

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİTANYUM ALAŞIM BİYOMALZEMELERDE PLAZMA
POLİMERİZASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK KEMİK
MORFOGENETİK PROTEİN TUTUKLAMASININ
İNCELENMESİ**

Gülşah Dicle

Yüksek Lisans Tezi

2015

**TİTANYUM ALAŞIM BİYOMALZEMELERDE PLAZMA
POLİMERİZASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK KEMİK
MORPHOGENETIC PROTEİN TUTUKLAMASININ
İNCELENMESİ**

**STUDY OF PLASMA POLYMERIZATION TECHNIQUE ON
TITANIUM ALLOYS BIOMATERIAL FOR IMMOBILIZATION
WITH BONE MORHOGENETİK PROTEIN**

Gülşah Dicle

Başkent Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMEDİKAL Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2015

**“TİTANYUM ALAŞIM BİYOMALZEMELERDE PLAZMA POLİMERİZASYON
TEKNİĞİ KULLANILARAK KEMİK MORFOGENETİK PROTEİN
TUTUKLAMASININ İNCELENMESİ ”** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından,
09/02/2015 tarihinde, **BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda**
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
(Prof. Dr. Selim ERKUT)

Üye (Danışman) :.....
(Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER)

Üye :.....
(Yrd. Doç. Dr. Erkin SÖNMEZ)

ONAY

..../02/2015

Prof. Dr. Emin AKATA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZ

TİTANYUM ALAŞIM BİYOMALZEMELERDE PLAZMA POLİMERİZASYON TEKNİĞİ KULLANILARAK KEMİK MORFOGENETİK PROTEİN TUTUKLAMASININ İNCELENMESİ

Gülşah Dicle

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği

Ortopedi, omurga cerrahisi, ve diş hekimliği uygulamalarında vida, plak vb benzer malzemelerin üretiminde titanyum alaşım içerikli metaller tercih edilirken (mükemmel mekanik özellik, kimyasal kararlılık, biyouyumluluk vs.) bu malzemelerin, kemik hücreleri ve dokusu ile bağlanmasındaki zayıflık bir süre sonra implantın çıkmasına, kaynamamasına, kırılmasına ve buna bağlı ciddi klinik bulguların ve/ya tekrarlayan revizyon cerrahilerine neden olmaktadır. Çok sık karşılaşılan eksik kaynama problemlerinin önüne geçilmesi, maddi olarak sarfiyat azaltma, hasta konforu vs. açısından son derece önemlidir. Bu nedenle, bel ve omurga cerrahi uygulamalarda sıklıkla kullanılan yöntem, kemik dokusu ile olan etkileşiminin (osteointegrasyon) en üst seviyeye çıkartılması için, kemik dokusu gelişimini indükte eden proteinlerin kemik morfogenetik proteinin (rhBMP-2) kemiğe sürülmesi ve sonrasında titanyum alaşım implant malzemesinin (transpediküler vida) fikse edilmesidir. Ancak, tümüyle doğal (bu nedenle biyouyumlu) bu proteinin, toz halinde omurilik bölgesine dökülmesi, hem maliyeti artırmakta hem de kemikteki doz fazlalığından dolayı hala komplikasyonlar (heterotropik ossifikasyon, osteoliz, enflamatuvar kist formasyonları vs.) oluşturmaktadır. Günümüz teknolojisinde ayrıca dinamik stabilizasyon ve perkütan enstrumantasyon teknikleri giderek yaygınlaşmaktadır. Dinamik stabilizasyonda omurgalar arası füzyon (füzyon: kemiksel birleşme ile iki omur arasındaki anormal hareketin önlenmesi) uygulanmamakta, minimal invaziv perkütan cerrahi de ise füzyon interbody füzyon şeklinde uygulanabilmektedir. Her iki cerrahide de sistemin stabilitesi açısından vida kemik integrasyonu çok önem kazanmaktadır.

Ülkemizde benzer amaçla, açık cerrahide kullanılabilen hidroksiapatit kaplı vidalar mevcuttur. HA kaplamasının pahalı olması, ülkemizde yapılamaması bu tekniğin

dezavantajlarıdır. Ayrıca HA ile yapılan kaplamalarda metal ve HA 'in yoğunluk farkından kaynaklı kırılma problemlerinden kaynaklı implantın çıkma problemleri sıklıkla görülmektedir. Araştırmada bu problemi çözmek amacıyla, plazma polimerizasyon tekniği ile malzeme yüzeyinde uygun kimyasal gruplar oluşturulması ve devamında (rhBMP-2) implant üzerine direkt tutuklanması yaklaşımı kullanılmıştır. Plazma polimerizasyon tekniğinde, özgün monomer (sisteamin) ve yük boşalım tipi (radyo frekansı), kullanılmıştır. Ayrıca yöntemdeki işlem parametreleri (güç (W), süre (dak), monomer akış hızı (ml/dak) değiştirilerek yüzeyde meydana gelen fiziksel ve kimyasal farklılıklar, çeşitli karakterizasyon teknikleri ile tanımlanmıştır. Bu sonuçlar değerlendirilerek, nanomertebe film oluşturulmasında, akış dinamik ortamında en kararlı olan plazma polimerizasyon parametresi seçilmiştir. Kararlılığa göre en uygun parametre güç: 30W, süre: 9 dak, akış hızı : 10 ml/dak' dır. Seçilen işlem koşullarında plazma polimerizasyon tekniği ile modifikasyon ve sonrasında % 2.5 v/v 'lik glutaraldehit ile aktivasyon aşamaları devamında % 1.5 mg/ml rhBMP-2, 2 saat süreyle tutuklanmıştır. İmplant yüzeyde (rhBMP-2) tutuklanması ile kemik dokusu gelişimini arttırdığı histolojik testlerle kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, spinal implantların plazma polimerizasyon tekniğiyle kemik yapımını arttırıcı rhBMP-2 ile kaplanması yaklaşımı, canlı dışı (in vitro) / ve canlı içi (in vivo) ortamlarda test edilmiş ve değerlendirilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Titanyum, Füzyon, Kemik Morfogenetik Protein, Plazma Polimerizasyon

Danışman: Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER, Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü.

ABSTRACT

STUDY OF PLASMA POLYMERIZATION TECHNIQUE ON TITANIUM ALLOYS BIOMATERIAL FOR IMMOBILIZATION WITH BONE MORPHOGENETIC PROTEIN

Gülşah Dicle

Baskent University Institute of Science

Department of Biomedical Engineering

Titanium is the material of choice in the production of implants used in orthopedics, spine surgery and dentistry due to its excellent mechanical properties, chemical stability and biocompatibility. The loose interaction between the implants and bone result in implant loosening, pull-out and screw breakage. Serious symptoms and probable revision surgeries can develop because of implant related problems. The acceleration of new bone development, production of new implant types and use in health area are strategically important steps. Therefore, waist and spine surgery in commonly used method, the bone tissue and the interaction (osteointegration) to maximize the level of bone tissue formation bone proteins which induce morphogenetic protein (rhBMP-2) is placed on the bone and then the titanium alloy implant material (transpedicular screws) is not fixed. However, completely natural (and therefore biocompatible) this protein spine pouring powdered, both increases the costs and due to dose excess of bone still complications (heterotopic ossification, osteolysis, inflammatory cyst formation, etc.). In the millenium, dynamic stabilisation and percutaneous instrumentation techniques have been started to be widely used. Interbody fusion is used in minimally invasive percutaneous spine surgery while no bony fusion was performed in dynamic stabilisation. New bone formation around the screw minimizes the risks of screw loosening, pull-out and screw breakage. In our country, only hydroxyapatite (HA) coated screws are available for increasing the screw bone integration. HA coating is expensive and cannot be performed in our country. Since HA coating is dependent on European countries, we planned to coat the spinal implants with recombinant bone morphogenetic protein (rhBMP) by plasma polymerisation technique.

In order to solve this problem in the research of material surface by plasma polymerization techniques in the creation of appropriate chemical groups and continue the bone morphogenetic protein (rhBMP-2) approach is used directly on the implant immobilization. In the plasma polymerization technique, the original monomer (cysteamine) and load discharge type (radio frequency) is used. Furthermore, the method of processing parameters (power (W) time (min), monomer flow rate (ml / min) by changing the surface physical and chemical differences occurred were identified by various characterization techniques. The results are evaluated in forming nanoscale film flow at the dynamic environment stable plasma polymerization parameters were selected. Optimal parameter power by resolution: 30 W, time: 9 min, flow rate: 10 ml / min . The modification by plasma polymerization technique to the selected processing conditions and after the activation (2.5% v / v, glutaraldehyde) step continued in is 2.5% mg/ml rhBMP-2 arrested for 2 hours. It is proven by histological testing the implant surface rhBMP-2 enhances bone tissue formation with the immobilization. As a result, spinal implants plasma polymerization coating technique with bone formation by increasing the bone morphogenetic protein (rhBMP-2) approach , outside the body (in vitro) / and animal (in vivo) has been tested and evaluated.

Keywords: Titanium, Fusion, Bone Morphogenetic Protein, Plasma Polymerisation

Advisor: Assoc. Prof Dilek Cokeliler, Baskent University, Department of Biomedical Engineering

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
1.GİRİŞ	13
2.GENEL BİLGİLER	
2.1 Titanyum Biyomalzeme.....	15
2.2 Titanyum Biyomalzeme-Biyouyumluluk İlişkisi:.....	17
2.2.1 Kemik dokusu	18
2.2.2 Füzyon kaynama.....	19
2.2.2.1 <u>Interbody (vücut içi) füzyon malzemeleri</u>	20
2.2.2.2 <u>Füzyon ve klinik iyileşme</u>	20
2.2.2.3 <u>Dinamik stabilizasyon</u>	21
2.3 Minimal İnvaziv Cerrahi.....	22
2.4 Kemik Morfogenetik Protein (rhBMP).....	22
2.5 Plazma Polimerizasyon Yöntemi.....	24
2.5.1 Alternatif yüzey modifikasyon yöntemleri ile karşılaştırılması.....	26
2.5.2 Plazma polimerizasyon yönteminin biyomalzeme uygulamaları.....	27
2.6 Osteointegrasyon Geliştirici Çalışmalar.....	29
2.7 Karakterizasyon Testleri	31
2.7.1 Yüzey karakterizasyon testleri	31
2.8 Histolojik Testler.....	32
3. MATERYAL METOT	
3.1 Kimyasal Malzemeler	35
3.2 Vidaların ve Plazma Polimerizasyon Sisteminin Hazırlığı.....	35
3.3 Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile İmplant Yüzey Üzerinde Fonksiyonel Grup Oluşturmak.....	37
3.4 Kimyasal Aktivasyon.....	39
3.5 Yüzey Karakterizasyon Testleri.....	38
3.5.1 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan / kimyasal aktivasyon yapılan vida setlerinde temas açısı ölçümü.....	39

3.5.2 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan / kimyasal aktivasyon vida setlerinde kaplama kalınlığı ölçümü.....	40
3.5.3 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde yüzey kimyasının belirlenmesi	41
3.5.4 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde yüzey iletkenlik değişiminin belirlenmesi	41
3.6 Rekombinant Kemik Morfogenetik Protein Tutuklanması.....	42
4.SONUÇ	
4.1 Yüzey Karakterizasyon Testleri.....	44
4.1.1 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde temas açısı ölçümü	
4.1.1.1 <u>Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde temas açısına gücün etkisi</u>	44
4.1.1.2 <u>Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde temas açısına sürenin etkisi</u>	46
4.1.1.3 <u>Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde temas açısına monomer akışının etkisi</u>	47
4.2 Plazma Polimerizasyon Yönteminde Kaplanan Vida Setlerinde Kaplama Kalınlığı Ölçümü.....	48
4.2.1 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplama kalınlığına gücün etkisi..	49
4.2.2 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplama kalınlığına sürenin etkisi..	50
4.3 Plazma Polimerizasyon Yönteminde Kaplanan Vida Setlerinde Yüzey Kimyasının Belirlenmesi.....	55
4.3.1 Plazma polimerizasyon yönteminde yüzey kimyasına gücün etkisi.....	55
4.3.2 Plazma polimerizasyon yönteminde yüzey kimyasına sürenin etkisi....	58
4.3.3 Plazma polimerizasyon yönteminde yüzey kimyasına monomer akışının Etkisi.....	59
4.4 Plazma Polimerizasyon ile Kaplanan Vida Setlerinde Yüzey İletkenlik Değişimin Belirlenmesi.....	61
4.5 Plazma Polimerizasyon ile Kaplamada Kimyasal Aktivasyonun Etkisi.....	62
4.5.1 Kimyasal aktivasyonu yapılan vida setlerinin temas açısı ölçümleri.....	63
4.5.2 Kimyasal aktivasyonu yapılan vida setlerinin kaplama kalınlığı ölçümleri	
4.5.3 Kimyasal aktivasyonu yapılan vida setlerinin yüzey kimyasının.....	65
Belirlenmesi.....	66

4.6 Rekombinant Kemik Morfogenetik Protein Tutuklanması ve Histolojik Testler...	.68
5. KAYNAKLAR LİSTESİ.....	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1	Yüzey modifikasyonunda kullanılan uyarıcılar.....	26
Şekil 3.1	Kullanılan plazma polimerizasyon cihazı	35
Şekil 3.2	Plazma polimerizasyon yöntemi ile yüzey aktif titanyum vida üretimi....	36
Şekil 3.3	Plazma polimerizasyon ile kaplamada kullanılan vida örneği.....	38
Şekil 3.4	Titanyum vida örneklerinin kimyasal aktivasyonu.....	39
Şekil 3.5	Temas açısı ölçüm cihazı.....	40
Şekil 3.6	Topoloji ölçümlerinde kullanılan AKM (PSIA XE150) model cihaz.....	41
Şekil 3.7	İletkenlik Ölçüm cihazı a) Kethley 2400 Model iletkenlik veri eldesi cihazı b) Lucab Labor FPP (Four Point Prob).....	42
Şekil 3.8	İletkenlik ölçümü yapılan örnekler.....	43
Şekil 3.9	SEM (EDS) cihazı a) cihaz genel görünüm b) Örnek tankı.....	43
Şekil 4.1	Titanyum vida yüzey temas açısı ölçümleri a) işlem görmemiş b) 25W c) 30W d) 45W e) 50W.....	44
Şekil 4.2	Boşalım gücüne bağlı yüzey temas açısı değişim eğrisi.....	45
Şekil 4.3	Titanyum vida yüzey temas açısı ölçümleri a) işlem görmemiş b) 3 dakika c) 6 dakika d) 9 dakika e) 12 dakika.....	46
Şekil 4.4	Kaplama süresine bağlı yüzey temas açısı değişim eğrisi.....	47
Şekil 4.5	Titanyum vida yüzey temas açılarına bakıldı a) İşlem görmemiş vida b) 5 ml/dak c) 10 ml/dak d) 20 ml/dak e) 30 ml/dak.....	48
Şekil 4.6	Monomer akışına göre yüzey temas açısındaki değişim eğrisi	49
Şekil 4.7	Referans (silikon) üzerinde elde edilen sınır görüntüsü a) 30W boşalım gücü b) 45W boşalım gücü c) 50W boşalım gücü.....	50
Şekil 4.8	Plazma polimerizasyon ile kaplamada gücün yüzey topolojisine etkisi..	51
Şekil 4.9	Referans (silikon) üzerinde elde edilen sınır görüntüsü a) 3 dakika b) 6 dakika c) 9 dakika	52
Şekil 4.10	Sabit boşalım gücünde süreye bağlı kaplama kalınlığı değişimi	53
Şekil 4.11	Referans (silikon) üzerinde elde edilen sınır görüntüsü d) 3 dakika e) 6 dakika f) 9 dakika.....	54
Şekil 4.12	Sabit boşalım gücünde süreye bağlı kaplama kalınlığı değişimi	55
Şekil 4.13	Kaplı 30W parametrelili vida elementel analiz ve SEM görüntüsü.....	56
Şekil 4.14	Kaplı 50W parametrelili vida elementel analiz ve SEM görüntüsü.....	57

Şekil 4.15	45W 3 dk parametrelili vida elementel analiz ve SEM görüntüsü.....	.58
Şekil 4.16	45W 6 dk parametrelili vida elementel analiz ve SEM görüntüsü.....	.59
Şekil 4.17	Kaplı 10ml/dk parametrelili vida elementel analiz ve SEM görüntü.....	.60
Şekil 4.18	Kaplı 20m/dk parametrelili vida elementel analiz ve SEM görüntü.....	.61
Şekil 4.19	Kaplı vidalarda ölçülen direnç değerleri tablosu62
Şekil 4.20	a)İşlem görmemiş vida b) 30W kaplanmış vida c) 30W aktive vida yüzey temas açısı63
Şekil 4.21	Titanyum vida yüzey temas açıları a) işlem görmemiş vida b) 45W kaplanmış vida c) 45W aktive vida.....	.63
Şekil 4.22	a) İşlem görmemiş vida b) 45W, 6 dakikada kaplanmış vida c) 45W dakikada kimyasal aktive edilmiş vida yüzey temas açısı64
Şekil 4.23	a) işlem görmemiş vida b) 45W, 3 dakikada kaplanmış vida c) 45W, 3 dakikada kimyasal aktive edilmiş vida.....	.64
Şekil 4.24	Kimyasal aktivasyona göre yüzey temas açıları dağılım tablosu.....	.65
Şekil 4.25	Referans (silikon) yüzeylerde kaplama ve kimyasal aktivasyon sonrası kalınlık ölçümü. a) 30W b) 45W c) 30W (aktive) d) 45W (aktive).....	.66
Şekil 4.26	Kimyasal aktivasyon sonrası yüzey topolojisi dağılım tablosu.....	.66
Şekil 4.27	30W 10 ml/dak 9 dk parametrelili vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element değişim grafiği, d) elementel dağılım tablosu.....	.67
Şekil 4.28	30W 10 ml/dak 9 dk aktive edilmiş vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element değişim grafiği, d) elementel dağılım tablosu67
Şekil 4.29	a) Titanyum vida b) Yüzeyi aktif vida kullanımı sonrası hücre gelişimi....	.68

SİMGELER KISALTMALAR

AKM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM-EDS	Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağılımlı Spektrometresi
HA	Hidroksiapatit
I	Akım
R	Direnç
rhBMP-2	Rekombinant Kemik Morfogenetik Protein-2
W	Watt (güç birimi)
V	Volt

1.GİRİŞ

Çalışmada hedef, cerrahi uygulamalarda kullanılan ve kemik fiksasyonları için tercih edilen titanyum alaşım implantların yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ile implantın (omurga pedikül vidası) omurga ile integrasyonunu arttırarak özellikle füzyonun tam sağlanamayacağı (osteoporoz vs) veya dinamik stabilizasyon, perkütan enstrumantasyon gibi omurgalar arası füzyon planlanmayan olgularda, vidanın zamanla omurga içerisinde gevşeyerek hareketlenmesi ve buna bağlı olarak hastalarda tekrardan klinik bulguların çıkmasını ve tekrar cerrahiye gitmesini engelleyecek vidaların geliştirilmesidir.

Osteointegrasyon; malzeme yüzeyi ile malzemenin yerleştiği bölgedeki kemik dokusunun kaynaşmasıdır. Metal implantların (transpediküler vida, plak vidası vs.) stabilize edici özellikleri, füzyon sağlanmadığı müddetçe bir süre sonra yetersiz kalmaktadır. Osteoporotik (kemik erimesi gözlenen) omurgada vida çevresinde, yeterli kemik trabeküler yapının olmaması bu osteointegrasyonun oluşmasını daha da engellemekte ve zaman içerisinde, vidaların omurga cismi içinde gevşemesine ve dışarı çıkmalarına daha çok sıklıkla neden olmaktadır. Bu noktada, vida çevresinde kemik dokusu gelişiminin arttırılabildiği yeni implant malzemelerin üretilmesi ve sağlık sektörüne sunulması, stratejik öneme sahip teknolojik bir değer olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun için bilimsel olarak araştırılan yöntemler (implant yüzeyini hidroksiapatit (HA) kaplama, kemik dokusu gelişimini stimule eden biyomoleküllerin ortamda toz olarak uygulanması vs.) pahalı ve Türkiye’de HA kaplaması teknolojik olarak yapılamamaktadır. Kemik erimesi gözükmeyen diğer hastalarda da HA kaplı metal implant kullanımı, kaplamanın yorulma dayanımının düşük olmasından kaynaklanan mekanik zayıflık, yüzeyden sıyrılması gibi dezavantajlara sahiptir.

Şu an cerrahide, pratikte tercih edilen uygulama ise kemik dokusu gelişimini stimule eden biyomoleküllerin, çıplak (kaplanmamış) implant yerleştirilmeden önce hasarlı bölgeye toz olarak sürülmesidir. Burada tercih edilen madde, rekombinant kemik morfojenetik proteindir (rhBMP-2). rhBMP-2’lerin hücre siklusunu hem başlatma

hem de iletme fonksiyonları bulunmaktadır ve böylece hücre siklusunun farklı aşamalarındaki etkileri aracılığıyla hücre proliferasyonu sürecinde düzenleyici olarak rol oynamaktadırlar. İmplantların yerleştirilmesinden sonraki iyileşme sürecinde de pek çok büyüme faktörü yaralanmanın olduğu bölgede ve çevresindeki hücre aktivasyonunun moleküler düzenlenmesinin uyum içinde olmasını sağlamaktadır. Ancak, tümüyle doğal (bu nedenle biyouyumlu) bu proteinin, toz halinde omurilik bölgesine dökülmesi, hem maliyeti artırmakta hem de kemikteki doz fazlalığından dolayı hala komplikasyonlar (heterotropik ossifikasyon, osteoliz, enflamatuar kist formasyonları vs.) oluşturmaktadır. Bu nedenle tez çalışması, bu problemlerin önlenmesi için plazma polimerizasyon tekniği ve rhBMP-2'nin vida yüzeyine tutuklanması içerikli kolay uygulanabilir yeni bir yöntemi önermektedir.

Plazma polimerizasyon kaplama tekniğiyle yüzey modifikasyonu esnasında farklı güç, süre ve monomer akışı parametreleri değiştirilerek farklı vida setleri hazırlanmıştır. Sonrasında kaplanmış vida setleri karakterizasyon için çalışılmıştır. Bir kısmı aldehitlenerek kimyasal aktivasyonu yapılmıştır. Bu yüzey karakterizasyon testlerinin değerlendirilmesi sonrasında en uygun parametreler seçilmiştir. Bu secilen parametrede plazma polimerizasyon tekniği ile modifiye edilen ve aktive edilen, vidalara direkt rhBMP-2 tutuklanması ile implantların yüzeyi hazırlanmıştır. Böylece hem uygulama aşamasında kolaylık sağlanacak hem de hasta, rhBMP-2 kaplı implantlar sayesinde kemik-omurga pedikül vida osteointegrasyonu sağlanacağı için stabilizasyon güvenli olacak ve ameliyat revizyonuna gereksinim çok azalacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Titanyum Biyomalzeme

Organ ve dokuların işlevlerini kısmen veya tümünden üstlenmek üzere tasarılan malzemelere biyomalzeme adı verilmekte olup, bu malzemelerin biyolojik yönden uyumlu olması, toksik ve karsinojenik olmaması, kimyasal açıdan inert ve stabil olması, yeterli mekanik kuvvete sahip olması, yoğun bir yaşama uyum gösterebilmesi, uygun ağırlık ve yoğunlukta olması, büyük miktarlarda işlenebilme ve fabrikasyon kolaylığı göstermesi, ekonomik olması istenmektedir. Biyomalzemelerin; fiziksel, kimyasal, mekanik, termal özelliklerinin iyi bilinmesi ve doku ile allerjik, toksik, karsinojenik reaksiyon vermemesi istenir. Titanyumun, biyomalzeme üretiminde kullanımı 1930'lu yılların sonlarıdır. Fiziksel ve kimyasal açıdan üstün özellikler gösteren titanyum, 316 paslanmaz çelik ve kobalt alaşımlarına göre daha hafif bir malzemedir. Özgül ağırlığı=4.5 gr/cm³, Erime sıcaklığı 1680°C olan ve oda sıcaklığında sıkı dizilmiş hekzagonal kafes yapısına sahip bir metaldir. Adını Yunan mitolojisinin güçlü tanrıları Titanlardan alır. Titanyumun avantajları:

- Uzun süreli implantasyonda (deri içine yerleştirme) en iyi biyouyumluluk.
- Enjekte maddelerle birlikte, kimyasal reaksiyona girme olasılığı en azdır.
- Manyetik olmadığından, MR (Magnetik Rezonans) için uyumludur.
- Yoğunluğu düşük olduğundan dolayı, hafif ağırlıktadır.
- Hipoalerjiktir (alerjik özelliği az).

