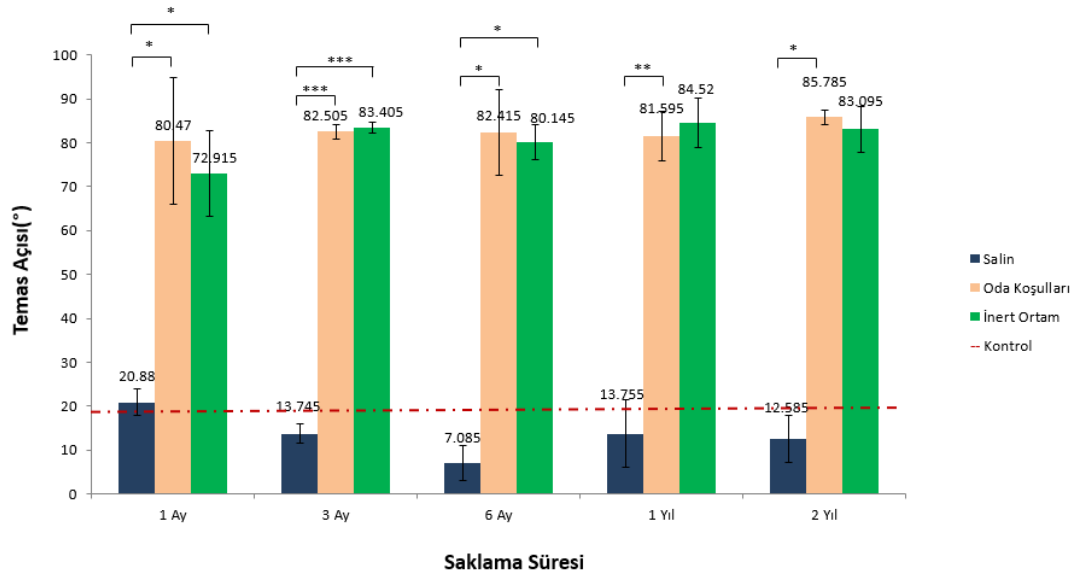
Deneyley süresince kullanılacak optimum plazma uygulama süresini belirlemek için 0 sn, 30 sn, 40 sn, 50 sn, 60 sn ve 90 sn plazma muamelesi sonrasında ölçülen temas açısı değeriyle sırasıyla 75.65°, 29.26°, 30.98°, 32.35°, 18.94° ve 20.28° idi (P<0.05). Ölçüm sonrası en küçük temas açısını veren süre 60 saniye olarak belirlendi [Şekil 3.1].



Şekil 3.1: Temas açısı- plazma uygulama süresi grafiği. Belirtilen gruplar arasındaki karşılaştırma için \*P<0.05.

### 3.2 Temas Açısının Değerlendirilmesi

Belirlenen optimum uygulama süresi (60 saniye) ile muamele edilen Ti diskler farklı sürelerde ve farklı ortamlarda saklanarak temas ölçümleri yapıldı. Temas açısı ölçümleri birbirleriyle ve plazma muamelesi yapılmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldı [Şekil 3.2]. Oda koşulları ve inert ortamda saklanan Ti disklerin tüm zamanlar için temas açıları yaklaşık 80°'dir ve bu hem salin içerisinde saklanan Ti disklerin tüm saklama süreleri için hem de kontrol değeri olan 18.94'ten büyüktür. Plazma muamelesinden sonra salin içerisinde 1 ay, 3 ay, 6 ay, 1 yıl ve 2 yıl bekletilen Ti disklerin ise temas açıları sırasıyla 20.88°, 13.74°, 7.08, 13.75° ve 12.68° dir. 3 ay, 6 ay, 1 yıl ve 2 yıldaki temas açıları kontrol değerinden daha küçüktür ve salin içerisinde 6 ay bekletilen Ti diskler 7.08° ile tüm grupların ve kontrol grubunun en küçük temas açısıdır.

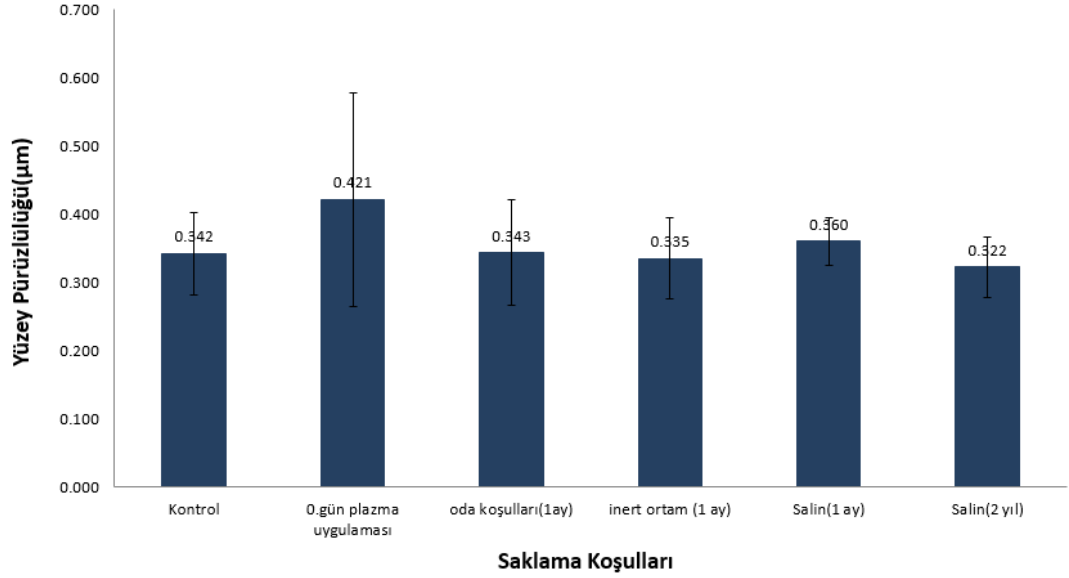


Şekil 3.2: Temas açısının saklama koşulları ve sürelerine bağlı değişimi. Belirtilen gruplar arasındaki karşılaştırma için \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005.

### 3.3 Yüzey Pürüzlülüğünün Değerlendirilmesi

Yüzey pürüzlülüğünün incelenmesinde kontrol, 0.gün plazma uygulaması, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay), salin(1 ay) ve salin(2 yıl) olmak üzere 6 deney grubu

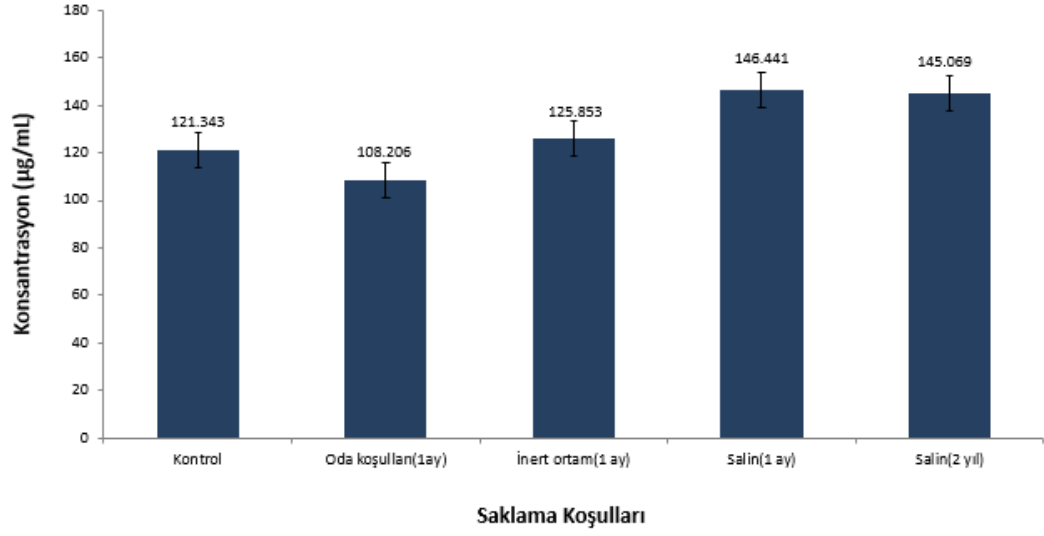
kullanıldı ve bunların yüzey pürüzlülüğü sırasıyla 0.342  $\mu\text{m}$ , 0.421  $\mu\text{m}$ , 0.343  $\mu\text{m}$ , 0.335  $\mu\text{m}$ , 0.360  $\mu\text{m}$  ve 0.322  $\mu\text{m}$  olarak ölçüldü ( $P>0.05$ ) [Şekil 3.3]. Elde edilen sonuçlara bakıldığında atmosferik soğuk plazma uygulamasının ve saklama koşullarının Ti disklerin yüzey pürüzlülüğünde herhangi bir değişime neden olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.3: Ti disklerin saklama koşullarına bağlı yüzey pürüzlülüğü değişimi. Belirtilen gruplar için  $P>0.05$ .

