

Atmosferik Soğuk Plazma ile Modifiye Edilen Titanyum Yüzeylerde Osteojenik Hücre Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Murat ULU^{1*}, Mehmet Burak KAPILI¹, Utku Kürşat ERCAN², Fatma İBİŞ², Işıl AYDEMİR³, Nazan KESKİN⁴, Mehmet İbrahim TUĞLU³

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Bölümü, İzmir

²İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomedikal Teknolojileri Bölümü, İzmir

³Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Bölümü, Manisa

⁴Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Bölümü, Denizli

(Alınış / Received: 27.01.2017, Kabul / Accepted: 21.06.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 14.09.2017)

Anahtar Kelimeler

Atmosferik soğuk plazma,
Dental implant,
Hücre adezyonu,
Yüzey hidrofilitesi

Özet: Diş eksikliklerinin tedavisinde dental implant uygulamaları günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak dental implantların kemik ile entegrasyonu (osseointegrasyon) için beklenmesi gereken sürenin uzun olması bu tedavi yönteminin en önemli dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır. Literatürde, osseointegrasyon için beklenen sürenin kısaltılması amacıyla yapılmış çok sayıda çalışma karşımıza çıkmaktadır. Osseointegrasyon süresinin kısaltılması amacıyla yüzey hidrofilitesini arttırarak hücre tutunma oranını yükselten Atmosferik Soğuk Plazma (ASP) uygulaması titanyum implantlar için uygulanmakta ve olumlu sonuçlar alındığı iddia edilmektedir. Bu çalışmada yüzey temas açısını düşürmek ve osteoblast hücrelerin yüzeye tutulumunu artırmak için titanyum disklerin yüzeyine ASP uygulandı. Farklı zaman aralıklarında uygulanan ASP öncesinde ve sonrasında temas açısı ölçümleri yapıldı. ASP uygulamasının osteoblast hücre hareketi üzerine etkileri immünohistokimyasal ve SEM analizi ile değerlendirildi. Uygulama sonrasında temas açısı değerlerinde anlamlı bir şekilde düşüş meydana geldi. Atmosferik soğuk plazma uygulaması osteoblast hücreler üzerinde oksidatif stres meydana getirmeden disk yüzeyinde çoğalmasını ve tutulumunu artırdı.

The Evaluation of the Osteogenic Cell Activities on Titanium Surface Modified with the Atmospheric Cold Plasma

Keyword

Atmospheric cold
plasma,
Dental implant,
Cell adhesion,
Surface hydrophilicity

Abstract: Dental implants became very popular in daily dentistry practice especially in recent decade. However, a long period of osseointegration is the most undesired disadvantage of this method. Several studies have been published related to shorten the osseointegration time. Atmospheric Cold Plasma (ACP) treatment is applied to titanium implants for shortening the osseointegration time by increasing the surface hydrophilicity and cell adhesion rate. In this study, ACP was applied to the surface of the titanium disc to increase hydrophilicity and osteoblast cell adhesion. Contact angle measurements were performed before and after ACP application. The effects of ACP application on osteoblast cells action were evaluated by immunohistochemistry and SEM analysis. The contact angle measurements were decreased after the ACP application significantly. ACP treatment increased the adhesion and proliferation on titanium disc surface without causing oxidative stress on osteoblastic cells.

1. Giriş

Günümüz diş hekimliğinde dental implantlar, kısmi ya da tam dişsiz hastaların tedavilerinde sabit ve hareketli protetik tedavilere destek veya alternatif olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [1]. Dental implantların çene kemiğine yerleştirilmesinden

hemen sonra iyileşme süreci başlar [2]. İmplantın kemiğe entegrasyonu ile sonuçlanan bu iyileşme dönemi Branemark tarafından osseointegrasyon süreci olarak tanımlanmıştır. İlk defa Branemark tarafından 1969 yılında "canlı kemik dokusu ile implant yüzeyi arasında fibröz bağ dokusu olmaksızın oluşan ve ışık mikroskobu düzeyinde

görülen direkt bağlantı” şeklinde tanımlanan osseointegrasyonun gerçekleşmesi için alt çenede 3 ay, üst çenede ise yaklaşık 6 ay beklenmektedir [3]. Bu biyolojik süreci beklemek hastaları psikolojik açıdan olumsuz etkilemektedir.

