

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
AĞIZ-DİŞ-ÇENE HASTALIKLARI VE  
CERRAHİSİ ANABİLİM DALI  
DANIŞMAN: Prof.Dr.NECLÂ TİMOÇİN

**TİTANYUM VE HİDROKSİAPATİT YÜZEYLERDE  
TÜKÜRÜK PROTEİNLERİNİN ADSORPSİYONU  
İLE İLGİLİ KARŞILAŞTIRMALI ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

Dt.MESTURE AYFER KAYNAR

İSTANBUL - 1991

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>GİRİŞ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİ</b> .....	3
- Adsorpsiyon Fenomeninde Proteinlerin Fonksiyonları.....	3
- Hidroksiapatit Yüzeyler ve Özellikleri.....	7
- Titanium Yüzeyler ve Özellikleri.....	8
- Protein Filmin Özellikleri ve Fonksiyonları.....	10
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	19
- Tükürük Toplanması ve Hazırlanması.....	19
- Yüzeylerin Hazırlanması.....	19
- Tükürük Proteinlerinin İn Vitro Adsorpsiyonu.....	20
- Total Protein Tayini.....	21
- Proteinlerin Kalitatif Analizleri.....	22
- Örneklerle Ait Proteinlerin Analizi.....	23
- Protein Karakterizasyonu.....	26
- Protein Molekül Ağırlıklarının Tayini.....	28
<b>BULGULAR</b> .....	29
<b>TARTIŞMA</b> .....	39
<b>SONUÇ</b> .....	48
<b>ÖZET</b> .....	50
<b>ABSTRACT</b> .....	51
<b>KAYNAKLAR</b> .....	52
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	63
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	64

## G İ R İ Ő

Biomateryallerin biolojik ortamlardaki davranışları, diş hekimliği de dahil olmak üzere birçok disiplinin ortak ilgi alanıdır(7). Son zamanlarda dental implantolojideki başarılı kullanımı nedeniyle, Titanium (Ti) özellikle bu alanda en çok kullanılan metal haline gelmiştir(3,44,68).

Diğer biomateryaller gibi Ti metallerin yüzeyleri, proteinden zengin vücut sıvılarıyla karşılaştıklarında, kaynağını içinde bulunduğu ortamdan alan, çeşitli protein moleküllerinden oluşan ince bir filmle kaplanır. Bu tabaka, implant yüzeyindeki hücreyel adhezyonunun ilk ve en önemli evresidir ve yapısında yer alan her molekülün konak ve bakteriyel hücrenin adhezyonu açısından birbirinden farklı ve spesifik rolü vardır. Hücrenin temel karakteristiklerinden sayılan "Adhezyon" özelliği gözönüne alınırsa, implant yüzeyinde hücreyel adhezyonun oluşup oluşmaması veya hangi tip hücrelerin yer alacağı, direkt olarak implant materyaline ve özellikle implant yüzeyinde oluşan bu tabakanın karakterine bağlı olacağı açıktır(24).

Albrektsson'a göre implantın kısa dönemdeki başarısı, kullanılan

materyalin biyolojik uyumluluğu (biyokompatibilite) ve buna bağlı olarak gelişen yakın kemik-implant ataşmanın sağlanmasıyla (Osseointegrasyon) yakından ilgili gibi görünmektedir(5). Birçok yazar tarafından basit olarak kemik-implant teması veya ataşmanı olarak tarif edilmesine karşılık, başarılı implantlarda görülen bu durum, moleküler düzeyde çok daha karmaşıktır. Gerçekte hücre, implant materyaline değil, implantasyonu takiben implant yüzeylerde oluşan protein filme tutunur(59).

İmplantın uzun dönemdeki başarısı ise oral mikroflora ile implant materyali arasındaki ilgiye bağlıdır. Günümüzde hızla ilerleyen biyomedikal teknolojinin geniş olanaklarına paralel olarak gelişen ve vücudun çeşitli nedenlerle fonksiyonlarını kaybetmiş olan kısımlarını biyokompatibil materyallerle telâfi edebilen implantoloji disiplini içinde sadece dental implantlar dış ortamla bağlantı halindedir. Bu nedenle her bir implant çivisi oral kaviteye yerleştirildiği andan başlamak üzere, hem kan hem de tükürük sıvısıyla karşılaşır. Serum ve kan proteinlerinin implant yüzeylerindeki adsorpsiyon karakteristikleri birçok araştırıcı tarafından geniş olarak incelenmiş olmasına rağmen(10,43,48,65). Ti implantların yüzeylerinde, tükürük proteinlerinin oluşturduğu film tabakasının yapısı üzerinde çalışılmış bir konudur.

Unutulmaması gereken önemli nokta, implantın başarısında reper noktası olan Osseointegrasyon bir yandan, kemik hücresinin implant yüzeyine adhezyonunu ve hızlı hücre çoğalmasını gerektirirken, diğer yandan bakteri hücresinin adezyonu ve kolonizasyonu, başarısızlığın gerçek nedeni olabilir. Bu nedenle yukarda sözü edilen protein filmin ayrıntılarıyla incelenmesinin implantolojinin gelişim süreci içinde önemli yer alacağı inancındayız.

## GENEL BİLGİ

İmplant materyallerinin proteinden zengin sıvılarla karşılaşmalarıyla başlayan reaksiyonlar zincirinin ilk evresini hızlı protein adsorpsiyonu oluşturur. Bu etkileşim moleküler seviyede, alıcı hücre ile implant materyali arasında yer alan ve "İnter-Face" olarak tanımlanan alanda gerçekleşir. Bu alan implant materyali yönünde oksit tabakasıyla alıcı hücre yönünde ise protein moleküllerinin oluşturduğu film tabakasıyla paylaşılır(14). Bu nedenle implant yüzeylerdeki adsorpsiyon sürecinin karakteri, implant metali ve bu implantın karşılaştığı biyolojik sıvılara bağlı olmakla birlikte, implant materyalinin yüzey özellikleriyle ve proteinin kendi yapısıyla da yakından ilgilidir.

Konuyu daha yakından tanımak amacıyla sözü edilen parametreleri ayrı ayrı incelemenin ve her bir değişkenin adsorpsiyona olan etkilerini değerlendirmenin doğru olacağı inancındayız.

### **Adsorpsiyon Fenomeninde Proteinlerin Fonksiyonları**

Proteinler, kuvvetli kovalent bağlarla tutunmuş amino asitlerin oluşturduğu uzun ve üç boyutlu yapılanmalardır. Amino asit gruplarını bira-

rada tutan bağların her yönde dönebilme özelliği vardır, böylece bir prote-in molekülü 3 boyutta katlanarak sayısız şekiller alabilir. Ancak biolojik ortamlarda protein molekülü yan zincirleri ve bunların yerlerine bağlı olmak üzere tek bir şekil alır ki buna "KONFORMASYON" denir(51) (Şe-kil 1).

Amino asit molekülü nonkovalent bağlarıyla bir başka amino asit zinciri veya kendi zincirinin bir başka segmentine bağlanır. Meydana gelen yapılanma, nonkovalent bağların ortaya çıkardığı kuvvetle stabilitesini korur ancak bu yapı reversibldir ve direkt olarak molekülün içinde bulun-duğu ortama bağlıdır(2). Bu nedenle protein molekülünün solid yüzeylere adsorpsiyonu polimerin yapısında konformasyonel değişikliklere neden olur.

Genel olarak proteinler aşağı yukarı bütün yüzeylere yapışma eği-limindedir. Bu ataşman protein zincirinin yüzeyden proteinin içinde bulun-duğu ortama uzanan tek ya da multipl segmentleriyle sağlanır ve varlığı da serbest yüzey enerjisi, yüzeyin elektrik yükü, hidrofobik oluşu molekül ağır-lığı, isoelektrik noktası ve molekülün bağlama kapasitesi gibi proteine ait birçok değişkenden etkilenir.

Bu değişkenlerin adrospsiyona olan etkileri farklı araştırmacılar tarafından ayrıntılı olarak incelenmiştir. Schakenraad ve arkadaşları imp-lant yüzeyi üzerinde hücrenin yayılması ile serbest yüzey enerjisi arasında-ki ilgiyi serum proteinleriyle incelemişler, yüzeyde hücrel ataşmanın sağ-lanabilmesi için serbest yüzey enerjisinin  $57 \text{ erg/cm}^2$  olması gerektiğini bil-dirmişler ve serbest yüzey enerjisi olduğu kadar serum proteinlerinin yüzey özelliklerini değiştirerek hücrel ataşmanı etkilediğini göstermişler-dir(65).

Baier ise yüzey serbest enerjisi düşük olan yüzeylerin biolojik sıvılarla karşılaşmalarında yüzey tarafından adsorbe olan protein örtünün son derece zayıf bir film olduğunu (Poor Primer Coat) ve dolayısı ile bu yüzeylerde meydana gelebilecek olan hücre sel kolonizasyonun inhibisyona uğradığını buna karşılık yeterli serbest yüzey enerjisine sahip olan yüzeylerde iyi bir protein film adsorpsiyonu olduğunu ve yeterli biolojik etkileşim sonucu iyi bir hücre sel ataşman sağlandığını bildirmiştir(9).

Schakenraad, Arends ve Busher ise proteinle kaplanmış yüzeylerde hücre tutunması ve yayılmasının çıplak yüzeylere göre farklı olduğunu göstermiş ayrıca yüzey ile hücre arasındaki mesafenin proteinle kaplanmış olan alanlarda 20 nm. ye kadar indiği görüldüğü halde bu filmin yokluğunda mesafenin 100 nm. kadar çıktığını göstermişlerdir(66).

Jacop Dankert ve arkadaşları ise protein film, bakteriyel adhezyon ve enfeksiyon dinamiğini yakın ve uzak etkileşim (Short-Long Range) sınırlarında incelemişlerdir(19).

Kan, gözyaşı, tükürük gibi proteinden zengin sıvılarla karşılaştıklarında implant yüzeylerde meydana gelecek ilk reaksiyonlardan biri, ortamdaki proteinlerin yüzeye adsorpsiyonudur. Ancak bu adsorpsiyon irreversible bir reaksiyon olmayıp, yüzeyde sürekli ve hızlı protein değişimlerinden oluşan ve VROMAN etkisi olarak tarif edilen dinamik bir olaydır. Yüzeydeki değişim, implantın içinde bulunduğu sıvıdaki aynı tür proteinler arasında olduğu gibi, yüzeye olan affiniteleri farklı proteinler arasında da olur(33,78).

Görüldüğü gibi İnter-Face denilen alanda oluşan protein filmin kompozisyonunu değişik proteinlerin farklı affiniteleri tayin eder. Sonuç olarak filmin yapısında bulunabilecek proteinler, yüzeye olan affiniteleri en fazla olan proteinler olacaktır. Bu protein filmin kompozisyonu ve kine-tiği implant yüzeylerdeki hücrel ataşmanı direkt olarak etkileyeceğinden konunun önemi Baier(7) tarafından ESANSİYEL BELİRTİ olarak vurgu-lanmıştır.

Yapay yüzeylerde hücrel ataşmanın oluşması için gerekli ilk koşul, sözünü etmekte olduğumuz protein filmin varlığıdır. Bu filmin oluş-masından sonra implant yüzeylerinde bakteri hücreleri de dahil olmak üze-re alıcıya ait hücreler arasında bir rekabet başlar. Protein adsorbsiyonu ve hücrel ataşmana olan etkileri birçok araştırmacının üzerinde durduğu bir konudur. Bazı hayvan deneylerinde bu filmin özel olarak hazırlanmış şekli-nin hücrel ataşmada inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir(4). Klinik yönden düşünüldüğünde hücrel ataşmanı direkt olarak etkileyen protein filmin fonksiyonu ve buna bağlı olarak moleküller ve aralarındaki rekabe-tin çok önemli bir parametre olduğu ortaya çıkar.

Adsorpsiyon fenomeni yönünden incelenirse her bir protein molekülünün;

1- Polar ve Hidrofilik

2- Nonpolar ve Hidrofobik

yan zincirleri vardır. Hidrofilik yüzeyler karşılaştırıldığında etkileşimin hidrofobik yüzeylere göre çok daha fazla olduğu görülür(79).

Hidrofobik yüzeyler, protein molekülünün iç kısmında ve bir çekirdek oluşturacak biçimde bulunur. Protein molekülü hidrofobik bir



yüzeyle karşılaştığında, hidrofobik çekirdekte etkileşim başlar, bunun sonucu molekül çözülür, intramoleküler bandlar kopar, böylece amino asit molekülünün yapısı ve yan zincirlerinin kimyasal reaktivitesi değişir. Bu durum protein molekülünde konformasyonel değişikliklere neden olduğu gibi protein filmin kompozisyonu ve kinetiği ile birlikte gelecekteki hücresel adropsiyonu etkileyen en önemli parametredir.