### 3.4 Protein Adsorpsiyonu

Ti diskler üzerinde gerçekleşen protein adsorpsiyonunu miktarını değerlendirmek için kontrol, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay), salin(1 ay) ve salin(2 yıl) olmak üzere 5 deney grubu kullanıldı ve bunların protein konsantrasyonu ortalamaları sırasıyla 121.343  $\mu\text{g/mL}$ , 108.206  $\mu\text{g/mL}$ , 125.853  $\mu\text{g/mL}$ , 145.441  $\mu\text{g/mL}$  ve 145.069  $\mu\text{g/mL}$  olarak ölçüldü ( $P>0.05$ ) [Şekil 3.4]. İnert ortam(1 ay), salin(1 ay) ve salin(2 yıl) grupların yüzeyinde absorplanan protein miktarları kontrolle karşılaştırıldığında daha fazladır.

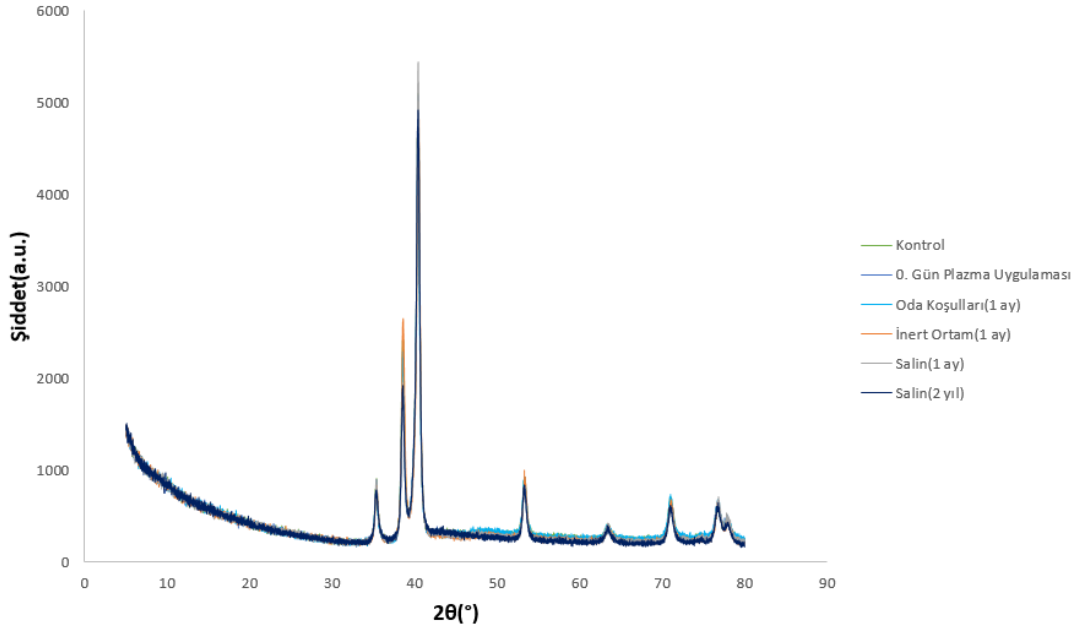


Şekil 3.4: Ti disklerin saklama koşullarına bağlı protein konsantrasyonu değişimi. Belirtilen gruplar arasındaki karşılaştırma için  $P > 0.05$ .

### 3.5 X-Işını Kırınımı

XRD diyagramları kontrol, 0.gün plazma uygulaması, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay), salın(1 ay) ve salın(2 yıl) grupları kullanılarak karşılaştırıldı. XRD grafikleri arasında herhangi bir kayma gözlemlenmedi, tüm grupların diyagramları birbirleriyle örtüşmüş bir sonuç elde edildi [Şekil 3.5].

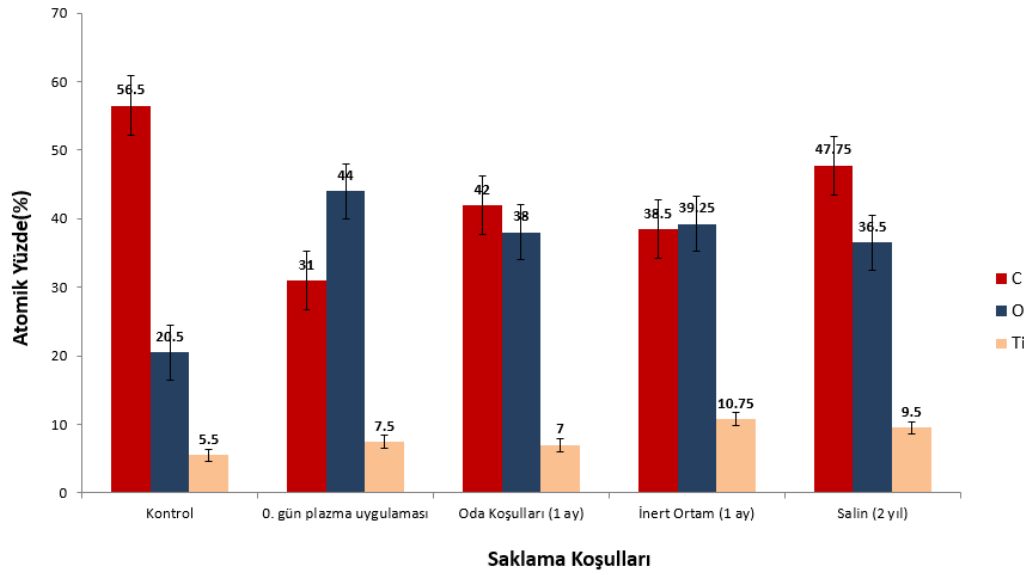




Şekil 3.5: Kontrol ve belirlenen diğer grupların X-ışını kırınım diyagramları

### 3.6 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

Karbon(C) yüzdesi kontrol, 0. gün plazma uygulaması, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay) ve salin(2 yıl) gruplarında sırasıyla %56.5, %31, %42, %38.5 ve %47.75 çıkmıştır [Şekil 3.6]. Buna göre kontrolle karşılaştırıldığında 0. gün plazma uygulaması, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay) ve salin(2 yıl) gruplarının C yüzdeleri düşmüştür hatta 0. gün plazma uygulamasının yüzde değeri neredeyse yarıya inmiştir. Oksijen(O) yüzdesi ise kontrol, 0. gün plazma uygulaması, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay) ve salin(2 yıl) gruplarında sırasıyla %20.5, %44, %38, %39.25 ve %36.5 çıkmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 0. gün plazma uygulaması, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay), salin(2 yıl) gruplarının O yüzdesi önemli ölçüde artmıştır özellikle 0. gün plazma uygulaması grubunda iki katına çıkmıştır.