İmplant tedavisinin belki de en can sıkıcı yanı, beklenmesi gereken uzun iyileşme sürecidir. Bu olumsuzluktan yola çıkarak, iyileşme sürecinin başarısını etkilemeden, osseointegrasyon için beklenmesi gereken süreyi kısaltmak amacıyla yapılmış birçok araştırmaya literatürde rastlamak mümkündür. Osseointegrasyon süresini kısaltmak için yapılan çalışmaların önemli bir bölümünün implantın yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve geliştirilmesi üzerine yoğunlaştığı görülmektedir [4].

Biyomateryaller biyolojik ortama bırakıldıklarında yüzeye ilk ulaşan molekülün su olmasından dolayı yüzey ıslanabilirliğinin hücre yapışması ile protein adsorpsiyonu arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir. Yapılan birçok çalışmada hidrofilitik yüzeyin yara iyileşmesinin erken döneminde avantaj sağladığı ve osseointegrasyon sürecine olumlu katkı yaptığı gösterilmiştir [5-6].

Son yıllarda biyomateryallerin yüzey ıslanabilirliğini arttırmak için atmosferik soğuk plazma (ASP) uygulaması, üzerine sıkça çalışılan bir konu haline almıştır. Maddenin 4. hali olarak tanımlanan plazma; kuvvetli elektrik veya manyetik alanın etkisiyle enerji kazanan serbest elektronların ortamdaki diğer elektronlara ve atomlara çarparak enerjilerini transfer edip, birbirleriyle reaksiyona girmeleri sonucunda yeni radikal iyonların oluşmasıdır [7]. Biyomalzemeler üzerine uygulanan ASP, farklı substratlara bağlanarak ya da ince bir film tabakası oluşturmak için reaksiyona girerek yüzey özelliklerinde modifikasyonlar yapar. Optimal şartlarda yapılan bir plazma uygulaması yüzey kirliliğini temizleyerek yüzeyi steril hale getirir, yüzey enerjisini artırarak ıslanabilirliği artırır ve organik moleküllerin adezyon kabiliyetini geliştirir. Dış hekimliği alanında yapılan çalışmalarda, ASP uygulamasının implant osseointegrasyon sürecini kısalttığı ve implant yüzeylerinde hücre çoğalmasını artırdığı gözlenmiştir [8].

Bu çalışmada; ASP'nin titanyum yüzeylere ekilen kök hücreden farklılaştırılmış osteoblastların yüzeye tutunması ve çoğalması üzerine olan etkileri incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Titanyum diskler

Bu çalışmada 8 mm çapında 2mm kalınlığında 40 adet SLA (Sand-blasted Large-grit Acid-etched) yüzeyli titanyum diskler (NucleOSS, İzmir, Türkiye) kullanıldı.

2.2. Hücre kültürü

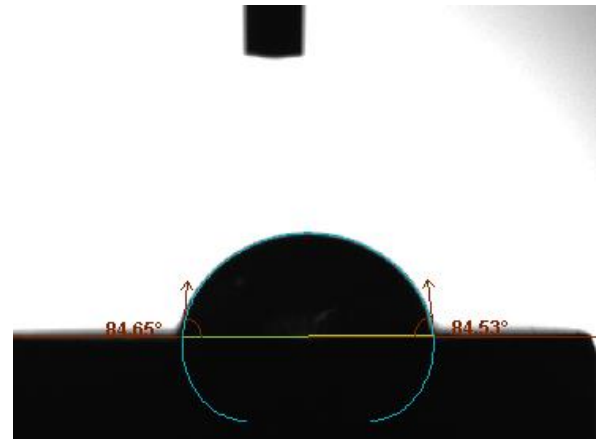
Bu araştırmada kullanılan kök hücreler için *Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulundan* onay alınmıştır. Çalışmamızda önceden koyunun yağ dokusundan alınarak izole edilmiş ve -80 °C'de dondurularak saklanmış üçüncü pasajdaki (P3) kök hücreler kullanıldı. Hücreler α -MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Germany) kültür ortamı içeren 25 cm² lik hücre kültür kabında 37 °C' de ve %5 CO₂ koşulunda inkübe edilerek çoğaltıldı. Osteojenik farklılaştırma amacıyla, hücrelerin besiyerine 10 mM Na- β -gliserofosfat (G9422, Sigma, St. Louis, USA) ve 50 μ g/ml Askorbik asit (A4544, Sigma, St. Louis, USA) ve 10-8 M Dekametazon (D4902, Sigma, St. Louis, USA) eklendi ve 3 hafta süreyle farklılaşmaları sağlandı.