### Hidroksiapatit Yüzeyler ve Özellikleri

Hidroksiapatit (HA) kalsiyum fosfatın doymuş solüsyonunun çökmesiyle meydana gelen mikrokristal bir yapılanmadır ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Bu formül içindeki OH iyonları başka iyonlarla değişebilir. Örneğin fluor iyonu formülün yapısına girdiğinde Ca, iyon bağlantısının stabilitesini artırarak HA'nın çözünebilirliğini azaltır. Kristal yapısındaki Ca ve OH eksikliği apatitin yüzeyinde yüksek bağlanma kapasitesine neden olur. Nriagu ve arkadaşları ise H in amfoterik özellikte olduğunu ve bu nedenle hem asidik hem de bazik proteinlere iyi bir şekilde bağlandığını göstermişlerdir(54). Bu bağlantının asidik proteinlerde muhtemelen fosfat gruplarıyla, bazik proteinlerde ise Ca iyonlarıyla olduğunu bildirmişlerdir. HA yüzeylerde protein adsorpsiyonundaki değişiklikler ya proteinler arasında affinite farkından ya da yüzeyin artan pozitif yükü nedeniyle meydana gelir. Örneğin PMN (Polimorfonükleer lökosit) de üretilen ve bazik bir protein olan lizozimin (Lz) Ca'a büyük bir affiniteyle bağlandığı gösterilmiştir(21). Bennick ve arkadaşları HA'nın kimyasal reaktivitesinin, adsorpsiyonun önemli bir fonksiyonu olduğunu, buna karşılık yüzeyin fiziksel özelliklerinin fazla etkili olmadığını savunmuşlardır(12).

## Titanium ve Yüzey Özellikleri

Titanyum yumuşak, hafif, allotropik bir metaldir. Meteorlarda, güneşte, taşlarda, minerallerde bulunabildiği gibi bitkiler ve insan vücudunda da bulunabilir. Metal saf olduğunda parlak ve beyazdır, dansitesi düşük olmasına rağmen son derece kuvvetlidir. Metalin yüzeyinde bulunan pasif oksit tabakası metalin korozyona karşı son derece dirençli olmasını sağlar. Bunlara ilave olarak kemiğin Young Modulus'u ile Ti arasındaki benzerlik ve metalin fizyolojik olarak inert oluşu Ti'un implantoloji disiplinindeki başarılı kullanım nedenlerindedir(79).

Ti metali polikristalin yapıdadır. Her bir kristal hegzagonal ünitlerden meydana gelir. Polikristalin yapı içindeki her kristalin spesifik oryantasyonuna GRAİN denir. Kristallerin bu dizimlerdeki düzensizlikler ise başlıca üç şekilde ortaya çıkar(48) (Şekil 3).

- 1- Grain Boundries : Grain denilen birimlerin spesifik oryantasyonlarının bozulduğu alanlardır.
- 2- Twin Boundries : Orijinal atomik oryantasyonun yansıması şeklindeki dizilişin görüldüğü alanlardır.
- 3- Dislocation : Metalin deforme olduğu durumlarda, bir atomik kesitin bir diğeri üzerinde kaymasıyla ortaya çıkan alanlardır.

Metal atomlarının geometrik dizilişlerindeki bu düzensizlikler metalin yüzeyindeki bağlama kapasitesini belirler(76). Yukarıda sözünü ettiğimiz düzensizliklerin sayısı metalin doymamış bağlarını, bağlama kapasitesini ve enerji potansiyelini gösterir.

Saf Ti yüksek enerji potansiyeli olan bir metaldir. Kullanılır duruma gelinceye kadar geçirdiği evreler Adell tarafından geliştirilmiştir(1). Metalin hava ile teması yüzeyde hızlı bir oksidasyonu başlatır. Saflaştırma işlemi sırasında çok yüksek bir enerji kullanıldığından hızlı oksidasyon kaçınılmazdır. Oda ısısında Ti yüzeyinde oluşan oksit tabakası 5-70 Å'ye kadar çıkabilir. Yukarda sözü edilen yapısal bozukluklar, oluşan oksit tabakasında kesintilere neden olsa da oksit tabakası yeniden oluşarak 100 Å'ye varabilir. Kendiliğinden oluşan bu oksit tabakası korozyona engel olan koruyucu bir bariyer olmakla kalmayıp, implantın konak ile karşılaştığı, konak hücre veya bakteri hürcesi arasındaki etkileşimin yer aldığı alandır(36). Bu oksit tabakanın koruyucu fonksiyonu tabakanın kalınlığını arttırmakla sağlanabilir. Bunun için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir(48). Ayrıca metal yüzeyinde açıkta oluşan oksidasyonun kemik içinde çok daha hızlı olduğu gösterilmiştir(49). Bu büyüme ya oksit tabakasına doğru metal atom/ion difüzyonu şeklinde ya da oksit yüzeyden içeri doğru oksijen taşıyan moleküllerin taşınmasıyla sağlanabilir(40) (Şekil 4). Bu etkileşim Gomer ve arkadaşları tarafından "SURFACE DIFFUSION" olarak tanımlanmıştır(23).

Yüzeye ait özelliklerden bir diğeri de yüzeyin elektriksel yüküdür. Bu konuda öncü olan araştırmacılar net negatif yüklü yüzeylerin hücre sel ataşmanı engellediğini bildirmişler, buna karşılık birçok çalışma elektriksel yükün biyolojik adhezyonda az etkili olduğunu öne sürmüştür. Ancak bu konudaki en son çalışmalar yüzey elektriklenmesinin biyolojik adhezyonla yakından ilgili olduğunu ortaya koymuştur. Aynı yükte yüklü yüzey ve moleküller birbirlerini minimum 10 nm. uzaklığa itme eğilimindedirler. Van der Waal's kuvvetleri protein moleküllerini yüzeye yakın olarak belirli bir pozisyona sokmağa yeterlidir(19,57). Ancak moleküllerin Van der

Waal's kuvvetleriyle olan bağlantıları oldukça zayıftır ve ancak 15 nm. uzaklığa kadar etkili olabilen hidrofobik kuvvetlerle yenilebilir. Hidrofobik bağlantıyla ortaya çıkan kuvvetler Van der Waal's kuvvetlerine göre 10-100 kez daha fazladır(25). Bu nedenle moleküllerle yüzey arasındaki iyonik bağlantının çoğu hidrofobik kuvvetlerle sağlanır.

Yüzey gerilimi, yani yüzeyin serbest enerji düzeyi, gözönüne alınması gereken bir diğer önemli parametredir. Kritik serbest yüzey enerjisi ile hücrel ataşman arasındaki ilişki Baier tarafından bildirilmiştir(19,84). Minimal bioadhezyon sağlanması için gerekli olan enerji 20-30 dyn./cm<sup>2</sup>'dir(53). Revel ve arkadaşları(60) proteinden zengin ortama yerleştirdikleri petri kaplarında yaptıkları çalışmada hücrelerin direkt olarak protein filme tutunduklarını Schakenraad ve arkadaşları da maksimum hücre tutunması ve yayılmasının proteinle kaplanmış olan implant yüzeylerinde çıplak yüzeylere göre anlamlı derecede fazla olduğunu bildirmişlerdir(66,77).

### **Protein Filmin Özellikleri ve Fonksiyonları**

İmplantın ağız ortamına yerleştirilmesi için kullanılan tekniklerin arasında en başarılı olanları iki safhalı cerrahi girişim gerektirenleridir(6). Tekniğin ilk evresini uygun implant çivilerinin çene kemiği içinde önceden planlanan yerlere yerleştirilmesi ve mikroskobik seviyede direkt kemik-implant teması olarak tarif edilen "osseointegrasyon" oluşturur. Osseointegrasyonun sağlanmasında gerekli iki önemli koşul enfeksiyona engel olmak ve en az 3 aylık bekleme süresince implant çivisi üzerine herhangi bir yük bindirmemektir. Gerekli kemik-implant bağlantısının sağlanmasından sonra uygulanan ikinci cerrahi girişimle mukoza ile örtülü olan

implant çivilerinin üzeri açılır ve çivilerin ağız ortamı tarafındaki kısımları "Abutment" denilen küçük kapakçıklarla kapatılır, böylece kemik dokusu ve kanla temasta olan implant çivisi ikinci cerrahi girişimden sonra ağız sıvılarıyla karşılaşmış olur(3,8,17,31).

Oral kavitedeki diğer bütün yüzeyler gibi Ti yüzeyleri de büyük bir kısmı majör ve minör tükürük bezlerinden, küçük bir kısmı ise gingival sulkustan gelen ağız sıvılarıyla kaplanır(70). Ağız sıvıları bilindiği gibi tükürük salgısının organik ve inorganik komponentlerini ayrıca bakteri hücreleri, dökülmüş epitel hücreleri ve serumdan gingival sulkusa sızan, savunma sisteminin düşük konsantrasyondaki komponentlerini içerir(56). Bu sıvılara ait proteinlerin adsorpsiyonu proteinin karşıt yüklü veya hidrofobik gruplarının katmanlar oluşturacak şekilde yığılmasıyla olur. Adsorpsiyon değerleri bir platoya ulaşıncaya kadar adsorbe olan proteinle yüzeyin biyolojik sıvı içinde kaldığı zaman periodu arasında bir korelasyon vardır. Adsorbe olan protein konsantrasyonunun yüzeyden dışarı doğru azalmasını Juriaanse ve arkadaşları belli bir uzaklıktan sonra iyon konsantrasyonunun daha fazla adsorpsiyon için çok düşük oluşuna bağlamıştır(37,38,39). Adsorpsiyonların çok katmanlı olduğunu (Multi Layer Film) ilk defa Dawes açıklamıştır(20). Saxton ise bu tür asellüler ve bakteri içermeyen film mine yüzeylerinde oral sıvılarla karşılaşmalarından hemen sonra oluştuğunu bildirmiştir(64).

Ağız sıvılarının komponentleri arasında adsorpsiyon açısından en önemli olanlar mikromoleküllerdir. Bu moleküllerden de organik filme en çok katkıda bulunanlar ise fosfo-proteinler ve glikoproteinlerdir. Ayrıca dikkate alınabilecek miktarda lipit ve bunların asidi inhibe edici etkileri bildirilmiştir(69).

Tükürüğün glikoproteinleri hem seröz hem de müköz tükürük bezlerinin bir fonksiyonu olmakla birlikte en çok müköz tükürük bezlerinden salgılanır. Ayrıca interstisiyel dokunun plazma hürcelerinde karbonhidrat içeren immunoglobulinler bulunur(46). Tükürük bezi kanallar sisteminin bazal hücrelerinin de protein içerdiği bildirilmiştir(42). İmmunolojik çalışmalar çok küçük miktardaki glikoprotein serumdan sızıntı ile tükürüğe geçtiğini göstermektedir(56). Protein içeriği son derece karışık olan tükürükte çok sayıda glikoprotein izole edilmiş ve biyolojik aktiviteleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır(46).

- 1- Kan grubu aktivitesi
- 2- Ca ve diğer metallerle bağlanabilme kapasiteleri.
- 3- Bazı bakterileri agglutine edebilme özellikleri
- 4- Enzimatik aktiviteleri
- 5- Antibakteriyel özellikleri
- 6- Influenza virusunun hemaglutasyonunu inhibe edebilmesi.

Majör tükürük bezlerinden olan Submandibular gland % 75 seröz ve % 25 müköz tipte, Sublingual ve minör tükürük bezleri çoğunlukla müköz tipte acinar hücre içermektedir. Buna karşı Parotis bezi tamamıyla serözdür. Submandibular tükürük parotis tükürüğüne ait total proteinin 2/3'sini içermekle birlikte karışık bir tükürüktür.

Mukus hücrelerinden salgılanan mucus, salgının yapışkan visko- elastik kalitesini sağlar. Mukus hücreleri ayrıca daha küçük moleküllü anyonik glikoproteinler üretir.

Seröz hücreler ise parotis tükürüğünde bulunan gliko-proteinleri salgılar, ancak konsantrasyonları parotis tükürüğüne göre daha düşüktür.