Şekil 3.6: Kontrol ve belirlenen diğer grupların C, O ve Ti atomik yüzdeleri

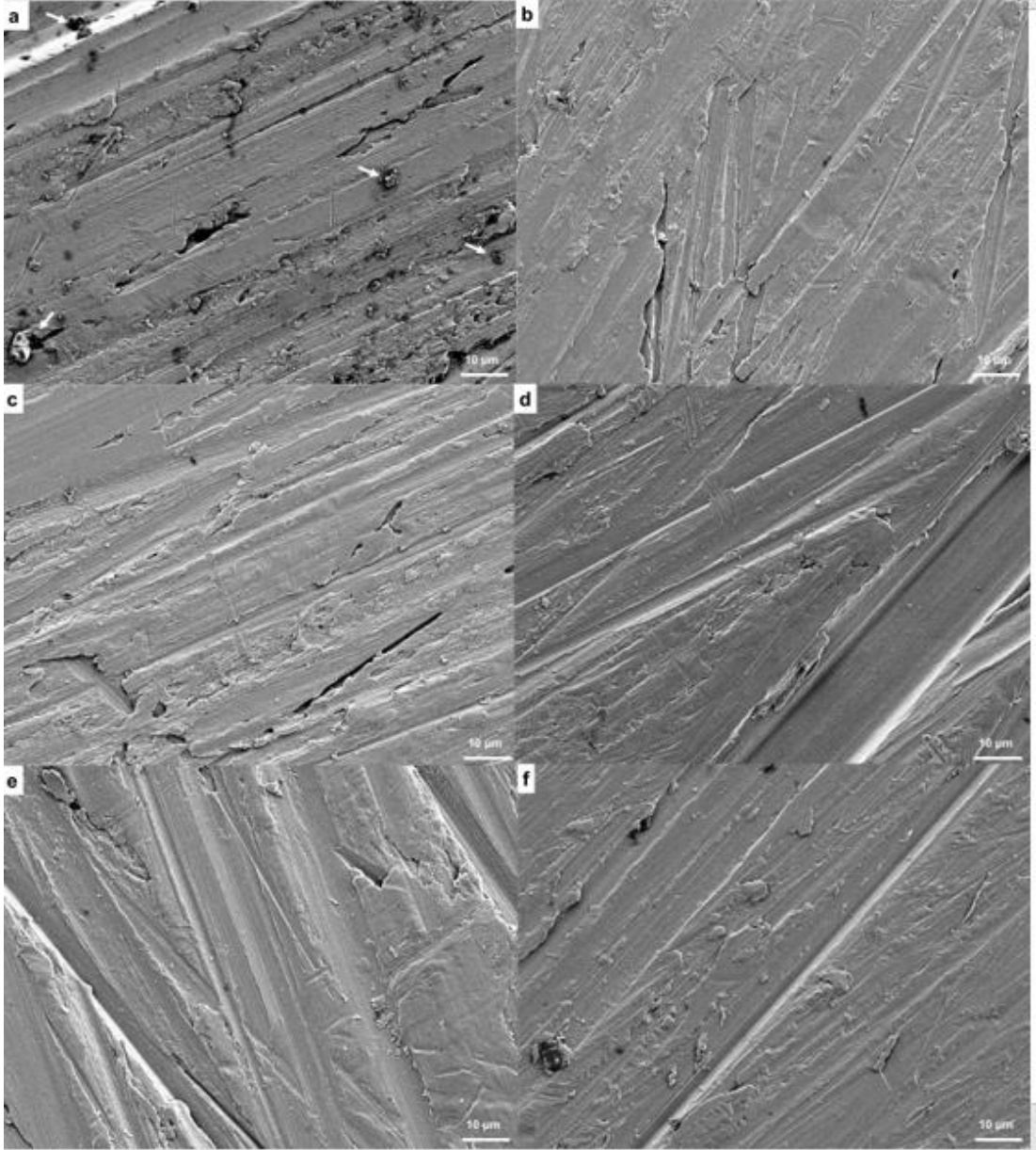
ASP muamelesi C-C bağlarının yoğunluğunu azaltırken, C-O-C ve O-C=O bağlarının yoğunluğu arttırmıştır. Yine kontrol grubu ile kıyaslandığında inert ortam (1 ay) grubu hariç Ti-C bağlarının yoğunluğu azalmıştır buna karşılık ise kontrol grubuyla kıyaslandığında oda koşulları (1 ay) grubu dışındaki grupların Ti-O bağlarının yoğunluğu artmıştır [Tablo 1].

Tablo 3.1: Kontrol ve belirlenen grupların bağlanma enerjileri

	C-C	C-O-C	O-C=O	Ti-C	Ti-O
<b>Kontrol</b>	44	6	4	0.76	4.12
<b>0. gün plazma uygulaması</b>	20	5	6	0.61	6.84
<b>Oda koşulları (1 ay)</b>	25	12	5	0.42	3.88
<b>İnert ortam (1 ay)</b>	20	12	7	1.85	9
<b>Salin (2 yıl)</b>	36	11	3	0.66	9.66

### 3.7 Taramalı Elektron Mikroskopisi (TEM)

TEM fotoğraflarına göre kontrol Şekil 3.6(a) ile karşılaştırıldığında plazma ile muamele edilen tüm gruplarda karbon kontaminasyonu miktarı azaltılmıştır bunun haricinde ti yüzeylerde belirli bir değişim gözlemlenmedi [Şekil 3.7].

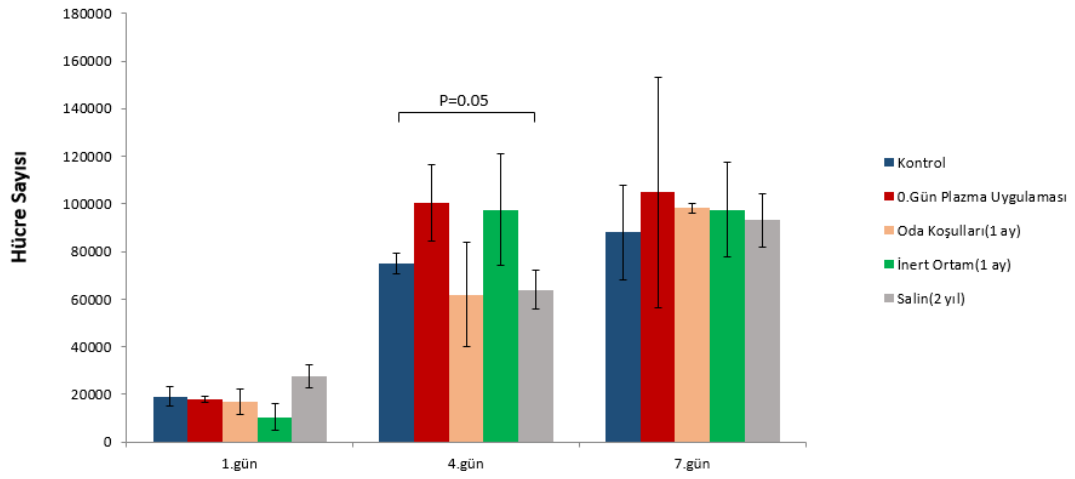


Şekil 3.7: Ti yüzeylerin TEM fotoğrafları: kontrol(a); 0.gün plazma uygulaması(b); oda koşulları(1 ay)(c); inert ortam(1 ay)(d); salin(1 ay)(e); salin(2 yıl)(f). Ölçek=10µm

### 3.8 Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığının belirlenmesinde kontrol, 0. gün plazma uygulaması, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay) ve salin(2 yıl) olmak üzere 6 grup kullanıldı ve herbir grubun 1 gün, 4 gün ve 7 gün inkübasyon süresi için hücre canlılığı test edildi. 1.gün, 4.gün ve 7 gün inkübasyondaki kontrol gruplarının hücre yoğunluğu %100 olarak hesaplandı.