Son yıllarda titanyum ve titanyum alaşımlarının, medikal ve dental uygulamasında ciddi bir artış görülmektedir. Metalin, dayanıklılık ve rijit yapısı, düşük özgül ağırlığı ve göreceli hafif oluşu, yüksek ısılara dayanıklılığı ve korozyona karşı direnci kullanımın bu özel alanlarda yaygınlaşmasına neden olmuştur. Son otuz yılda metalin yeni işleme yöntemlerinin gelişimine paralel olarak biyomedikal ürünlerdeki kullanımı artmaktadır [1]. Titanyum çok reaktif bir metal olup, korozyona karşı yüksek direncini, hızla oluşan bu koruyucu oksit tabakasına borçludur [2].

Neredeyse anında oksit olarak, metal yüzeyinde yaklaşık 10 nanometre kalınlığında dirençli ve stabil oksit katmanı oluşur. Bu oksit katmanı kıymetli metallerde olduğu gibi yüksek biyouyumlu bir yüzey ve korozyona karşı direnç özelliği sağlar. Ayrıca bu oksit katmanı porselene kaynaşma, polimere yapışma ve implantlarda plazma püskürtme veya çekirdek apatit ile kaplama yöntemlerine katkıda bulunmaktadır [2].

Titanyum uzun süreden beri kemik içi implantı olarak kullanılmaktadır. Kemik içi implantlar çubuk, post ve blade şeklinde saf veya alaşımlı titanyumdan yapılmaktadır. İmplant yüzeyindeki oksit tabakasının inert etkisi, fizyolojik sıvı, protein, sert ve yumuşak dokunun metal yüzeyini kavramasını sağlar.. Doku tarafından kabul edilirliliği yüksek olan titanyum, yerleştirildikten sonra vücudun bir parçası haline gelir. Bu da implanta maksimum dayanım sağlamaktadır.

Titanyum Biyomalzeme Kullanım Alanları şu şekilde özetlenebilir;

- * Etken madde salım sistemleri,
- * Hücre yenilenmesi ve hücre transplantasyonunda uygulamaları,
- * Ortopedik amaçlı kullanımlarıdır.

Bugün titanyum ve alaşımları protez eklem, cerrahi splint, damar stentler ve bağlayıcıları, dental implant, kuron köprü ve parsiyel protez yapımında kullanılmaktadır. Metalin mekanik özelliklerini geliştirmek için; örneğin, alüminyum, vanadyum ve demir gibi metallerle alaşımı yapılır [3].

2.1.1 Titanyum biyomalzeme-biyouyumluluk ilişkisi:

Fizikokimyasal özelliklerin yanında istenen biyolojik özellikleri taşımayan biyomalzemenin başarısından söz etmek imkansızdır. Bir biyomalzeme veya implantın başarısı büyük oranda şu üç faktöre bağlıdır;

- İmplantın (yerleştirilen) özelliği ve kullanıldığı yere göre biyouyumluluğu
- Kullanıcının durumu
- Uygulamayı yapan kişinin becerisi [5]

Biyomalzemenin organizmaya uygulanışı uygun doku-polimer etkileşmesini de beraberinde getirmektedir. Bu konuda birçok araştırma yapılmıştır. Kemik veya dentin gibi kırılabilen materyaller yerine kullanılacak biyomalzemelerin, tüm fizikokimyasal özellikleri dikkatle incelenerek seçilmelidir[6,7]. Biyomalzemelerin istenilen mekanik özelliklerinin yanı sıra bu malzemelerin biyouyumluluğu vücut uzuvları ve organlarının tedavisinde ve değiştirilmesinde oldukça önemlidir [2]. Ortopedik dokuyu destekleyecek sistemlerde (eklem protezleri, küçük veya büyük protez birleştiricileri, kemikteki deformasyonu düzelten implantları vida, plaka vs.) yoğunluklu olarak tercih edilen titanyum alaşımlarda, kemik dokusu gelişimi kritik bir noktadır. Biyomalzeme, uygulandığı kemik dokuyla arada sınırlı fibröz bir doku olmadan birleşir. Çoğu zaman biyomalzemeler uygulandıkları dokuyu, dokularda kendilerine uygulanan materyali etkilemek çabasındadırlar. Özellikle kemik içi implant olarak kullanılacak tüm cerrahi biyomalzemelerde, canlı doku ile malzemenin etkileştikten sonra (temas) kemik oluşumu da bir biyouyumluluktur [4,8-9].

2.2 Kemik Dokusu

Kemik dokusu, destek dokuları (Bağ, Kıkırdak, Kan, Kemik dokuları) arasında gerçek anlamda destek görevi yapan dokudur. Merkezi sinir sistemi, akciğer, kemik iliği gibi yumşak doku ve organlar kemik dokusunun oluşturduğu kemikler tarafından desteklenir ve korunurlar. Organizmaya biçim kazandıran ve yükünü taşıyan iskelet sisteminde kemikler oluşturur [10]. Bunlar dışında kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içermesi ve metabolik önemi olan kalsiyum deposu olarak ele alınacak olursa, kemiğin destek dokusu olma dışında da önemli rolleri olduğu ortaya çıkar. Kemiklerin kırılması durumunda kendilerini tamir edebilme kapasiteleri çok iyi gelişmiştir ve böylece bozulan bölgede yeni kemik dokusu oluşturularak bölgenin fonksiyonları eskisi gibi yerine getirilir. Kemik dokusu beslenme, metabolik, endokrin (hormonal) ve mekanik koşullara çok duyarlı bir dokudur.[11].

Kemiğin kompakt ve spongiyöz olmak üzere iki ayrı formu vardır. Kompakt kemik sıkı tertiplenmiş, boşluk içermeyen bir dokudur. Spongiyöz kemik dokusunun ise

gevşek, labirent veya bol boşluklu tarzda bir görünümü vardır. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Vücudun femur gibi uzun kemik içeren bir ekstremitesi ele alınacak olursa, bu kemiğin iki uç tarafı veya eklemlerinin bulunduğu bölge epifiz, bunların arasında yer alan uzun bölgeye ise diyafiz adı verilir. Epifiz bölgesi aynı zamanda kemiğin oluşumunda rol oynar (epifiz plağı). Epifiz kısmı ince kompakt kemikle kaplı olup spongyöz kemik dokusundan yapılmıştır. Diyafiz bölümü ise kompakt kemik dokusundan yapılmıştır. Diyafizin ortasında da kemik iliği bulunur. Kemikler genellikle periosteum adı verilen ve osteojenik (kemik oluşturabilme) aktivitesi olan bir bağ dokusuyla çevrilidir. Periosteum eklem kıkırdağında bulunmaz. Diyafizdeki kemik iliği kavitesi ve spongyöz kemikteki boşlukların etrafı ince bir bağ dokusuyla çevrilidir. Bu yapı endosteum adını alır ve osteojenik aktiviteye sahiptir. Kemik dokusu kıkırdağın aksine bol damarlıdır. Ancak matiksinin sert olması difüzyona elverişli değildir. Dolayısıyla dokunun beslenmesi kanaliküllerle olmaktadır. Bu kanaliküllerin içinde kemik hücreleri yerleşmiştir [12].

2.2.1 Füzyon (kaynama)

Spinal füzyon, kemiksel birleşmeyle iki omur arasındaki anormal hareketin önlenmesi, yani iki omurun kaynaştırılmasıdır. Füzyon omurga cerrahisinin en sık yapılan girişimlerinden birisidir. Çok çeşitli uygulama yöntemi olan füzyon cerrahisinde temel amaç, hareketleri ağırlık kaynağı olduğu düşünülen vertebra segmentlerini hareketsiz hale getirmektir. Hareketi ortadan kaldırmak ve yük dağılımı dengelemek için enstrüman yardımı ile veya enstrüman yardımı olmaksızın çok çeşitli füzyon teknikleri geliştirilmiş ve her tekniğin klinik etkinlikleri çeşitli klinik çalışmalar ile gösterilmiştir [16]. Kronikleşmiş bel ağrısı için en fazla kullanılan füzyon teknikleri posterolateral ve interbody füzyon teknikleridir. İki vertebra korpusu arasında intervertebral disk aralığına yapılan füzyon yöntemine interbody füzyon denir. İnterbody füzyon tekniklerinde amaç yükün en fazla bindiği anterior kolonda yük taşıma prensiplerine uygun en geniş füzyon alanını sağlamak, disk yüksekliğini ve spinal aks dizilimini restore etmektir. Girişim yönüne göre isimlendirilen interbody füzyon tekniklerinden Posterior İnterbody Lomber Füzyon (PLIF), Transforaminal Lomber İnterbody Füzyon (TLIF) ve Anterior İnterbody Lomber Füzyon (ALIF) en fazla kullanılan interbody füzyon

yöntemleridir. İlk lomber interbody füzyon işlemi spondilolistezis olguları için 1930'larda tanımlanmıştır [16]. 1950'lerde lomber posterior girişim ile laminektomi sonrası interbody füzyon tanımlanmış ve posterior interbody füzyon olarak (PLIF) isimlendirilmiştir [17]. Daha sonraki dönemde sinir kökü retraksiyonunu minimal düzeye indirmek için transforaminal interbody füzyon (TLIF) ve extreme lateral

interbody füzyon (XLIF) teknikleri tanımlanmıştır [17,18]. Ancak teknik birtakım zorluklar içermesi, artmış kanama miktarı, ameliyat süresini uzatması ve minimal invaziv girişim mantığıyla çok örtüşmemesi nedeniyle alternatif yöntemlerin bulunması gereklidir. Füzyonda amaç, implantlarla sabitlenen omurga hareket kısıtlılığının uzun dönemde devamını sağlamaktır. Usulüne uygun yapılmış bir füzyon cerrahisinden sonra vidalar, yaklaşık ilk 6 ay-1 yıla kadar vertebra hareketlerini engellerken, bu arada kemik füzyon gelişmekte ve 1. yılın sonuna doğru vertebra hareketlerini engelleyen ana etken olmaktadır. Bu dönemden sonra vidalara herhangi bir yük binmemekte ve buna bağlı olarak da vida ile ilişkili herhangi bir komplikasyon yaşanmamaktadır. Eğer bu 6 ay-1 yıllık süre içinde yeterli kemik füzyon gelişmezse vidalara binen yüklenme devam etmekte ve buna bağlı olarak vidalar gevşemekte, yerinden çıkmakta veya kırılmaktadırlar.

Osteoporotik olgularda füzyon cerrahisi belli başlı bir sorundur. Bu hasta grubunda hem füzyon yetersiz ve uzun sürede oluşurken hem de vidalar çok daha erken dönemde kemik içerisinde hareketlenmektedirler. Buna bağlı klinik şikayetler ortaya çıkmakta ve gerekirse revizyon cerrahileri yapılmaktadır. Bu nedenle vida başına düşen yükü azaltmak için uzun segment enstrumantasyonlar yapılmakta, bu da cerrahi süreyi, morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır. Kemik morfogenetik protein klasik spinal füzyon cerrahilerinde topikal olarak kullanılmaktadır. Fakat hem kullanılış şekli hem de kullanma miktarının yüksek olması nedeniyle sinir kökleri çevresinde aşırı kireçlenmeye bağlı komplikasyonlara neden olmaktadır. Ayrıca ekonomik olarak da pahalı bir füzyon materyalidir.

2.2.1.1 Interbody (vücut içi) füzyon malzemeleri

Tüm diğer spinal cerrahi işlemlerinde olduğu gibi füzyon için ilk başlarda sentetik veya kadavra kemikleri yaygınlaşmadan önce otogreftler kullanılmıştır. Özellikle iliak kanattan trikortikal greft materyali alımına bağlı kanama, ağrı komplikasyonlar bildirilince allogreftler devreye girmiştir. Teknolojinin gelişimi ile çeşitli interbody kafesler üretilmiş ve hızla yenileri üretilmeye devam edilmektedir.

Literatürde ALIF için füzyon tartışmaları daha çok kullanılan kafes veya füzyon materyallerinin karşılaştırılması yönünde değil, ALIF ek olarak yapılacak stabilizasyon tekniklerinin füzyona yapacağı katkı yönündedir. Stabilizasyon ve füzyon için neyin tercih edileceği cerrahin seçimine bağlıdır [14].

2.2.1.2 Füzyon ve klinik iyileşme

Füzyon oranları ile ilgili çok farklı literatür bilgileri vardır. Yalnız başına ALIF uygulaması ile posterior enstrümantasyon ile kombine edilen seriler karşılaştırıldığında kabul edilebilir füzyon oranları vardır [15]. İnce kesit BT ile füzyon taramasında sadece ALIF işlemi yapılan olgularda %51, ALIF işlemine ek translaminar vida uygulanan olgularda %58, bilateral transpediküler vida ile desteklenen olgularda %68 füzyon oranı saptanmış 1). Sonuç olarak tek başına ALIF'in kullanıldığı olgularda füzyon oranı ek stabilizasyon tekniği kullanılan serilere göre daha düşüktür. Uzun dönemli klinik iyileşmeyi ölçen yayınlarda, 10 yıllık izlem sonunda %70'e ulaşan klinik iyileşme oranları bildirilmektedir (18). Sonuç olarak klinik ve/ya radyolojik füzyon gelişen hastaların şikayetleri belirgin şekilde gerilerken, bir şekilde füzyon gelişemeyen hastalarda implant problemleri ve buna bağlı tekrarlayan revizyon cerrahisi geçirme olasılıkları artmaktadır. Füzyon gelişmediği durumlarda, implantlara binen aksial yüklenme devam ettiği için vida kemik integrasyonu bozulmakta, vidalar kemikler içinde hareket etmeye başlamakta ve buna bağlı olarak da ciddi ağrılara ve sorunlara neden olmaktadır.

2.2.1.3 Dinamik stabilizasyon

Her ne kadar füzyon cerrahisi günümüzde altın standart olarak görülmekteyse de , füzyon cerrahisine bağlı ortaya çıkan komşu segment hastalığı ve implant problemleri gibi belli başlı komplikasyonların görülmesi, kaynamamaya bağlı tekrarlayan cerrahi olasılıklarının ortaya çıkması ve omurga biyomekaniğinin daha iyi anlaşılması ibreyi dinamik stabilizasyona doğru kaydırmıştır.

Dinamik stabilizasyonda amaç, instabil segmentin hareket kabiliyetini tamamen yok etmeden omurga stabilizasyonunu sağlamaktır. Bu nedenle klasik kemik füzyon yapılmaksızın sadece enstrumantasyon yapılmaktadır. Burada kullanılan vidaların çoğunluğu hidroksiapatit (HA) kaplıdır. Vida kemik integrasyonunu arttıran HA kaplaması pahalı bir metod olmakla birlikte ülkemizde yapılmamaktadır

2.2.1.4 Minimal invaziv cerrahi

Cerrahi uygulama gerektiren tüm tedavilerde MIS(=minimal invaziv surgery) yada sağlam dokuya en az zarar veren cerrahi yöntemler tercih edilir.

Böylece;

- Ameliyatlar, geniş kesi yapılmadan gerçekleştirilir. Deri yüzeyinde estetik açıdan rahatsız eden izler kalmaz.
- Kanama ve enfeksiyon riski açık cerrahiye oranla daha azdır.
- Tedavi imkanı ve başarısı artar.
- Girişim sonrası hastanın ağrısı daha az olur ve daha az ağrı kesici kullanır.
- Hastanede kalış süresi daha kısadır. Hastanın ayağa kalkma ve normal fiziksel aktivitesine kavuşması daha kolay ve hızlı olur. Hastanın işine yeniden dönebilme süresi ameliyatın türüne göre değişmekle birlikte daha kısadır [19].

Minimal invaziv bir teknik olan Nuss yöntemi 1987'de Donald Nuss tarafından tanımlanmıştır [20]. Bu yöntem kısa operasyon süresi, kozmetik oluşu, hastanede kalış süresinin kısalığı ve hasta memnuniyeti nedeniyle spinal cerrahisine yeni bir

bakış kazandırmış ve tercih edilmesine sebep olmuştur. Minimal invaziv spinal cerrahi, konvansiyonel açık cerrahilerle karşılaştırıldığında, aynı klinik sonuçları sağlayabilmek ve bunun yanında konvansiyonel metotlarla yapılan cerrahi sırasında oluşabilecek iyatrojenik (hekim kaynaklı) yaralanmaları ve komplikasyonları en aza indirmek amacını taşımaktadır. Mikroskop, endoskop ve lazer teknolojilerinde çok belirgin olan ilerleme, görüntüleme yöntemlerinin kılavuzluğunda cerrahi yapabilme imkanı ile spinal cerrahi uygulamalarında minimal invaziv girişimlerin sayısı artmaktadır [20].

2.3 Kemik Morfogenetik Protein (Bone Morfogenetik Protein –rhBMP)

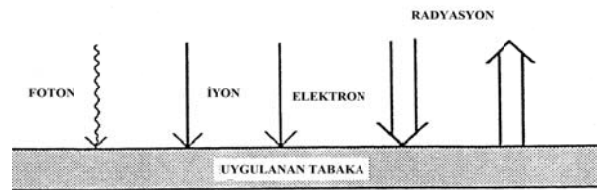
BMP'ler, embriyonik gelişim ve rejenerasyon sürecinde kıkırdak ve kemik oluşumunda güçlü düzenleyicisidir. 1965 yılında Marshal Urist iskelet dışı bölgelere yerleştirilen dekalsifiye kemik matriksinin (Demineralized Bone Matrix, DBM) kemik formasyonu indüksiyonu yaptığını göstermiştir. Embriyojenik kemik gelişimi sırasında görülen morfogenezis, iskelet dışı bölgelere implante edilen DBM'nin indüksiyonu ile tekrar edilebilmekte ve doğal kemik oluşumu sağlanabilmektedir. Demineralize kemiğin osteoindüktif potansiyelinin temelinde kemik matriks proteinleri özellikle de Bone Morphogenetic Proteinler (BMP) yer almaktadır. Demineralize kemik bütün BMP türlerini bilinmeyen oranda içerisinde bulundurmaktadır.[21,22] DBM kemik greft materyali olarak geniş kullanım alanı bulmuştur, fakat osteoindüktif kapasitesi her zaman tartışılmıştır. Schwartz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada DBM'nin kemik indüktif özelliklerinin az olmasının sebebi yeterli miktarda BMP içermemesine bağlanmıştır. BMP'ler transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily'nin üyesidir. Günümüzde 15 adet BMP tanımlanmıştır. Aminoasit diziliş benzerliklerine göre altgruplara ayrılmışlardır. BMP-2 ve 4 birinci altgrubu, BMP-5 ve 8 ikinci altgrubu oluşturmaktadır. BMP-2, BMP-4 ve BMP-7'nin en etkin osteoindüktif özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinler arasında bone morphogenetic protein-2'nin osteoindüktif özelliği en fazla olan protein olduğu görülmüştür [23]. Yapılan çalışmalar; BMP'lerin birçok doku ve organın oluşumunda erken morfogenezis sırasında olan epitelial mezenşimal etkileşimlerde morfogenler olarak rol oynadıklarını göstermiştir. Suzuki ve arkadaşları BMP-2'nin gelişmekte olan diş

jermlerinde, çene kemiğinde, çizgili ve düz kaslarda, spinal kord, nasal, trakeal ve özefagal epitelde lokalize olduğunu belirlemiştir. Embriyojenik hücrelerin BMP'lere cevap vererek kartilaj ve kemik hücrelerine diferansiye olmaları da, BMP'lerin embriyojenik iskelet sisteminin oluşmasında rol aldıklarını göstermektedir. BMP'nin osteovenik etkisi direk olarak olgun olmayan ,primitif hücreler üzerinedir. Olgun osteoblastların BMP'ye cevap verme yeteneğini kaybettikleri tespit edilmiştir.Yetişkin memelilerde BMP osteoblastlar ve osteositler tarafından sentez edilmekte ve primer olarak kemik ve dentinde yer almaktadır. 1988 yılında Wozney BMP'nin DNA zincirinin klonlanmasını gerçekleştirmiş ve bu işlemle BMP'lerin rekombinant olarak istenilen miktarlarda üretilmesi sağlanmıştır. Klinikte, BMP'nin rekombinant formunun pürüfiye edilerek elde edilen formundan daha güvenli olarak kullanılacağı düşünülmektedir. Bessho ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada rekombinant insan kemik protein-2'nin (rhBMP-2) ve insan kemik matriksinden pürüfiye edilerek elde edilen rhBMP-2'nin kemik indüktif özellikleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak rekombinant olarak elde edilen BMP'nin pürüfiye olarak elde edilenin onda biri oranında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.[22,23] Günümüzde rekombinant human bone morphogenetic protein-2'nin (rhBMP-2) çoğunluğu chinese hamster over hücreleri kullanılarak elde edilmektedir. Esherichia coli veya chinese hamster over hücreleri kullanılarak elde edilen rhBMP-2'nin osteoindüktif özelliklerinin karşılaştırılması sonucunda iki proteinin indüktif aktivitelerinin benzer olduğu görülmüştür. BMP tarafından sağlanan osteoindüksiyonun klinik olarak kullanılmasında beş çeşit iskeletsel rekonstrüksiyon metodu bulunmaktadır. Birinci metod BMP'nin direk olarak iskeletsel defekt bölgesine uygulanmasıdır. İkinci metod BMP sadece kemik grefti kullanılarak iskelet augmentasyonunun sağlanmasıdır. Üçüncü metod defektten uzak bir bölgede BMP indüksiyonu ile kemik oluşturulması ve bu kemiğin serbest kemik grefti olarak kullanılmasıdır. Dördüncü metod BMP indüksiyonu ile oluşturulan kemiği de içeren flebin kullanılmasıdır. Üçüncü ve dördüncü metod rekonstrüktif operasyon öncesi BMP tarafından osteoindüksiyonun sağlanabilmesi için belirli bir zaman gerektirmektedir. Beşinci metod donör bölgeye BMP sürülmesi ve aynı zamanda konvansiyonel kemik greftinin, serbest kemik greftinin veya vaskularize kemik greftinin uygulanmasıdır [21].

2.5 Plazma Polimerizasyon Yöntemi

Plazma terimi, ilk defa 1929'da Langmuir tarafından iyonlarına ayrılmış bir gaz olarak tanımlanmıştır. İyonlarına ayrılmış gaz olan plazma, içerisinde iyon, elektron, uyarılmış atom, foton, nötral atom veya molekül içeren bir karışımdır [27]. Plazma maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinden oldukça farklılık göstermesinden dolayı maddenin dördüncü hali olarak da ifade edilir. Plazma haline geçiş için, gaz halindeki maddeye enerji vermek gerekir. Gerekli olan bu enerjiyi, ısı, ışın, manyetik ve elektrik enerjisi şeklinde vermek mümkündür [28]. Bunlardan pratikte en çok kullanılan ve en önemli olan elektrik boşalmasıyla plazma elde etmektir. Bu tür plazma için güç kaynakları doğru akım (DC), düşük frekans, radyo frekansı (RF) veya mikrodalga frekansıdır (MW).

Şekil'2.1de yüzey modifikasyonu gerçekleştirilirken yüzeye etkiyenler ve giriş yapan uyarıcılar gösterilmektedir. Yüzey modifikasyonu gerçekleştirilebilmesi için belirli bir eşik değer üzerinde enerji uygulanmalıdır. Bizim tekniğimizde, de bu enerjiyi üreten kısım RF jeneratörüdür. Bu kısım sayesinde oluşturulan RF dalgasının sahip olduğu enerji yüzey modifikasyonu yapılması gereken eşik değer üzerinde ve madde üzerinde istenildiği gibi değişiklikler gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.1. Yüzey modifikasyonunda kullanılan uyarıcılar

Çok sayıda yüksüz grup ile eşit konsantrasyonda pozitif ve negatif yük içeren iyonize bir gaz olan plazma bir hücre içine yerleştirilmiş iki elektrot arasında bir potansiyel fark uygulanması sonucu oluşmaktadır. Hücre, basıncı değişebilen bir gaz ile doldurulmakta ve potansiyel fark sonucunda radyasyon ile katottan ayrılan

elektronlar gaz atomları ya da molekülleri ile çarpışmayı hızlandırmaktadır. Çarpışmalar tahrik olan atomlara hız kazandırmaktadır. Bu süreç 'Yük boşalımı' olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak, malzeme yüzeyleri ile yük boşalımı plazmasının reaksiyonları üç başlık altında özetlenmiştir;

a)Yüzey reaksiyonları: Gaz fazında bulunan türler ile yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonlar ve sadece yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonlar yüzeyde sırasıyla fonksiyonel gruplar ve çapraz bağlar oluşturmaktadırlar. Bu tür reaksiyonların örnekleri, argon, amonyak, karbonmonoksit, karbondioksit, flor, hidrojen, azot, azotdioksit, oksijen ve suyla gerçekleştirilen plazma işlemlerini içermektedir.

b)Plazma polimerizasyonu: Organik bir monomerin polimerizasyonu yoluyla materyal yüzeyinde ince bir film oluşumu plazma polimerizasyonu prosesini oluşturur. Plazma polimerizasyonu, gaz fazındaki türler arasındaki reaksiyonları, gaz fazındaki türler ile yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonları ve sadece yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonları içermektedir. Plazma polimerizasyonunun mekanizması, gaz faz ve yüzeyde meydana gelen reaksiyonların her ikisini de içeren polimerizasyon prosesin karmaşıklığı nedeniyle henüz yeterince anlaşılamamıştır. Ortamda mevcut olan çeşitli reaktif gruplar (örneğin, iyonlar, serbest radikaller v.s) plazma polimerizasyon reaktöründe monomerin polimerizasyonuna katkıda bulunur.