Bu glikoproteinler amilazın glikozitli izoenzimleri, katyonik ve anyonik glikoproteinler, IgA'nın sekretuar parçası, fosfoproteinler, IgG, IgM çok az miktarda olmak üzere kallikrein, laktoferrin, laktoperoksidaz ve eser miktarda serum proteinleridir(46). Ayrıca Guggler ve arkadaşları Ca affinitesi olan Submandibular tükürüğe ait bir proteinin varlığına dikkat çekmiş(26) Boat ve arkadaşları ise(15) 1970'de kısmen(16) 1974'de ise tamamiyle karakterize edilen % 0.85 oranında fosfor içeren proteini bildirmişlerdir. Ca'u presipite edebilen (CaPP) bu proteinin moleküler ağırlığı ise 12000 Dalton idi.

Yukarıda sözü edilen proteinlerden başka submandibular glanda ait karakterize edilememiş, parotis salgısındaki konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyondaki bazı proteinlerin varlığı ve bunların seröz hücrelerden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Seröz tabiatına rağmen parotis tükürüğünün submandibular tükürüğe göre çok daha fazla miktarda karbonhidrat içeren glikoprotein salgıladığı bildirilmiştir. Bu glikoproteinler aşağıdaki gibi sıralanabilir. Majör katyonik glikoproteinler (Prolin, Glisin, Lizin, Histidin), glikozitli isoamilaz, sekretuar parçası ve "j" zinciri de dahil olmak üzere IgA, IgG, IgM, laktoferrin, kallikrein, Ca presipite edebilen fosfoprotein ve karakterizasyonu yapılmamış bazı anyonik glikoproteinlerdir(46).

Farklı tükürük bezlerinden salgılanan glikoproteinlerin çeşitliliği nedeniyle ağız içinde herhangi bir yüzeyde oluşan filmin kompozisyonunun lokalizasyona göre varyasyonlar göstereceği düşünülse de, mine yüzeyinde oluşan organik filmin lokalizasyondan etkilenmediği ve benzer profili gösterdiği bildirilmiştir(47,70).

Selektif olarak adsorbe olan glikoproteinlerin miktarı organik filmin olgunlaştığı ilk 1-1.5 saat arasında artar. Bu proteinler arasında mürin glikoproteinlerin HA yüzeylerine olan affiniteleri gösterilmiştir.

Bu proteinin ağız boşluğundaki non-immunolojik korunmayı sağladığı düşünülmektedir(41,67,74). Mürin glikoprotein başlıca iki formda ortaya çıkar: MG1 ve MG2 MG1 diğerine göre daha büyük moleküldür. Ayrıca bu iki formdan MG1'in HA'e daha kuvvetli affinitesi vardır(73).

Selektif olarak adsorbe olan ve depolanan mürinin mine yüzeyinde demineralizasyon ve remineralizasyon sürecinde rolü olduğu bildirilmiştir(20,81,82).

Ayrıca mürin ağız ortamındaki bakterilerin ve özellikle Streptokokkus Sanguis'in eliminasyonunu sağlaması yönünden önemlidir(41,52,67,71).

Bennick ve arkadaşları asidik prolinden zengin fosfoproteinlerin mine yüzeyinde oluşan protein filmin total protein miktarının % 42'sini teşkil ettiğini bildirmişlerdir. Bu proteinler adsorpsiyonun ilk 1/2 saatinde protein filmin majör komponentini oluştururlar(12). Asidik prolinden zengin fosfoproteinler hem parotis hem de submandibular tükürükte detaylı bir şekilde araştırılmış, karakterize edilmiş ve kantitatif olarak incelenmiştir(28).

Asidik prolinden zengin fosfoproteinlerin en önemli fonksiyonları, içerdikleri fosfoserin grubuyla sağladıkları Ca bağlama kapasiteleridir. Ca'un HA yüzeylere optimum bağlanması için her protein molekülünün iki molekül fosfor taşıması gerekmektedir. Asidik prolinden zengin proteinlerin Ca değişimindeki potansiyelleri özellikle bu proteinler için önemli-



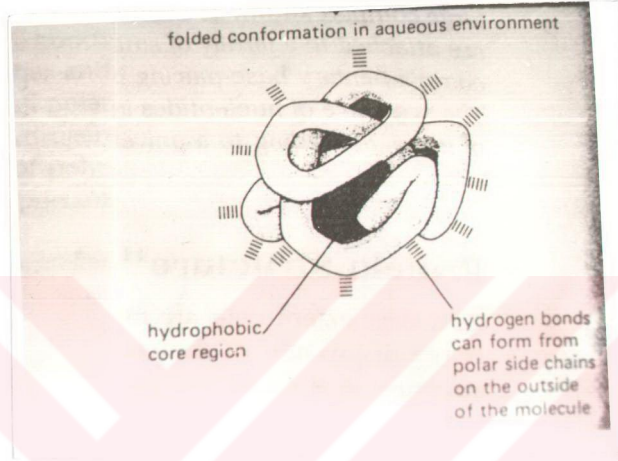
dir(12). Bunun yanında HA yüzeylerinin yüksek reaktivitesinde bu etkileşimin rolü Nriagu tarafından bildirilmiştir(54). Hay ve arkadaşları ise HA yüzeyindeki organik filmin majör komponentinin çeşitli fosfoproteinler olduğunu bildirmişlerdir(28).

Organik film yapısına giren IgA, IgG lizozim, laktoferrin, albumin, glikoziltransferaz ayrıca incelenmiş olmakla beraber bunlar sellüler tabakanın küçük bir kısmını teşkil ederler. Genel olarak organik film yapısına giren bazı proteinler diğerlerine göre daha fazla regülarite gösterirler ve her biri farklı konsantrasyondadır. İki benzer protein arasındaki konsantrasyon farkları direkt olarak bireysel farklılıklara ve incelenen proteinin ilgili kişideki konsantrasyonuna bağlıdır.

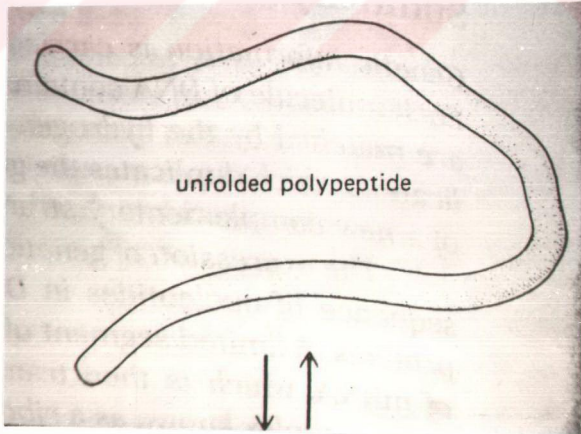
Konsantrasyondaki bu varyasyonlar bakteri adhezyonu yönünden önem taşır. Bakteriyel ataşman fenomeninin bakteri duvarıyla organik film arasındaki spesifik etkileşim olduğu bildirilmiştir(11,30,55). Bakteri hücrelerini bağlayabilen bazı tükürük komponentlerinin HA yüzeylerinden izole edilen filmin yapısında olduğu gösterilmiş ve tükürüğün büyük moleküllü glikoproteinlerinin streptokok kolonilerinin agregasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir(32). Bakterilerin Ti yüzeylerdeki davranışları HA kadar detaylı incelenmemiştir. Streptokokkus Mitior, Streptokokkus Sanguisle yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar S.Mitiorun Ti yüzeylere adhezyon insidansının yüksek olduğunu göstermiştir(22,32,35). Mikroorganizmaların farklı yüzeylerde gösterdikleri adhezyon karakterlerini Fine ve arkadaşları(21) yüzey özelliklerine ve protein filmin kompozisyonuna bağlamışlar, Kraus ve arkadaşları ise bu protein filmin kompozisyonunun ilk bakteriyel ataşmanı başlatabileceği kadar durduracağını da bildirmişlerdir(42,63). Ti'un başarılı kullanımları giderek artmakla birlikte enfeksiyon, başarısızlı-

ğın başta gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. İmplant yüzeyinin özellikleri, hücre duvarı ve İnterface denilen alanda bulunan protein film, primer hücre ataşmanını ve kolonizasyonunu başlatan faktörlerdir. Vücuda yerleştirilen diğer implantların aksine dental implantlar enfeksiyon potansiyeli yüksek bir ortamla bağlantı halindedirler. Ti yüzeylerdeki protein tabakasının bakteriyel ataşmandaki rolü nedeniyle implant yüzeyinde yerleşerek enfeksiyona neden olabilecek bakterilerin geleceği bu protein tabakasının kompozisyonuna bağlı olacaktır(83).

Bu çalışmayı HA ve Tİ yüzeylerdeki protein filmin varlığını ve karakterini araştırmak ve her iki yüzey arasındaki farklılıkları ortaya koymak amacıyla yaptık.

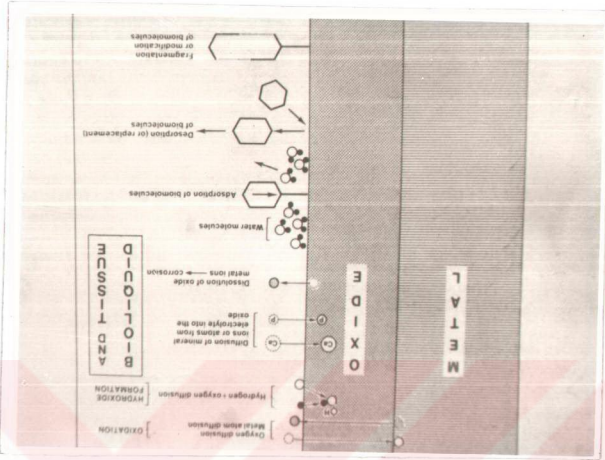


Şekil 1: Protein molekülünün konformasyonu ve iskeletsel yapısı (Weast'dan)

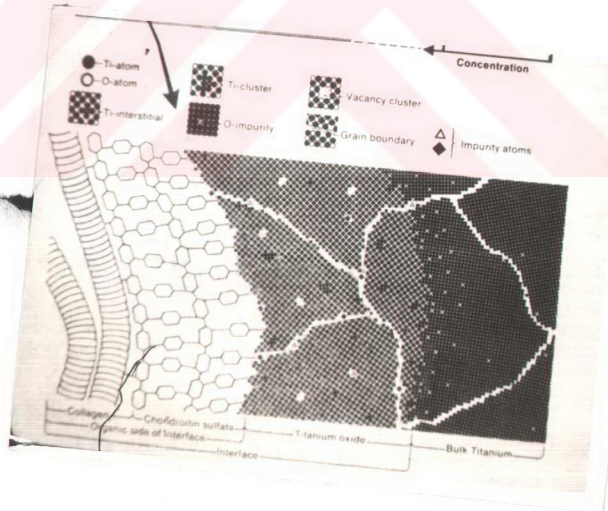


Şekil 2: Protein molekülünün açılmış şekli (Weast'dan)

Şekil 4: Ti yüzeylerindeki iyon alış-verişi (Kasemo'dan)



Şekil 3: Ti metalinin kristal yapısı (McAlarney'den)



## GEREÇ VE YÖNTEM

### Tükürük Toplanması ve Hazırlanması

Çalışmaya herhangi bir sistemik hastalığı olmayan yaş ortalaması 28 olan 30 kişi katıldı. Tükürük toplama işlemlerinin tümü öğleden önceki bir saatte yapıldı ve deneklere yemek yemeden gelmeleri söylendi. Tükürük bezlerinin stimülasyonu parafin kağıt çiğnetmekle sağlandı. Her denekten 20 ml. kadar karışık tükürük toplandı. Bu iş için 50 ml.lik soğutulmuş erlenmayerler kullanıldı. Toplanan tükürük bekletilmeden hidrofilik özelliği minimal olan özel olarak hazırlanmış corex tüplerine aktarıldı. tükürüğün içinde bulunabilecek artık ve dökülmüş hücreleri ayırmak amacıyla 10 dak. süreyle 9000 rpm.de santrifüje edildi. (Du Pont Sorval RC5)

### Yüzeylerin Hazırlanması

Hidroksiapatit (HA) (BDH Chemical Gallard Schlesinger) partikülleri ve Titanium (Ti) tozu (Aesar % 99.9 Lot no: 19-837) çalışılacak yüzeyler olarak seçildi. Her iki materyal 0.75 gr.lık kısımlara bölündü ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı.