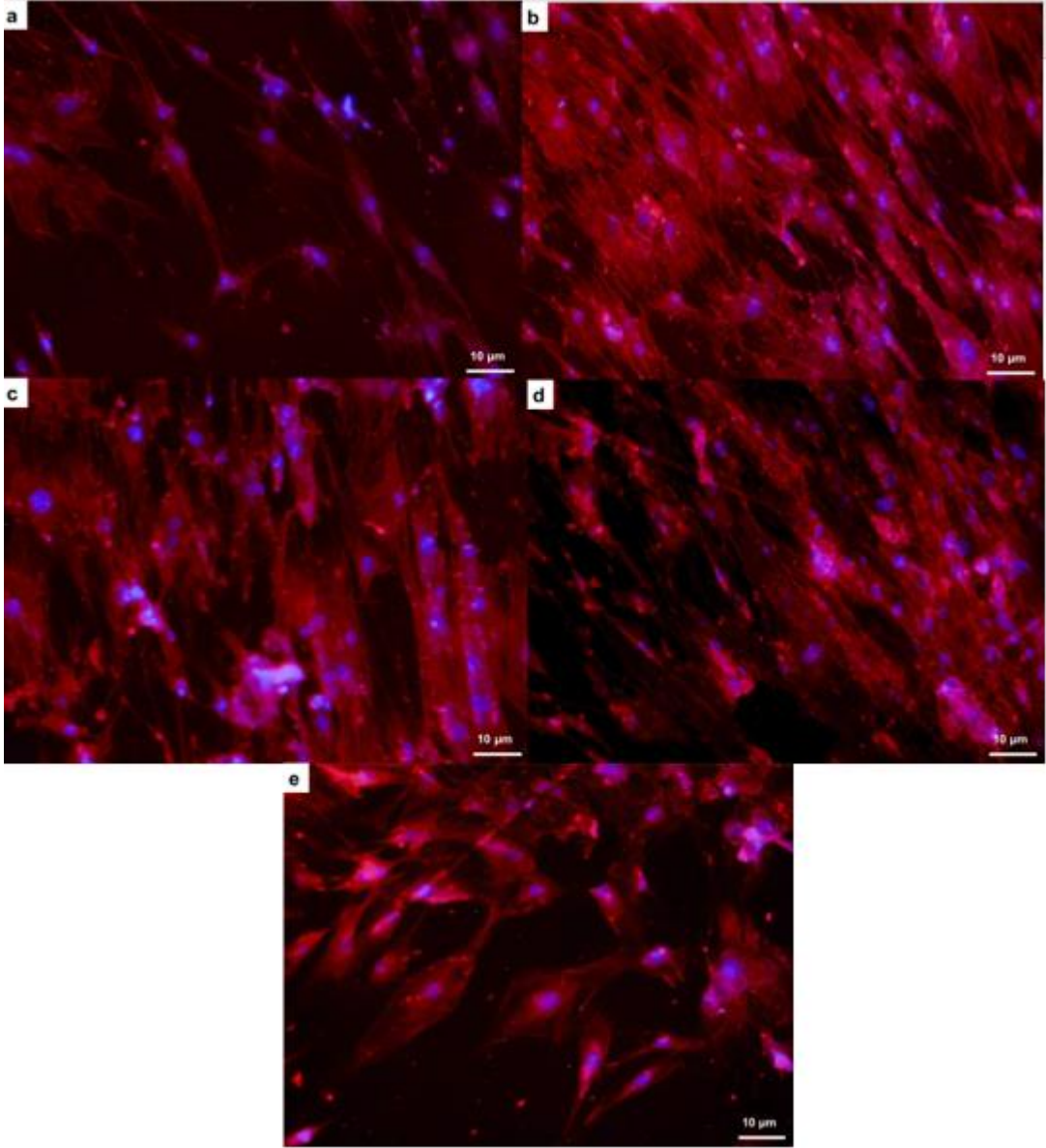
Buna göre 1.gün inkübasyonda hücre canlılığı gruplar 0. gün plazma uygulaması, oda koşulları(1 ay), inert ortam(1 ay) ve salin(2 yıl) olmak üzere sırasıyla %93.1, %88.5, %54.2 ve %144.7 idi. En yüksek hücre canlılığının görüldüğü grup salin(2 yıl) iken en düşük hücre canlılığı ise inert(1 ay) grubunda gözlemlenmiştir. 4 gün inkübasyon sonrası ise hücre canlılığı sırasıyla %133.9, %82.5, %130.1 ve %85.4 idi (P=0.05). Burada ise 0. gün plazma uygulaması ve inert ortam(1 ay) grupları kontrol grubunun yüzde değerini geçerek en yüksek hücre canlılığını gösteren gruplar olmuştur. 7 gün inkübasyon sonrasında ise canlılık sırasıyla %118.9, %111.4, %110.7 ve %105.7 idi. 7 günlük inkübasyon sonrasında ise artık plazma ile muamele edilen bütün grupların hücre canlılık yüzdesi kontrolden büyüktü [Şekil 3.8].



Şekil 3.8: Kontrol ve plazma ile muamele edilen grupların hücre sayısının inkübasyon süresine bağlı değişimi. Belirtilen gruplar arasındaki karşılaştırma için P=0.05.

### 3.9 Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi

Hücrelerin, floresan görüntüleme öncesi DAPI ile çekirdekleri ve phalloidin kullanılarak aktin hücre iskeleti boyandı. Elde edilen görüntüler, hMSC hücrelerinin ASP ile muamele edilen gruplara başarılı bir şekilde bağlandığını ve yayıldığını göstermektedir [Şekil 3.9].



Şekil 3.9: Deney gruplarının mikroskopik görüntüleri: (a) Kontrol, (b) 0. Gün plazma uygulaması, (c) oda koşulları (1 ay), (d) inert ortam (1 ay), salin (2 yıl).

## 4 Tartışma ve Sonuç

Atmosferik soğuk plazmanın titanyum yüzey modifikasyonuna uygulanması, son zamanlarda malzeme modifikasyonu alanında bir araştırma odağı haline geldi. İn vitro çalışmalarda, ASP' nin, titanyumun yüzey özelliklerini değiştirerek bakteri kolonizasyonunu ve osteoblastların biyolojik davranışlarını etkileyebileceğini bulunmuştur. İn vivo çalışmalar, soğuk atmosferik plazmanın titanyum implantların osseointegrasyon sürecini destekleyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu tez çalışmasının amacı, ASP muamelesinden sonra inert ortam, oda koşulları ve salin içerisinde saklandığında Ti yüzeyinin biyoaktivitesinin, 60 saniye ASP işleminden hemen sonra ve kontrol yüzeyiyle karşılaştırılabilir olup olmadığını değerlendirmektir.

Fiziksel yüzey özellikleri ve yüzey enerjisi, ıslanabilirlik ve sıvıların yüzeyle temas açısı ile ölçülebilir. Temas açısı değerleri, yüzeyin hidrofilik mi yoksa hidrofobik mi olduğunu gösterir. Şekil 3.2' de gösterildiği gibi 60 saniye plazma ile muamele edilen yüzeyin en hidrofilik yüzey olduğunu göstermektedir. İmplant yüzeyi ıslanabilirliği (hidrofobik veya hidrofilik), ilk osseointegrasyon sürecinde hücre davranışını etkiler. Osseointegrasyon mekanizması, implant kanla temas ettiğinde başlar. Titanyum implantın yüzeyindeki proteinlerin davranışı, özellikle adsorpsiyon ve adezyon olmak üzere yüzey özelliklerine bağlıdır [115]. Hidrofobik yüzeylerde antikorların işaretleri hücre adsorpsiyonunu azaltırken, hidrofilik yüzeylerde trombin işaretleri baskındır ve adsorpsiyon uyarılır [116]. Plazmanın titanyum yüzeyler üzerindeki etkisine ilişkin daha önceki çalışmalar, bu tedavinin, plazmaya maruz kaldıktan sonra yüzey pürüzlülüğünü ve ıslanabilirliğini değiştirerek hücre yapışmasını iyileştirebildiğini göstermiştir [117],[118]. Genel olarak, atmosferden gelen organik kirlilikler zamanla Ti yüzeylerine yapışarak yüzey hidrofobisitesinde bir artışa neden olur [119],[120]. ASP muamelesi, yüzey oksit tabakasının bileşimindeki değişiklikler nedeniyle ti disk

yüzeylerinin hidrofiliğini artırır. Bu fizikokimyasal değişiklikler esas olarak ASP tarafından indüklenen TiO<sub>2</sub> yüzeyindeki hidrokarbonların doğrudan fotolizi ve ASP tarafından reaktif oksijen türlerinin üretimi ile ilişkilidir [121],[122]. ASP genellikle yüzeydeki inorganik safsızlıkları gidererek ve ortamdaki oksijeni ve suyu süperoksitler ve hidroksiller dahil olmak üzere çeşitli radikallere dönüştürerek polariteyi artırır ve yüzey potansiyelini elektronegatiften elektropozitifeye dönüştürebilir. Bu çalışmadaki temas açısı değerlendirmesine göre ıslak saklama koşullarının ti disklerde hidrokarbonların azaltılması ve hidrofilitenin artması hakkında önemli bilgiler vermektedir [Şekil 3.2]. Benzer şekilde, ASP, hidrokarbonun titanyum yüzeyinden uzaklaştırılmasının etkileri nedeniyle hidrofiliğe bir artışa ve temas açısında bir azalmaya neden olur [123]–[126].