2.3. Deneysel protokolü

Ticari olarak temin edilen steril diskler 4 günlük (n=2) ve 7 günlük (n=2) iki iyileşme süreci grubuna ayrılarak hücre kültür ortamında açıldı ve 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına steril penset yardımıyla yerleştirildi. Belirlenen gruplarda ASP uygulaması kültür ortamına koyulmadan önce yapıldı. Farklılaşmış hücrelere ASP uygulaması yapıldıktan sonra diskler kültür ortamından alındı ve fikse edilerek histokimyasal ve immunohistokimyasal işlemler için kullanıldı. Diğer 2 grup ASP yapılmayan kontrol grubu olarak kullanıldı. İki zamanlı deney düzeneğine göre 4. ve 7. günlerde kontrol ve deney grubundaki örnekler SEM analizi için gluteraldehit ile fikse edilerek tampona alındı.

2.4. Temas açısı analizi

Temas açısı ölçmek için disklere damlatma tekniği uygulanarak optik bir tensiometre (KSV Attension Theta Lite Optical Tensiometer, Terralab, Ankara) kullanıldı. Distile su damlatılan titanyum yüzeyin fotoğrafı cihaz üzerinde bulunun CCD kamera kullanılarak çekildi. Alınan görüntüler üzerinden su damlasının sağından ve solundan yüzeye yaptığı açının ölçümü yapılarak ortalaması alınarak temas açısı hesaplandı (Şekil 1).



Şekil 1. Temas açısı ölçümü

2.5. ASP uygulaması

Disk yüzeyine ASP uygulaması için atmosferik soğuk plazma jeneratörü kullanıldı. Plazma jeneratörü ile uygulanan voltajın frekansı 1500 Hz, giriş gücü 6W ve RF voltajı 31,4 kW olarak ayarlandı. Plazma uygulama aparatı ile diskler arası mesafe 5mm uygulama süresi ise 60 sn olarak ayarlandı. Uygulama verileri için çalışma öncesi yapılan pilot uygulamada ASP uygulaması sonrası disklerde temas açısı analizi yapıldı. Yapılan analizde sıfıra en yakın değerlerin elde edildiği veriler baz alındı.

2.6. SEM örneklerinin hazırlanması

Üzerinde hücre bulunan diskler hücre kültür kaplarından steril penset yardımıyla temiz kaplara alındı ve 0.1 M Kakodilat tamponu (C-0250, Sigma, St. Louis, USA) (pH 7.4) içerisinde hazırlanan %2.5'lik gluteraldehit (R1010, Agar Scientific, Essex, England) ile 30 dk fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Tampon ile yıkamadan sonra dereceli alkol serisinden (%30, %50, %70, %90 ve %96) 15 dk geçirilerek heksametilmelaminde 5 dk yıkandı ve havada 30 dk kurutma yapıldı. Örnekler altın iyonları ile ince tabaka halinde kaplanarak taramalı elektron mikroskopunda (Carl Zeiss, Supra 40 VP, Germany) incelendi.

2.7. İmmünohistokimyasal inceleme

Hücreler, %4'lük paraformaldehid solüsyonu (pH 7,4) ile fikse edildikten sonra indirekt Avidin-Peroksidaz immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Oksidatif stres belirteçlerinden anti-eNOS (sc-654, Santa Cruz Biotechnology) ve anti-iNOS (GTX15322, Gene Tex), yara iyileşme sürecinin değerlendirilmesi için anti-TGFbeta-1 (sc-146, Santa Cruz Biotechnology) ve osteoblastik farklılaşma için anti-Osteokalsin (ab13420, Abcam) primer antikörleri ile 18 saat inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra "biotinlayted anti-mouse/anti-rabbit" konjuge edilmiş streptavidin-horsedish peroksidaz solüsyonları ile boyandı. İmmunreaktiviteyi görünür halde saptamak amacıyla diaminobenzidin kullanıldı. Hücreler kapatma medyumunu ile kapatıldı ve ışık mikroskobu (BX43, Olympus, Japan) altında incelenerek değerlendirildi. Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL, S7101, Millipore, USA) boyama yöntemi kullanıldı.