Plazma polimerizasyon, düşük basınç altında ya da atmosferik basınç ortamındaki organik gaz veya buharın yük boşalımına maruz bırakılmasıyla oluşur. Plazma polimerizasyon, monomerin akış oranına, sistemin basıncına, boşalım gücüne başlangıç monomerinin reaktivitesine, tetikleme sinyalinin frekansına ve substratın sıcaklığına bağlıdır.

c)Temizleme ve yüzeyden kopmalar (etching): Bir materyal yüzeyinde bulunan maddeler yüzeyden uçucu ürünler oluşturulmak koşuluyla kimyasal reaksiyonlar ile fiziksel kopmalar şeklinde uzaklaştırılırlar. Yüzeylerde varolan organik bulaşların uzaklaştırılması için oksijen içeren plazmalar kullanılmaktadır.

Plazma polimerizasyonu, monomer moleküllerindeki kimyasal bağların kırılması ile devreye girdiğinden, plazma ile doymuş bağlar da polimerize edilebilir. Plazma polimerleri, sıvı fazda üretilmiş analog polimerlere oranla genel olarak daha az düzenli bir molekül yapısına ve daha yüksek çapraz kaplama derecesine sahip boşluksuz özelliktedir [28]. Plazma ortamında yani yük boşalım ortamında polimerize edilmiş filmler delikli yapıda olmayan, çok iyi çapraz bağlanmış, kimyasallarda çözünmeyen, ısı bakımından stabil, kimyasal olarak tepkime vermeyen, fiziksel olarak da sağlam yapıdadır. Bunların yanı sıra filmler oldukça tutarlı, birbirine yapışık ve cam- metal-polimer vs. yüzeylerde kullanılabilir yapılarıdır. Tüm olumlu özelliklerinden dolayı son yıllarda biyomalzemelerin yüzeylerine plazma polimerize edilmiş film kaplanması farklı kullanım alanlarında ve yüzeylerde denenmektedir [29]. Plazma polimerizasyonu organik ve organometalik kimyasal malzemeler içeren çok ince polimer tabakaların (10^Å-1 μ m) üretilebildiği tek tekniktir. Ayrıca bu tip tabakalar genellikle, içinde geleneksel polimerlerin, metal ve cam yüzeylerinde olduğu birçok substrat ile tutarlı ve uyumludur. Uygun plazma yüzey işlemi ve ortamda kullanılan monomer seçimi ile, optik yansımaya, adezyon, sürtünme katsayısı, yüzey enerjisi (ıslaklık ve su iticiliği), geçirgenlik, yüzey iletkenliği ve sıradan polimerlerin biyouyumluluğu gibi yeni özellikler elde edilebilir. [30].

2.5.1 Alternatif yüzey modifikasyon yöntemleri ile karşılaştırılması

Plazma polimerizasyonunun avantajları standart kaplama yöntemleri ile karşılaştırıldığında belirgin bir biçimde ortaya çıkmaktadır. Bir yüzeyin, uygun bir polimerle standart yöntemler kullanılarak kaplanması şöyle bir işlem sırasını gerektirir.

- Yüzeye kaplanacak polimerin veya öncü polimerin sentezi
- Sentezlenen polimerin uygun çözücüde çözünmesiyle kaplama çözeltisinin hazırlanması
- Kaplanacak yüzeyin temizlenmesi
- Kaplama işleminin gerçekleştirilmesi
- İşlem sonrası yüzeyin kurutulması

- Kaplamada oluşacak gerilimlerin yok edilmesi için ısı işlem uygulaması (iyileştirme)

Geleneksel polimerizasyon işlemlerine göre plazma polimerizasyonunun avantajı açıktır, bütün bu yukarıdaki basamaklar tek aşamada gerçekleştirilir. Bu sayede 24 saat gibi uzun süreler yerine 1 saatten az bir sürede polimerizasyon gerçekleştirilir.

Plazma Polimerizasyon yönteminin diğer avantajları;

- Plazma polimerizasyonu ile bir ön koşul aranmaksızın tüm organik bileşikler kullanılarak materyal yüzeylerinin değiştirilmesi, yöntemin en önemli avantajıdır.
- Diğer kaplama yöntemleriyle karşılaştırıldığında, çok ince ve çok daha homojen kalınlıkta kaplama sağlanabilmektedir.
- Proses son derece temizdir, bir başka ifadeyle klasik proseslerde kullanılan çözücüler, başlatıcılar, stabilizörlere, vb. burada gerek olmadığından ürün çok saftır. Bu özellikle tıp uygulamalarında önemli bir avantaj olarak vurgulanmaktadır.
- Substratların sadece en dışta bulunan tabakalarının modifikasyondan etkilenmesidir. Böylece, modifiye edilen substratların yığın özellikleri değişmediğinden yüzey özellikleri kontrollü bir şekilde modifiye edilebilmektedir.
- Proses çözücü kullanımını gerektirmez.
- Karmaşık geometrili malzemelerin kaplanması mümkündür.
- Ultra-ince gözeneksiz filmler hemen hemen tüm malzemeler üzerine kaplanabilir. Örneğin; fiber, polimer, metal, cam vs...
- Kaplanmak istenen malzeme düşük gaz basıncı altındaki kapalı sistem içine yerleştirilir. Dolayısıyla diğer kaplama tekniklerine göre kaplanan yüzey daha steril olmaktadır.
- Kaplanacak yüzeye iyi yapışma kabiliyetine sahiptir [31].

2.5.2 Plazma polimerizasyon yönteminde biyomalzeme uygulamaları

Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler olup, sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut akışkanlarıyla temas ederler. Biyomalzemeler,

insan vücudunun çok değişken koşullara sahip olan ortamlarında kullanılır. Biyomalzemelerin tüm bu zor koşullara dayanıklı olması gerekir. Son 30 yıl içinde biyomalzeme/yüzey etkileşimlerinin anlaşılması konusunda önemli bilgiler elde edilmiş bulunmaktadır. Biyouyumlu, yani 'vücutla uyuşabilir' bir biyomalzeme, kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu, vb) meydana getirmeyen malzemedir. Yüzey uyumluluğu, bir biyomalzemenin vücut dokularına fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak uygun olmasıdır. Yapısal uyumluluk ise, malzemenin vücut dokularının mekanik davranışına sağladığı optimum uyumdur. Biyomalzeme yüzeylerinin mikroorganizmalar ile kontamine olması kullanım açısından zorluk taşımaktadır. Mikroorganizmalar biyomalzeme yüzeyinin yakınına ulaşabilecek bir yol buldukları zaman , "biyofilm" olarak adlandırılan mikrobik topluluğun yapışmasına yol açan çok aşamalı bir süreci başlatırlar. Mikroorganizmaların, bu yüzeylerden tamamen uzaklaştırılmaması durumunda yüzeyde biyofilm oluşumuna neden olmaktadır. Ortamda bulunan protein gibi makromoleküllerin yüzey tarafından adsorblanması hücrelerin ve bakterilerin yüzeye tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Literatürde biyofilm oluşum mekanizmaları göz önünde bulundurularak çeşitli yüzeyler için mikroorganizma birikimini engelleyecek bir takım stratejiler geliştirilmiştir. Genelde protein adsorpsiyonu ve hücre yapışmasına dayanıklı yüzeyler geliştirmek için materyal yüzeyinin pürüzsüz, yüzey enerjisi düşük ve hidrofilik karakterde olması gerekmektedir. [36,37-38]. Ayrıca bu tekniğin, kalp damar cerrahisi alanında biyomalzemelerin kanla uyumunu arttırma, gibi farklı kullanımları da mevcuttur.

Biyomalzeme uygulamalarında implantın vücut sıvısının ile yapacağı sürekli etkileşimlerin korozyon etkilerine maruz kalmadan ve bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesinin önüne geçilerek, doku gelişiminin maksimum düzeyde gerçekleşmesi açısından son derece önemlidir. Örneğin titanyumun yüksek biyouyumluluğuna rağmen, cerrahi olarak yerleştirildikleri bölgelerde doku gelişimini destekleyici yüzey kaplamalarının kullanıldığı, literatürdeki çalışmalardan bilinmektedir. Literatürde plazma polimerizasyon tekniği ile titanyum malzeme üzerinde hidroksiapatit kaplamasının yapıldığı, malzeme üzerinde plazma iyon implantasyonu ile oksit tabakanın oluşturulduğu gibi örnekler mevcuttur [39].

Bunların dışında doku mühendiliği ve ilaç salım sistemlerine bakıldığında tam tersi bir strateji ile doku iskelesi olarak üretilen biyomalzemelerin hücre adhezyonunu geliştirme, hücre spesifik biyoaktif ligandlarını yüzeye tutuklamaya uygun gruplar oluşturmak, proliferasyonu geliştirmek, anti-kanser ilaçlarını, enzim, sitokin ve polisakkaritleri tutuklayabilecek yüzey özelliğinde kontrollü ilaç salım matrisleri geliştirme ile ilgili yük boşalım tekniği ile modifikasyon çalışmaları da yürütülmektedir.

2.6. Osteointegrasyon Geliştirici Çalışmalar

Kemik indüksiyonunu sağlayan proteinlerin izolasyonu 1973'lerde gerçekleşmiştir. 1993-1997 arasında laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda hayvanlardan üretilen rhBMP'nin, dışarıdan uygulanması ile omurga kemiklerini etkili bir şekilde geliştirdiği gösterilmiştir. İnsan BMPs büyüme faktörü direkt kullanıldığında mezenkimal hücreler kondro progenitör ve osteoprogenitör hücrelere farklılaştığı gösterilmiştir. BMP-2 ve BMP-7'inin direkt cerrahi yerleştirilen implantın kullanımı sırasında sürülerek uygulanması değerlendirilmiştir. (Cochran et al). Çalışmanın sonucunda implant çevresindeki defektlerdeki yeni kemik oluşumunun zamana, taşıyıcıya, bariyer membranın yeri ve rhBMP-2 'nin bulunmasına bağlı olduğunu söylemiştir. Cook ve Rutherford yeni çekim yapılmış bölgelere OP-1 içeren implantların etkilerini değerlendirmiştir. İki çalışmanın sonucunda da yeni kemik oluşumu protein ile uyarılmıştır. Fiorellini ve arkadaşlarının 2001'de osteoindüktif peptid olan insan kemik morfogenetik protein-2 (rhBMP-2) kullanarak kemik yapımının artmasını göstermişlerdir [40]. Çalışmada önce çift taraflı mandibular premolarlar çekilmiştir. Xiang ise sığır BMP'nin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, aktif ajan ile tedavi edilen implantlarda kemik formasyonunun daha hızlı ve yeni kemik implant yüzeyine adapte olmaktadır. Lynch 'da büyüme faktörlerinin derivasyonlarından oluşan kombinasyon ve insülin benzeri büyüme faktörü -1'de kan model üzerinde benzer sonuçlar elde etmiştir [39]. İmplantın iyileşme dönemini kısaltmak için elektrik alan (capacitively coupled electric fields) (CCEF) oral implantlarda kullanılmıştır. 1985'de CCEFne tedavisinin osteogenezi stimule ettiği Brighton ve Pollock bildirmiştir. Ochi ve arkadaşları CCEF kullanımının; tavşanların femurlarına yerleştirilen implantların çevresindeki kemik

yapımını uyardığını bildirmişlerdir. Shigino ve arkadaşları köpek mandibulası üzerindeki çalışmalarında benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Tokohino ve arkadaşlarının CCEF ile ilgili son araştırmada, köpek mandibulasına implant uyguladıktan sonra 14. ve 21. günlerde okluzal yükleme yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda erken loading artırılrsa bile CCEF uygulanan implant yakınında yoğun kemik yapımının arttırdığını, CCEF uygulamanın osteogenezisi arttırdığını belirtmişlerdir .Ancak, tümüyle doğal (bu nedenle biyouyumlu) bu proteinin, toz halinde omurilik bölgesine dökülmesi hem maliyeti artırmakta hemde kemikteki doz fazlalığından dolayı komplikasyonlar (heterotropik ossifikasyon,osteoliz, enflamatuvar kist formasyonları vs.) oluşturmaktadır. Son yıllarda, doz ayarlama için BMP nin jel ya da kapsül içerisine yerleştirilip kontrollü salındığı çalışmalara rastlanmakta, ancak bu yöntemde rastlanan, jelin malzeme yüzeyinden sıyrılması, taşıyıcının sert kemik dokusu yapısına entegre problemleri vs. bu yaklaşımın pratikte hastanede henüz kullanımına imkan vermemiştir.Kirsh ve Donath, plazma püskürtülmüş titanyum ile tedavi edilmiş implantların daha erken kemik apozisyonu sağladığını, ham Ti implantlara göre bildirmişlerdir. Daha sonra kum püskürtülmüş ya da asitlendirilmiş titanyum implantlar geliştirilmiş. Bu değişiklikler daha iyi ve klinik iyileşme dönemini azaltmaktadır. Hidroksiapatit (HA) ve kalsium fosfat, (BMP içermeksizin tek başına) kemik-implant temasını arttırmak için kullanılan diğer bir stratejidir. Ancak HA kaplı implantlarda HA-Ti arasında zayıf dayanıklılık ve kaplanan dış yüzeyin zamanla çözüldüğünü gösteren çalışmalar vardır. Ancak Chang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yüksek oranda HA kaplı Ti implantların kullanılması sağlamlığın sağlanmasında daha çok arzu edildiğini bildirmişlerdir. Bu yöntemlerde, hidroksiapatit kaplı Ti kullanımı öne çıkmaktadır.

Ancak, hidroksiapatitin plazma püskürtme yoluyla kaplanmasında yüksek plazma sıcaklığı ile yapısının bozularak faz ayrışması meydana geldiği, bu ayrışım neticesinde insan bünyesi ile biyouyumlu olmayan alerjik reaksiyonlar oluşturabilecek kalsiyum oksit fazı oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca plazma dışında diğer yöntemlerle hidroksiapatit kaplanması durumunda, mekanik testlerinde elde edilen yapının gevrek olması nedeniyle kırılma tokluğunun insan kemiğinden çok daha düşük olduğuna rastlanmıştır. Ayrıca, osteoporotik hastalarda bu yaklaşımların hiçbirisi başarı gösterememiştir [40].

2.7. Karakterizasyon Testleri

2.7.1.Yüzey Karakterizasyon Testleri

Temas Açısı Ölçüm Sistemi; Bir katının yüzeyine bırakılan sıvı damlası, çoğunlukla yüzeye tam olarak yayılmaz, yarım yuvarlak veya kubbemsi bir şekil alır. Kubbe yüzeyinin katı yüzeyine temas ettiği sınırdaki, katının yatay düzlemi ile kubbenin temas sınırındaki teğeti arasında oluşan açıya temas açısı denir ve katının sıvı tarafından ne kadar ıslatılabildiğini gösterir. Temas açısı malzemenin yüzey özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Bu açının büyüklüğü ıslanabilirlik düzeyi ile ters orantılıdır. Temas açısı büyüdükçe ıslanabilirlik azalır, temas açısı küçüldükçe ıslanabilirlik artar.

Temas açısı ölçümleri, yüzey yükü, yüzeyin ıslanabilirliği ve yüzey enerjisi parametreleri hakkında kolayca fikir veren bir yöntemdir. Temas açısı dört teknikle ölçülebilmektedir; Duran damla (sessile drop) yöntemi, tutuklanmış hava kabarcığı (captive air bubble) yöntemi., kapiler (Capillary rise) yöntemi ve Wilhelmy plate yöntemi.

Yüzeye damlatma yöntemi bir katı yüzeyine bırakılan sıvı damlasının denge temas açısını ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir [42]. Bu yöntemin esası katı, sıvı ve gaz üçlü faz dengesine dayanmaktadır. Bu teknikle ölçümler hava ortamında gerçekleştirilmektedir. Tutuklanmış kabarcık yönteminin esası ise katı/sıvı/gaz veya katı/sıvı/sıvı üçlü faz dengesine dayanmaktadır [43].

Atomik Kuvvet Mikroskopu; (AKM) ya da taramalı kuvvet mikroskopu çok yüksek çözünürlüklü bir taramalı kuvvet mikroskopudur. Ulaşılmış çözünürlük birkaç nanometre ölçeğinde olup optik tekniklerden en az 1000 kat fazladır. AKM'nin öncülü olan taramalı tünelleme mikroskopu 1980lerin başında Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer IBM Research - Zürih'te geliştirilmiş, araştırmacılara 1986 Nobel Ödülü'nü kazandırmıştır. Sonrasında Binnig, Quate ve Gerber 1986'da

ilk atomik kuvvet mikroskopunu geliştirmişlerdir. İlk ticari AKM 1989'da piyasaya sürülmüştür. AKM, nano boyutta görüntüleme, ölçme ve malzeme işleme konusunda en gelişmiş araçlardan biridir. Bilgi, mekanik bir ucun yüzeyi algılamasıyla toplanır. Elektronik kumanda üzerinde bulunan, küçük fakat hassas hareketleri sağlayan piezo elektrik öğeler, doğruluğu kesin ve hassas bir tarama sağlar. İletken manivelalar kullanmak suretiyle numune yüzeyindeki elektrik potansiyeli de taranabilir. Cihazın daha yeni ve gelişmiş versiyonları da, elektriksel iletkenliği ya da yüzeydeki elektron iletimini algılamak için uçtan akım geçirilmektedir [44]. AKM uygulamaya bağlı olarak çeşitli modlar da kullanılabilir. Bu görüntüleme modları "statik" (temas) ya da "dinamik" (temassız) olabilir. Dinamik modlar manivelanın akustik ya da manyetik yollarla titreştirilmesini gerektirir ve yumuşak yüzeyler için daha yaygın olarak kullanılır [45].

Taramalı Elektron Mikroskobu ; SEM ya da taramalı elektron mikroskobu herhangi bir örnek veya örnek üzerindeki ilgili küçük bir alanda elementel kompozisyonu tanımlamak için kullanılan bir tekniktir. Elektron mikroskopunda (SEM) bulunan EDS analizi, örnek üzerine taramalı bir elektrondemeti düşürülerek gerçekleştirilir. Bu elektronların bazıları numune içindeki elektronlar ile çarpışarak elektronların yörüngelerinden çıkması sağlanır. Boşalan pozisyonlar x-ışınları yayan yüksek enerjili elektron tarafından doldurulur. Yayılan x-ışınları analizedilerek, numunenin elementel kompozisyonu tespit edilebilmektedir [46].

2.8 Histolojik Testler

Histoloji bilimine, mikroskopik anatomi de denmektedir. Histoloji biliminde, bir mikroskop yardımıyla biyolojik materyal ve yapılar incelenir. İncelenecek yapı hücre (sitoloji), doku (histoloji) ve organ (organoloji) bazında olmak üzere üç alt bölüme ayrılır. Histoloji hücre, doku ve organ bilimi olduğuna göre, bunların yapılarının yanı sıra işlevlerini de ele alacaktır. Bu yüzden, histoloji sadece yapıyı tanımlamakla kalmaz, aynı zamanda biyokimya, moleküler biyoloji ve fizyoloji arasında bağlantılar kurar ve hastalık ile ilgili patogeneizde önemli rol oynar.

Histolojik testlerde ana gereç mikroskopdur. Materyaller, mikroskopta incelenmeden önce, aşağıda belirtildiği şekilde elde edilir:

İğne Biyopsisi: Beyin, göz, tiroid, lenf düğümü, meme, akciğer ve plevra, böbrek, kemik ve kemik iliği, testis ve iskelet kası.

Endoskopik Biyopsi: Solunum yolu, mide ve barsak yolu, üriner sistem yolu.

Transvasküler Biyopsi: Kalp ve karaciğer

Doğrudan Çıkarım Biyopsisi: Deri, ağız, larinks ve serviks uteri.

Kürete Biyopsisi: Uterus endometriyumu.

Alınan biyolojik materyaller, belli aşamalardan geçirilir. Bunları, şu şekilde sıralayabiliriz:

(1) Tespit (Fiksasyon), (2)Yıkama, (3) Suyunu giderme (Dehidrasyon), (4) Gömme veya blokaj (Blokaj), (5) Kesme, (6) Boyama

Sırasıyla izlenen bu aşamaların her birinde, öngörülen şartlara uyma zorunluluğu vardır. Bunlardan birinde yapılan bir hata, neticeyi menfi yönde etkiler ve uygun bir preparat elde edilemez.

Tespit ; Hücre veya dokuların, alındığı gibi saklanmasıEğer bu sağlanmazsa bozunma olur.En önemli unsur dokudaki proteinlerin çökmesidir.

Yıkama ; Uygulanan tespit çeşidine göre yapılır.Su veya değişik yoğunluklarda alkol kullanılır.Formol, osmiyum tetraoksit ve krom tuzu içeren tespitlerden sonra, yıkama aşamasında su kullanılır.Pikrik asitle gerçekleştirilen tespitler den sonra, % 70 – 80'lik alkol ile yıkama yapılabilir.

Suyunu Giderme (Dehidrasyon) ; Parafine gömülecek olan dokuların, yıkamadan sonra içerisinde hiç su kalmaması gerekir. Bu amaçla, en yaygın olarak *etil alkol* kullanılır. Etanol, dokulardaki suyu çeker.Dokular, sırayla artan derecelerde alkol serisinden geçirilir.Parafine gömülecek olan dokuların, yıkamadan sonra içerisinde hiç su kalmaması gerekir. Bu amaçla, en yaygın olarak etil alkol kullanılır. Etanol, dokulardaki suyu çeker.Dokular sırayla artan derecelerde alkol serisinden geçirilir

Gömme (Blokaj) ; Emdirme maddesi dokuların içine iyice nüfuz ettikten sonra, bu dokular yine aynı maddenin içine gömülürler. Bu amaçla, özel kalıpların içine emdirme maddesi doldurulur. Sıvı durumdaki bu maddenin içine, kesit yüzleri üzerine oturtulmak şartıyla doku parçaları yerleştirilir

Kesme; Emdirme maddesinin içine gömülerek homojen biçimde sertleşmiş olan blok kitlesi (doku ve emdirme maddesi), mikrotom adı verilen özel bir aletle kesilir .Bunların günlük pratikte en çok kullanılanları ise, kızaklı veya rotatif (dönerli) mikrotom tipleridir. Bu aletlerde kullanılan çelik bıçaklar (mikrotom bıçakları) da, özel şekilde üretilmiştir. Ayrıca, çok pahalı olan elmas uçlu bıçaklar da kullanılmaktadır. Mikrotomlarda, (tiplerine göre) 1– 10 mikron kalınlığında kesitler alınır.

Boyama ; Dokuların genellikle çoğu boyasız olup, bunların incelenmesi için öncelikle boyanmaları gerekmektedir. Aynı zamanda, bu yolla kimyasal maddeler de belirlenebilir.En basit boyamada, hücrelerin iki temel ögesi ayrı özellikteki boyalarla boyanır ve şekilli oluşumlar, mikroskop altında görülebilir hale gelir. Buna göre, rutin boyamada çekirdek hematoksilinle ve sitoplazma *ezinle* boyanır [50].

3.MATERYAL METOT

Sunulan bu çalışmada titanyum vida örneklerinin farklı güç , süre ve monomer akışı değerlerinde set halinde plazma polimerizasyon yöntemiyle kaplanarak örnek grupları oluşturulmuştur. Çalışılan güç değerleri 30W ,45W ve 50W tır. Çalışılan süreler 3 dk, 6 dk, 9 dk ve 12 dakikadır. Çalışılan monomer akışı ise 5ml/dak , 10ml/dak, 20ml/dak ve 30ml/dak' dır. Bu parametrelerle 5 paralel örnekleme ile örnek setleri oluşturulduktan sonra yüzey karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Kaplanan vida setleri hazırlandıktan sonra sırasıyla yüzey karakterizasyon testleri , kimyasal karakterizasyon , protein tutuklama ve histoloji testleri yapılmıştır. Bu çalışma da kimyasal malzemeler, vidaların ve plazma polimerizasyon sisteminin hazırlığı , plazma polimerizasyon yöntemi ile implant yüzey üzerinde fonksiyonel grup oluşturmak(kimyasal aktivasyon),yüzey karakterizasyon testleri, kimyasal karakterizasyon testleri, rekombinant kemik morfogenetik protein tutuklanması, canlı içi testler şeklinde aşağıda ayrıntılı şekilde anlatılmaktadır.