Plazma muamelesi, yüzeylerde kimyasal ve fiziksel değişikliklere neden olabilir [127]. İslanabilirliğin artması, artan pürüzlülük ile yakından ilişkilidir [128]. Bununla birlikte, plazma ile ilgili artan ıslanabilirlik, mutlaka pürüzlülük ile doğrudan korelasyon göstermez. Bu çalışmada ASP muamelesi yüzey pürüzlülük parametrelerini önemli ölçüde değiştirmedir [Şekil 3.3]; bununla birlikte, ti disk yüzeyinin hidrofiliğini ve ıslanabilirliğini arttırmıştır. Aynı şekilde, ASP muamelesinden sonra yüzey pürüzlülüğü üzerinde kayda değer bir etki olmaksızın ıslanabilirliğin arttığını bildirmiştir [129]. Ek olarak, bu fizikokimyasal değişiklikler TiO<sub>2</sub> 'nin fotokatalitik fenomeni ile ilişkilidir ve hidrokarbon seviyesi, protein adsorpsiyon ve hücre tutunma oranları ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [130].

Özellikle, BSA gibi kan proteinlerinin titanyum yüzeylere ilk adsorpsiyonunun da uzun vadeli implant performansında önemli bir parametre olduğu iyi bilinmektedir. Biyomalzeme yüzeylerinde protein adsorpsiyonunun önemi, absorbe edilen farklı proteinlerin toplam miktarları ve hücre tutunması ile de gösterilir. Protein adsorpsiyonu kapasiteleri salin(1 ay) ve salin(2 yıl) gruplarında daha yüksekti çünkü hava altındaki hidrokarbonla kirlenmiş ti yüzey hidrofobik hale geldi. Sonuç olarak, ASP muamelesinden sonra protein yapışma kapasiteleri kuru ortamda saklanan numunelere kıyasla ıslak ortamda saklanan numunelerde daha yüksekti. Bununla birlikte, ti yüzeylerinden elde edilen hem karbon giderim hem de protein adsorpsiyonu miktarı salin içerisinde saklanan numunelerde daha yüksekti. ASP muamelesi sonrası salinde saklanan numunelerde gözlenen artan biyolojik aktivite, sadece TiO<sub>2</sub>

tabakasının kimyasal bileşim değişikliği ile değil aynı zamanda ıslak depolamanın neden olduğu nanoyapıların biyolojik aktivitede artışa neden olduğu düşünülmektedir [131].

Yüzey karakterizasyonu sonuçları, ASP işleminin yüzey yapısını ve morfolojisini önemli ölçüde değiştirmedini göstermiştir. Bu arada, XPS sonuçlarına bakılacak olursa ASP muamelesinin kontrolle karşılaştırıldığında O yüzdesini arttırıp C yüzdesini azalttığı gözlemlenmiştir [Şekil 3.5]. Bu da ASP muamelesi ile oksijen açısından zengin fonksiyonel grupların oluşumunu gösterir. ASP işlemi atomik bileşimleri değiştirir, Ti-O bağlarının yoğunluğu oda koşulları(1 ay) dışında kontrol grubuna kıyasla artmıştır, özellikle C-C bağlarının yoğunluğu, muamele edilmemiş Ti disklerle kıyasla azalmıştır. Bu da ASP muamelesinin karbon içeriğini azaltma yeteneğine sahip olduğunu kanıtlar. Ayrıca ASP' nin karbon kontaminasyonunu azalttığı Şekil 3.6'da ki TEM görüntüleri ile de kanıtlanmıştır. Kontrol, 0. gün plazma uygulaması, inert ortam(1 ay), oda koşulları(1 ay), salin(1 ay) ve salin(2 yıl) gruplarının XRD grafikleri ise birbirleriyle örtüşmüş [Şekil 3.4] yani ASP muamelesi Ti disklerin faz diyagramlarında da kaydedilecek bir değişiklik yapmamıştır. Bu çalışmada ASP, hidrofobik Ti yüzeyini daha az karbon kontaminasyonu ile hidrofilik bir yüzeye dönüştürdü.

Titanyum numunelerinin biyolojik etkinliğini incelemek için hMSCs hücreleri kullanıldı. ASP muamelesi sonrası meydana gelen kimyasal değişim, titanyum disk üzerindeki hMSCs yapışmasını arttırdı. Özellikle, yumuşak doku hücrelerinin titanyum üzerine bağlanması, ilk entegrasyon olaylarından birini içerir ve kemik veya titanyum yüzeyine bakteri istilasına karşı koruma ile sonuçlanan sonraki hücresel proliferasyon için esastır [132]. Ayrıca, biyomalzemelerin biyouyumluluğu, bu tür materyallerin kabulü için esastır ve biyouyumluluğun temsilcisi olarak bir sitotoksosite testi kabul edilir [133],[134]. Hücre canlılık testi ile her bir titanyum numunesine bağlanan hMSCs hücrelerinin hücre ölümü olmaksızın yüksek canlılık sergilediğini bulduk. Buna göre canlılık testinin sonuçları, ASP muamelesinin titanyum üzerinde hemen hemen hiç sitotoksositeye neden olmadığını gösterdi. Hücre morfolojisi sonuçlarında ise ASP muamelesinin hMSCs tutunmasını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir ve sonuçlar hücre canlılık testiyle paralellik göstermiştir.



Son olarak, ti implantların uzun süreli sağkalımını veya erken yükleme olasılığını sağlamak için bu in vitro sonuçların gerçek klinik durumlara uygulanabilir olup olmadığını doğrulamak için in vivo deneyler gereklidir.

# Kaynaklar

- [1] K. Duske *et al.*, ‘Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals’, *J. Clin. Periodontol.*, vol. 39, no. 4, pp. 400–407, 2012.
- [2] B. R. Adhikari and R. Khanal, ‘Introduction to the Plasma State of Matter’, no. 1.
- [3] V. Nehra, ‘Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources’, no. 2, pp. 53–68.
- [4] R. Afshari and H. Hosseini, ‘Non-thermal plasma as a new food preservation method , Its present and future prospect Non-thermal plasma as a new food preservation method , Its present and future prospect’, no. May, 2014.
- [5] C. Tendero, C. Tixier, P. Tristant, J. Desmaison, and P. Leprince, ‘Atmospheric pressure plasmas : A review’, vol. 61, pp. 2–30, 2006.
- [6] K. Weltmann and T. Von Woedtke, ‘Basic requirements for plasma sources in medicine’, *Eur. Phys. J.*, vol. 13807, 2011.
- [7] K. Fricke, ‘Influence of non-thermal plasma-based biological decontamination processes on the surface properties of plasma-exposed polymers’, 2013.
- [8] J. Robert and P. H. Rutherford, *Introduction to plasma physics*. 1995.
- [9] L. Xu, A. L. Garner, B. Tao, and K. M. Keener, ‘Microbial Inactivation and Quality Changes in Orange Juice Treated by High Voltage Atmospheric Cold Plasma’, 2017.
- [10] N. N. Misra, B. K. Tiwari, K. S. M. S. Raghavarao, and P. J. Cullen,