2.8. İstatistik

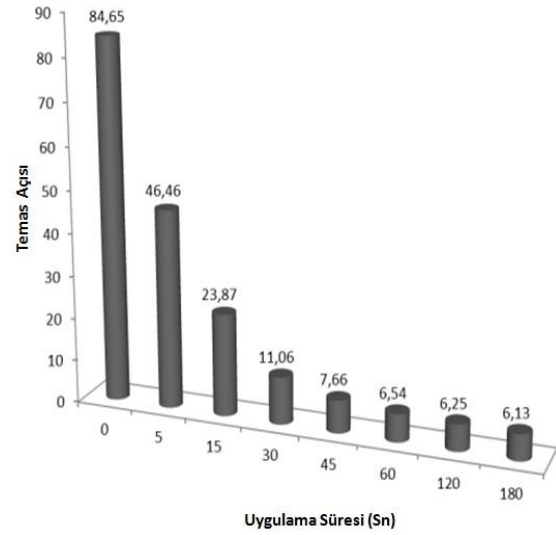
İmmünohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi ve 0 = hücrelerin %1'den azında boyanma; 1+ = hücrelerin %1- 10'unda boyanma; 2+ = hücrelerin %11-50'sinde boyanma; 3+ = hücrelerin %51-80'inde boyanma; 4+ = hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma ile

boyanma şiddeti ise 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlendi. Daha sonra $(1+\text{boyanma şiddeti}/3) \times \text{boyanma oranı}$ formülü ile toplam skor hesaplandı. Elde edilen veriler One Way-ANOVA istatistik testiyle karşılaştırıldı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir [9].

3. Bulgular

3.1. Plazma uygulaması sonrası temas açısı analizi sonuçları

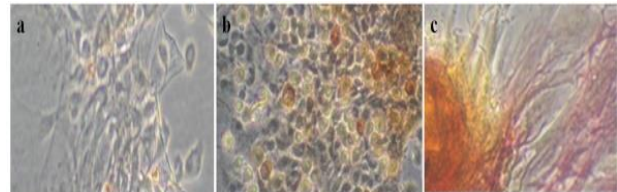
ASP uygulamasının yüzey temas açısı üzerine etkisi değerlendirildiğinde; ASP uygulama zamanındaki artışın temas açısında azalmaya neden olduğu gözlemlendi. ASP uygulamasında 60 sn. ye kadar temas açısında anlamlı azalma gözlenirken 60. sn. den sonra temas açısında anlamlı değişim görülmedi (Şekil 2).



Şekil 2. Zamana göre temas açısı ölçüm değerleri

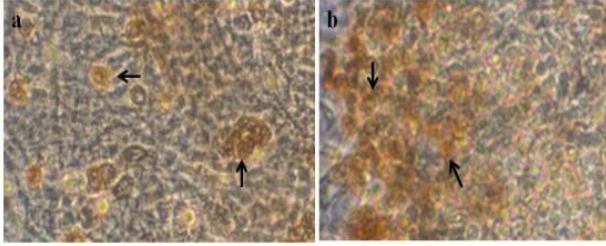
3.2. Osteojenik farklılaşmanın tanımlanması

Osteojenik farklılaşma için β -gliserofosfat, askorbik asit ve deksametazon içeren besiyerinde 3 hafta süre ile inkübe edilen hücrelerde ALP/VK boyama sonrasında ALP enzim aktivitesinin olduğu alanlar kırmızı, mineralize nodüllü alanların kahverengi veya siyah boyandığı görüldü. Ayrıca alizarin kırmızısı boyamasında ise osteojenik farklılaşma gösteren hücrelerin kırmızı olarak boyandığı izlendi (Şekil 3).



Şekil 3. Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma sonrası histokimyasal olarak alizarin kırmızısı ve ALP/VK belirteçleri ile tanımlanması, kontrol boyama (a), alizarin kırmızısı (b), Von kossa (c). x400 büyütme.

İmmünohistokimyasal olarak osteojenik farklılaşma osteonektin ve osteokalsin ile boyanma sonucunda pozitif boyanan hücre sayısının oldukça artmış olduğu ve hücrelerin farklılaştıkları görüldü (Şekil 4).