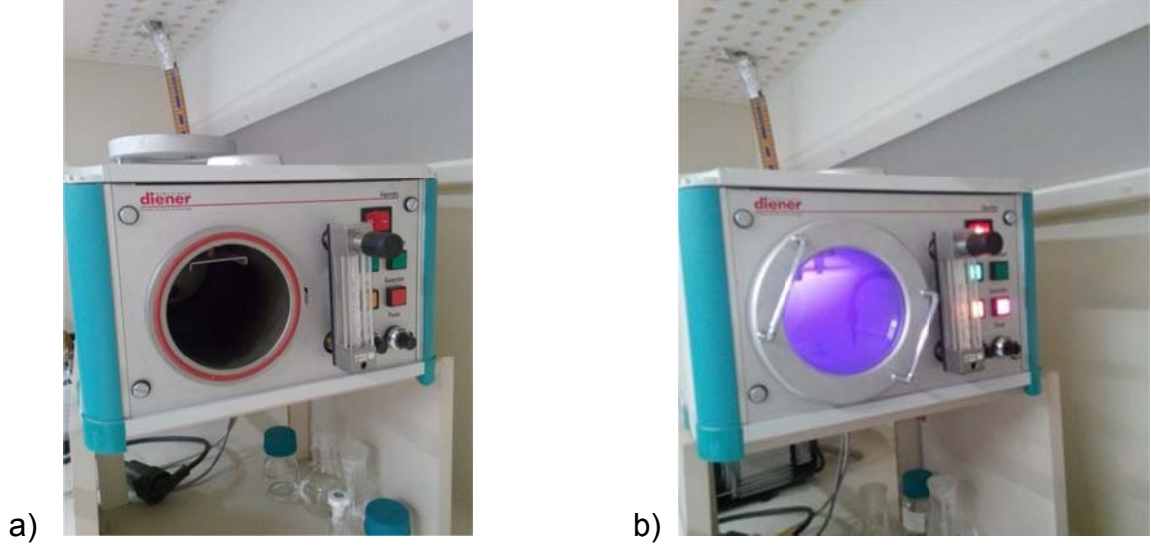
3.1 Kimyasal Malzemeler

Üzerinde çalışılan monomer sistemin Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Referans (silikon) diskleri maskelemede kullanılan selüloz asetat Bmp protein sigma-Aldrich (Almanya) firmasından sağlanmıştır. Kimyasal karakterizasyon esnasında kullanılan glutaraldehit Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Son aşamada vida yüzeylerine tutuklanacak bmp proteini Fisher (Amerika) firmasından temin edilmiştir.

3.2 Vidaların ve Plazma Polimerizasyon Sisteminin Hazırlığı

Güç kaynağı olarak 13.56 MHz radyo frekans jeneratörünün kullanıldığı plazma polimerizasyon sisteminin radyo frekansın kullanılması ile homojen kaplamaya imkan verir manipulasyonlar tamamlanmıştır. Burada, işlemlerin temiz uygulanması kriteri gözönünde bulundurularak vakum ortamında yük boşalımı tipi

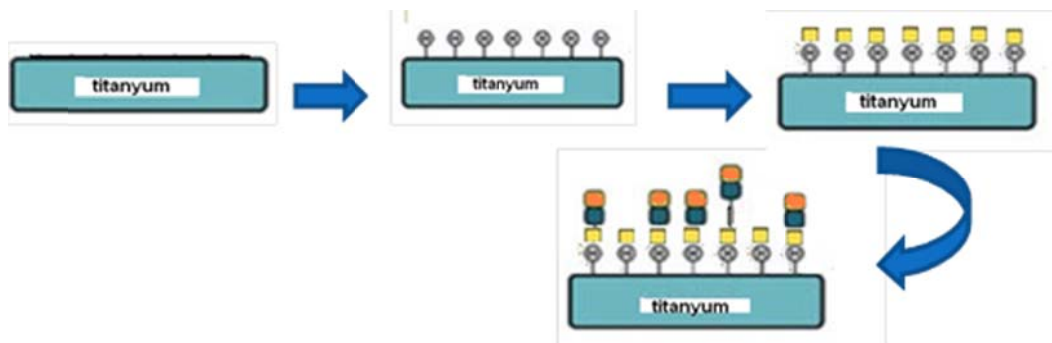
tercih edilmiştir. Kullanılan plazma polimerizasyon cihazı Diener electronic marka Pico-LF-RF modeldir. (Şekil 3.1). Yöntemde kaplanacak vidalar ise ön hazırlık olarak saf suyla yıkama sonrası %50 v/v'lik etil alkolden geçirilmiştir.



Şekil 3.1 Kullanılan plazma polimerizasyon cihazı a) genel görünüş b) Plazma polimerizasyon esnasında

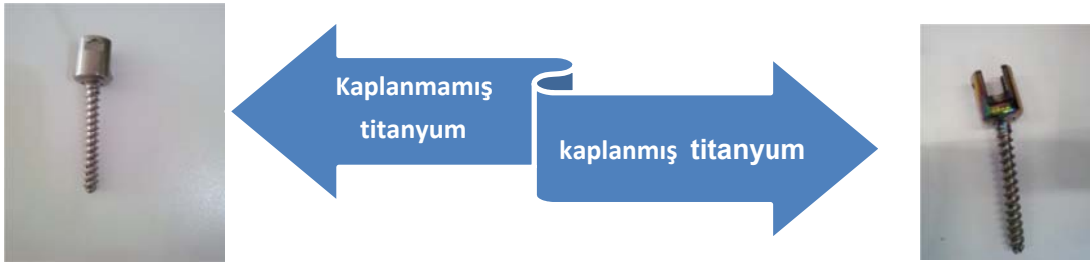
3.3 Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile İmplant Yüzey Üzerinde Fonksiyonel Grup Oluşturmak

Çalışma kapsamında, uygulanması planlanan tüm basamaklar genel olarak şekil 3.2 'de özetlenmiştir.



Şekil 3.2 Plazma polimerizasyon yöntemi ile yüzey aktif titanyum vida üretimleri (titanyum: temizleme, plazma polimerizasyon modifikasyon, aktivasyon, protein tutuklama)

Şekil 3.2'deki tanımlanan ilk basamak plazma polimerizasyon tekniği ile modifikasyondur. Bu basamak için, 13.56 MHz radyo frekans jeneratörünün kullanıldığı plazma polimerizasyon sisteminin (Şekil 3.1) iç kısmına bir önceki ön basamakta ön hazırlığı yapılmış vidalar ve yüzey karakterizasyonun da yardımcı olarak kullanılacak silikon pulcuklar yerleştirilmiştir. Devamında katı monomer tablet halinde, plazma sistemi içerisine konulmuştur. Bu bölümde, bir ucunda amino grubu diğer ucunda metal yüzey ile bağ yapma enerjisi ve eğilimi yüksek kimyasal grup içeren monomer (sisteamin) kullanılmıştır. Sonrasında reaktör kapağı kapatılarak sistem belli bir vakum değerine ulaştıktan sonra (10^{-2} mbar), monomer akış hızı akış ölçer vasıtasıyla sabitlenmiş yük boşalım jeneratörü açılmıştır.



Şekil 3.3 Plazma polimerizasyon ile kaplamada kullanılan kaplanmamış ve kaplanmış titanyum vida örneği

Yük boşalım jeneratörü açıldıktan sonra tespit edilen sürede yük boşalımı vida-örnek ve monomer üzerine uygulanmıştır. Şekil 3.3'de plazma polimerizasyon tekniği öncesi titanyum alaşım ve kaplama sonrasında yüzeyi değişmiş vida örneğinin fotoğrafı sunulmuştur.

3.4 Kimyasal Aktivasyon

Plazma polimerizasyon yöntemiyle titanyum vida yüzeylerinin kaplanmasından sonraki basamak kimyasal aktivasyondur. Kaplama yapılan bir kısım vida örnekleri yüzey karakterizasyon testleri için ayrılırken diğer kısmına kimyasal yöntemle aktivasyon işlemi uygulanmıştır. Ayrıca kimyasal aktivasyonu yapılan vida yüzeyinde karakterize edilmiştir. Bu basamaktaki amaç titanyum vida yüzeyinde monomerle (sisteamin) oluşturulan amin (NH₂) gruplarının aktivasyon için kullanılan glutaraldehit (-C=OH) çözeltisi içinde bulunan karboksil (COOH) gruplarına bağlanarak rhBMP-2 proteinin bağlanabileceği fonksiyonel gruplara dönüştürülmesidir. Kimyasal aktivasyonda % 2.5 (V/V)'lik glutaraldehit çözeltisi kullanılmıştır. Titanyum vidalar beher içersindeki çözeltiliye daldırılıp 370 rpm hızında 6 saat bekletilmiştir. Beher içinden alınan örnekler saf su ile yıkandıktan sonra kurutulmuştur. Örnekler tekrar kimyasal karakterizasyon testlerinde incelenmiştir.

3.5 Yüzey Karakterizasyon Testleri

Plazma, kaotik bir ortamdır ve beslediğimiz monomerin farklı formlarını içerir (iyon, nötr parçacık, elektron vs). Bu yüzden de bu bulut, ışımaya ile birlikte enerjisini düşürme eğilimi ile implant yüzeyi üzerinde yoğunluklu kovalent bağlarla oturur, bazı durumlarda yüzey atomları ile direkt kimyasal bağ kurar. Bu davranışı, parametrelerin değişimi ile (güç, akış hızı vs.) farklılıklar içerir ve bu durum fonksiyonel grup oranlarını değiştirir. Bu nedenle, tez çalışmasında plazma polimerizasyon ile modifikasyon sonrası yüzeyin fiziksel ve kimyasal özelliğindeki değişimler ilgili karakterizasyon testleri ile tanımlanmıştır. Ayrıca, bu testler kullanılarak kararlı (her defasında aynı özellikte) fonksiyonel grup oranı oluşturulduğu kontrol edilip, dinamik akış ortamından etkilenmediği kanıtlanmaya çalışılmıştır. Fiziksel karakterizasyon için AKM, kimyasal karakterizasyon için SEM EDS kullanılmıştır. Bu sonuçların kritik edilmesi ile sistemin çalışma koşulları seçilecek ve üretim için reçete (hangi güç, süre, tutuklama parametresi kullanılacak vs.) uygulanacağı hakkında fikir oluşturulmuştur.

3.5.1 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan / kimyasal aktivasyon yapılan vida setlerinde temas açısı ölçümü

Temas açısı vida yüzeyi ile yüzeye temas eden su damlası arasındaki açıdır. Bu açının büyüklüğü ıslanabilirlik düzeyi ile ters orantılıdır. Temas açısı büyüdükçe ıslanabilirlik azalır, temas açısı küçüldükçe ıslanabilirlik artar. Temas açısı ölçümleri, yüzey yükü, yüzeyin ıslanabilirliği ve yüzey enerjisi parametreleri hakkında kolayca fikir veren bir yöntemdir. Tez çalışmam da titanyum vida örnekleri kaplanmamış yüzey (kontrol grup) , farklı (güç,süre,akış) parametrelerde plazma polimerizasyon yöntemiyle monomer (sisteamin) ile kaplanan yüzeyler ve glutaraldehit kullanarak aktive ettiğim yüzeylerin temas açısı incelendi. Kullanılan Drop Shape Analyzer marka temas açısı ölçüm cihazı Şekil 3.4 ' te sunulmuştur.



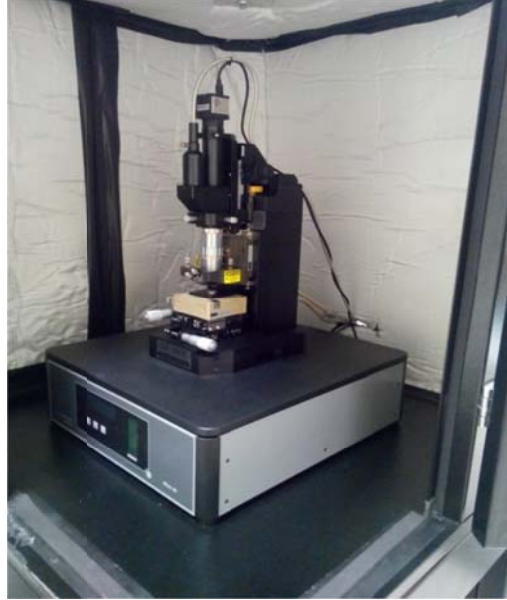
Şekil 3.4 Kullanılan temas açısı ölçüm cihazı

Her bir örnek titanyum vida seti üzerine 4 mikrolitre su damlatılarak yüzey temas açıları ölçülmüştür. Bu sonuçlar, farklı parametreler de plazma polimerizasyon yöntemi ile kaplama sonrası ve aktivasyon sonrası yüzey hidrofikliği, temas açısı ölçüm değerleri bulunarak tespit edilmiş ve sonuç kısmında sunulmuştur.

3.5.2 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan / kimyasal aktivasyon yapılan vida setlerinde kaplama kalınlığı ölçümü

Titanyum vidaların plazma polimerizasyon işlemindeki parametrelerin kaplama kalınlık değişimini görmek için referans olarak seçilen silikon yüzeyler %38 v/v

derişiminde selüloz asetat çözültisi hazırlanmıştır, hazırlanan çözültiden#1 damla şeklinde yüzeyin belirli bölgelerine bir tabaka sürölüp, sonrasında plazma polimerizasyon tekniği ile modifikasyon sonrasında bu maske bir spatul yardımı ile kaldırılmıştır. Buradaki maske bölgesi ile kaplama arasındaki ara yüzey üzerine AKM ile tarama ve topoğrafi çıkarımı yapıldı. Ayrıca farklı bir vida seti kaplanıp maske bölgesi elde edildikten sonra kimyasal aktivasyonu için glutaraldehit çözültisinde bekletilme,yıkama ve kurutma işleminden geçirildikten sonra yüzey topoğrafisi incelenmiştir. Aşağıdaki şekil 3.5' de ölçüm yapılan cihaz gösterilmiştir.#

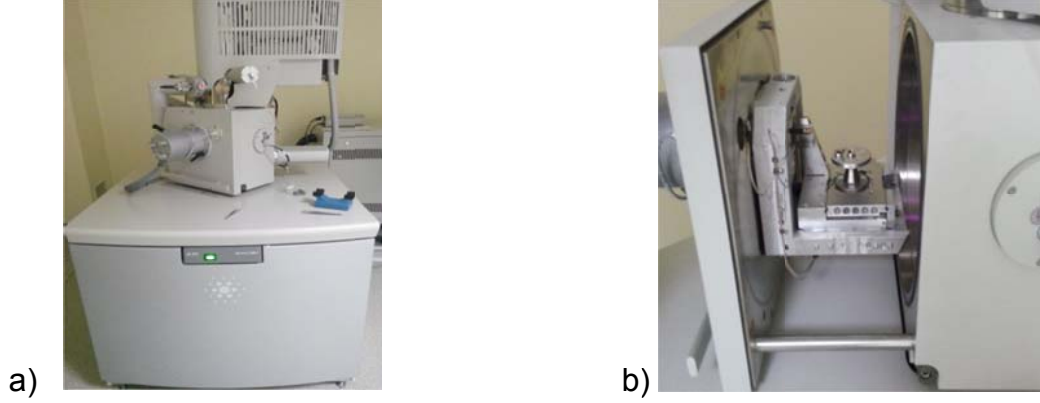


Şekil 3.5 Topoloji ölçümlerinde kullanılan AKM (PSIA XE150) model cihaz.

3.5.3 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan / kimyasal aktivasyon vida setlerinde yüzey kimyasının belirlenmesi

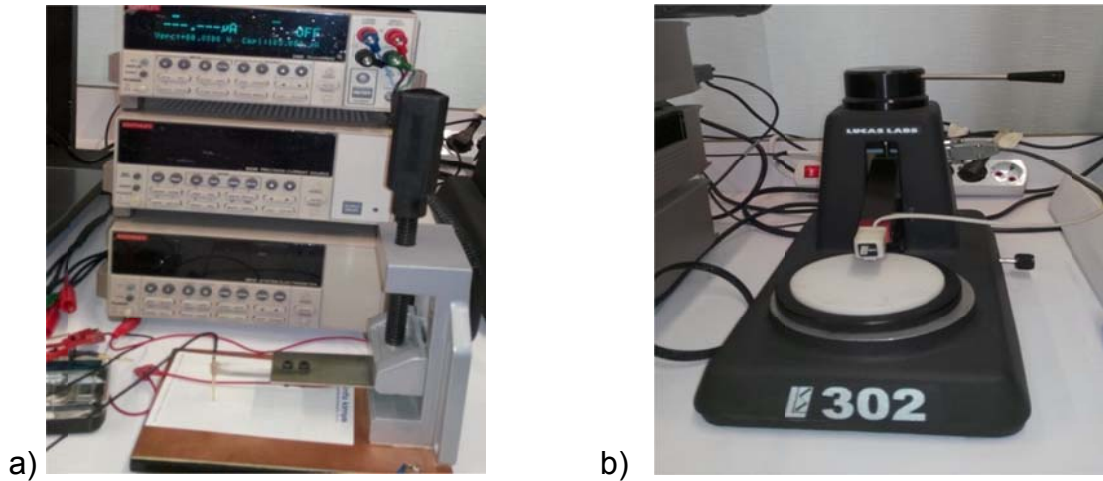
Plazma polimerizasyon sisteminde değişik parametrelerde kaplanan vida setlerinden bir seti ile kimyasal karakterizasyon yapıldı. Bu basamaktan önce yapılan yüzey karakterizasyon sonuçlarından belirgin farklılık gösteren 6 parametrede örnekler seçildi. Seçilen örnekler numune bölgesine yerleştirilmeden sabitlendi ve sırayla cihaza yerleştirildi. Sistem 10mbar vakum değerine ulaştıktan sonra örneklerin görüntüsü ve kimyasal analiz verileri alındı. Araştırmalarda

Bilkent Üniversitesinde bulunan UNAM laboratuvarlarında Kaplı yüzey kimyasına bakılması için SEM (EDS) cihazı kullanılmıştır.(Şekil 3.6)



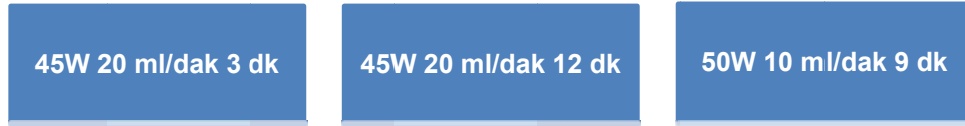
3.5.4 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde yüzey iletkenlik değişiminin belirlenmesi

Plazma polimerizasyon sonrası monomerle etkileşen yüzeylerde iletkenlik değişimi ön görüsüne sahip olmak için üç farklı parametredeki örneklerde yüzey iletkenlik değişimine bakılmıştır. İletkenlik ölçümleri yapılan cihaz aşağıda Şekil 3.7 de gösterilmiştir.



Şekil 3.7 İletkenlik Ölçüm cihazı a) Kethley 2400 Model iletkenlik veri eldesi cihazı b) Lucab Labor FPP (Four Point Prob)

İletkenlik değişimi incelenen kaplanmış titanyum vida yüzeylerine $1\pm 0.4V$ luk elektrik verilmiştir. Saf titanyumla beraber diğer kaplı 4 örnekte akım (I) değerleri elde edilmiştir. Sonrasında $V = I \cdot R$ formülünden yola çıkılarak elde edilen akım (I) değerleri 1 ± 0.4 değerlerine oranlanarak R (direnç) değerleri elde edilmiştir. Elde edilen R (direnç) değerleri sonuç bölümünde sunulmuştur. Şekil 3.8’de iletkenlik ölçümü yapılan vidaların parametreleri gösterilmiştir.



Şekil 3.8 İletkenlik ölçümü yapılan örnekler

3.6 Rekombinant Kemik Morfogenetik Protein Tutuklanması

Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vidalarla yapılan yüzey karakterizasyon testlerinin değerlendirilmesi sonucunda temas açısı, kaplama kalınlık değişimi ve kimyasal analiz verileri dikkate alınarak, seçilen plazma polimerizasyon parametresinde modifiye edilen vidalar tekrar glutaraldehit ile aktive edildikten sonra tutuklanma basamağına geçilmiştir. Tutuklama için 4.2 mg rhBMP-2, 3.2 ml saf suyla çözelti hazırlandıktan sonra örnekler rhBMP-2 olan beher içerisine daldırılıp, 2 saat bekletilip yıkanmıştır. Devamında bu örnekler tavşan deneyleri için Başkent Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Bölümü'ne gönderilmiştir. Bu tavşanlara osteoporoz oluşturma sebebiyle hormon enjekte edilmiştir. Canlı-içi testler için tavşan tibia formu kemiklerine çıplak titanyum vida (kaplanmamış) ve yüzeyi farklı proses parametreleri ile aktif hale getirilmiş vidalar implante edilmiştir, belirli süre sonra (kısa: 4 hafta ve uzun dönem: 8 hafta) vida-kemik-kompleksi şeklinde aynı anda çıkarılan örneklerden histolojik testleri tamamlanmıştır. Histolojik analiz için %10 v/v neutral buffer formaldehit içinde

bekletilen örnekler sonrasında sabitleme işlemi için % 20 v/v 'lik formaldehit içersinde 20 saat bekletilmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra örnekler histolojik anlizde incelenecek kesit elde etmek için parafine gömülmüştür. Kesiti alınan örneklerde kemik hücreleri (osteoblast) nin oluşturduğu fibröz dokuya bakılmıştır. Elde edilen görüntü sonuç bölümünde Şekil 4.27 sunulmuştur.

4. SONUÇ

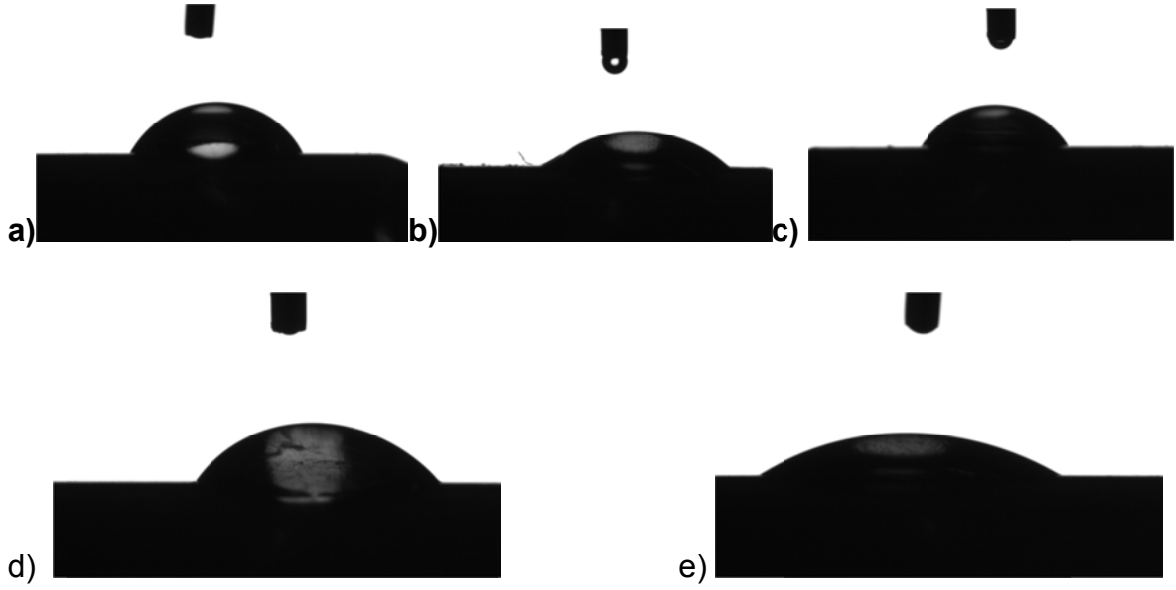
4.1 Yüzey Karakterizasyon Testleri

4.1.1 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde temas açısı ölçümü

Tez çalışmam da titanyum vida örnekleri kaplanmamış yüzey (kontrol grup) , parametrelerde güç değerleri 30W ,45W ve 50W, süreler 3 dk , 6 dk , 9 dk ve 12 dakika, çalışılan monomer akışı ise 5ml/dak, 10ml/dak , 20ml/dak ve 30ml/dak' dır. Bu parametrelerle 5 paralel örnekleme ile örnek setleri oluşturulduktan sonra yüzeylerin temas açıları incelendi. Bu sonuçlar, farklı parametreler de plazma polimerizasyon yöntemi ile kaplama sonrası yüzey hidrofikliği, temas açısı ölçüm değerleri bulunarak tespit edilmiş ve sunulmuştur.