### Tükürük Proteinlerinin İn Vitro Adsorpsiyonu

Tükürük proteinlerinin HA ve Tİ yüzeylere adsorpsiyonu önceden hazırlanarak ayrılmış olan bu tozların santrifüje edilmiş tükürükteki inkübasyonu ile sağlandı. Dakikada 90 salınım yapacak şekilde ayarlanan vertikal karıştırıcıya yerleştirilen coreks tüpleri 1.5saat süreyle oda ısısında bekletildi. İnkübasyonu takiben katı fazı çökertmek amacıyla 9000 rpm.de santrifüje edildi. Süpernatant (geri kalan) tükürük total protein tayini amacıyla ayrıldı. Partiküller distile suyla yıkandı. Tükürüğün ortamdan tam olarak uzaklaştırılması için yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı ve her yıkama işleminin sonunda yine 9000 rpm'de santrifüje edildi. Kullanılan distile su kontrol amacıyla saklandı. Partikül yüzeylerine adsorbe olan proteinlerin ekstraksiyonu için 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH7) çözeltisi kullanıldı. 5 ml  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  çözeltisi ve tükürükle inkübe edilmiş HA, Ti partikülleri vertikal karıştırıcıda 90 dak. süreyle karıştırıldı, ekstraksiyonu kolaylaştırmak amacıyla her 10 dakikada bir olmak üzere tüpler horizontal yönde hareket ettirildi. Katı faz daha önce de olduğu gibi santrifüje ederek ayrıldı. Likit faz ise moleküler geçirgenliği 6000-8000 olan yarı geçirgen membrandan hazırlanmış torbacıklarda toplandı, +4 C'de 48 saat süreyle distile suya karşı dializ edildi. Dializ işlemi tamamlandıktan sonra membran torbacık steril bir makasla penetre edilerek torbacık içindeki likit tekrar bir corex tübüne aktarıldı. Ti ve HA yüzeylerden elde edilen bu örnekler kuru buz içinde tabaka tabaka donduruldu (Shell freezing) ve her örnek yaklaşık 20 saat süreyle liyofilize edildi. Liyofilizasyonu takiben ekstreler 1 ml. distile suyla çözüldü. Corex tüpünün çeperlerinde herhangi bir kayba neden olması için kullanılan miktardaki suyla tüp içindeki ekstrenin tamamının çözünmesine özen gösterildi. Daha sonra bu çözelti 1.5 ml. lik kapaklı pro-

pilen tüplere transfer edilerek Shell freezing işleminin ardından ikinci kez liyofilize edildi. Ekstreler bu defa 300 mikrolitre suyla çözüldü. HA ekstreleri için 300 mikrolitre distile su kullanılırken, Ti ekstreleri için aynı kişiden yukarda açıklanan şekilde elde edilen 3 örnek bir araya toplanarak 300 mikrolitrelik çözelti elde edildi. Böylece Ti örneklerinin HA örneklerine göre 3 kez daha konsantre olması sağlandı. Elde edilen protein ekstreleri aşağıda sıralandığı gibi hem kalitatif hem de kantitatif yöntemlerle analiz edildi.

### **Total Protein Tayini**

Tükürükteki, HA ve Ti süpernatantlarındaki, partiküllerin yıkanma artıklarındaki ve iki yüzeyden elde edilen ekstrelerdeki total protein tayinin de kolorimetrik analiz tekniğinden yararlanıldı ve bunun için BIO-RAD total protein analiz kiti kullanıldı. Analizi istenen 0.2 ml.lik örnek 0.6 ml. de iyonize suyla seyreltildi ve daha sonra 0.2 ml. lik BIO-RAD aktivatörüyle reaksiyona sokularak 10-15 dak. bekletildi. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra dalga boyu 595 nm. ayarlanmış olan Spektrofotometrede (Perkin Elmer B-55) okundu. Bu analizde Bovine serum albumininin orantılı konsantrasyonları standart olarak kullanıldı. Böylece yoğunluğu bilinen standartların x-y koordinatları üzerinde çizilen eğrisi üzerinde spektrofotometrede okunan protein miktarlarının konsantrasyonları mg. cinsinden bulundu.



### Proteinlerin Kalitatif Analizleri

Albumin (Alb) laktoferrin (Lf) 7S IgA, 11S IgA lizozim, histidinden zengin proteinlerin kalitatif analizleri Rocket İmmunoelektroforez tekniği kullanılarak tayin edildi (Dr.Mandel tarafından ortaya konulan teknik)(80). Bu teknik 0.2 cm. kalınlığında ve 5x5 büyüklüğündeki özel olarak hazırlanmış cam planelere (plak) dökülen % 1'lik agaroz jelinde gerçekleştirildi. Analizde kullanılacak olan pipet erlenmayer ve volumetrik kaplar ısısı 56°-60° ye ayarlanmış olan su banyosuna yerleştirildi. Kullanılan agarın (Bio-Rad low motility) % 1'lik konsantrasyonunu elde etmek için 1 gr.lık agaroz 20 ml. stok tampon çözeltisi (Na Barbitol 39 gr. NaN<sub>3</sub> 6 gr. 5 lt. distile su ile glisin 168.8 gr. Tris (Tham) 135.6 3 lt. distile su) 30 ml. distile su ve 50 ml. PEG (Polietilengilisin) de çözüldü. Çözülme işlemi kaynayan su banyosunda tutulan 250 ml.lik erlenmayere konulan toz halindeki agarın polimerizasyonuna engel olmak amacıyla su banyosunun ısısı 56° de sabit tutuldu. Her bir protein için farklı konsantrasyonda olmak üzere sıvı halindeki bu ortama aranan proteine spesifik antiserum karıştırıldı (Cappel), daha sonra da jel özel olarak temizlenmiş ve yere olan paralelliği ayarlanmış olan yüzeylere yerleştirilmiş cam planelere pipetler yardımıyla döküldü. Her plate için yaklaşık 14 ml. agar jeli kullanıldı. Jel sertleştikten sonra en az iki en çok 12 saat olmak üzere 4°C'de bekletildi ve platein kenarından yaklaşık 0.5 cm. uzaklıkta olmak üzere "Well" denilen 13 adet kuyucuk açıldı. Bu kuyucukların her biri 6 lamdalık örnek alabiliyordu. Analizi yapılması amaçlanan proteine ait standartlar 100 ml.de 20 mg. dan başlamak üzere 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.628 mg. olacak şekilde seyreltildi ve bunları standartları bulunmak istenen örnekler izledi. Yükleme işlemi düşük gerilim altında ve LKB Multiphor elektroforez sisteminin sürekli



soğutulan yükleme levhası üzerinde yapıldı. Sistemde geçirgen olarak Stock tampon çözeltinin 1:4 oranında seyreltilmiş şekli kullanıldı (pH 8.6) Plate'in  $\text{cm}^2$  sine düşen elektrik akımı 4 miliamperden başlamak üzere saat başı arttırılarak 12 ve 20 miliampere yükseltildi. Elektroforez işleminin tamamlanmasından sonra plateler sıcak hava ile kurutuldu. Daha sonra da 15 dak. süreyle % 0.9'luk NaCl çözeltisinde stabilize edildi ve distile suyla çalkalandı. Jel üzerindeki suyun uçurulması bir miktar etanolle sağlanarak 0.025, % 0.125, % 0.25 konsantrasyonlardaki (Bio-Rad) Coomasie Brilliant Blue ile boyandı. Boyanın fazlası % 7'lik asetik asitle çıkartıldı. Aranılan proteinlerin mutlak değerleri içerdikleri protein miktarı mg. cinsinden agar içinde aldıkları mesafe cm. cinsinden bilinen standartların koordinat sisteminde gösterilmesiyle çizilen standart eğrisi üzerinde mg. cinsinden bulunmuş oldu.

### Örneklere Ait Proteinlerin Analizi

HA ve Ti örnekleri Ultrathin pore gradient Horizontal SDS elektroforezinde incelendi(72). Bu analiz için:

1- LKB2117 Multiphor System

2- LKB Elektrofocusing Constant Power Supply

3- Gradient Mixing Chamber sistemleri kullanıldı. Analiz için gerekli stok solüsyonları ise aşağıda açıklanacak biçimde hazırlandı. Alt jele ait tampon çözelti Lower gel Buffer (LGB): 182.2 gr. Tris (Hydroxymetil aminometthane), 0.4 gr. SDS (Sodium dodecylsulfat) volumetrik kaptan

100 ml. distile suyla çözüldü, pH'sı 8.8'e ayarlandı.

Üst jele ait tampon çözelti Upper gel Buffer (UGB): 6.05 gr. Tris, 0.4 gr. SDS volumetrik kapta 100 ml. distile suyla çözüldü. pH'sı 8.3'e ayarlandı.

Laemmlı tampon çözeltisi: 30.285 gr. Tris, 144.18 gr. glisin ile 1 lt. distile suda çözüldü ve pH'sı HCl ile 6.8'e ayarlandı.

#### SDS jel hazırlanması:

SDS gradient jel konsantrasyonu % 5'den % 30'a doğru artan alt bölüm ve % 4 konsantrasyondaki üst bölümden oluşmaktaydı. Kalınlığı 1 mm. olması istenen jel, önce distile su banyosundan sonra da metanol banyosundan geçirilmiş, kısa kenarlarından ikişer adet klampla sıkıştırılmış iki cam arasındaki mesafe 1.2 mm. kalınlığındaki plastik çubuklarla sağlanmış olan sisteme döküldü. Jelin alt bölümündeki degradasyon % 5 ve % 30 konsantrasyonlarda hazırlanan iki ayrı jelin Gradient karıştırıcıda karıştırılmasıyla sağlandı. Bunun için % 5'lik jel: 4 ml., % 30'luk akrilamid 6 ml., LGB, 14 ml. H<sub>2</sub>O, 50 mikrolitre % 10'luk ammonyumpersulfat ve 10 mikrolitre TEMED (Tetrametil etilen di amin) in karıştırılmasıyla, % 20'lik jel ise 6.66 ml. % 30'luk Akrilamid, 1.67 ml. LGB, 1.67 ml. % 75'lik sükroz 20 mikrolitre % 10'luk amonyumpersulfat ve 15 mikrolitre TEMED in karıştırılmasıyla hazırlandı. Daha sonra da karıştırıcının birinci haznesine % 20 konsantrasyondaki jel konuldu. İkinci haznedeki % 5 konsantrasyondaki jelle bileşik kaplar prensiplerine göre ve birinci hazneye yerleştirilen magnetik bir karıştırıcı yardımıyla bir taraftan giderek konsantrasyonunun düş-

mesi sağlanırken diğer taraftan birinci haznenin alt kenarına bağlanmış polietilen tüpten jelin yukarıda açıklanan biçimde hazırlanmış sisteme dökülmesi sağlandı. Jel istenilen yüksekliğe ulaşıncaya polietilen tüp kapatıldı ve sıvı halindeki jelin hava ile temasını kesmek ve böylece düzgün bir polimerizasyon sağlamak amacıyla etanol izolasyonu yapıldı. Polimerizasyonun tamamlanmasından sonra etanol ortamdan uzaklaştırıldı ve sistemin üst kısmına final konsantrasyonu % 4 olan jel döküldü. Bu jel 6.67 ml. % 30'luk Akrilamid, 12.50 ml. UGB, 30.38 ml. H 20,0.02 gr. amonyumpersulfat ve 100 mikrolitre TEMED'in karıştırılmasıyla hazırlandı. Sistemin üst 1/4 kısmını oluşturan bu kısım örneklerin yüklendiği kısımdır. Örneklerin yükleneceği bölümleri ayırmak amacıyla, dökülen jel polimerize olmadan Comb denilen aygıt sistemi üst kenardan kapatacak biçimde yerleştirildi. Polimerizasyonu takiben Comb çıkartıldı ve CamJel-Cam düzenindeki sandwich LKB Multiphor sistemine yerleştirildi. Tris glisin tampon çözeltisinin 100 ml. si % 10'luk 10 ml. SDS ve 890 ml. distile suyla karıştırılmasından elde edilen Laemmli tampon çözeltisi sistemde geçirgen olarak kullanıldı. Örnekler yüklenmeden önce örnek tampon çözeltisiyle 1/4 oranında dilüe olacak biçimde karıştırılarak 3 dak. süreyle kaynayan su banyosunda tutuldu. Bu şekilde hazırlanan örnek ve standartlar jele yüklendi. Kullanılan miktarlar x seviyesindeydi. Protein örneklerin jel içindeki durumunu ve ilerleyişini izlemek amacıyla % 0.001'lik Bromfenol Mavisli indikatör olarak örneklere ilave edildi. Bu analiz için moleküler ağırlıkları 200.000'den 14.000'e kadar olan proteinleri içeren Bio-Rad SDS-Page High Range 161-030 ve Bio-Rad SDS-Page Low Range 161-0304 protein standartları kullanıldı. Yükleme işleminin tamamlanmasından sonra sistem yüksek gerilime bağlandı. Akım şiddeti ise yavaş yavaş yükseltilerek 80 miliampere getirildi ve proteinlerin vertikal yönde jelin alt kenarına doğru ilerlemesi

yaklaşık 8 saat kadar sürdü. Brom Fenol Mavisini jelin alt kenarına ulaştığında akım durduruldu. Jel tampon çözelti banyosu içinde sistemden serbestlendi ve ortadan ikiye ayrılarak yarısı Southern-Western Blot analizi için, diğer yarısı coomasie ve gümüş boyama metodu için kullanıldı.