Şekil 4. Osteojenik farklılaşma sonrası immünohistokimyasal olarak Osteonektin (a), ve Osteokalsin (b) açısından pozitif boyanma saptandı. Oklar: Pozitif boyanan hücreler, x400 büyütme.

3.3. Hücre kültürü ve soğuk plazma etkileşiminin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

Çekilen faz kontrast mikroskop fotoğraflarında osteoblast hücrelerinin bipolar ve epiteloid morfolojide oldukları görüldü. 4 ve 7 günlük değerlendirmelerde soğuk plazma uygulamasının belirgin bir toksik etkiye neden olmadığı gözlemlendi. Ortamın oksidatif stresini göstermek için eNOS boyaması yapılarak incelendi. Hücrelerde bazal bir boyamanın olduğu ancak gruplar arasında belirgin bir fark olmadığı izlendi.

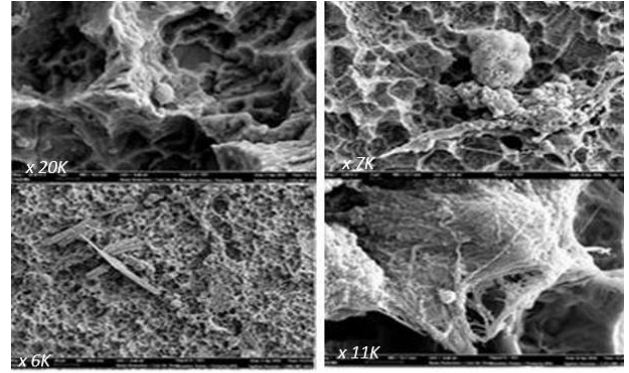
Diğer bir oksidatif stres belirteci olan iNOS boyamasında da eNOS ile karşılaştırıldığında boyamanın daha az olduğu ancak gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığı saptandı.

Oksidatif strese bağlı apoptotik bir ölüm durumu için yapılan TUNNEL boyamasında da gruplar arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı saptandı.

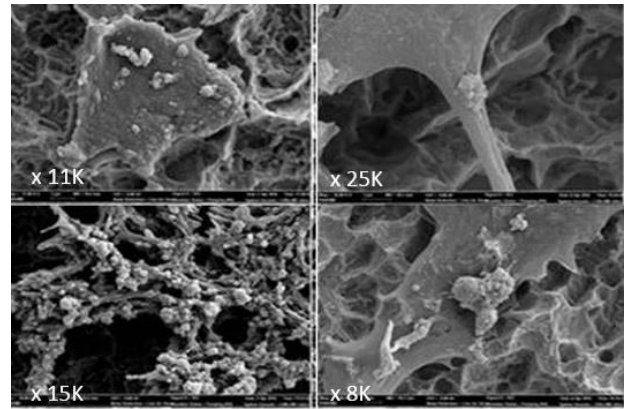
Hücre davranışının ve yara iyileşmesinin belirteci olan TGF-beta 1 boyama ile de kontrol edildi. Benzer şekilde bazal düzeyde boyamanın varlığı olduğu ancak gruplar arasında bir fark olmadığı görüldü.

3.4. Hücre davranışlarının SEM ile analiz edilmesi

Kültür ortamına yerleştirilen ve MKH osteoblastik farklılaşmasından sonra soğuk plazma uygulaması yapılan ancak kültür ortamında titanyumun ışık geçirmemesine bağlı olarak faz kontrast mikroskopta incelenemeyen hücre davranışı SEM ile analiz edildi. Hücrelerin titanyum disk üzerinde çoğalan ve yuvarlak, yayılmış ve tutunmuş, saçak yapıp boşluklarla ilişki kurmaya çalışan, filopodiyadan lamellapodiyaya kadar değişik düzeylerde sitoplazmik uzantılar oluşturan çeşitli morfolojik davranışlar gösterdiği görüldü. Ancak toksik etkiye benzer morfolojik bozukluk ve apoptoz gibi ılımlı toksik etki bulgusuna rastlanmadı. ASP uygulamasının hücrenin daha adeziv ve uzantılı olmasını arttırdığı gözlemlendi (Şekil 5 ve 6).



Şekil 5. Kontrol grubu (a) ve ASP uygulanan grubun (b) 4. Gün SEM görüntüsü.



Şekil 6. Kontrol grubu (a) ve ASP uygulanan grubun (b) 7. Gün SEM görüntüsü.