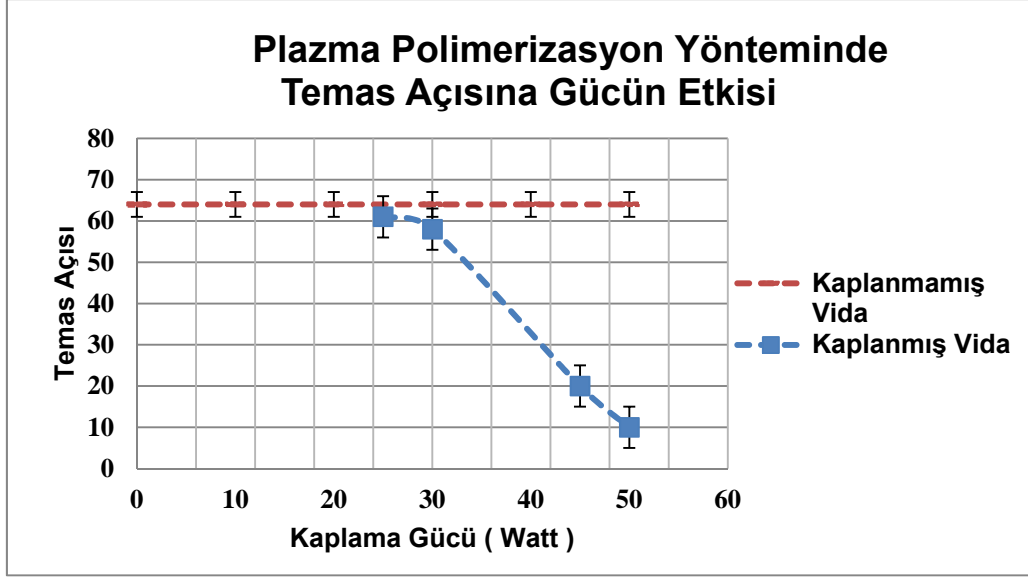
4.1.1.1 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde temas açısına gücün etkisi

Titanyum vida örnekleri monomer akışı (10ml/dak) ve süre (9 dak) sabit tutularak 25W,30W,45W,50W güç parametrelerinde kaplama yapıldı. Sonuçlarda monomerin yüzeye tutuklanma miktarının farklılığı ile ilgili sonuçların kritik edilmiştir. Dört farklı güç parametresinde elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Titanyum vida yüzey temas açısı ölçümleri a) işlem görmemiş b) 25W c) 30W d) 45W e) 50W

Kaplanmamış Titanyum vida yüzeyinin, temas açısı $64.2^{\circ} \pm 2$ bulunmuştur.(Şekil 4.1a) .Titanyum vidalarının 25W boşalım gücü parametresinde yüzey temas açısı $61.3^{\circ} \pm 2$, 30W boşalım gücü parametresinde ise yüzey temas açısı $58.7^{\circ} \pm 2$ ' ye düşmüştür (Şekil 4.1b ve Şekil 4.1c). 45W boşalım gücünde vida yüzey temas açısı $20.8^{\circ} \pm 2$, 50W boşalım gücünde yüzey temas açısı $10.8^{\circ} \pm 2$ ' ye düşmüştür (Şekil 4.1d ve Şekil 4.1e). Bu düşme yüzeyde oluşturulan primer ve sekonder aminler nedeniyle görülmektedir. Amin (NH_2) grupları polar özelliktedir ve yüzeyin hidrofilitesini artırmaktadır. Sonuçlar Şekil 4.2 'de özetlenmiştir.

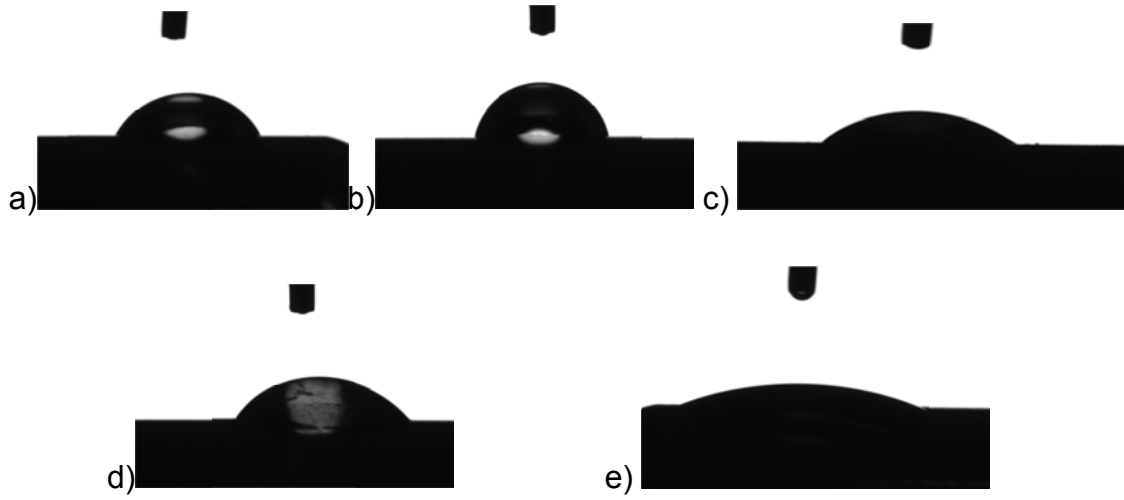


Şekil 4.2 Boşalım gücü parametresine göre temas açısı değişim grafiği

Sonuçlara göre plazma polimerizasyon cihazının gücünü artırdıkça monomerin etkileşimi ve yüzeyde oluşturduğu kimyasal ve kovalent bağlar sayısı artar böylece amin gruplardada artma meydana geldiğinden yüzey temas açısında azalma yani hidrofilitiklik te artma gözlenmiştir.

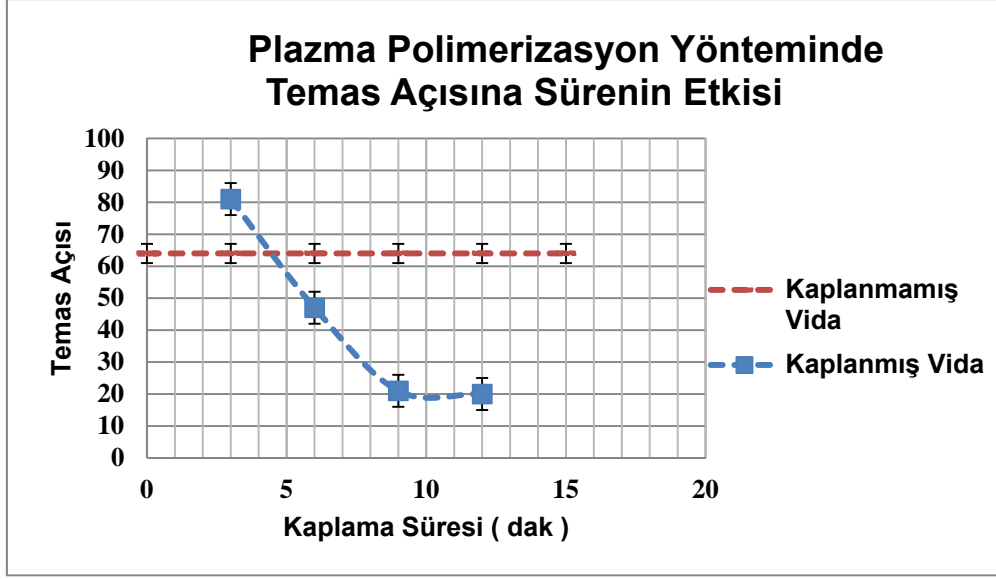
4.1.1.2 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde temas açısına sürenin etkisi

Monomer akışı ve cihaz boşalım gücü sabit tutularak dört farklı süre parametresinde yüzey temas açısı ölçümleri yapıldı. Burada yapılmak istenen yüzey temas açısı ile belirlenen hidrofilitiklik değerlerine göre kaplama için en ideal süreyi tespit etmektir. Şekil 4.3. te elde edilen sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Vida yüzeyinde bakılan temas açıları a) işlem görmemiş b) 3 dak c) 6 dak d) 9 dak e) 12 dak

Kaplanmamış vida yüzeyini temas açısı $64.2^{\circ} \pm 2$ bulunmuştur (Şekil 4.2a). 45W 10ml/dak sabit parametrede 3 dakika tutulan örneklerin temas açıları $81.0^{\circ} \pm 2$ ölçülmüştür (4.2b). Aynı şekilde 45W, 10ml/dak parametrede 6 dakika bekletilen örnekler için temas açısı $47.0^{\circ} \pm 2$ ye düşmüştür (Şekil 4.2c). 45W, 10ml/dak sabit parametrede 9 dakika bekletilen örnek yüzey temas açısı $20.9^{\circ} \pm 2$ (4.2d). 45W, 10ml/dak sabit parametrede 12 dakika bekletilen örnekler için yüzey temas açısı $20.4^{\circ} \pm 2$ ye düşmüştür (4.2e). Elde edilen sonuçlar aşağıdaki Şekil 4.5'de özetlenmiştir.

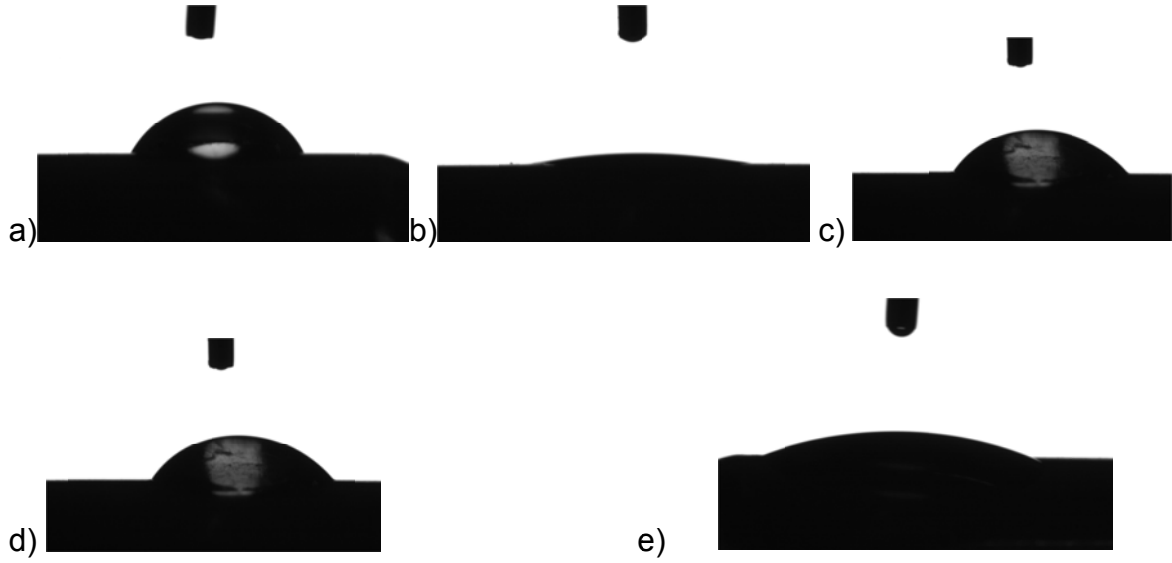


Şekil 4.4 Kaplama süresine bağlı yüzey temas açısı değişim eğrisi

Sonuç olarak plazma polimerizasyon tankında bekleme süresi arttıkça yüzeye temas eden monomer miktarı arttığı için temas açısında düşme meydana gelmiştir. Monomer kimyasındaki aminlerden kaynaklı yüzey hidrofilik olmuştur.

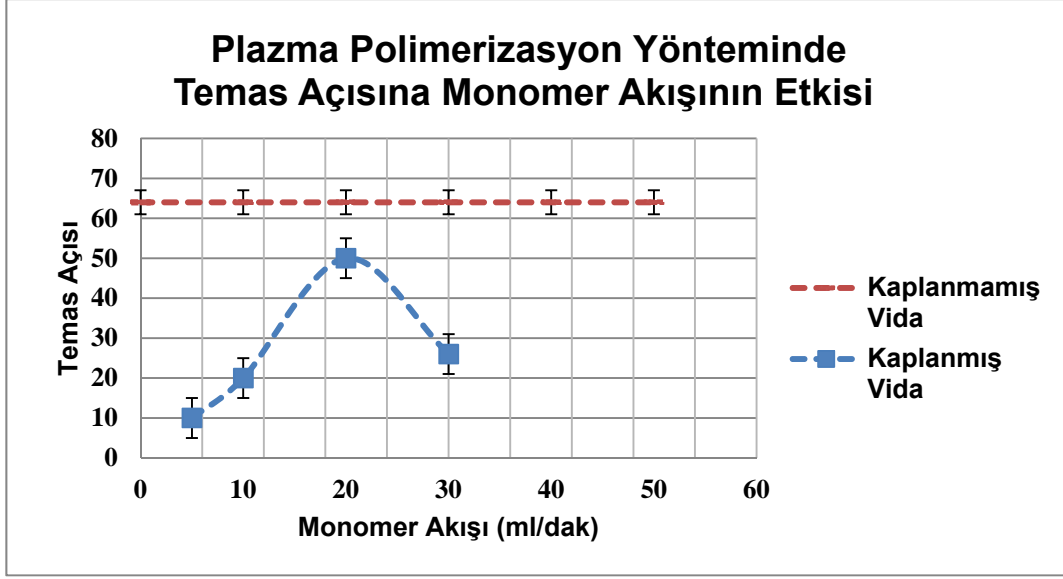
4.1.1.3 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplamada monomer akışının etkisi

Plazma polimerizasyon sisteminde kullandığımız monomer (sisteamin) akışını dört farklı parametrede kaplama yapıldı ve yüzey temas açıları ölçüldü. Sonuçlarda akışın hızını artırdıkça yüzeyden geçen monomerin yüzeyle etkileşme oranının azalmasına bağlı olarak hidrofiliklikte azalmalar meydana geldi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’de sunulmuştur.



Şekil 4.5 Titanyum vida yüzey temas açıları a) İşlem görmemiş titanyum vida b) 5 ml/dak c) 10 ml/dak d) 20 ml/dak e) 30 ml/dak

Temas açısı ölçümlerine bakılan örneklerde a) işlem görmemiş titanyum vida temas açısı $64.2^{\circ} \pm 2$ (Şekil4.5a) Güç ve zaman sabit değerlerde monomer akışı 5ml/dak olan titanyum vida yüzey temas açısı $10.9^{\circ} \pm 2$ ölçüldü (Şekil 4.5b). 10ml/dak kaplama yapılan vida yüzey temas açısı $20.9^{\circ} \pm 2$ ölçüldü (Şekil 4.5c). 20 ml/dak monomer akışı ile kaplanan titanyum vida yüzey temas açısı $51.4^{\circ} \pm 2$ olarak ölçüldü (Şekil 4.5d). 30ml/dak monomer akışı ile kaplanan titanyum vida temas açısı ise $26.6^{\circ} \pm 2$ 'ye düşmüştür (Şekil4.5e). Şekil 4.6'da elde edilen sonuçlarda değişim özetlenmiştir.



Şekil 4.6 Monomer akışına bağlı yüzey temas açısı değişim eğrisi

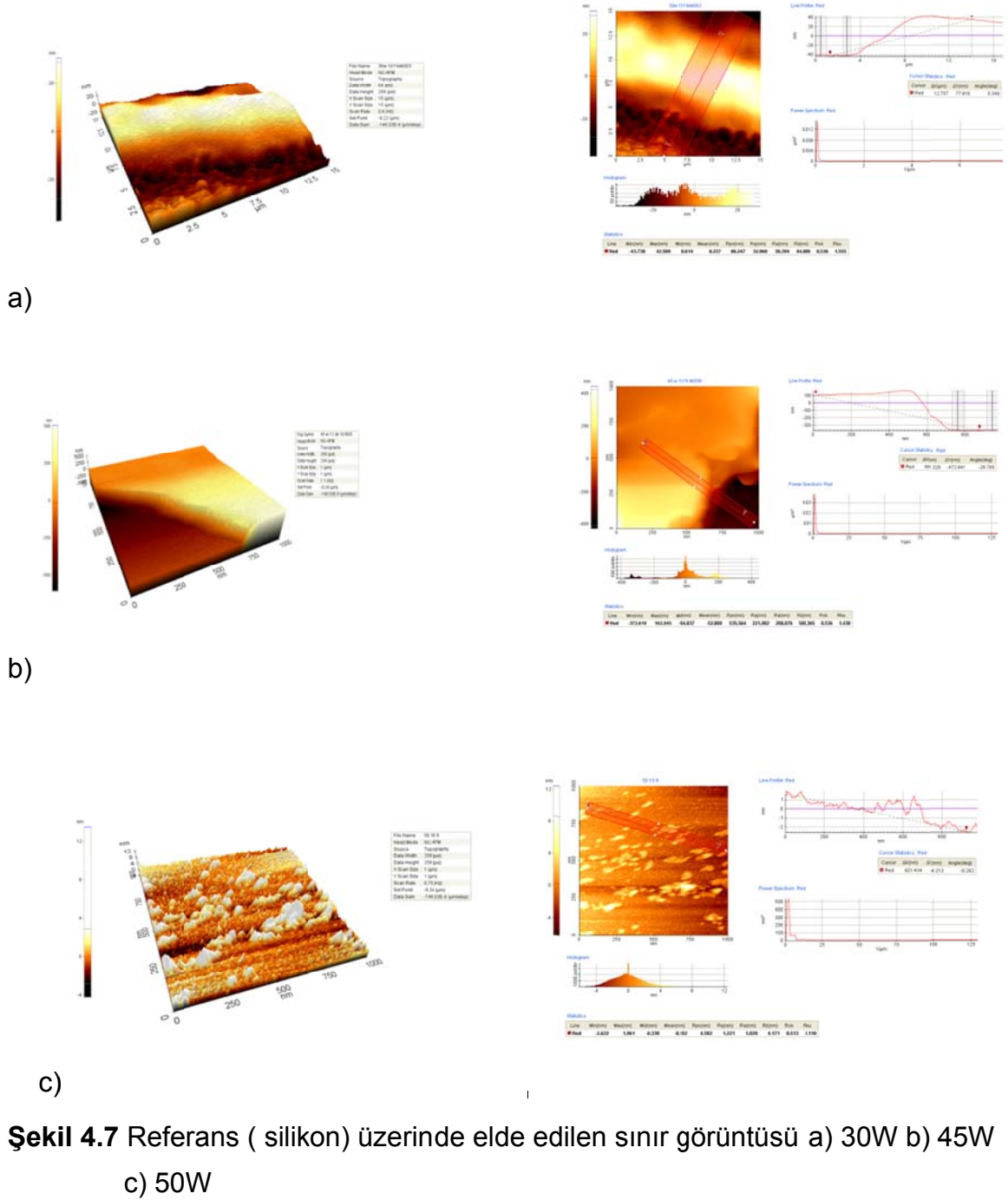
Sonuçlara göre monomer akışı yavaş iken kaplanan yüzeyle daha çok etkileştiğinden yüzey temas açısı azalmakta daha hidrofilik özellik göstermektedir. Monomer akışını artırdığımızda tam tersi durum monomer yüzeyden hızlıca geçtiğinden etkileşimi daha azdır. Çünkü cihazın gücünü artırdığımızda monomerin elementlerine ayrılması daha kolay olur böylece yüzeyde daha çok birikerek kalınlığın artmasını sağlamıştır.

4.2 Plazma Polimerizasyon Yönteminde Kaplanan Vida Setlerinde Kaplama Kalınlığı Ölçümü

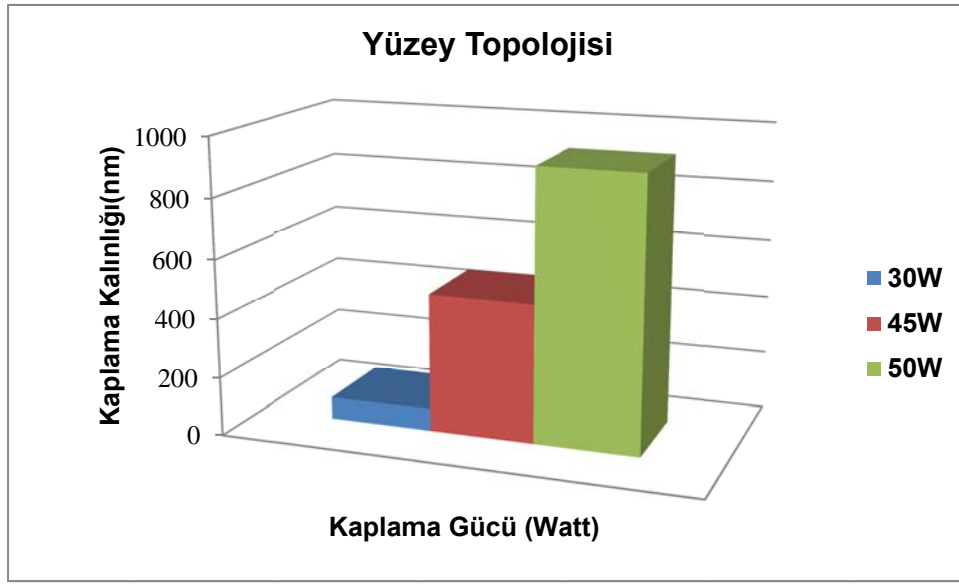
Titanyum vidaların plazma polimerizasyon işlemindeki parametrelerin kaplama kalınlık değişimini görmek için referans olarak seçilen silikon yüzeyler selüloz asetat ile maskeleye yapıp, titanyum vidalarla aynı parametrelerde kaplanmışlardır. Kaplı silikon yüzeyler ve karıştırılmalı saf su ortamında bekletilen örneklerde yüzey topolojisi ile kaplama kalınlığı ölçülmüştür.

4.2.1 Plazma Polimerizasyon Yönteminde Kaplama Kalınlığına Gücün Etkisi

Referans (silikon) yüzeylerde kaplama sonrası kalınlıktaki farkları belirlemek için monomer akışı ve zaman sabit tutularak boşalım gücü değiştirilerek kaplama yapılmıştır.



Referans (silikon) üzerinde kaplama sonrası meydana gelen kalınlık değerleri ; 30W 10ml/dak 9 dakika kalınlık : 77.810 ± 2 nm (Şekil 4.7a). 45W 10ml/dak 9 dakika kalınlık : 472.841 ± 2 nm (Şekil 4.7b). 50W 10ml/dak 9 dakika kalınlık : 921.434 ± 2 nm olarak ölçülmüştür (4.7c). Elde edilen değişimler aşığıdaki Şekil 4.8 'de özetlenmiştir.

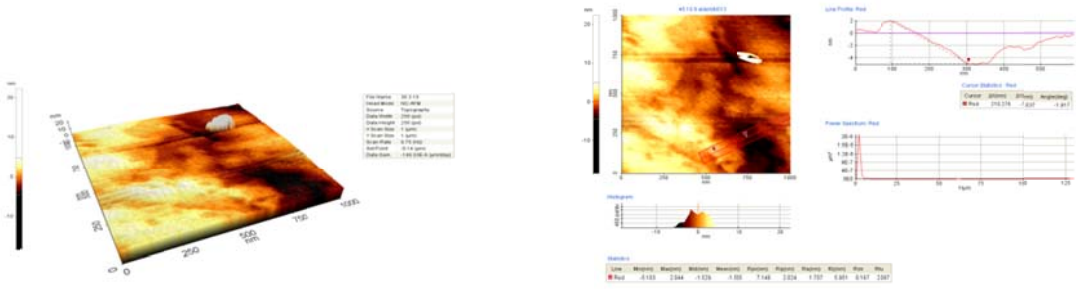


Şekil 4.8 Plazma polimerizasyon ile kaplamada gücün yüzey topolojisine etkisi

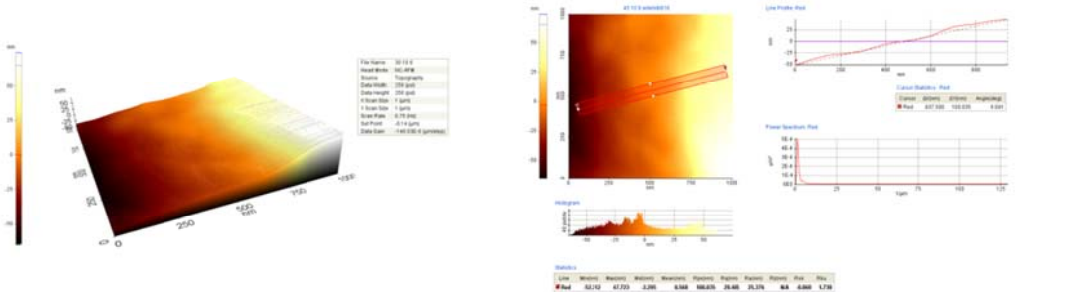
Elde edilen verilere göre plazma polimerizasyon ile kaplamada cihazın gücü artırıldığında yüzey kalınlığında doğru orantılı olarak artış gözlenmiştir. Çünkü cihazın gücünü artırdığımızda monomerin elementlerine ayrılması daha kolay olur böylece yüzeyde daha çok birikerek kalınlığın artmasını sağlamıştır.