#### Jelin Boyanması:

Sistemden çıkartılan jel önce 2.75 gr. Coomasie Brilliant Blue, 500 ml. % 10'luk Metanol, 500 ml. distile su ve 100 ml. Glasial Asetik Asitin karıştırılmasıyla elde edilen boyada yaklaşık 1 saat bekletildi. Boyanın fazlası 75 ml. glasial asetik asit, 50 ml. etanol ve 875 ml. distile suyun karışımı ile elde edilen solüsyonda bekletilerek çıkartıldı. Coomasie ile boyamanın ardından gümüş boyama tekniği uygulandı. Bunun için önce Coomasie'nin tümünü çıkartmak amacıyla jel 500 ml. distile su, 500 ml. metanol, 100 ml asetik asit içinde bekletildi. Daha sonra da gümüş boyama için % 40 metanol % 10 asetik asitte 30 dak. ve % 10 etanol % 5 asetik asitte 15 dak. bekletildi. Tespit işleminden sonra Bio-Rad Silver Stain kitinde bulunan oksitleyici ile 5 dak. oksitlendi. Meydana gelen sarı renk yok oluncaya kadar deiyonize su ile birkaç kez yıkandı, gümüş aktivatörde 20 dak. bekletildi. Jel daha sonra sodyum karbonat ve paraformaldehid içeren banyoda yaklaşık 10 dak. süreyle tutuldu. Reaksiyon % 5'lik asetik asit solüsyonuyla durduruldu. Jel 1 numara Whatman kağıtları arasında ve vakumlu kurutucularda kurutularak saklandı.

#### Protein Karakterizasyonu

Jelin boyanan yarısında görülen proteinlerin karakterizasyonu,

örneklerin simetrik olarak yüklendiği diğer yarısının Southern Western Blot tekniğini kullanarak nitrosellüloz kağıda transferiyle sağlandı(18,75). Bu işlem için Trans-Blot apareyi kullanıldı. Transferi istenen jel öncelikle 25 mM  $\text{Na}_2\text{NPO}_4$  (pH 9.15) solüsyonda bir saat süreyle stabilize edildi. LKB Elektrofocusing Constant Power aygıtına bağlanan transfer apareyi 100 mA. den başlamak üzere her 1/2 saatte arttırılarak 350 mA.'lik akım altında 12 saat süreyle bekletildi. Transfer işleminin tamamlanmasından sonra nitrosellüloz kağıt % 3'lük Bovine serum albumini (BSA) (Sigma Bovine alb. Fraction 5 % 9699) içeren Tris,Buffer-Saline (TBS) (pH7.4) tampon çözeltisi içinde (10 mM Tris, % 0,8 NaCl, % 0.03  $\text{NaN}_3$ ) 1 saat süreyle stabilize edildi. Daha sonra nitrosellüloz kağıt iki tür antiserayla reaksiyona sokuldu:

1- % 3'lük BSA, % 5'lik CS (Calf Serum) ve TBS. Tampon çözeltinin her 3 ml. için 100 ml antisera kullanıldı. Bunlar karakterizasyonu yapılacak olan proteine karşı tavşanda hazırlanmış olan Antihuman IgA, Lf, IgG, Alb (Cal. Behring Biomedikal USA) kullanıldı. Nitrosellüloz kağıt bu çözeltinin içinde 37°C de 1 saat kadar inkübe edildi. İkinci antiserayla reaksiyona girmeden önce de TBS pH 7.4 tampon çözeltisinde 20 dak. süreyle yıkandı.

2- Yıkanan nitrosellüloz kağıt bu defa 200  $\mu\text{l}$  peroksidaz konjuge Goat-Anti Rabbit immunoglobulinleri içeren (Heavy and Light chain spesifik Cooper Biomedical Cappel USA) 40 ml. BSA, Cs, TBS çözeltisiyle 37°C 45 dak. inkübe edildi. Daha sonra da nitrosellüloz kağıt TBS (pH 7.4) çözeltisinde 45 dak. yıkandı.

Bu işlemlerden sonra 250  $\mu$ l benzidin dihidroklorit 40 ml. TBS içinde çözülerek % 30'luk 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi ve nitrosellüloz kağıt bu çözelti içinde bekletilerek aranılan proteinlere ait bandların oluşması izlendi. Daha sonra da distile suyla yıkanarak filtre kağıdında kurutuldu.

### **Protein Molekül Ağırlıklarının Tayini**

SDS PAGE jel analizlerinde varlığını gösterdiğimiz ve karakterize ettiğimiz proteinlerin molekül ağırlıkları moleküler ağırlığı bilinen standartlara göre hazırlanan eğri yardımıyla saptandı. Bunun için jel üzerinde her bandın jelin üst ve alt kısımlarının birleşme sınırına olan uzaklığı mm cinsinden ölçüldü. Koordinatların semilogaritmik kağıda aktarılmasıyla migrasyona göre moleküler ağırlığı bilinmeyen proteinlerin ortalama değerleri bulunmuş oldu.

## BULGULAR

HA ve Ti yüzeylerin yukarda açıklanan yöntemlerle yapılan protein analizleri iki yüzey arasında protein bağlama yönünden kalitatif ve kantitatif farklılıklar olduğunu göstermektedir.

### Total Protein'in Kantitatif Analizleri

Karışık tükürük, HA ve Ti ile inkübe edilmiş tükürük analizleri inkübasyondan sonra karışık tükürüğün total protein miktarlarının HA ile inkübe edilmiş olan tükürükte % 13.9, Ti ile inkübe edilmiş olan tükürükte ise % 9.47 oranında azaldığını göstermektedir (Tablo 1). Yüzeylerden ekstrakte edilen proteinlerin gerçek değeri karşılaştırıldığında HA örneklerinin Ti örneklerine göre 13.33 kez fazla protein içerdikleri görülür. Adsorbe olan total proteinin miktarı mg/dl cinsinden tablo 2'de görülmektedir.

## **İmmunoelektroforez Yöntemiyle Proteinlerin Kalitatif Analizleri**

Albumin Laktoferrin, lizozim 7S IgA 11S IgA, Histidinden zengin proteinlerin kalitatif analizleri HA ve Ti yüzeylerinin bu proteinleri bağlama kapasitelerinde anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir. HA ekstrelerinden elde edilen örneklerin ayrı ayrı yapılan IgA analizleri her HA ekstresinde IgA'nın varlığını kantitatif olarak ortaya koymuş olmasına rağmen Ti'a ait ekstrelerde IgA'nın ölçümü yapılamadı. Çünkü örneklerdeki IgA konsantrasyonu kullanılan analizin duyarlılık derecesinin altındaydı. Bu sınırın üzerine çıkabilmek amacıyla değişik örnekler bir araya toplanarak IgA analizi yapıldığında Ti örnekler içindeki IgA miktarı immunoelektroforezle tayin edilebilecek seviyede olduğundan Ti örneklerdeki IgA'nın varlığı gösterilmiş oldu. Bundan başka laktoferrin, albumin, lizozim ve HRP varlığı hem HA yüzeylerden, hem de Ti yüzeylerden elde edilen ekstrelerde kalitatif olarak gösterildi (Resim 1, 2).

## **Örneklerdeki Protein Yapısının Tayini**

Örneklerin kalitatif olarak SDS Poliakrilamid jel elektroforeziyle yapılan analizlerinde Coomasie ile boyanan jeller analizi yapılan örneklerdeki proteinlere ait bandları gösteremedi. Bu nedenle duyarlılık derecesi Coomasie boyasından birkaç kez fazla olan gümüş boyası kullanıldı(50). Gümüşle boyanan jeller incelendiğinde (Res. 34) seçici adsorpsiyonun olduğu gözlemlendi. Ti'a ait tüm bandlar HA ekstrelerinde görülürken, bazı bandların Ti ekstrelerinde görülmediği bazılarının da boyanmasında HA'a



göre farklılıklar olduğu saptandı. Karşılaştırılan örneklerden bandların daha iyi değerlendirilmesi için örneklerin konsantrasyonları relatif olarak eşitlenmeye çalışıldı. Bunun için Ti yüzeye ait ekstrelerin HA yüzeylerden elde edilen ekstrelerle göre 9 kez daha konsantre olması gerektiği bulundu. Bu şartlar altında hem HA hem de Ti'a ait örneklerde albumin bölgesine rastlayan alanda oldukça koyu boyanmış birbirine yakın iki band görüldü. Bu bandların boyanma yoğunlukları HA'e göre az da olsa Ti'un diğer bandlarına göre en koyu boyananlarıydı. HA ve Ti ekstrelerinde dikkati çeken ikinci önemli alan standartlara göre prolinden zengin proteinler bölgesine uymaktaydı.

Her iki yüzeye ait ekstrelerde büyük moleküllü proteinlere ait kuvvetli bandlar görülmedi. HA'e ait kolonlarda görülen son derece zayıf ince bandlar Ti ekstrelerinde zorlukla seçilebiliyordu. Bu bandların hemen altında yer alan bir başka büyük moleküllü protein olan IgA hem HA ve hem de Ti'a ait ekstrelerde, standartlardaki IgA bölgesine uyan iki net çizgi olarak ortaya çıktı. Buna karşılık karışık tükürük ve Ti ekstrelerine ait örneklerde hafif olarak görülen ve laktoferrin bölgesine uyan band ise HA örneklerinde oldukça belirgin boyanmıştı.

Daha küçük moleküllü proteinler seçici adsorpsiyon tarzı gösterdiler. Bu seçicilik tüm örneklerde kendini tekrarladı. Genel olarak karşılaştırıldığında bu bandların HA ekstrelerinde Ti ekstrelerine göre daha koyu boyandığı görüldü. Bununla birlikte Ti'a ait örneklerdeki küçük moleküllü bandlardan sadece biri HA örneklerinde aynı bölgeye rastlayan banda göre keskin ve netti. Buna karşılık HA örneklerinde bu bandın hemen üzerindeki band oldukça belirginken, Ti örneklerinde ise zorlukla seçilebiliyordu.

Diğer bir fark da albumin bölgesinin alt sınırındaki en koyu boyanan bandın hemen altında Ti'da görülmeyen ilave bir bandın bulunmasıydı.

Farklı deneklerden toplanarak elde edilen ve ayrı ayrı birçok sayıda analizleri yapılan HA ve Ti yüzeylere ait ekstreler ısrarla aynı seçici adsorpsiyonu gösterdiler. Bireysel farklılıklar bu bandların relatif boyanma yoğunluklarını etkileseler de yukarda sözü edilen seçici adsorpsiyonun şekli değişmedi.

### **Protein Transferi**

Nitrosellülöz kağıda transfer edilen proteinlerden albuminin hem HA hem de Ti'a ait ekstrelerdeki varlığı immunolojik olarak gösterilirken, IgG sadece HA ekstrelerinde bulundu. Buna karşılık IgA ise her iki ekstrede vardı. Analizlerde daha küçük moleküllu APRP, Lz ve CRP'in varlığı araştırıldı. CRP dışında diğer proteinlerin her iki yüzeye ait ekstrelerde bulunduğu gösterildi. Bir diğer önemli protein olan Lf, HA ekstrelerinde gösterildiği halde Ti ekstrelerinde bulunamadı.