- ‘Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens’, pp. 159–170, 2011.
- [11] J. Kim, E. Lee, E. Ha, and Y. Kim, ‘Inactivation of *Staphylococcus aureus* on the beef jerky by radio-frequency atmospheric pressure plasma discharge treatment’, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 22, pp. 124–130, 2014.
- [12] J. F. Kolb *et al.*, ‘Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications’, vol. 241501, no. 2008, pp. 24–27, 2013.
- [13] W. Stolz and G. E. Morfill, ‘Cold atmospheric plasma devices for medical issues’, no. May 2014, 2013.
- [14] S. Eliezer and Y. Eliezer, ‘The Fourth State of Matter: An Introduction to Plasma Science’, 2001.
- [15] N. R. Council, P. S. Committee, and P. 2010 Committee, *Plasma science: advancing knowledge in the national interest*, vol. 3. National Academies Press, 2008.
- [16] S. Bußler, *Cold atmospheric pressure plasma treatment of food matrices : Tailored modification of product properties along value-added chains of plant and animal related products*, no. September 2016. .
- [17] K. Weltmann, S. Hamaguchi, and K. K. Ostrikov, ‘The future for plasma science and technology’, no. July 2018, pp. 1–29, 2019.
- [18] C.-K. K. Jun-Hyun Kim, Jin-Su Park, Yong-Seon Shin, ‘Atmospheric-pressure floating electrode-dielectric barrier discharge with flexible electrodes: Effect of conductor shapes’. 2019.
- [19] P. Chemistry, G. Xiao, X. Gao, and Z. Luo, *Non-Thermal Plasmas for VOCs Abatement*, no. January 2016. 2014.
- [20] T. Shao, F. Liu, B. Hai, Y. Ma, R. Wang, and C. Ren, ‘Surface Modification of Epoxy Using an Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge to Accelerate Surface Charge Dissipation’, vol. 24, no. 3, pp. 1557–1565, 2017.

- [21] K. Fricke, K. Weltmann, and M. R. Wertheimer, 'Plasma polymers deposited in atmospheric pressure dielectric barrier discharges: Influence of process parameters on film properties', *Thin Solid Films*, 2016.
- [22] D. Ziuzina, L. Han, P. J. Cullen, and P. Bourke, 'Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for Salmonella enterica serovar Typhimurium, Listeria monocytogenes and Escherichia coli', *Int. J. Food Microbiol.*, 2015.
- [23] A. Fridman and L. A. Kennedy, *Plasma physics and engineering*. CRC press, 2004.
- [24] M. Taheraslani, *Non-oxidative coupling of methane to C2 hydrocarbons : integration of dielectric barrier discharge plasma and catalyst packed bed*, no. February 2019. 2021.
- [25] J. Heinlin *et al.*, 'Plasma medicine : possible applications in dermatology', vol. 2010, no. Band 8, pp. 968–976, 2010.
- [26] A. Thesis, 'Direct Plasma Interaction with Living Tissue', no. September, 2008.
- [27] G. Bartosz, 'Reactive oxygen species : Destroyers or messengers ?', vol. 77, pp. 1303–1315, 2009.
- [28] K. H. Brieger, K.; Schiavone, S.; Miller, F.J.; Krause, 'Article Reactive oxygen species : from health to disease', vol. 142.
- [29] T. Finkel and N. J. Holbrook, 'Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing', vol. 408, no. November, pp. 239–247, 2000.
- [30] C. Bogdan, 'Nitric oxide and the immune response', vol. 2, no. 10, pp. 907–916, 2001.
- [31] L. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, 'Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease', pp. 315–424, 2011.
- [32] Y. Li, M. H. Kang, H. S. Uhm, G. J. Lee, E. H. Choi, and I. Han, 'Effects of

atmospheric-pressure plasma and plasma activated nitric oxide water on cervical cancer cells', *Nat. Publ. Gr.*, no. March, pp. 1–9, 2017.

- [33] V. Sarron *et al.*, 'ROS implication in a new antitumor strategy based on nonthermal plasma', vol. 2194, pp. 2185–2194, 2012.
- [34] S. U. Kalghatgi, M. Ieee, G. Fridman, A. Fridman, G. Friedman, and A. M. Clyne, 'Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge Plasma Treatment of Endothelial Cells', no. May 2014, 2008.
- [35] K. Cheng, Z. Lin, Y. Cheng, H. Chiu, and N. Yeh, 'Wound Healing in Streptozotocin- Induced Diabetic Rats Using Atmospheric-Pressure Argon Plasma Jet', no. November 2017, pp. 1–15, 2018.
- [36] X. Lu, M. Keidar, M. Laroussi, E. Choi, E. J. Szili, and K. Ostrikov, 'Transcutaneous plasma stress: From soft-matter models to living tissues', *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 138, pp. 36–59, 2019.
- [37] H. Shintani, 'Inactivation of Bacterial Spore , Endotoxin , Lipid A , Normal Prion and Abnormal Prion by Exposures to Several Sorts of Gases Plasma', vol. 21, no. 1, 2016.
- [38] N. M. Nasir, B. K. Lee, S. S. Yap, K. L. Thong, and S. L. Yap, 'Cold Plasma Inactivation of Chronic Wound Bacteria', *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 605, no. April, pp. 76–85, 2016.
- [39] P. Brun *et al.*, 'Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma', *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33245, 2012.
- [40] G. Isbary *et al.*, 'A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients', *Br. J. Dermatol.*, vol. 163, no. 1, pp. 78–82, 2010.
- [41] J. Pan *et al.*, 'Cold Plasma Therapy of a Tooth Root Canal Infected with Enterococcus faecalis Biofilms In Vitro', *J. Endod.*, vol. 39, no. 1, pp. 105–110, 2013.
- [42] Y. Jiao, F. R. Tay, L. Niu, and J. Chen, 'Advancing antimicrobial strategies

- for managing oral biofilm infections’, *Int. J. Oral Sci.*, vol. 11, no. 3, pp. 1–11, 2019.
- [43] Z. Chen and R. E. Wirz, ‘Cold atmospheric plasma for COVID-19’, no. April, pp. 1–7, 2020.
- [44] R. Date, R. Date, A. Date, and R. Article, ‘Microbiological Interactions with Cold Plasma’, 2017.
- [45] O. Odunayo and O. Soottawat, ‘Dielectric barrier discharge cold atmospheric plasma : Bacterial inactivation mechanism’, no. August, pp. 1–10, 2019.
- [46] M. Laroussi, ‘Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art’, *Plasma Process. Polym.*, vol. 2, no. 5, pp. 391–400, 2005.
- [47] D. A. Mendis, M. Rosenberg, and F. Azam, ‘A note on the possible electrostatic disruption of bacteria’, *IEEE Trans. plasma Sci.*, vol. 28, no. 4, pp. 1304–1306, 2000.
- [48] M. Moisan, J. Barbeau, M. Crevier, J. Pelletier, N. Philip, and B. Saoudi, ‘Plasma sterilization . Methods and mechanisms’, no. January 2017, 2002.
- [49] P. Bourke, D. Ziuzina, L. Han, P. J. Cullen, and B. F. Gilmore, ‘Microbiological interactions with cold plasma’, 2017.
- [50] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman, ‘Applied Plasma Medicine’, pp. 503–533.
- [51] S. U. Kalghatgi *et al.*, ‘Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma’.
- [52] T. W. Stief, J. Kurz, M. O. Doss, and J. Fareed, ‘Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood’, *Thromb. Res.*, vol. 97, no. 6, pp. 473–480, 2000.
- [53] D. Del Principe, A. Menichelli, W. De Matteis, M. L. Di Corpo, and S. Di Giulio, ‘Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets’, vol. 18, no. 1, pp. 142–146, 1985.