4.2.2 Plazma Polimerizasyon Yönteminde Kaplama Kalınlığına Sürenin Etkisi

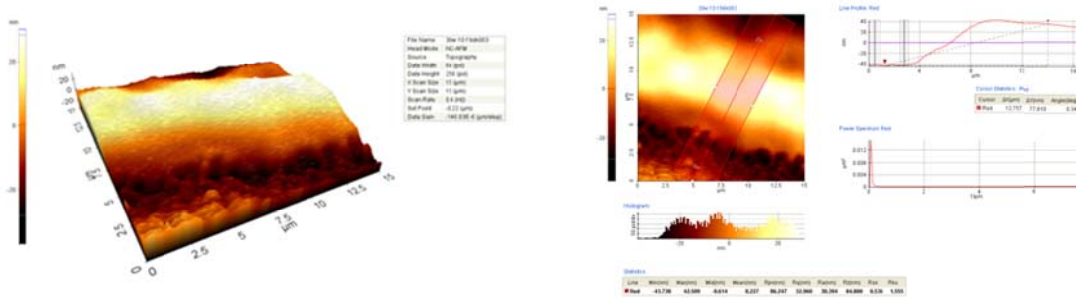
Referans (silikon) yüzeyler boşalım güçleri 30W ve 45W, monomer akışı sabit tutularak 3-6-9 dakikalar da kaplama sonrası kalınlık ölçümü yapılmıştır.



a)



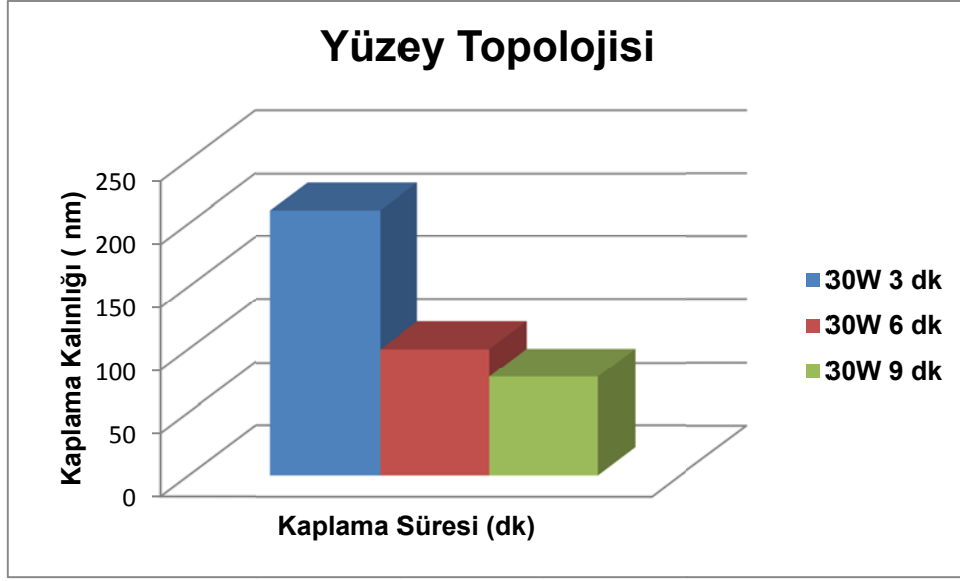
b)



c)

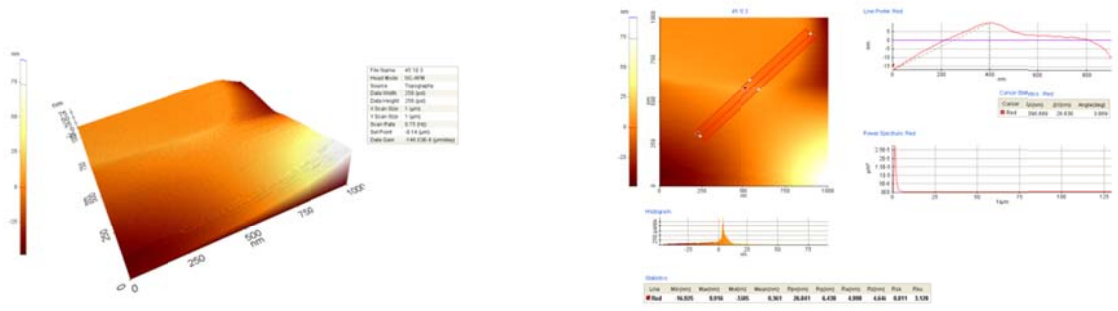
Şekil 4.9 Referans (silikon) üzerinde elde edilen sınır görüntüsü a) 30W, 3 dakika b) 30W, 6 dakika c) 30W, 9 dakika

Referans (silikon) üzerinde kaplama sonrası meydana gelen kalınlık değerleri ; 30W 10ml/dak 3 dakika kalınlık : 210.276 ± 2 nm (Şekil4.9a). 30W 10ml/dak 6 dakika kalınlık: 100.035 ± 2 nm (Şekil4.9b). 30W 10ml/dak 9 dakika kalınlık: 77.810 ± 2 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.9c).

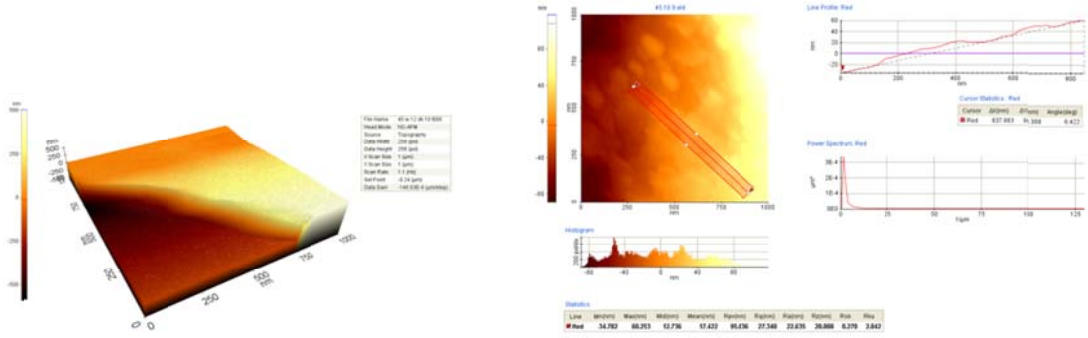


Şekil 4.10 Plazma polimerizasyon ile kaplamada sürenin yüzey topolojisine etkisi

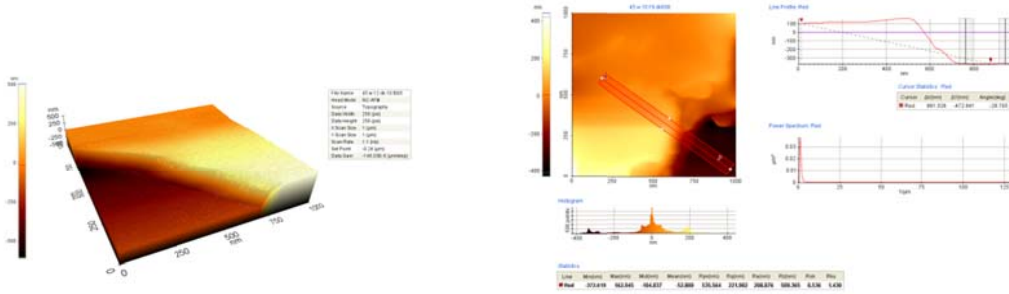
Elde edilen sonuçlara göre aynı güçte kaplama süresinin artırılmasıyla kaplama kalınlığı doğru orantılı olarak artmıştır. Kaplama süresinin artması monomerin yüzeye daha çok etkileşmesi ile kalınlık artmıştır.



d)



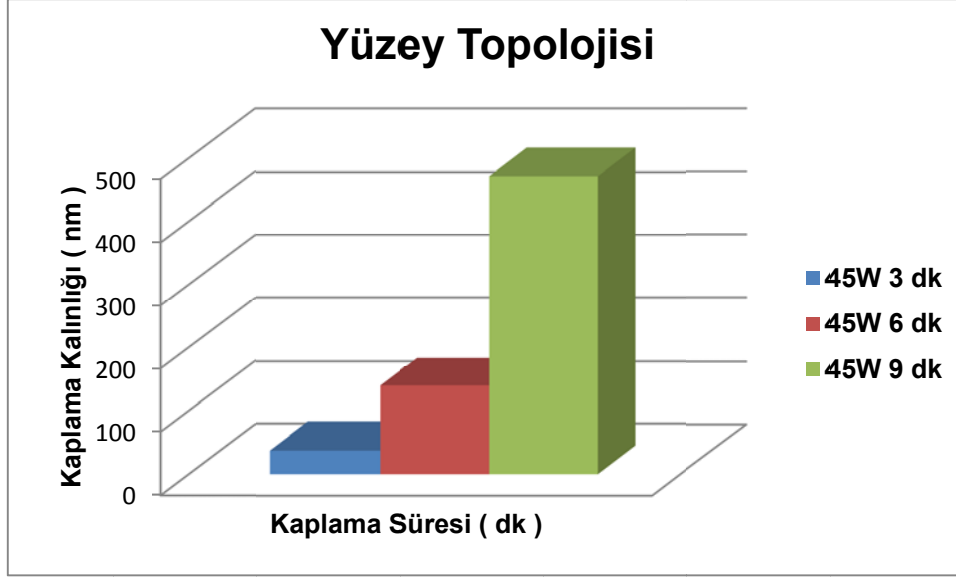
e)



f)

Şekil 4.11 Referans (silikon) üzerinde elde edilen sınır görüntüsü d) 45W, 3 dakika e) 45W, 6 dakika f) 45W,9 dakika

Referans (silikon) üzerinde kaplama sonrası meydana gelen kalınlık değerleri ; 45W, 3 dakika kalınlık : 37.053 ± 2 nm (Şekil 4.11d). 45W, 6 dakika kalınlık : 139.497 ± 2 nm (Şekil 4.11e). 45W ,9 dakika kalınlık : 472.841 ± 2 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.11f).



Şekil 4.12 Plazma polimerizasyon ile kaplamada sürenin yüzey topolojisine etkisi

Daha önceki adımda elde ettiğimiz temas açısı verilerine göre de doğrulanmış, plazma polimerizasyon yöntemi ile kaplamada süreyi attığımızda monomer yüzeyde daha uzun süre kalacağından kaplama kalınlığında doğru orantılı olarak artma meydana gelmiştir.

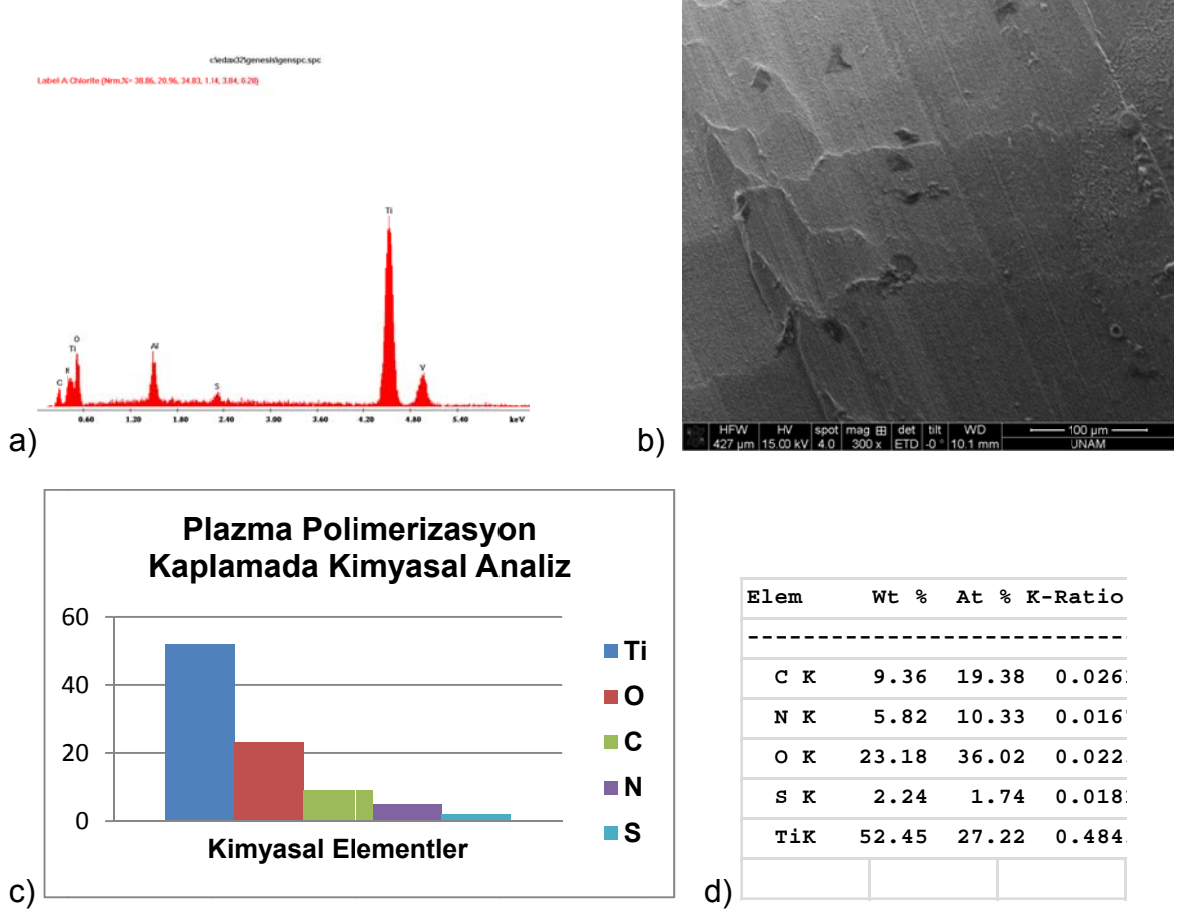
4.3 Plazma polimerizasyon yönteminde kaplanan vida setlerinde yüzey kimyasının belirlenmesi

Plazma polimerizasyon yöntemiyle kaplanan farklı set vidalara SEM-EDS ile bakılmıştır. SEM-EDS ile beraber kaplama yapılan örneklerde kullanılan monomer kimyasından kaynaklı S (kükürt) veya N (azot) değeri beklenmektedir.

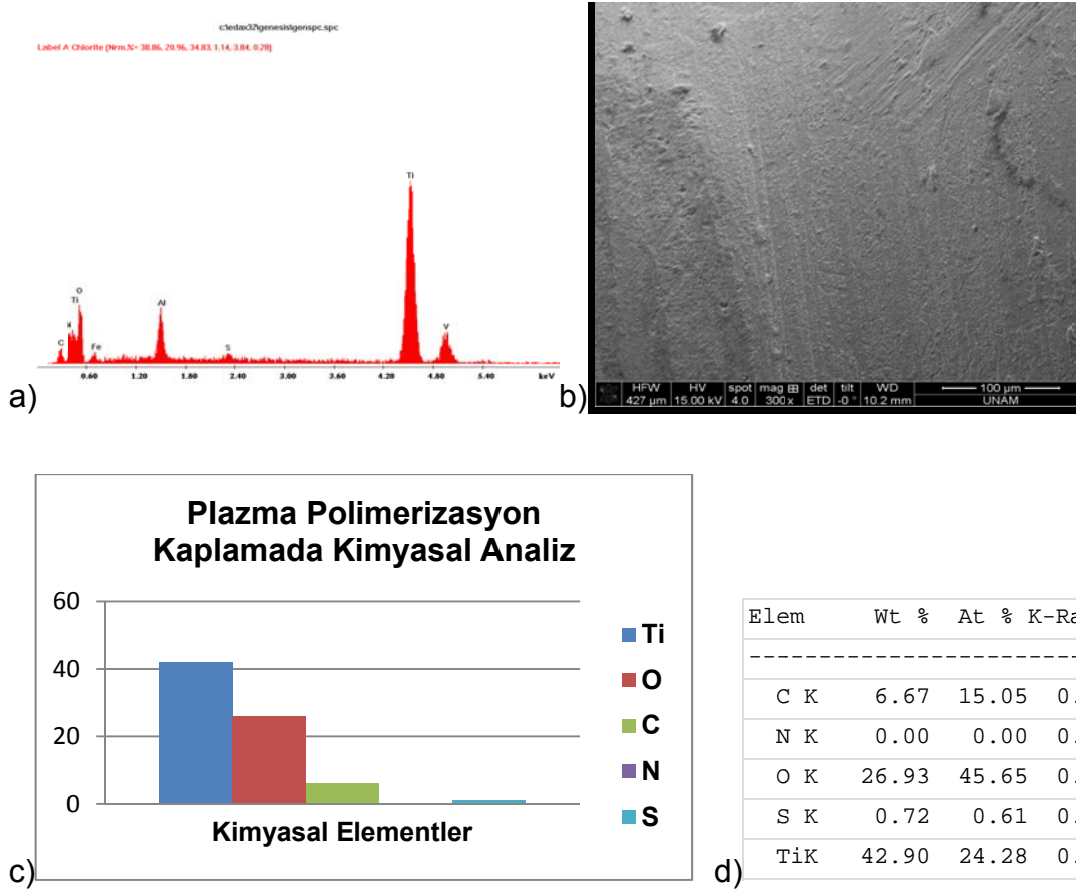
4.3.1 Plazma polimerizasyon yönteminde yüzey kimyasına gücün etkisi

Kaplanmış vidalarda kimyasal analizde gücün etkisini görmek için 30W ve 50W boşalım güçlerinde kaplanmış vidalar seçilmiştir.Öncesinde yüzey karakterizasyon

testlerini yapılmış olan vida setlerinde en kararlı 30W göstermiştir. 50W boşalım gücünde ise en yüksek kaplama gücü olduğu için tercih edilmiştir.



Şekil 4.13 30W 10 ml/dak 9 dk parametrelili vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element dağılım grafiği, d) elementel dağılım tablosu



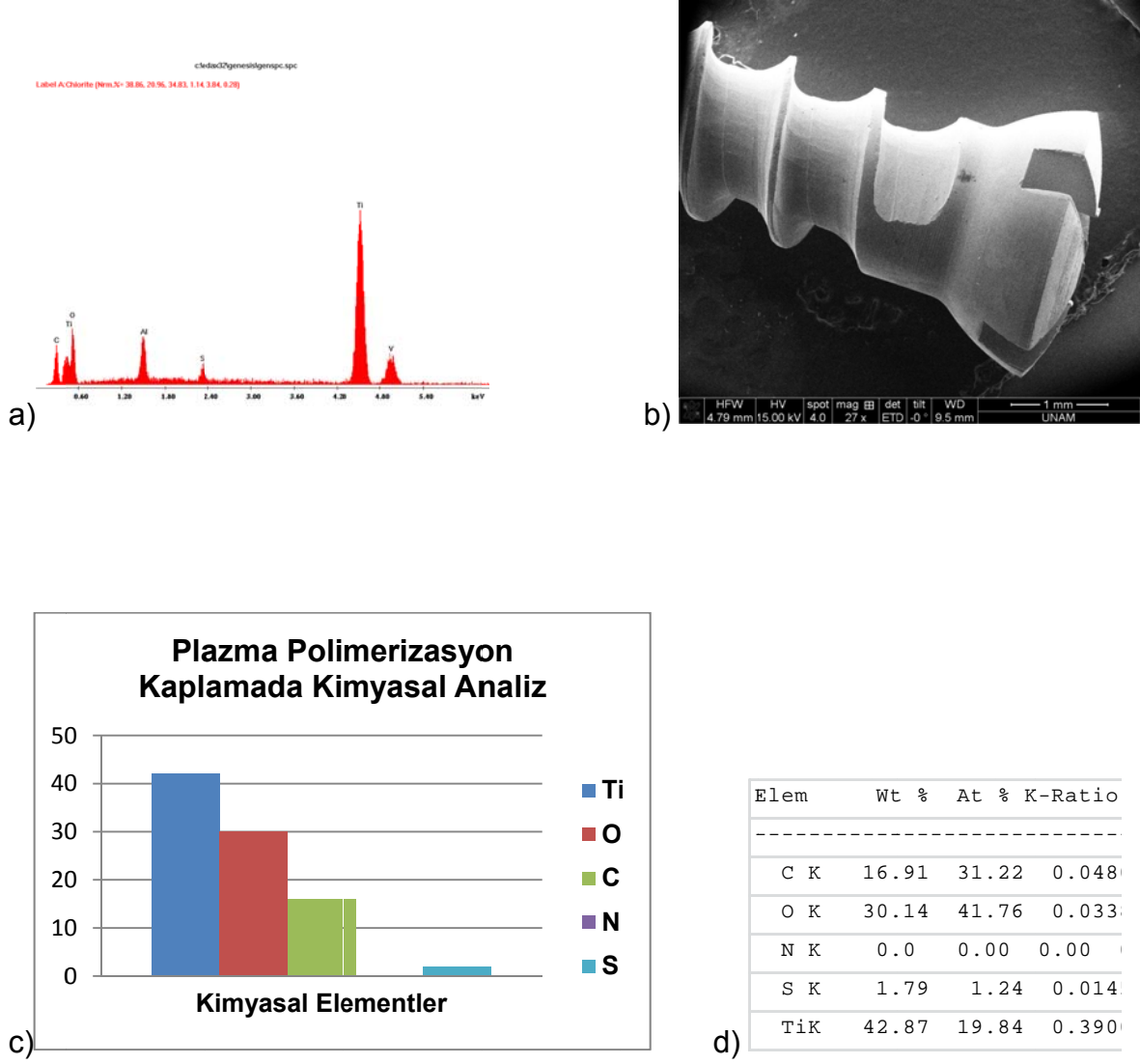
Şekil 4.14 50W 10 ml/dak 9 dak parametrelili vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element değışim grafiği, d) elementel dağılım tablosu

Elde edilen veriler doğrultusunda plazma polimerizasyon ile kaplamadan sonra yapılan kimyasal analizde dikkat edilmesi gereken husus kaplanan monomerin yapısıdır. Kullanılan monomer sistemin yapısında amino (NH₂) ve tiyol (S) bulunmaktadır. Elde edilen verilerde azot ve kükürt oranlarına bakılmalıdır. 30W boşalım gücünde kükürt (S) oranı azottan (N) daha fazladır. Böylece yüzeye hem amino hemde tiyol grupları bağlanırken boşalım gücü 50W iken yüzeyde sadece kükürt (S) görülmektedir. 50W gücünde sadece tiyol grubu bağlanmıştır.