Yapılan değerlendirmede hücre davranışı, yayılması ve adezyonu açısından ASP grubu ile kontrol grubu arasında fark bulunurken 4. ve 7. gün değerlendirmeleri arasında anlamlı bir fark görülmedi.

4. Tartışma ve Sonuç

Titanyumun canlı dokulara yapışmasını sağlayan özelliğine biyoaktivite denir. Dental implant yüzeylerinin biyoaktif özelliği artırılarak daha kısa sürede, daha fazla kemik implant kontağı sağlanması hedeflenmektedir. İmplantların yüzey özelliklerini değiştirip biyoaktif yüzeyler elde etmek için yüzeye iyon implantasyonu, flor ile yüzey modifikasyonu, yüzeylerin hidroksiapatit ile kaplanması ve ASP ile yüzey modifikasyonu gibi pek çok farklı yöntem kullanılmıştır. Bu uygulamalar vasıtasıyla yüzey ıslanabilirliğini artırmak ve bu sayede biyoaktif yüzeyler elde etmek hedeflenmiştir. Hidrofilik yüzeylerde hücre adezyonunda artış olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir [10]. Hauser ve ark. yaptıkları çalışmada ASP uygulamasının, yüzey enerjisini değiştirerek hidrofilik ve biyoaktif yüzeyler oluşturduğunu ve bunun sonucu olarak organik molekül adezyonunu artırdığını gözlemlemişlerdir [11]. Duske ve ark. yaptıkları çalışmada, yüzey

topografileri farklı titanyum disk gruplarına argon plazması uygulayarak yüzeyin ıslanabilirliğini ve osteoblast hücrelerinin yüzey yayılımındaki farklılığını değerlendirmişlerdir. Bu değerlendirme esnasında kullandıkları gazın içeriğini ve uygulama süresini değiştirerek en uygun uygulama süresi ve gaz içeriğini tespit etmeye çalışmışlardır. ASP uygulaması öncesinde temas açıları 68 ile 117 derece aralığında ölçülen disklerin, ASP uygulaması sonrasında temas açılarının neredeyse 0 dereceye yaklaştığını görmüşlerdir [12]. Bu çalışmada, literatürdeki bilgilerle benzer biçimde, ASP uygulamasının yüzey enerjisini artırdığını ve buna bağlı olarak yüzey ıslanabilirliğinde artış olduğu gösterilmiştir. Tüm disklerin temas açılarının plazma uygulanması sonrasında uygulama yapılmayan diskler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür.

Dental implantların yüzey hidrofilitesinin artması konak doku hücreleri tarafından adsorbsiyon ve adezyon yönünden olumlu sonuçlara neden olmaktadır. Yüzey enerjisinin artması belirli doku veya hücre tiplerinin adezyonunda etkili olup kemik implant ilişkisini güçlendirdiği literatürde gösterilmiştir. Vargas ve ark. yaptıkları çalışmada argon gazının plazma halini kullanarak dental implantlar üzerinde monomer kullanmadan yük boşalım tekniği uygulamışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre plazma uygulanan dental implantların yüzeyindeki organik kirliliklerin temizlendiği, yüzey enerjisinin arttığı buna bağlı olarak ıslanabilirliğin ve doku adezyon özelliğinin güçlendiği görülmüştür [13]. Johnson ve ark. yaptıkları çalışmada inorganik yüzeylere ASP uygulamışlar ve bu durumun yüzey ıslanabilirliğini arttırarak hücre adezyonu açısından olumlu sonuçlar doğurduğunu gözlemlemişlerdir [14]. Xu ve ark. yaptıkları çalışmada dental implantların yüzeyinin protein bağlama kapasitesinin yüzey enerjisi ve ıslanabilirlik ile doğrudan ilişkili olduğunu, ASP uygulamasının dental implant yüzeyinin enerjisi ve ıslanabilirliğini arttırarak protein adsorpsiyon mekanizmasını hızlandırdığını gözlemlemişlerdir [15]. Bu çalışmada soğuk plazma uygulanan grupta hücrelerde titanyum yüzeye daha fazla yayılım, göç, çoğalma, farklılaşma, hücre adezyonunda artış, hücrelerin birbirleriyle ve titanyum yüzeye olan etkileşimlerinde artış olduğu gösterilmiştir.

Yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede ASP uygulamasının osteoblastik hücre kültüründe herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı ve oksitadif stres meydana getirmediği gözlemlendi. Buna bağlı olarak yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi soğuk plazma uygulamasının hücre canlılığını ve çoğalmasını olumsuz yönde etkilemediği gösterildi [16].

Bu çalışmada soğuk plazmanın yüzey temas açısına etkisi ve buna bağlı osteoblastik hücre davranışının olumlu yönde etkilendiğini gözlemlendi. Titanyum

yüzeylere soğuk plazma uygulamasının osteoblastik hücre çoğalması için toksik etki yaratmadığı ve hücre aktivitesini inhibe etmediği görüldü. Bu çalışmanın sonucu olarak ASP uygulamasının yüzey ıslanabilirliğini arttırarak hücre adezyonu ve proliferasyonu üzerinde olumlu katkıları olduğu gözlemlendi.

Teşekkür

Bu çalışma 2015-TDU-DİŞF-0011 No'lu BAP projesi ile desteklenmiştir. Bu çalışmada kullanılan SLA yüzeyli titanyum diskler NucleOSS (İzmir, Türkiye) firması tarafından temin edilmiştir.

Kaynakça

- [1] Salinas, T. J., Block, M. S., Sadan, A. 2004. Fixed partial denture or single-tooth implant restoration? Statistical considerations for sequencing and treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62(2004), 2-16.
- [2] Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N. P., Lindhe, J. 2003. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research*, 14(2003), 251-262.
- [3] Branemark, P. I., Hansson, B. O., Adell, R., Brene, U., Lindstrom, J., Hallen, O., Ohman, A. 1977. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery. Supplementum* 16(1977), 1-132.
- [4] Howlett CR., Evans MD., Wildish KL., Kelly JC., Fisher LR., Francis GW., Best DJ. 1993 The effect of ion implantation on cellular adhesion. *Clinical Materials* 14(1993), 57-64.
- [5] Rupp F., Scheideler L., Eichler, M., Geis-Gerstorfer J. 2011. Wetting behavior of dental implants. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 26(2011), 1256-1266.
- [6] Hirakawa Y., Jimbo R., Shibata Y., Watanabe I., Wennerberg A., Sawase T. 2013. Accelerated bone formation on photoinduced hydrophilic titanium implants: an experimental study in the dog mandible. *Clinical Oral Implants Research*, 24(2013), 139-44.
- [7] Hauser J., Manfred Koeller, Sebastian Bensch, Helmut Halfmann. 2010. Plasma mediated collagen-I-coating of metal implant materials to improve biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94(2010), 19-26.
- [8] Bazaka K., Jacob M.V., Crawford R.J. & Ivanova E.P. 2011. Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. *Acta Biomaterialia*, 7(2011), 2015-2028.

- [9] Smith J, Robida MD, Acosta K, Vennapusa B, Mistry A, Martin G, Yates A, Hnatyszyn HJ. 2016. Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagnostic Pathology* 18(2016), 44
- [10] Jimbo, R., Sawase, T., Baba, K., Kurogi, T., Shibata, Y. & Atsuta, M. 2008. Enhanced initial cell responses to chemically modified anodized Ti. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 10(2008), 55-61.
- [11] Hauser J., Zietlow J., Köller M., et al. 2009. Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(2009), 2541-2548.
- [12] Duske K, Koban I, Kindel E, et al. 2012. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(2012), 400-407.
- [13] Vargas E, Baier RE, Meyer AE. 1992. Reduced corrosion of CP Ti and Ti-6Al-4V alloy endosseous dental implants after Glow-Discharge treatment: A preliminary report *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 7(1992), 338-44.
- [14] Johnson, S.D., Anderson, J.M., Marchant, R.E. 1992. Biocompatibility Studies On Plasma Polymerized Interface Materials Encompassing Both Hydrophobic And Hydrophilic Surfaces. *Journal Of Biomedical Materials Research*, 26(1992), 915-35.
- [15] Xu LC, Siedlecki CA. 2007. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 28(2007), 3273-3283.
- [16] Garcia, J. L., Asadinezhad, A., Pacherník, J., Lehocký, M., Junkar, I., Humpolíček, P., Sa'ha, P. & Valašek, P. 2010. Cell proliferation of HaCaT keratinocytes on collagen films modified by argon plasma treatment. *Molecules*, 15(2010), 2845-2856.