### **Moleküler Ağırlıkların Tayini**

Semilogaritmik kağıtta büyük ve küçük moleküllu protein standartlarına göre çizilen eğri üzerinde (Grafik 1) HA ve Ti ekstrelerine ait örneklerin yaklaşık değerleri en küçükten büyüğe doğru olmak üzere aşağıdaki gibidir. Ti örneklerinde en küçük belirgin band 12.250 dalton olarak

bulundu. Bu bandı HA ve Ti ekstrelerinde görülen birbirine yakın üç band izledi. Yaklaşık moleküler değerleri sırasıyla 13.750, 14.00, 15.000 olarak hesaplandı. Bu gruptan sonra görülen bir diğer band grubunun ise HA ekstrelerine spesifik, yaklaşık 21.500 dalton büyüklüğündeki proteinlere ait bandla başladığı görüldü. Bu bant Ti ekstrelerinde yok denebilecek kadar silik görülüyordu. Daha sonraki band grubunun ise fazla koyu boyanmadığı ve molekül ağırlıklarının 31.000 ile 39.000 dalton arasında olduğu bulundu. Buna karşılık bir sonraki koyu boyanan grup HA'e spesifik 55.000 dalton molekül ağırlığındaki proteine ait bandla başlıyordu. Bu grup jel analizlerinde görülebilen en son band grubuydu. Daha sonraki bandların oldukça açık renk olduğu izlendi. Her iki ekstrenin analizlerinde bu bölgede görülen ve açık renk boyanan birbirine yakın üç banda ait proteinlerin molekül ağırlıkları 110.400, 112.000, 132.000 dalton olarak hesaplandı. Bu grubuda her iki örnekte görülen açık fakat belirgin boyanan, molekül ağırlığı yaklaşık 180.000 ve 225.000 olan iki band izliyordu.

HA ve Ti ekstrelerine ait majör bandlar Commercial Bio-Rad SDS Page standartlarına göre incelendiğinde her iki grupta en küçük moleküler ağırlıklı proteinlere ait bandların mol. ağırlığı 12.000 daltondan başlayan lizozim ve histidinden zengin proteinler olduğu düşünüldü. Örneklerde ilk göze çarpan grup standartların Hen egg White protein bölgesine rastlamaktaydı. Bunu izleyen ikinci bölge ise fosfoprotein bölgesine uyuyordu. Bu bandlar mol. ağırlığı 21.000 olan Tripsin inhibitörü ile 31.000 dalton olan karbonik anhidraz arasındaydı. Üçüncü önemli bölge ise standartlardaki Ov-albumin ve Bovine serum albumin bölgesine rastlamaktaydı (45.000 66.000) Albumin bölgesinin üzerindeki alanda her iki yüzeye ait ekstrelerde kuvvetli boyanan bandlar görülmedi. Bu jelin kapasitesinin 10.000 dal-

ton ile 300.000 dalton arasında olduğu hatırlanarak yukarda varılan sonucun ancak bu sınırlar içindeki proteinleri kapsadığı unutulmamalıdır.

Jelin alt bölümüne rastlayan daha küçük molekülü proteinler oldukça seçici bir adsorpsiyon tarzı gösterdiler. Bu seçicilik tüm örneklerde kendini tekrarladı. Genel olarak karşılaştırıldığında bu bandların HA ekstrelerinde Ti ekstrelerine göre daha koyu boyandığı görüldü. Bununla birlikte Ti'a ait örneklerde küçük molekülü bandlardan sadece biri HA örneklerinde aynı bölgeye rastlayan banda göre kesin ve netti. Buna karşılık HA örneklerinde bu bandın hemen üzerindeki band oldukça belirginken, Ti örneklerinde ise zorlukla seçilebiliyordu. Diğer bir fark da albumin bölgesinin alt sınırındaki en koyu boyanan bandın hemen altında Ti ekstrelerinde görünmeyen ilave bir bandın bulunmasıydı.

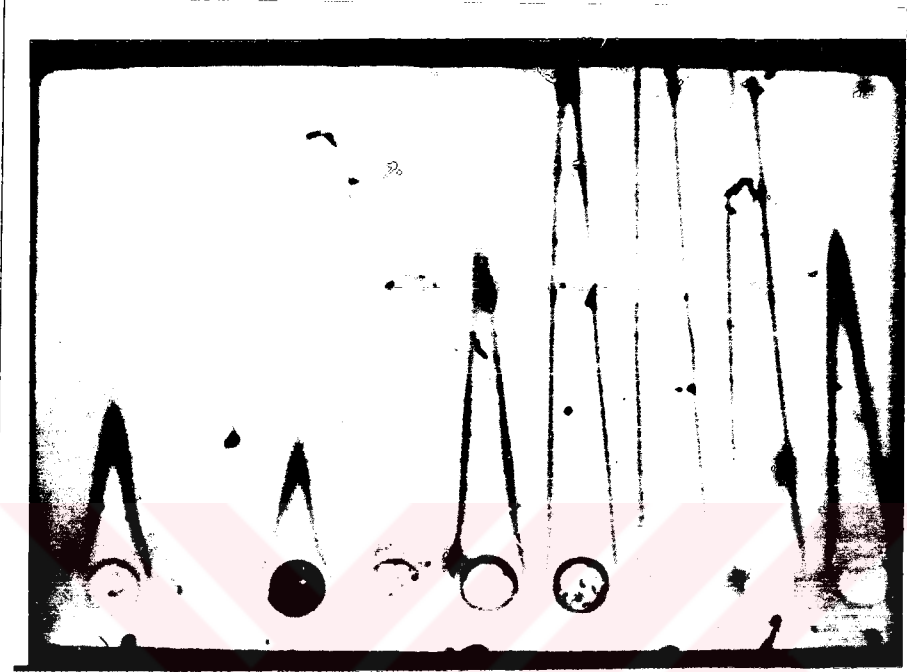
Farklı örneklerden elde edilen ve ayrı ayrı birçok sayıda analizleri yapılan HA ve Ti yüzeylere ait ekstreler ısrarla aynı seçici adsorpsiyonu gösterdiler. Bireysel farklılıklar bu bandların relatif boyanma yoğunluklarını etkilese de yukarda sözü edilen seçici adsorpsiyonun şekli değişmedi.

**Tablo I**  
(HA ve Ti ile işlem görmüş tükürüklerin kantitatif analizleri)

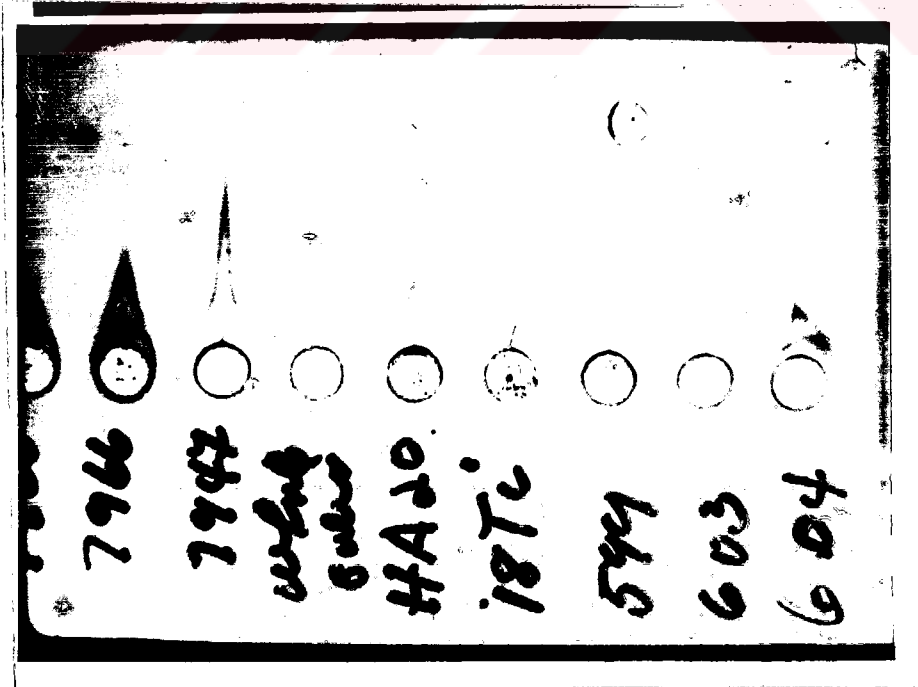
n:25	Karışık Tükürük	HA ile	Ti ile
Total protein (mg/dl)	108.73	93.70	100.10
% Adsorption	-----	13.90	9.47

**Tablo II**  
HA ve Ti ekstralarının Kantitatif Analizleri  
(Ortalama + Standart Sapma)

n:28	HA	Ti	Karışık Tükürük
Total protein	7.4200	0.5570	129.80
7 S IgA	0.0336	0.0012	1.00
11S IgA	0.9300	0.0045	3.00
Laktoferrin	0.0550	< 0.0005	1.40
Albumin	0.1290	< 0.0005	6.75
Lizozim	0.0870	0.0047	0.78
HRP	0.0026	< 0.0005	0.35



Resim 1: Rocket İmmunoelektroforez analizleri



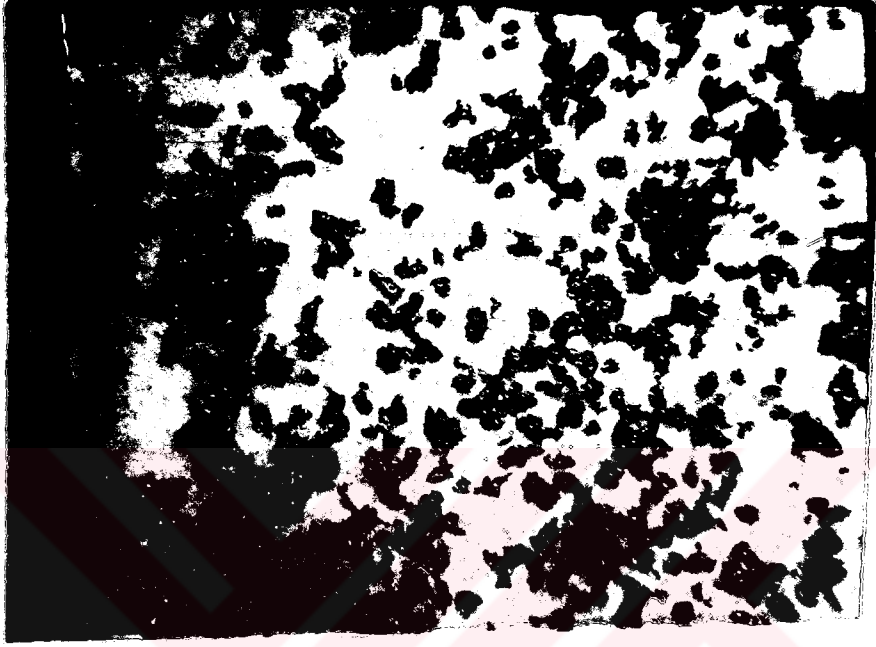
Resim 2: Rocket immunoelktroforez analizleri



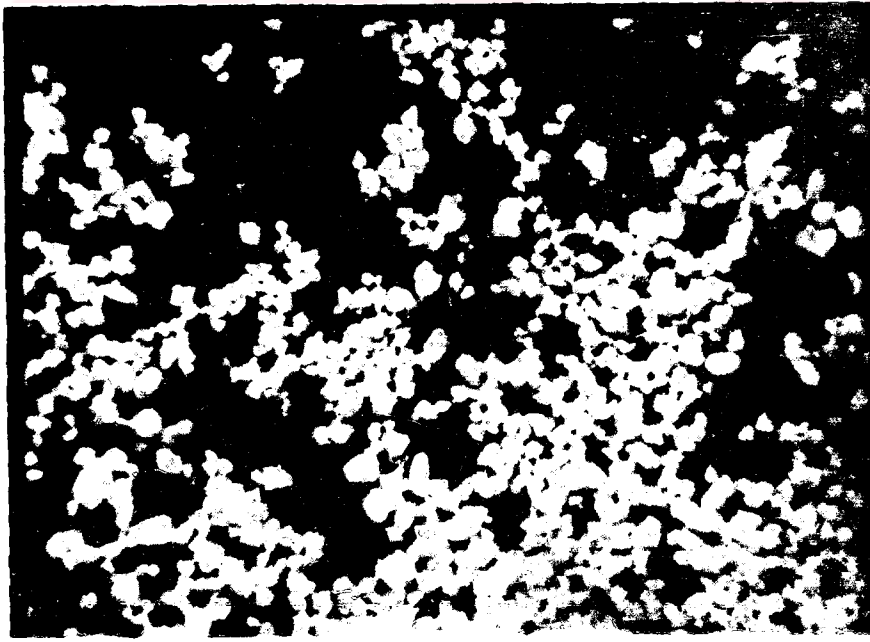
Resim 3: SDS poliakrilamid jel analizleri