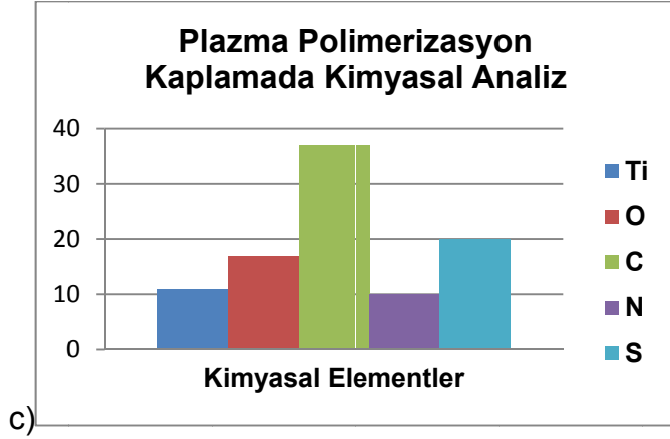
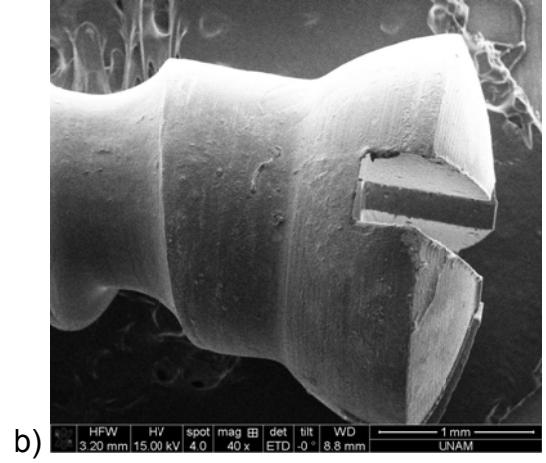
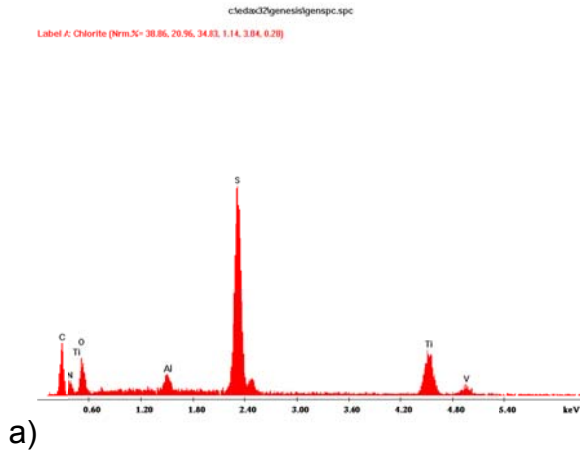
4.3.2 Plazma polimerizasyon yönteminde yüzey kimyasına sürenin etkisi

Kimyasal analizde süre parametresinin element dağılımına bakılan örnekler diğer karakterizasyon testlerinde belirgin farklı sonuçlar elde ettiğimiz 45W 3dak ve

45W, 6 dak parametresinde kaplanmış vidalar kullanılmıştır.



Şekil 4.15 45W 10 ml/dak 3 dk parametrelili vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element değışim grafiği, d) elementel dağılım tablosu



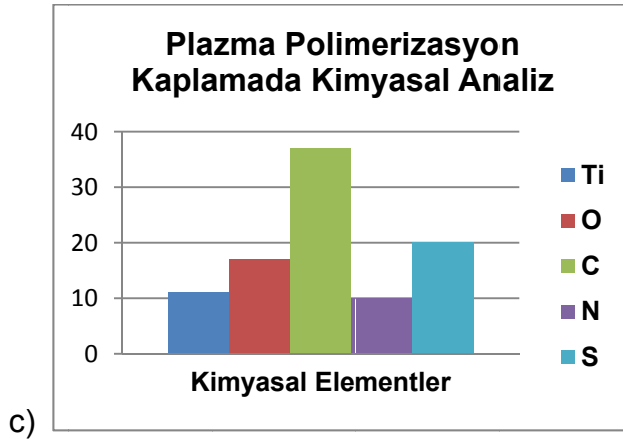
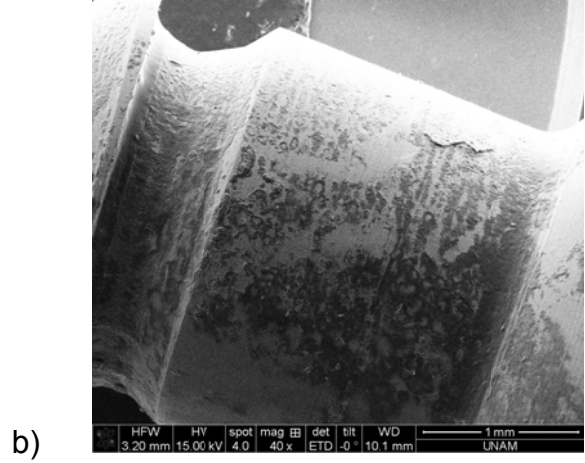
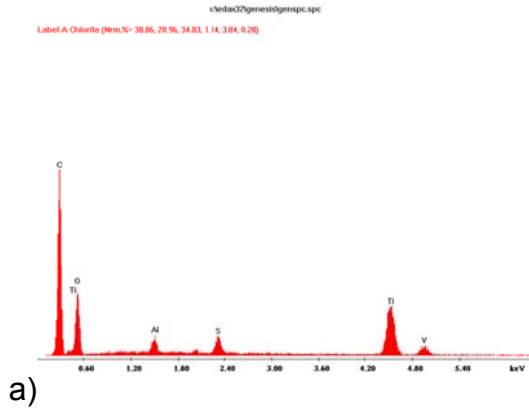
	Elem	Wt %	At %	K-Ratio
	C K	6.67	15.05	0.017
	N K	0.00	0.00	0.000
	O K	26.93	45.65	0.034
	S K	0.72	0.61	0.005
	TiK	42.90	24.28	0.400

d)

Şekil 4.16 45W 10 ml/dak 6 dak parametrelili vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) Element değışim grafiği, d) elementel dağılım tablosu

4.3.3 Plazma polimerizasyon yönteminde yüzey kimyasına monomer akışının etkisi

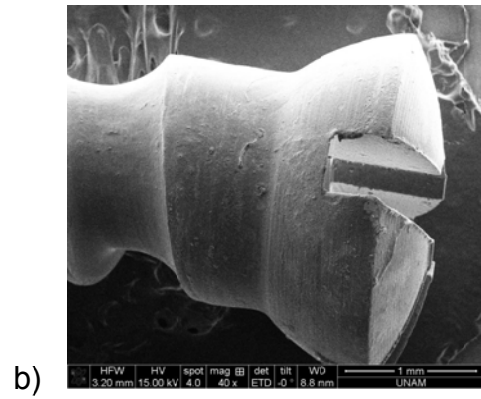
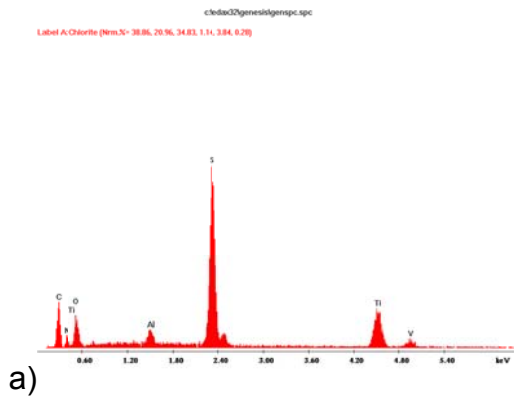
Plazma polimerizasyon ile kaplanan iki farklı monomer akışına sahip vida setinde kimyasal analize bakılmıştır. Monomer akışına bakılırken boşalım gücü 45W temas açısındaki belirgin farklılık nedeniyle tercih edilmiştir.

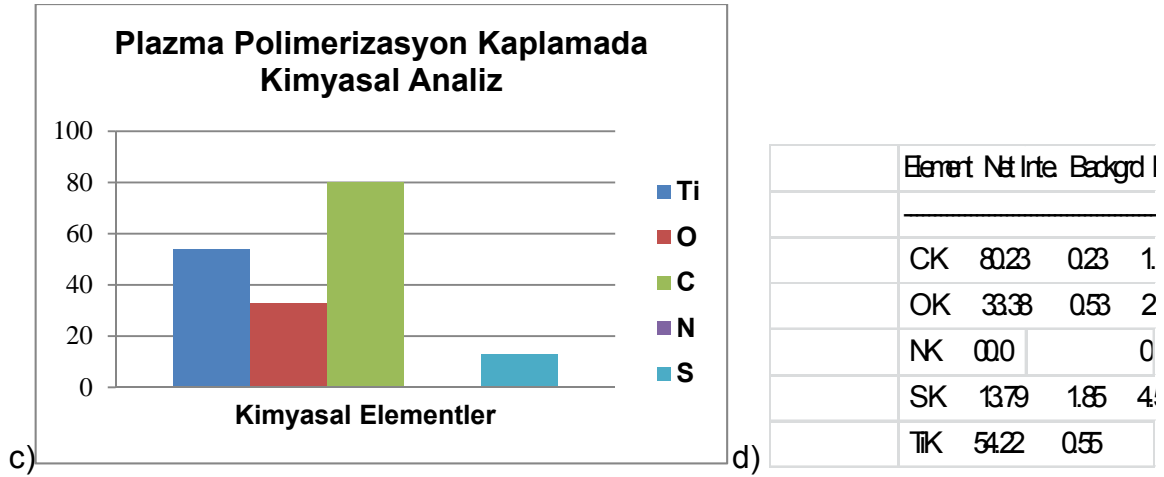


	Elem	Wt %	At %	K-Ratio
	C K	6.67	15.05	0.017
	N K	0.00	0.00	0.000
	O K	26.93	45.65	0.034
	S K	0.72	0.61	0.005
	TiK	42.90	24.28	0.400

d)

Şekil 4.17 45W,10 ml/dak, 9 dak parametrelili vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element değışim grafiği, d) elementel dağılım tablosu





Şekil 4.18 45W, 20 ml/dak, 9 dak parametrelili vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element değişim grafiği, d) elementel dağılım tablosu

4.4 Plazma Polimerizasyon ile Kaplanan Vida Setlerinde Yüzey İletkenlik Değişiminin Belirlenmesi

Plazma polimerizasyon ile kaplama yapılan vidalarda kullanılan monomer iletken bir madde olan titanyum vidada nasıl bir etki yarattığını gözlemlemek amacıyla iletkenliği ölçüldü. Elde edilen veriler Şekil 4.19 de sunulmuştur.

V	I	R	
1.0000 V	+ 3.234847E	0.309136	SAF TİTANYUM
1.0000 V	+2.049046E	0.488031	45 W 20 f 12 dak
1.0000 V	+1.050439E	0.951982	50 W 10 f 9 dak
1.0000 V	+2.760237E	0.362287	45 w 20 f 3 dak

Şekil 4.19 Kaplı titanyum vidalarda direnç (R) değişimleri

Titanyum vida kaplama sonrası 1Volt sabit elektrik verildi ve yüzeylerde cihaz probuna uygulanan direnç artmıştır. Sonuçlara göre normalde iletken olan titanyum vida plazma polimerizasyon yöntemi ile kaplama sonrasında yalıtkanlığa doğru eğilim göstermiştir.

4.5 Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile Kaplamada Kimyasal Aktivasyonun Etkisi

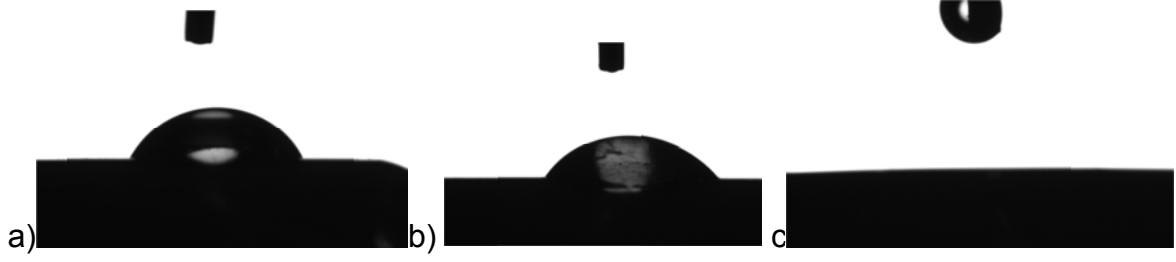
4.5.1 Kimyasal aktivasyonu yapılan vida setlerinin temas açısı ölçümleri

Kimyasal aktivasyonun temas açısı ölçümlerindeki değişimin değerlendirilmesi için kaplanmamış, kaplanmış ve aktive vidalardaki temas açıları kıyaslandı.



Şekil 4.20 a) İşlem görmemiş vida b)30W,10ml/dak,9dak parametrede kaplanan vida c) 30W,10ml/dak, 9 dakika aktive vida

İşlem görmemiş titanyum vida yüzey temas açısı $64.2^{\circ} \pm 2$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.20a). Plazma polimerizasyon yöntemiyle kaplanan vida yüzey temas açısı $58.7^{\circ} \pm 2$ 'ye düşmüştür (Şekil4.20b). Kimyasal aktivasyonu yapılan vidaların yüzey temas açıları $1.5^{\circ} \pm 2$ 'ye düşerek süper hidrofilik olmuştur (Şekil 4.20c).



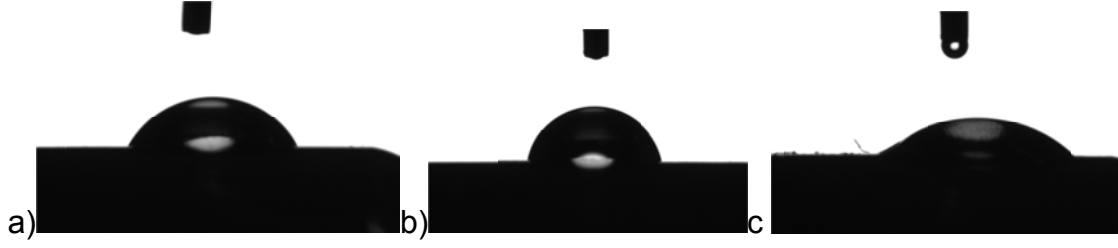
Şekil 4.21 a) İşlem görmemiş vida b) 45W,10ml/dak, 9 dak parametrede kaplanan vida c) 45W,10ml/dak, 9 dak aktive vida

İşlem görmemiş titanyum vida yüzey temas açısı $64.2^{\circ} \pm 2$ ölçülmüştür (Şekil4.21a). 45W 10ml/dak 9 dakika plazma polimerizasyonla kaplanan vida yüzey temas açısı $20.9^{\circ} \pm 2$ 'a düşmüştür(Şekil 4.21b). 45W 10ml/dak 9 dakika plazma polimerizasyonla kaplama ve kimyasal karakterizasyon yapılan titanyum vida yüzey temas açısı $1.0^{\circ} \pm 2$ olarak ve süper hidrofilik olmuştur (Şekil 4.21c).



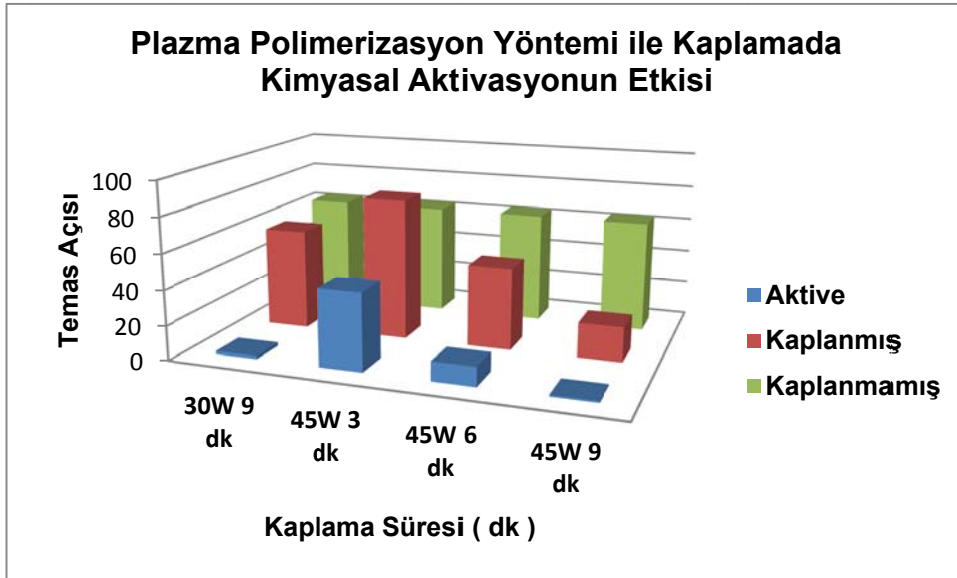
Şekil 4.22 a) İşlem görmemiş vida, b) 45W, 10ml/dak, 6 dakikada kaplanan vida c) 45W, 10ml/dak, 6 dak aktive edilmiş vida

İşlem görmemiş titanyum vida yüzey temas açısı $64.2^{\circ} \pm 2$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.22a).45W 10ml/dak 6 dakika kaplama yapılan örnek yüzey temas açısı $47^{\circ} \pm 2$ 'ye düşmüştür (Şekil 4.22b).45W 10ml/dak 6 dakikadan sonra kimyasal karakterizasyon yapılan örneklerde yüzey temas açısı $10.8^{\circ} \pm 2$ 'e düşmüştür (Şekil 4.22c).



Şekil 4.23 a) işlem görmemiş vida b) 45W,10ml/dak,9 dak kaplanmış vida c) 45W 10ml/dak, 3 dakika aktive vida

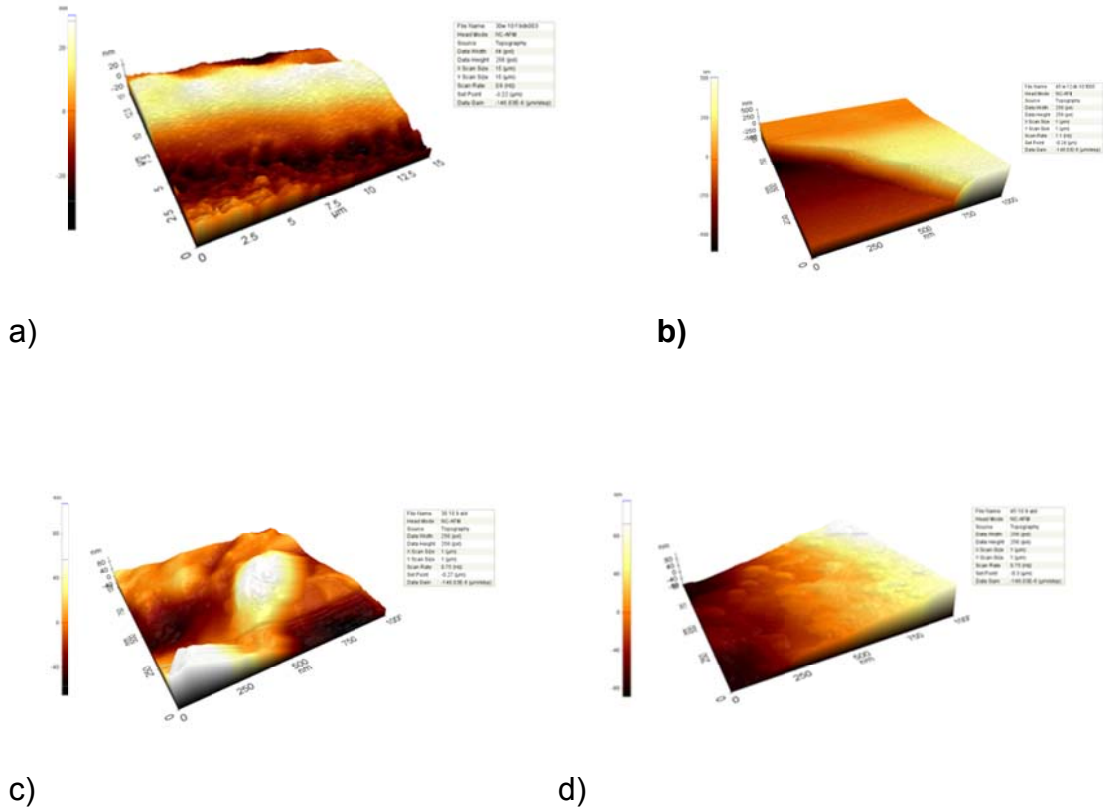
İşlem görmemiş titanyum vida yüzey temas açısı $64.2^{\circ} \pm 2$ (Şekil 4.23a).45W 10ml/dak 3 dakika parametresinde kaplama yapılan vida yüzey temas açısı $81.0^{\circ} \pm 2$ (Şekil 4.23b).45 W 10ml/dak 3 dakika kaplama ve kimyasal karakterizasyon sonrası yüzey temas açısı $43.8^{\circ} \pm 2$ 'ye düşmüştür (Şekil 4.23c).Aşağıdaki Şekil 4.24'de kimyasal aktivasyon sonrası yüzey temas açılarındaki değişim özetlenmiştir.



Şekil 4.24 Kimyasal aktivasyona göre yüzey temas açıları

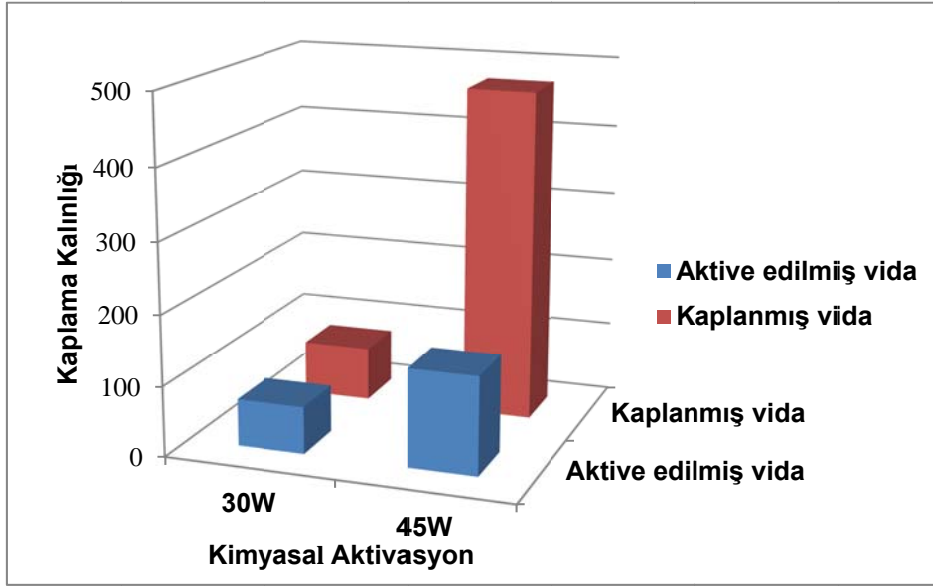
4.5.2 Kimyasal aktivasyonu yapılan vida setlerinin kaplama kalınlığı ölçümleri

Kimyasal aktivasyon sonrası kaplama kalınlığı ölçümleri için seçilen örnekler daha önceki topoloji ölçümlerinde birbirleri arasında belirgin fark gösteren iki farklı güçte örnekler seçilmiştir. Seçilen örnekler aktive edilmiş ve kaplama kalınlığına bakılmıştır.



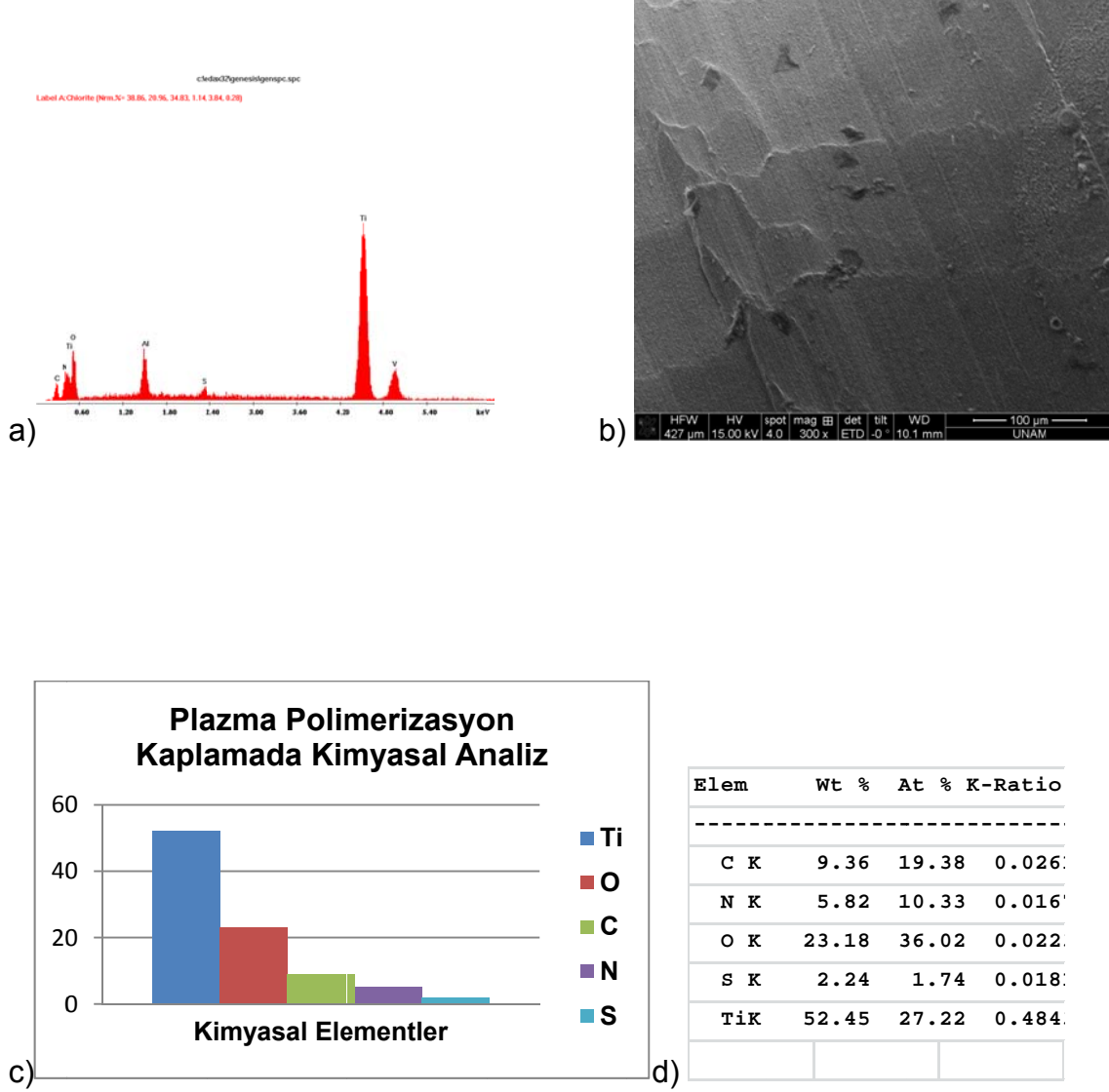
Şekil 4.25 Referans (silikon) yüzeyler a) 30W, 10ml/dak, 9dak b) 45W, 10ml/dk 9 dak c) 30W,10ml/dak, 9 dak (aktive) d) 45W 10 f 9 dak (aktive)

Kaplama sonrası ve kimyasal aktivasyon yapılan örneklerde kalınlık değerleri 30W 10ml/dak 9 dakika kalınlık: $77.810 \pm 2 \text{ nm}$ (Şekil 4.25a). 45W 10ml/dak 9 dakika kalınlık: $472.841 \pm 2 \text{ nm}$ (Şekil 4.25b). 30W 10ml/dak 9 dakika (aktive) kalınlık : 67.540 nm (Şekil 4.25c). 45W 10ml/dak 9 dakika (aktive) kalınlık : $139.497 \pm 2 \text{ nm}$ (Şekil 4.25d). Kimyasal aktivasyon sonrasında yüzey topolojisindeki değişim aşağıdaki Şekil 4.26'de özetlenmiştir.