- [54] C. Heslin, D. Boehm, V. Milosavljevic, and P. J. Cullen, 'Quantitative Assessment of Blood Coagulation by Cold Atmospheric Plasma', no. March, 2015.
- [55] P. Chemistry *et al.*, 'Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air School of Biomedical Engineering , Science , and Health Systems Drexel E-Repository and Archive ( iDEA ) Please direct questions to archives@drexel.edu', no. May 2014, 2006.
- [56] O. Access, 'Contribution of a portable air plasma torch to rapid blood coagulation as a method of preventing bleeding', 2009.
- [57] S. P. Kuo, 'Air plasma for medical applications', vol. 2012, no. September, pp. 481–495, 2012.
- [58] C.-Y. Chen *et al.*, 'Blood clotting by low-temperature air plasma', *IEEE Trans. plasma Sci.*, vol. 37, no. 6, pp. 993–999, 2009.
- [59] S. Kuo, 'Air Plasma Spray for First Aid', pp. 69–82, 2016.
- [60] S. Kuo, 'On Hemostasis of Cold Atmospheric Air Plasma', pp. 99–111, 2018.
- [61] E. García-Alcantara *et al.*, 'Accelerated mice skin acute wound healing in vivo by combined treatment of argon and helium plasma needle', *Arch. Med. Res.*, vol. 44, no. 3, pp. 169–177, 2013.
- [62] C. Dunham, E. I. Cornwell, C. Brathwaite, and P. Militello, 'Experience with the argon beam coagulator in critically injured patients', *Panam J Trauma*, vol. 1, pp. 81–85, 1989.
- [63] E. Croce, M. Azzola, R. Russo, M. Golia, S. Angelini, and S. Olmi, 'Laparoscopic liver tumour resection with the argon beam.', *Endosc. Surg. Allied Technol.*, vol. 2, no. 3–4, pp. 186–188, 1994.
- [64] V. W. Rusch, R. Schmidt, Y. Shoji, and Y. Fujimura, 'Use of the Argon Beam Electrocoagulator for Performing Pulmonary Wedge Resections', *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 49, no. 2, pp. 287–291, 1990.

- [65] E. Brand and N. Pearlman, 'Electrosurgical debulking of ovarian cancer: a new technique using the argon beam coagulator', *Gynecol. Oncol.*, vol. 39, no. 2, pp. 115–118, 1990.
- [66] A. Koagulation and E. E. Gmbh, 'Argon plasma coagulation', vol. 3, no. 1, pp. 1–5, 2008.
- [67] M. Pakyari and A. Farrokhi, 'Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing', vol. 2, no. 5, pp. 215–224, 2013.
- [68] S. Barrientos, O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem, and M. Tomic-canic, 'Growth factors and cytokines in wound healing', 2008.
- [69] Y. Su and A. Richmond, 'Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds', vol. 00, no. 00, pp. 1–10, 2014.
- [70] B. Behm, P. Babilas, M. Landthaler, and S. Schreml, 'Cytokines , chemokines and growth factors in wound healing', 2011.
- [71] E. Y. Lin and J. W. Pollard, 'Macrophages : modulators of breast cancer progression', vol. 256, pp. 158–172, 2004.
- [72] S. A. Eming, P. Martin, and M. Tomic-canic, 'Wound repair and regeneration : Mechanisms , signaling , and translation', vol. 6, no. 265, 2014.
- [73] F. Brehmer *et al.*, 'Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm® VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT 01415622)', *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 29, no. 1, pp. 148–155, 2015.
- [74] C. Ulrich and F. Kluschke, 'Clinical use of cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: A pilot study', no. May, 2015.
- [75] D. Li *et al.*, 'Promotion of Wound Healing of Genetic Diabetic Mice Treated by a Cold Atmospheric Plasma Jet', *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 47, no. 1, pp. 4848–4860, 2019.



- [76] Y. Hung, L. Lee, Y. Peng, C. Chang, and Y. Wong, ‘ScienceDirect Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing : An animal study’, *J. Chinese Med. Assoc.*, vol. 79, no. 6, pp. 320–328, 2016.
- [77] S. Kubinova, K. Zavisikova, L. Uherkova, V. Zablotskii, O. Churpita, and O. Lunov, ‘Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats’, *Nat. Publ. Gr.*, no. February, pp. 1–11, 2017.
- [78] C. P. Plasma, H. Metelmann, and K. Weltmann, *Comprehensive Clinical Plasma Medicine*. .
- [79] M. Keidar, D. Yan, I. I. Beilis, B. Trink, and J. H. Sherman, ‘Plasmas for Treating Cancer : Opportunities for Adaptive and Self-Adaptive Approaches’, *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 6, pp. 586–593, 2018.
- [80] D. B. Graves, ‘Low temperature plasma biomedicine : A tutorial review a ) Low temperature plasma biomedicine : A tutorial review a )’, vol. 080901, 2014.
- [81] D. Boehm and P. Bourke, ‘Safety implications of plasma-induced effects in living cells – a review of in vitro and in vivo findings’, vol. 400, no. 1, pp. 3–17, 2019.
- [82] X. Zhang, M. Li, R. Zhou, K. Feng, and S. Yang, ‘Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle’, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 93, no. 2, p. 21502, 2008.
- [83] J. Y. Kim *et al.*, ‘Single-Cell-Level Cancer Therapy Using a Hollow Optical Fiber-Based Microplasma’, *small*, vol. 6, no. 14, pp. 1474–1478, 2010.
- [84] N. K. Kaushik, H. Uhm, E. H. Choi, N. K. Kaushik, H. Uhm, and E. Ha, ‘Micronucleus formation induced by dielectric barrier discharge plasma exposure in brain cancer cells Micronucleus formation induced by dielectric barrier discharge plasma exposure in brain cancer cells’, vol. 084102, no. 2012, pp. 98–102, 2013.
- [85] N. Kumar, J. H. Park, S. N. Jeon, and B. S. Park, ‘The action of microsecond-

pulsed plasma-activated media on the inactivation of human lung cancer cells', *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 115401, p. 115401.

- [86] F. K. Fumi Utsumi, Hiroaki Kajiyama, Kae Nakamura, Hiromasa Tanaka, Masaaki Mizuno, Kenji Ishikawa, Hiroki Kondo, Hiroyuki Kano, Masaru Hori, 'Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo.pdf'. 2013.
- [87] B. T. M Keidar<sup>1</sup>, R Walk, A Shashurin, P Srinivasan, A Sandler, S Dasgupta, R Ravi, R Guerrero-Preston, 'Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy'. 2011.
- [88] M. Vandamme, E. Robert, S. Pesnel, E. Barbosa, J. Sobilo, and A. Le Pape, 'Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts : Preliminary Results', pp. 264–273, 2010.
- [89] J. Won *et al.*, 'Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma : Involvement of DNA-damage-triggering sub-G 1 arrest via the ATM / p53 pathway', *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 545, pp. 133–140, 2014.
- [90] N. Kumar, P. Attri, D. K. Yadav, J. Choi, E. H. Choi, and H. S. Uhm, 'Induced apoptosis in melanocytes cancer cell and oxidation in biomolecules through deuterium oxide generated from atmospheric pressure non-thermal plasma jet', pp. 1–13, 2014.
- [91] P. Kuehn, C. Heidecke, W. Von Bernstorff, and T. Von Woedtke, 'Non-thermal plasma-treated solution demonstrates antitumor activity against pancreatic cancer cells in vitro and in vivo', no. April, pp. 1–12, 2017.
- [92] O. Karaman *et al.*, 'Synergistic Effect of Cold Plasma Treatment and RGD Peptide Coating on Cell Proliferation over Titanium Surfaces', no. November, 2017.
- [93] Y. Yang *et al.*, 'Inhibition of bacterial growth on zirconia abutment with a helium cold atmospheric plasma jet treatment', pp. 1465–1477, 2020.