Resim 4: SDS poliakrilamid jel analizleri



Resim 5: Ti tozlarının mikroskop altındaki görüntüsü

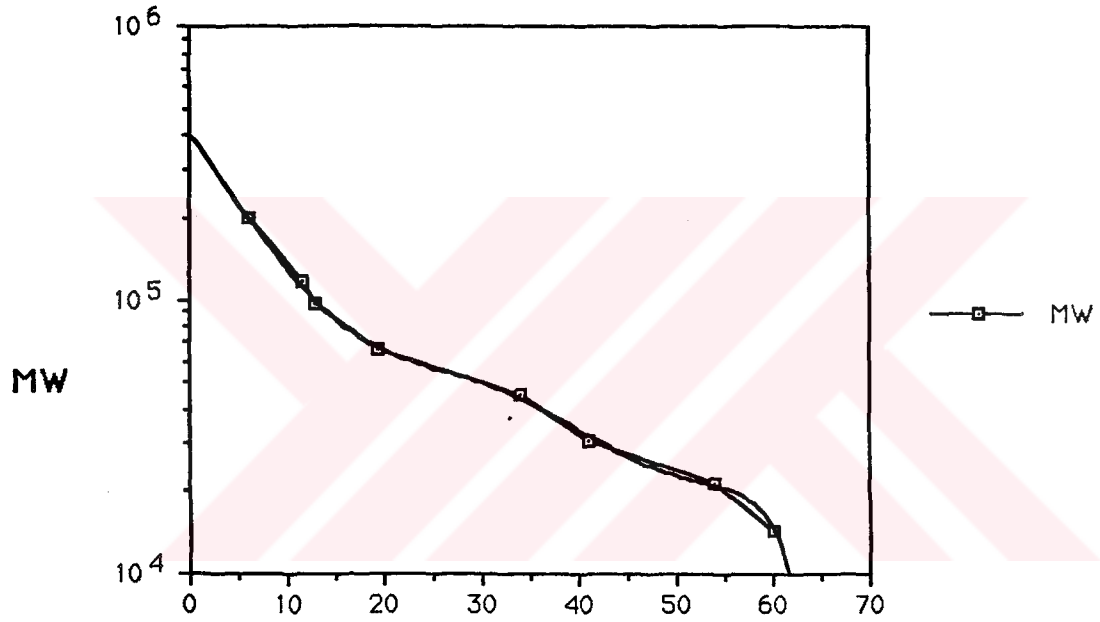


Resim 6: HA tozlarının mikroskop altındaki görüntüsü



**Molekül ağırlığı standardı eğrisi**

$$y = 4.0507e+5 - 4.7511e+4x + 2640.5x^2 - 73.261x^3 + 0.98098x^4 - 5.0598e-3x^5 \quad R^2 = 0.999$$

**Migrasyon**

## T A R T I Ő M A

Bu çalışmanın sonuçları Ti ve HA yüzeylerde oluşan organik film yapılarında ısrarlı ve anlamlı farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır. Hem kalitatif hem de kantitatif olan bu farklılıklar, doğurdukları sonuçlar yönünden önem taşırlar.

- Adsorpsiyon fenomeni biokimyasal olduğu kadar fiziksel etkileşimler zinciridir.

- Tükürük proteinleri farklı yüzeylerde farklı ataşman karakteristikleri göstermektedir.

- Farklı kişilerden alınan örnekler karşılaştırıldığında kalitatif farklılıklar görülmemesine rağmen kantitatif farklar ve kişiye bağlı varyasyonlar ilgi çekicidir.

- Ti yüzeylerde oluşan protein filmin hem hücresel hem de bakterial ataşmanın sağlanmasıdaki hazırlayıcı etkisi, implantın uzun dönemdeki başarısında rol oynar. Bu da konunun önemini ortaya koymaktadır.

Elde edilen protein ekstreleri incelendiğinde görülen kantitatif farklılıklar anlamlıdır. Bu farklılıkların sayısız tekrarlarda aynı sonuçları vermiş olması HA yüzeylerin Ti yzeyele göre çok daha fazla protein bağ-

lama kapasitesi olduğunu göstermektedir. İki yüzey arasındaki adsorpsiyon farklılıkları HA'in daha önce de sözü edilen yüksek reaktivitesine bağlanabilir(54).

Bennick ve arkadaşlarının da bildirdikleri gibi(13) bu sonuçlar yüzey kimyasının adsorpsiyondaki önemini vurgulamaktadır. Şüphesiz daha önce sözü edilen faktörlerin adsorpsiyona olan hazırlayıcı etkileri HA için Ti göre çok daha fazladır. Ancak her şeye rağmen Ti yüzeylerde organik bir filmin varlığı ve yapısına giren proteinler bu çalışmada ortaya konmuştur.

İleri sürülecek sorulardan biri çalışmada kullanılan yüzeylerin formları olabilir. Çalışılan yüzeyi ve buna bağlı olarak çalışılacak protein miktarını arttırmak amacıyla HA ve Ti'un toz şekilleri tercih edildi. HA (Resim 5) partikülleri mikroskop altında düzgün dairesel veya eliptik tane-cikler olarak görünmelerine rağmen Ti (Resim 6) partikülleri irregular şekilli düzgün olmayan yüzeyler olarak görüldü. 100 mikron ve üzerindeki düzensizliklerin mekanik yönden bazı sonuçlar doğuracağı bilinmektedir. Yüzey düzensizliklerinin 1-100 mikron arasında olduğu hallerde ise yüzeyle temas halindeki makromoleküllerin iskeletsel yapısında bazı değişiklikler beklenebilir.

İskeletsel yapıdaki değişikliklerin, implant yüzeylerindeki önemli parametrelerden biri olan elektro-magnetik alanı ve buna bağlı olarak Bjursten'in de bildirdiği gibi(14) moleküllerin adsorpsiyonunda rol alan Van der Waal's kuvvetlerini etkilemesi olağandır. Bu nedenle protein adsorpsiyonu yüzey düzensizlikleri yönünden değerlendirildiğinde, implant yüzeylerdeki adsorpsiyon sürecinin yüzey topografisinden etkilenmiş olması düşünülse de, Ti yüzeylerdeki total protein miktarı ve adsorpsiyona etkili faktörler de gözönüne alınırsa bu etkileşimin minimal düzeyde olacağı açıktır.

Tükürük proteinlerinin farklı yüzeylerdeki adsorpsiyon karakterleri daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Juriaanse(38) mine ile

HA'in Fine ve arkadaşları ise mine ve sementin adsorptif kapasitelerini karşılaştırmışlar, bulunan anlamlı sonuçları organik ve inorganik komponentler arasındaki farklılıkları ve kristal yapıların büyüklüklerine bağlamışlar, aynı çalışmada bazik proteinlerin semente olan affinitelerinin mineye göre çok daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ruan ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada mine ve sementin adsorptif kapasitelerini kalitatif yönden karşılaştırmışlardır(62). Bizim çalışmamızda da HA ve Ti'un adsorptif kapasiteleri arasında anlamlı farklılıklar bulundu. Kimyasal yapılarındaki benzerliğe rağmen mine ve sementin farklı adsorpsiyon karakteristikleri gözönüne alınırsa, tükürük proteinlerinin Ti yüzeylerde çok farklı bir tavır alması olağandır. Ti ve HA yüzeylerden elde edilen protein ekstreleri çoğunlukla kantitatif farklılıklar göstermelerine rağmen bazı kalitatif farklılıkların varlığı dikkati çekmektedir. Kantitatif farklar SDS jel ile gözlemsel olarak boyanma yoğunluklarının karşılaştırılmasıyla gösterilebildiği gibi, total protein ve immunoelektrofores analizleri her iki yüzeyin bağlama kapasitelerini ortaya koymaktadır.

Kalitatif olarak SDS jelin incelenmesinden sadece Ti'a özel bir proteinin bulunmadığı, HA yüzeylerden elde edilen ekstrelerde görülen bandların bir kısmının Ti ekstrelerinde bulunduğu gözlenmiştir. Her iki yüzeyin ekstrelerinin jel analizleri karşılaştırılacak olursa küçük moleküllu proteinlerin seçici bir bağlanma gösterdikleri dikkati çekmektedir.

Ti ekstrelerinin analizi lizozim (Lz) standartlarının görüldüğü küçük moleküllu proteinler bölgesinde net ve belirgin iki bandın varlığını ortaya koymuştur. Diğer bir deyişle Western Blot analizlerinde de nitroselüloz kağıtta rabbit-anti-human lizozimiyle reaksiyon verdiğiinden SDS jelde görülen bu bandlardan biri katyonik protein olan lizozimdir. Daha önce de belirtildiği gibi lizozimin affinitesinin organik inorganik matrisle ve kristal yapıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Buna karşılık gözlemlerimiz Lz'in Ti'a olan geçici affinitesinin organik etkenlerden çok implantın yüzey özelliklerine ve protein molekülünün elektriksel yüküne bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Küçük molekülü proteinler bölgesinde saptanan diğer band Histidinden zengin proteinler bölgesine uyar. Bu proteinin de Lz gibi katyonik olduğu hatırlanırsa, seçici affinitede iyonik etkileşimin rolü ortaya çıkar.

Vertikal jelde görülen bir diğer belirgin grup ise HRP ve Lz'e göre daha yukarda yer alan ve relatif olarak büyük molekülü fosfoprotein bölgesine uymaktadır. Bu grup içinde her iki yüzeyden elde edilen ekstrelerde görülen ve daha önce mine yüzeylere affinitesi gösterilmiş olan(13,28) prolinden zengin proteinler yer almaktadır.

Ayrıca Hay, statherin ve bazı fosfoproteinler tükürükte kendiliğinden kristal oluşumunu inhibe ederek minenin kristal yapısının sürekliliğini koruduğunu(29), Juriaanse ise mine yüzeylerde fosfat grubu dominant olduğundan, negatif yüklü proteinlerin büyük bir olasılıkla Ca ile reaksiyona gireceğini ve etkileşimin amino asit, OH grupları vasıtasıyla olduğunu ileri sürmüştür(38). Bizim çalışmamızda Ti ve HA yüzeylerden ekstrakte edilen örneklerin vertikal jelde incelenmesinden fosfoproteinlerin her iki gruba ait örneklerdeki majör komponentlerden biri olduğunu göstermektedir. Bu spesifik protein bağlanma mekanizması görüldüğü gibi daha çok kimyasal temellere dayanmaktadır. Ti yüzeylerde fosfoproteinlerin HA yüzeylere göre çok daha az bir düzeyde tutunması her iki yüzey arasındaki "Free Surface Energy" (serbest yüzey enerjisi) farklarına ve kimyasal yapılarına bağlanabilir. Her iki yüzeyin fosfoproteinler yönünden adsorptif kapasitelerindeki farklar jel analizlerinde de açıkça görülmektedir.

Her iki yüzey arasındaki farklar prolinden zengin proteinler incelendiğinde de görülmektedir. Orstavik ve arkadaşları tarafından(55) HA yüzeylerdeki majör proteinlerden olduğu bildirilen prolinden zengin proteinler bizim çalışmamızda da ekstrelerdeki dominant protein olarak ortaya çıkmıştır. Ti ekstreleri için de aynı sonuçlar geçerli olmakla birlikte HA ekstrelerine göre daha çok açık boyanır. Bu durum serbest yüzey enerjisi ve kimyasal yapının adsorpsiyonda etkili olduğunu birkere daha düşündürmektedir.

Fosfoprotein grubundaki bir diğ er protein olan sisteinden zengin protein CRP'dir. Ancak ekstrelerin bu proteini iç erdiğ i ne immunoelektroforez ve ne de Western Blot teknikleriyle g österilebilmiştir.

Çalışmada kullanılan tükürüğün ve toplama yönteminin kritik bir rolü vardır. Titanyum çivisinin sonuç olarak karışık tükürük banyosunda olacağı gözönünde alınır sa, karışık tükürüğün en uygun şekil olacağı ortaya ç ıkar. Ekstereleri izole etme proçesi iç inde tükürüğün yapısındaki proteinlerin denatüre olmamaları iç in santrifüj hızının 9000 rpm geçmemesine özen g österildi. Ayrıca kullanılan deney tüplerinin çeperlerinde olabilecek adsorpsiyon gözönüne alınarak hidrofilik özelliğ i minimum olan tüpler kullanıldı. Böylece protein kaybının en az düzeyde kalması sağlandı.

Rölla(61) ve Ruan(62)'in çalışmalarında albumin'in HA yüzeylere olan affinitesini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise albuminin Ti yüzeylere de seçici affinitesi olduğu g österildi. Ancak HA ekstreleriyle boyanma yoğunlukları yönünden karşılaştırıldığında, her iki ö rnek iç in belirgin olan bu bölgenin HA yüzeylerden elde edilen ekstrelelere göre çok daha koyu boyandığı g örülmektedir. Her iki ö rneğ e ait analizlerde üçüncü önemli band olarak ortaya ç ıkan albuminin kantitatif analizleri de bu proteinin tükürükteki dominant pozisyonunu yansıtmaktadır.