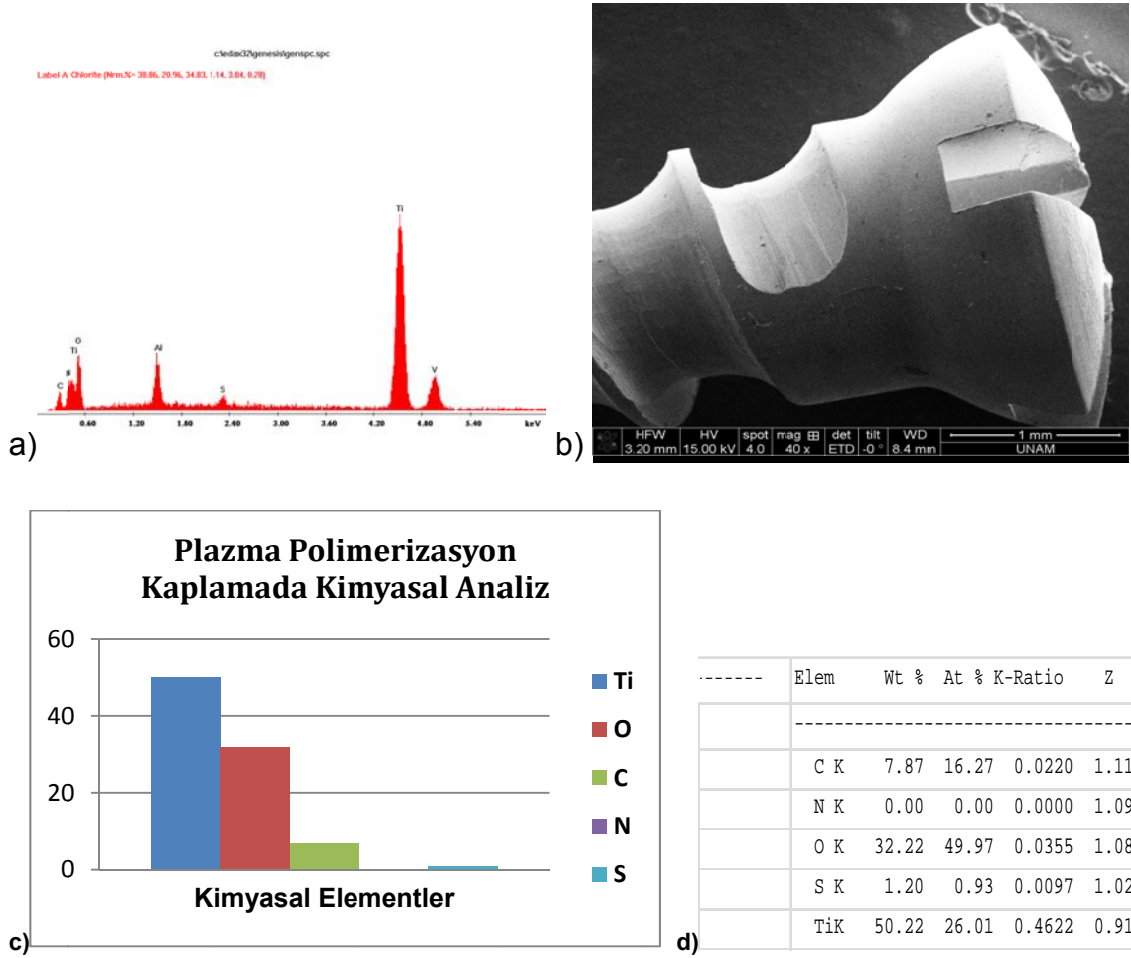


Şekil 4.26 Kimyasal aktivasyon sonrası yüzey topolojisi

4.5.3 Kimyasal aktivasyonu yapılan vida setlerinin yüzey kimyasının belirlenmesi



Şekil 4.27 30W 10 ml/dak 9 dk parametrelili vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element değişim grafiği, d) elementel dağılım tablosu



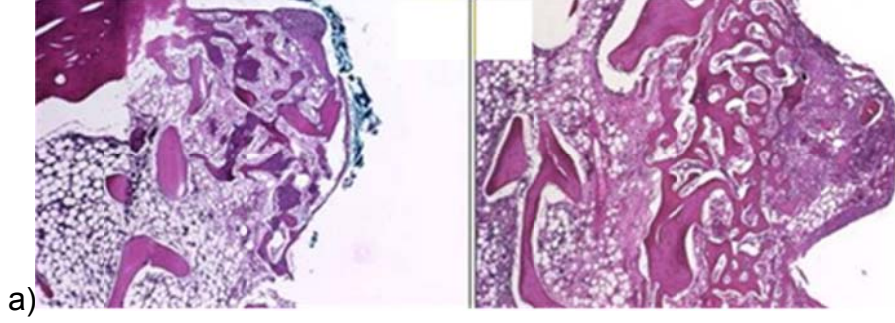
Şekil 4.28 30W 10 ml/dak 9 dk aktive edilmiş vida, a) elementel analiz, b) SEM görüntüsü, c) element değişim grafiği, d) elementel dağılım tablosu

Sonuçlarda 30W güç değerinde kaplanmış vidaların kimyasal analizinde N değeri S değerinden daha yüksek çıkmıştır. Aynı parametrede kimyasal aktivasyonu yapılmış vidaların kimyasal analizinde ise N değeri sıfırlanırken yüzeyde bir miktar S kalmıştır.

4.6 Rekombinant Kemik Morfogenetik Protein Tutuklanması ve Histolojik Testler

Canlı içine implante edilen örnekler metot kısmında değinildiği gibi histolojik boyama testlerine tabi tutulmuştur, boyama sonrasında parafine gömme ve kesit

alma işlemleri gerçekleştirilen örneklerde inceleme yapılmıştır. Işık mikroskopunda bakılan örneklerde rhBMP-2 tutuklanması sonrasında implante edilen vidaların çıkarıldığı bölgelerde osteoblastlar (kemik hücresi) gözlenmiştir. (Şekil 4.29)



Şekil 4.29 a) Titanyum vida b) Yüzeyi aktif titanyum vida kullanımı sonrası hücre gelişimi.

Şekil 4.29 a) kaplanmamış titanyum vidanın çıkarıldığı bölgelerde fibröz dokuda tahribatında herhangi bir değişim olmadığı gözlenirken Şekil 4.29b'de osteoporozdan kaynaklı tahrip olan bölgelerde yeni hücrelerin oluştuğu gözlenmiştir, özellikle daha fazla koyu bölgelerin görülmesi osteoblastik hücrenin daha fazla geliştiğini kanıtlamıştır.

Çalışmalar sonucunda plazma polimerizasyon yöntemiyle kaplanan vidalarda yüzey karakterizasyon verileri ele alınacak olursa; çalışmalarda ilk parametre boşalım gücünün kaplama üzerinde nasıl bir etki yarattığı görmek amacıyla cihazın plazma ışması verdiği en düşük güç (25W) ve yine cihazın optimum çalıştığı en yüksek güçle birlikte 4 farklı güç değeri çalışılmıştır (25W-30W-45W-50W). Kaplanmış vidalarda yapılan ilk yüzey karakterizasyon testi temas açısı ölçümü sonuçlarında plazma polimerizasyon cihazının boşalım gücünü artırdığımızda temas açısı değerlerinde logaritmik bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün sebebi ise gücün artmasıyla kullanılan monomerin elementlerine daha çok ayrılarak monomerin içerisinde bulunana amin (NH₂) gruplarının yüzeye tutunmasıdır, böylece yüzey daha hidrofilik olmuştur ve buna bağlı olarak temas açısı değeri düşmüştür. Sonrasında aynı güç değerlerinde kaplanmış vidalarda

kaplama kalınlıkları analizi yapılmıştır. Boşalım gücünün artması veya azalmasıyla kaplama kalınlığındaki değişim ise şöyledir; Güç değeri arttıkça kaplama kalınlığının nanomertebede arttığı gözlenmiştir, bunun sebebi ise boşalım gücünün artmasına bağlı monomerin daha çok ayrışarak yüzeye daha çok etkileşmesidir. Boşalım gücüyle yapılan karakterizasyonların devamında kimyasal karakterizasyon için yüzey kimyası incelenmiştir. Sonuçlarda ele alınan 2 farklı güç parametresinde (30W-50W) kullanılan monomerin (sisteamin kimyasal yapısından kaynaklı yüzeyde N (azot) ve S (kükürt) görülme değerleri doğrultusunda 30W gücünde yüzeyde hem N hemde S bağlanmışken, 50W gücünde yüzeyde yalnız S değeri saptanmıştır, buradaki farklılığın sebebi plazma ortamının kaotik olmasından kaynaklı gücün artmasıyla monomerde meydana getirdiği kovalent bağlarda farklılıklar meydana gelmiş ve böylece yüzeye bağlanmada farklılıklar olabileceği öngörülmektedir. Devamında kaplanmış farklı bir set vidaya kimyasal aktivasyon yapıldıktan sonra iki farklı güç (30W- 45W) değerinde kıyaslamalar yapılmıştır. Aktivasyonu yapılmış vidalardada aynı şekilde sırasıyla temas açısı, kaplama kalınlığı ve yüzey kimyasına bakılmıştır. Sonuçlarda aktivasyonu yapılan vidalarda temas açısı belirgin olarak düşmekte iki parametrede hemen hemen aynı oranda hidrofilik olmaktadır. Kaplama kalınlığı ölçümlerinde aktivasyonu yapılmış vidalardan 30W gücünde kalınlıkta çok az farklılık gösterirken, 45W gücündeki vidalarda kalınlık birden azalmaktadır. Yüzey kimyası sonuçlarında ise 30W gücündeki örneklerde aktivasyon sonrası S ve N değerlerinde ritmik bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında güç parametrelerinden en kararlı davranan vidalar 30W boşalım gücüyle kaplanmış vidalardır.

Çalışmada ikinci optimize edilmek istenen süre parametresidir. Çalışmalarda 4 farklı süre (3-6-9-12 dak) kullanılmıştır. Plazma polimerizasyon yöntemiyle kaplanmış farklı bir set vidada yüzey karakterizasyon testleri yapılmıştır. İlk olarak kaplanmış vidalarda temas açısı ölçümüne bakılmıştır. Sabit 45W gücünde ve 10ml/dak monomer akışında kaplanmış örneklerde temas açısı değişimleri 3 dakika sürede kaplanmış vida temas açısı değeri işlem görmemiş vidadan bile daha yüksek çıkmıştır, yüzey hidrofobik olmuştur. 6 dakika parametrede ise yüzey temas açısı düşerek yüzey hidrofiliğe kaymıştır, 9 ve 12 dakikalarda beklenildiği

gibi temas açısı ritmik olarak düşmüştür. Kaplama süresi arttıkça monomerin yüzeyle daha çok etkileşmesinden kaynaklı temas açıları düşmüştür. Fakat 3 dakika parametresinde görülen hidrofobikliğe kayma eğilimi öngörülen bir sonuç olmamıştır. Farklı süre parametrelerinde yapılan kaplama kalınlığı ölçümlerinde ise 3, 6 ve 9 dakikalarda bakılan ölçümlerde kaplama süresinin artmasına bağlı kalınlığın arttığı gözlenmiştir. Yüzey kimyasında ise temas açısı ölçümlerinde belirgin farklılık gösteren 45W 3 ve 6 dakikadaki örnekler incelenmiştir. Sonuçlarda her iki süre parametresinde de N (azot) rastlanmamıştır, 3 dakika parametrede olan vidada diğer 6 dakika parametresine göre daha fazla görülmüştür, 3 dakika süreli örneklerde S değerinin fazla olması bu örnekleri hidrofobik yapmıştır. Tüm bu sonuçlar ele alındığında aslında 9 dakika parametredeki örneklerde temas açıları ve kaplama kalınlık değişimleri kararlılık göstermektedir. Çalışmada en uygun süre parametresi 9 dakikadır.

Son olarak monomer akış hızının optimizasyonu için vidalar plazma polimerizasyon yöntemiyle kaplanmış ve yüzey karakterizasyon testleri yapılmıştır. Monomer akışı için kullanılan 4 değer 5-10-20-30 ml/dak dır. Yapılmış olan testler sonucunda yüzey temas açısı değerleri parabol bir şekilde değişmektedir, yani monomer akış hızı arttıkça temas açısı değerinde artma meydana gelmiştir. En düşük temas açısı 5 ml/dak akış parametresindeki vidalarda gözlenmiştir. Bunun sebebi monomer akışı ne kadar yavaş olursa monomer yüzeyde daha çok kalmasından kaynaklı yüzeyi hidrofilikleşmiştir. Yüzey kimyası incelen 10ml/dak ve 20ml/dak parametrelili örneklerde 20ml/dak olan örneklerin daha fazla S (kükürt) içerdiği gözlenmiştir. Her ne kadar kaplama kalınlığına monomer akışının etkisi bakılamamış olsada güç ve süre parametreleri optimizasyonunda monomer akış hızı 10ml/dak kullanılmış ve sonuçlarda herhangi bir belirgin farklılık gözlenmemiştir. Monomer akış hızı 10ml/dak parametresinde daha kararlı davranmaktadır.

Tüm bu veriler sonucunda elde edilen parametre güç: 30W süre: 9 dak ve monomer akış hızı: 10 ml/dak dır. Bu parametrede kaplanmış örneklere aktivasyon sonrası rhBMP-2 tutuklanması yapılmıştır. Elde edilen vidalar canlı içi bekleme sonrasında vida-doku kompleksine histolojik testler yapılmıştır. Elde edilen

histolojik kesitlerde (Şekil 4.29) fibröz doku geliştiği ispatlanmıştır. Vida üzerine tutuklanan protein rhBMP-2 hücre bölünmesini başlatma ve ilerletme özelliğine sahip olduğundan vidaların çıkartıldığı kısımlarda öncesinde kemik erimesi gözlenen bölge olmasına rağmen kemik dokusu oluşmuştur.

Çalışmalarda elde ettiğimiz optimizasyon sonrasında tutuklama gerçekteştirdiğimiz proteinin yapısına herhangi bir zarar vermediği için istenilen yüzeyi aktif vida hazırlandığı ispatlanmıştır.

5.KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] Lee, H.B., Khang, G. And Lee, J.H., 2000. Polymeric Biomaterials, The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition. CRC Press LLC, 2000
- [2] Williams, D.F., 1991. Materials for surgical implants. *Met. Mater.*:24-29, 1991. Hench, L.L., Wilson, J., 1984. Surface active biomaterials. *Science*; 226,1984
- [3] Park, J.B., "Biomaterials An Introduction " , Plenum Press, N.Y. (1979)
- [4] Wood, D.A "Biodegradable Drug Delivery System", *Int. J. Pharm.*7.1-18,1980
- [5] Salam,A.(1968).Weak and electromagnetic interactions. In: Svartholm (Ed.)
- [6] M.Skotak, A.P. Leonov, G. Larsen, S. Noriega, A. Subramanian, Biocompatible and biodegradable ultrafine fibrillar scaffold materials for tissue engineering by facile grafting of L-lactide onto chitosan, *Biomacromolecules* 9 (2008)
- [7] Maruoka,A.,Saito,M.,Sakai,H.,Sugano,N.,Hino,K., "Safety Assessment of Hydroxyapatite Composite Resin, A New Bioactive Bone Cement", *Biocer Ceramics in Medicine, Turku,Finland July*,.284- 291 (1994)
- [8] Ashar,B.V.,"Characterization and Testing of Biomaterials and Medical Devices", *MD&DI January*, s.57-63 (1987)
- [9] J.Sun, Z. Dai, Y. Zhao, G.Q. Chen, In vitro effect of oligo-hydroxyalkanoates on the growth of mouse fibroblast cell line L929, *Biomaterials* 28 (2007)
- [10] Ziats,N.P.,Miller, K.M., Anderson, J.M., "In vitro and In vivo Interaction of Cell with Biomaterials" *Biomaterials*, 9 , s.5-13, (1988)
- [11] Martinez ME, del Campo MT, Medina S, Sanchez M, Sanchez-Cabezudo MJ, Esbrit P, et al. Influence of skeletal site of origin and donor age on osteocalcin Tissue Int 1999;64:280–6.
- [12] Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 1992;7
- [13] Rodriguez JP, Garat S, Gajardo H, Pino AM, Seitz G. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *J Cell Biochem* 1999;75:414–23.
- [14] Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ, Gruber H, McDougall S, Hahn TJ. Age related changes in osteogenic stem cells in mice. *J Bone Miner Res*

1996;11:568– 77

- [15] Robinson JA, Harris SA, Riggs BL, Spelsberg TC. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. 1997;138:2919– 27.
- [16] Picetti GD III, Ertl JP, Bueff HU: Endoscopic instrumentation, correction, and fusion of idiopathic scoliosis. Spine 1 1:190-197, 2001
- [17] Zdeblick TA:A prospective, randomized study of lumbar fusion. Spine 18:983
- [18] Herkowitz HN, Sidhu K: Lumbar spine fusion in the treatment of degenerative recommendations. 3:123-135, 1995
- [19] Bessho K, Kusumoto K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Tani Y, Iizuka T. Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. 1999.
- [20] Foley KT, Gupta SK: Percutaneous pedicle screw spine: preliminary clinical Neurosurgery 97:7-12,2002
- [21] Boyne PJ, Nath R, Nakamura A. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate defects. Br J Oral 1998; 36: 84-90.
- [22] Boyne PJ. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. 2001; 83: 146-50.
- [23] Cochran DL, Schenk R, Buser D, Wozney JM, Jones AA.Recombinant Human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around Dental implants. J Periodontol 1999; 70: 139-150.
- [24] Fleet JC, Cashman K, Cox K, Rosen V. The effects of aging on the bone inductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2.1996.
- [25] Stenderup K, Justesen J, Eriksen EF, Rattan SI, Kassem M. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging . J Bone Miner Res 2001;16:1120–9.
- [26] Lane JM, Johnson CE, Khan SN, et al Minimally invasive options for the treatment of osteoporotic vertebral compression fractures. 33:431-438, 2002.
- [27] Lin Y., Yasuda H., “Effect of Plasma Polymer Deposition Methods on Copper Corrosion Protection,” J. Appl. Polym. Sci., 60, 543, (1996).
- [28] Arefi F., Andre V., Motjtazer-Rahmati P., Amouroux J., Plasma Polymerization and Surface Treatment of Polymers, Pure & Appl. (1992).

- [29] Hinman PV, Bell AT, Shen M., Composite reverse evaluation of membrane performance for the treatment of washwater and its components, J.Appl.Polym.Sci,23, 12, 3651-3656, (1979).
- [30] Yasuda, H., Plasma Polymerization, Academic Press, New York, (1985).
- [31] Hattori S, Tamano J, Yasuda M, Ieda M, Morita S, Yoneda K, Ishibashi S., Vacuum lithography using plasma polymerization and plasma development, Thin Solid Films, 83, 189-194, (1981).
- [32] Biederman, H, Osada, H, Plasma Chemistry of Polymers, Advance polymer Science, Editor: Olive G, Olive S, Springer, Berlin, 95, (1989).
- [33] Inagaki N., Yasuda H, Adhesion Of Glow-Discharge Polymers To Metals And Polymers, J.Appl. Polym. Sci., 26, 3333-3341, (1981).
- [34] Amouroux J., Arefi F., Spartacus P., Mournet S., Goldman M., Evolution Of The Wettability And The Adhesion Of Polymeric Materials Treated By A Nonequilibrium Plasma, Amer Chemical Soc, 193, 80-PMSE, (1987).
- [35] Klemberg J.E., Martinu L., Wertheimer M.R., NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada) industrial research chair Plasmas and Polymers, 2,53-64, (1996).
- [36] Çökeliler D, Enhancement of Polycarbonate Membrane Permeability Due to Plasma Polymerization Precursors, Applied Surface Science, (2013)
- [37] Çökeliler D, Göktaş H, Tosun PD, Mutlu S, Infection Free Titanium Alloys By Stable Thiol Based Nanocoating, Journal of Nanoscience 1-7, (2009)
- [38] Çökeliler D, Erkut S, Akdogan E, Shard A G, Özden N, Imirzalıoğlu P, Mutlu M, A Novel Approach for Improvement of Interfacial Binding of Ceramics for Dental Materials Part I: Chemical Treatment and Oxygen Plasma Etching, Journal of Applied Polymer Science, 110, 5, 2656-2664 (2008)
- [39] Moshonov A., Avni Y. J., The use of acetylene glow-discharge for Improving adhesive bonding of polymeric films, Appl. Polym.Sci., 25, 771-781, (1980).
- [40] Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, et al The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans. Preliminary Report Spine 25: 376-381, (2000)

- [41] Çökeliler D, Küçükturhan A, Özçil B, Caner H, Göktaş H, Özsar A.Özgür, Titanyum İçerikli Malzeme Biyouyumululuğunun Arttırılmasında Yeni Bir Yaklaşım; Plazma Polimerizasyon tekniği ile Aktif Protein Tutuklanması, 13. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, (2008).
- [42] Liu X., Chu P.K., Ding C., "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications", *Materials Science and Engineering*, 47, 3-4, 49-121, (2004).
- [43] Sudağdan, M., *Biyomalzemelerin Biyolojik Sistemlerde Test Edilmesi*, Yüksek lisans tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 2001-2002
- [44] Ürkmen K., Atabak M., Özdağ M. ve Oral A., *Kuvars Kristal Sensörlü Atomik Kuvvet Mikroskobu*, 13. Yoğun Madde Fiziği Ankara Toplantısı, ODTÜ Kültür Kongre Merkezi Ankara, 12 (2006).
- [45] I.C. Stefan, D. Mandler, D.A. Scherson, *In situ FTIR-ATR studies of functionalized self-assembled bilayer interactions with metal ions in aqueous solutions*, *Langmuir* 18 (18) (2002) .
- [46] Cornwall, J.M.,&Norton,R.E.(1973).Spontaneous symmetry breaking without scalar mesons. *Physical ReviewD*, 8, 3338–3346.
- [47] Anderson, J.M. "In vivo Biocompatibility of Implantable Delivery Systems and Biomaterials"*Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40 (1), s.1-8 (1994)
- [48] Yianni,J.P., "Making PVC More Biocompatible", *Medical Devices Technology*, September,.20-29 (1995)
- [49] Lundberg F., Schliamser S., Ljungh A., *Vitronectin may mediate Staphylococcal adhesion to polymer surfaces in perfusing human*, 46, 285-296, 1997
- [50] Doyle A, Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. John Wiley&Sons. 1998; 57-61:62-64
- [51] Freshney RI. *Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Techniques*. Wiley-Liss. New York. 2008; 46-49