- [94] Y. Naujokat, H.; Harder, S.; Schulz, L.Y.; Wiltfang, J.; Florke, C.; Acil, 'Surface conditioning with cold argonplasma and its effect on the osseointegration of dental implants in miniature pigs'. pp. 484–490, 2019.
- [95] P. G. Coelho *et al.*, 'Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces', *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 100 A, no. 7, pp. 1901–1906, 2012.
- [96] J. Lee, V. Frias, K. Lee, and R. F. Wright, 'Effect of implant size and shape on implant success rates: A literature review', no. October, 2005.
- [97] C. N. Elias, 'Factors Affecting the Success of Dental Implants', no. August 2011, 2014.
- [98] R. M. Sullivan, 'Implant dentistry and the concept of osseointegration: a historical perspective', *J Calif Dent Assoc*, vol. 29, no. 11, pp. 737–745, 2001.
- [99] L. Gaviria, J. P. Salcido, T. Guda, and J. L. Ong, 'Current trends in dental implants', 2014.
- [100] R. G. Triplett, U. Frohberg, N. Sykaras, and R. D. Woody, 'Implant materials, design, and surface topographies: their influence on osseointegration of dental implants', *J. Long. Term. Eff. Med. Implants*, vol. 13, no. 6, 2003.
- [101] V. Duraisamy and S. Sarate, 'DENTAL IMPLANT MATERIALS , IMPLANT DESIGN , AND ROLE OF FEA-A', no. June, 2017.
- [102] J. T. Steigenga, K. F. Al-shammari, F. H. Nociti, C. E. Misch, and H. Wang, 'Dental Implant Design and Its Relationship to Long-Term Implant Success', pp. 306–317.
- [103] S. Seth and P. Kalra, 'Effect of Dental Implant Parameters on Stress Distribution at Bone-Implant Interface', vol. 2, no. 6, pp. 121–123, 2013.
- [104] A. Balamurugan, S. Rajeswari, G. Balossier, A. H. S. Rebelo, and J. M. F. Ferreira, 'Corrosion aspects of metallic implants — An overview', no. 11, 2008.

- [105] J. L. Gilbert, ‘Medical Implant Corrosion : Electrochemistry at Metallic Biomaterial Surfaces’, pp. 1–28.
- [106] A. Jemat, M. J. Ghazali, M. Razali, and Y. Otsuka, ‘Surface modifications and their effects on titanium dental implants’, *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [107] M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, and D. M. Brunette, ‘Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys’, in *Titanium in medicine*, Springer, 2001, pp. 171–230.
- [108] J. A. Jansen, A. F. Von Recum, J. Van Der Waerden, and K. De Groot, ‘Soft tissue response to different types of sintered metal fibre-web materials’, *Biomaterials*, vol. 13, no. 13, pp. 959–968, 1992.
- [109] andJukka P. M. Xiaotian Liu<sup>1, 2,†</sup>, Shuyang Chen<sup>2, 3,†</sup>, James K.H. Tsoi<sup>2,\*</sup>, ‘Binary titanium alloys as dental implantmaterials—a review.pdf’. 2017.
- [110] A. Sérgio *et al.*, ‘Some aspects of bone remodeling around dental implants’, *Rev. Clínica Periodoncia, Implantol. y Rehabil. Oral*, pp. 1–9, 2016.
- [111] M. F. David Erhardt, Mecklenburg, ‘Accelerated vs Natural Aging: Effects of Aging Conditions on the Aging Process of Cellulose’. .
- [112] M. R. Amirzada, ‘Optimization in the Technological Steps for the Fabrication of Large Area Micromirror Arrays’. 2015.
- [113] T. V. V. and J. Raja, ‘Surface finish metrology tutorial’. .
- [114] J. Wiechelman, D. Braun, and D. Fitzpatrick, ‘Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay : Identification Groups Responsible for Color Formation’, vol. 237, 1988.
- [115] Y. J. Lim and Y. Oshida, ‘Initial contact angle measurements on variously treated dental/medical titanium materials’, *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 11, no. 4, pp. 325–341, 2001.
- [116] J. M. Macak *et al.*, ‘TiO<sub>2</sub> nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications’, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*,

vol. 11, no. 1–2, pp. 3–18, 2007.

- [117] H. Kawai, Y. Shibata, and T. Miyazaki, ‘Glow discharge plasma pretreatment enhances osteoclast differentiation and survival on titanium plates’, vol. 25, pp. 1805–1811, 2004.
- [118] Y. Shibata, M. Hosaka, H. Kawai, and D. D. S. T. Miyazaki, ‘Glow Discharge Plasma Treatment of Titanium Plates Enhances Adhesion of Osteoblast-like Cells to the Plates Through the Integrin-Mediated Mechanism’, pp. 771–777.
- [119] T. Suzuki, K. Kubo, N. Hori, M. Yamada, and N. Kojima, ‘Biomaterials Nonvolatile buffer coating of titanium to prevent its biological aging and for drug delivery’, *Biomaterials*, vol. 31, no. 18, pp. 4818–4828, 2010.
- [120] S. H. Choi *et al.*, ‘Time-dependent effects of ultraviolet and nonthermal atmospheric pressure plasma on the biological activity of titanium’, *Sci. Rep.*, vol. 6, no. July, pp. 1–11, 2016.
- [121] L. Bárdos and H. Baránková, ‘Cold atmospheric plasma : Sources , processes , and applications’, *Thin Solid Films*, vol. 518, no. 23, pp. 6705–6713, 2010.
- [122] S. Choi, W. Jeong, J. Ch, J. Lee, and H. Yu, ‘Time-dependent effects of ultraviolet and nonthermal atmospheric pressure plasma on the biological activity of titanium’, no. September, pp. 1–11, 2016.
- [123] S. Seo, S. Uhm, J. Kwon, E. H. Choi, K. Kim, and K. Kim, ‘An Alternative to Annealing TiO<sub>2</sub> Nanotubes for Morphology Preservation : Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment’, vol. 15, no. 3, pp. 2501–2507, 2015.
- [124] H. Y. Seo, J. S. Kwon, Y. R. Choi, K. M. Kim, E. H. Choi, and K. N. Kim, ‘Cellular attachment and differentiation on titania nanotubes exposed to air- or nitrogen-based non-thermal atmospheric pressure plasma’, *PLoS One*, vol. 9, no. 11, pp. 1–14, 2014.
- [125] P. Attri *et al.*, ‘Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis’, pp. 1–8, 2015.

- [126] K. Duske *et al.*, ‘Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals’, *J. Clin. Periodontol.*, vol. 39, no. 4, pp. 400–407, 2012.
- [127] H. Puliyalil and U. Cvelbar, ‘Selective Plasma Etching of Polymeric Substrates for Advanced Applications’, no. Cvd, 2016.
- [128] M. Z. Khan, R. Sreekanth, and P. Srinivasa, ‘Effect of Argon Plasma Treatment on Tribological Properties of UHMWPE / MWCNT Nanocomposites’, pp. 1–15, 2016.
- [129] Y. Ito, T. Okawa, T. Fujii, and M. Tanaka, ‘Influence of plasma treatment on surface properties of zirconia’, *J. Osaka Dent. Univ.*, vol. 50, no. 2, pp. 79–84, 2016.
- [130] H. Aita *et al.*, ‘Biomaterials The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone’, *Biomaterials*, vol. 30, no. 6, pp. 1015–1025, 2009.
- [131] S. Choi, J. Ryu, J. Kwon, J. Kim, and J. Cha, ‘Effect of wet storage on the bioactivity of ultraviolet light- and non-thermal atmospheric pressure plasma-treated titanium and zirconia implant surfaces’, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 105, no. August, p. 110049, 2019.
- [132] I. Abrahamsson and N. P. Lang, ‘Morphogenesis of the peri-implant mucosa : an experimental study in dogs’, pp. 1–8, 2007.
- [133] W. I. S. Biocompatibility, ‘Principles of biocompatibility for dental practitioners’, pp. 203–209, 2001.
- [134] G. Mazzanti, C. Daniele, B. Tita, F. Vitali, and A. Signore, ‘Biological evaluation of a polyvinyl siloxane impression material’, pp. 371–374, 2005.

# Ekler

# Ek

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

### **Konferans Bildirileri**

**1. Yasav G.**, Ekimci G. D., Türkal M., Karaman O., Ercan U. K., Evaluation of Long Term Effect of Cold Atmospheric Plasma on Titanium Implant Materials. In 2019 Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO), 3-5 October 2019, Kuşadası, TÜRKİYE (Sözlü Sunum)



# Özgeçmiş

Adı Soyadı: Gencay Yasav  
E-mail: gencayasav@gmail.com

Eğitim:  
2014–2018 Afyon Kocatepe Üniversitesi, Biyomedikal Müh. Bölümü

Yayınlar (varsa):

1. **Yasav G.**, Ekimci G. D., Türkal M., Karaman O., Ercan U. K., Evaluation of Long Term Effect of Cold Atmospheric Plasma on Titanium Implant Materials. In 2019 Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO), 3-5 October 2019, Kuşadası, TÜRKİYE (Sözlü Sunum)