Albuminden sonra gözlenebilen bir diğ er band ise laktoferrin bölgesine uymaktadır ve bu alan karışık tükürük analizlerinde izlenen laktoferrin bandına göre hafifçe koyudur. Bu da Ruan ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyum g östermektedir(62). HA ve Ti yüzeylere ait ekstreler laktoferrin yönünden karşılaştırıldığında bu proteinin HA'e olan affinitesinin Ti'a göre çok daha fazla olduğu g örülmektedir. Bu durum kantitatif olarak immunoelektroforez analizleriyle g österilmiştir.

Varlığı her iki yüzeyden elde edilen ö rneklerde g österilen IgA, SDS analizlerinde çok ince hafif bir band olarak g örünmektedir. IgA'nın HA yüzeylerdeki protein filminin bir komponenti olduğu bilinir(45). Bu nedenle çalışma daha öncekilerle uygunluk g östermekle kalmayıp, IgA'nın

HA yüzeylere olan affinitesinin Ti'a göre çok daha fazla olduğunu da ortaya koymaktadır. IgA tükürükte iki formda bulunur:

- 1- Serum IgA (7S)
- 2- Sekretuar IgA (11S)

Serum IgA gingival sulkustan sızıntıyla tükürüğe karıştığından miktarı son derece küçüktür. Bu nedenle tükürükteki varlığı bilinmesine rağmen, duyarlılık derecesi oldukça yüksek olan Western Southern Blot tekniği ile gösterilemedi. Nitrosellüloz kağıtta reaksiyon veren IgA ise serum ve sekretuar IgA standartlarına göre sekretuar IgA'dır.

Kaynağını gingival sulkustan alan ve SDS jelde vertikal kolonların başlangıcında yer alan bir diğer immunoglobulin ise IgG'dir. Bu çalışmada HA yüzeylerden elde edilen ekstrelerde IgG varlığı gösterilmiş ve karakterize edilmiş olmasına rağmen Ti yüzeylere IgG bağlandığı gösterilemedi. Bunda kullanılan yöntemin son derece düşük seviyedeki IgG'yi tespit etmeye yetmeyeceğinin etken olabileceği düşünülse de küçük moleküler ağırlıklı proteinlerin yüzeye olan affinitelerinin daha iyi olduğu gözden uzak tutulmamalıdır.

Büyük molekülü bir glikoprotein olan müsinin varlığı vertikal jelde gösterilememiş olmasına rağmen, jelin kapasitesi ve moleküler ağırlık faktörü dikkate alınırca incelenen ekstrelerde "mucin bulunmamaktadır" gibi kesin bir sonuca varmak yanıltır.

Daha önce de belirtildiği gibi bakteriyel ataşmanda rol alan moleküller HA yüzeylerdeki protein filmin yapısında bulunmaktadır. Bundan da sözü edilen moleküllerin ya bakterinin ataşmanı için reseptör görevi yaptıkları ya da ataşmanla bakteriyel agregasyonu sağlayarak bakterilerin elimine edilebileceği sonucu çıkar.

Yukarda varlığı gösterilmiş ve karakterize edilmiş olan proteinlerin klinik önemi bakteriyel ataşmana olan etkilerinden dolayıdır.

Örneğin küçük moleküllü ve katyonik bir protein olan lizozimin gram pozitif bakterinin hücre duvarında bulunan negatif yüklü Lipoteichoic asit ile iyonik etkileşimi daha önce bildirilmiştir(58). Bu proteinin sözü edilen seçici affinitesi, tükürükle kaplanmış Ti yüzeylerdeki Streptokokus Sanguis ve Streptokokus Mitior'un seçici bağlantısını açıklayabilir(35).

Daha önce de vurgulandığı gibi küçük moleküllü proteinler bölgesinde ortaya çıkan ve kendilerini birçok deneyde tekrarlayan bu proteinlerin S.Mitiorun Ti yüzeylere olan seçici affinitesini ne düzeyde etkileyebileceği, ilerde bu konuda araştırılması gereken sorulardan biridir.

S.Mitiorun agregasyonunda etkili olan tükürük proteinlerinin HA yüzeylere olan yüksek affinitesi Hay tarafından gösterilmiştir(27,52). S.Mitiorun Ti yüzeylerdeki seçici adhesif özelliği ya HA yüzeylerde bulunan agregasyon faktörlerinin Ti yüzeylerde bulunmaması ya da Ti yüzeylerde S.Mitioru bağlayıcı proteinlerin varlığıyla açıklanabilir.

Ti ekstrelerinde bulunan albuminin de lizozim gibi bakteri duvarında lipoteichoic asit ile reaksiyona girdiği bilinmektedir. Sonuçlara göre Ti yüzeyindeki protein tabakada bulunan albumin, HA yüzeyine göre az da olsa mikroorganizmalar için reseptör rolünü oynar.

Tükürükte bulunduğu gibi nötrofillerin ürünlerinden olan laktoferrinin Ti yüzeylerdeki adsorpsiyonu, bu enzimin bakteriostatik özelliği yönünden önem taşır. Laktoferrinin mikrobiyal agregasyon kalitesi Iacona tarafından bildirilmiştir(34). Demirin laktoferrin tarafından bağlanmasına bağlı olarak gelişen demir eksikliği mikroorganizmanın ölümüne neden olur. Bu nedenle Ti implantların yüzeylerinde karakterize ettiğimiz ve organik filmin yapısına giren laktoferrinin mikroorganizmalara karşı koruyucu bir fonksiyonunun olabileceği dikkate alınmalıdır.

Karakterize edilen bir diğer immunoglobulin sekretuar IgA'dır. Bu immunoglobulinin de bakteriyel agregasyonla ilgili olduğu ve özellikle S.Sanguisin agregasyonunda yer aldığı bildirilmiştir(45).



İmbedorf ise S.Sanguis'in Ti yüzeylere olan affinitesinin HA yüzeylere göre çok daha fazla olduğunu göstermiştir(35). Ayrıca IgA'nın HA ve Ti yüzeylerde gösterdiği kantitatif farklılıkları, S.Sanguisin Ti yüzeylerdeki varlığını ve daha düşük düzeydeki agregasyonunu açıklar.

Kısaca Ti yüzeylerde varlığını gösterdiğimiz protein filmin yapısını oluşturan lf, alb. APRP, HRP ve Lz'in yukarda belirtildiği gibi klinik önemleri vardır. Özellikle küçük moleküllu katyonik proteinlerin Ti yüzeylere olan affinitesi, Ti yüzeylerdeki selektif adsorpsiyonu gösterilmiş olan S.Mitiorun bağlanmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Tükürük, oral mikrofloranın dengesini sağlayan ve bakterinin selektif adhezyonunda etkili proteinler içermekle beraber tükürüğün antibakteriyel fonksiyonuyla da ilgili proteinleri içerir. Bunlar lizozim, laktoferrin, laktoperoksidaz ve IgA'dır(34,52).

Çalışmamızda her iki yüzeyden elde edilen ekstrelerde bulunduğunu göstererek karakterize ettiğimiz lizozim, laktoferrin, ve IgA'nın implant yüzeylerde antibakteriyel fonksiyonlarını sürdürecekleri açıktır.

Bakteriyel adhezyonunun implant çevresinde gelişebilecek enfeksiyondaki başlatıcı fonksiyonu nedeniyle cerrahi girişim sırasında implante edilecek olan birimin yüzey özelliklerini bozmamak amacıyla sadece Ti dan imal edilmiş aletlerle dokunulması, ameliyattan önce perioral ve intraoral alanlarda maksimum dezenfeksiyonun sağlanması, ameliyat sırasında ameliyat odasının ve aletlerin mutlak sterilizasyonuna uyulması, post operatif olarak hastanın ağız hijyeni yönünden motive edilmesi şarttır.

Orstavik ve Kraus(55) mine yüzeylerindeki protein filmin yapısına giren başlıca 6 protein bildirmişler ve bu proteinlerin rölatif konsantrasyonlarının bireysel değişikliklere bağlı varyasyonlar gösterdiklerini savunmuşlardır. Bizim çalışmamızda da ekstrelerin analizlerinde rutin olarak varlığı gösterebilen proteinlerin kişiye bağlı konsantrasyonları görülmüştür.

Hem bakteriyel faktörler, hem de hücrel ataşmanda etkili protein faktörleri gözönüne alındığında bir implantın alıcı tarafından kabul edilmesi ve ağız ortamındaki varlığını sürdürmesi, kullanılan implant sistemi, metalin özellikleri, ameliyat tekniğı, ağız planı, ağız hijyeni ve tükürüğün biokimyası gibi birçok değışkenden etkilenen multifaktoriyel etkileşimler kompleksidir. Bu nedenle implantolojinin her safhası özenli ve ayrı çalışmayı gerektirmektedir.



## S O N U Ç

- 1- HA ve Ti yüzeylerin, kaynağını karşılaştıkları biolojik sıvıdan alan bir protein filmle kaplandığı çeşitli analizlerle saptandı.
- 2- Bu filmin kalitatif ve kantitatif analizleri Titanium yüzeylerdeki adsorptif kapasitelerinin HA yüzeylere göre az olduğunu göstermektedir.
- 3- Yüzeylerden elde edilen proteinlerin konsantrasyonları karşılaştırıldığında HA yüzeylerden elde edilen ekstrelerdeki total proteinin, Ti yüzeylerden elde edilenlere göre yaklaşık 13 kat fazla olduğu belirlendi.
- 4- HA ve Ti yüzeylerinin adsorptif kapasitelerindeki farklar tükürük proteinleri açısından değerlendirildiğinde, Ti yüzeylerinin üstünlüğü saptandı.
- 5- Ti yüzeylerde varlığı gösterilen kalitatif ve kantitatif analizleri yapılarak karakterize edilmiş olan proteinlerin Lz, HRP, PRP, fosfoproteinler, Alb, Lf ve IgA olduğu bulundu.

- 6- Titanium yüzeyindeki bu protein film tükürüğün antibakterial fonksiyonlarının yapan proteinleri içerdiği görüldü.
- 7- Ti yüzeylere seçici bir affinite gösteren özellikle küçük moleküllü proteinlerin, enfeksiyon potansiyelindeki fonksiyonları araştırılmalıdır.
- 8- Farklı bireylere ait tükürüklerdeki proteinlerin kantitatif farklılıkları Ti yüzeylerde oluşan protein filme aynen yansır. Bu da klinik yönden implantın başarısında rol oynayan hücresel ataşman ve enfeksiyon potansiyeli yönünden önem taşır.



## Ö Z E T

Bu çalışma tükürük proteinlerinin HA ve Ti yüzeylerde hem kalitatif hem de kantitatif farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ti'a spesifik bir protein bulunmamasına rağmen küçük moleküllü katyonik proteinlerin bu yüzeylere olan affinitesi dikkat çekicidir.

Genel olarak aynı seçici affinite HA yüzeylerde de izlenir ancak bu durum Ti yüzeylere göre çok daha fazladır. Bundan da Ti yüzeylerde HA yüzeylere göre düşük bir düzeyde etkileşim olduğu sonucu çıkar. Ti yüzeylerdeki adsorpsiyon fenomeni genel olarak fiziksel özelliklerin fonksiyonudur ve bu nedenle protein molekülleriyle Ti yüzeyi arasında kurulan bağlar, HA ile kurulan bağlara göre çok daha zayıftır.

Relatif olarak az protein birikimi daha az bakteriyel bağlantı ve bunun sonucu olarak da zayıf bir enfeksiyon potansiyeli anlamına gelir. Tükürük proteinlerinin adsorpsiyonu yönünden değerlendirildiğinde Ti yüzeylerin HA yüzeylere olan üstünlüğü ortaya çıkar.

Gelecekte bu konuda yapılması ilginç olabilecek çalışma, küçük moleküllü katyonik proteinlerle bakterilerin ilişkisini araştırmak olacaktır.

### ABSTRACT

Behavior of salivary proteins on the HA and Ti surfaces was compared in an in vitro model system. Attachment was provided by coating HA beads and powdered Ti with whole saliva. Saliva treated HA and Ti were subjected to NaHPO<sub>4</sub> buffer to extract attached proteins. The eluted proteins were quantitated and examined by rocket immunoelectrophoresis, and SDS-PAGE and Western Southern electro blot protein transfer assays. Albumin IgA, IgG, Lf, Lz, cysteine-rich and histidine-rich peptides were characterized and quantitated.

It was found that Ti has much less ability to bind proteins compared to HA. Adsorption of salivary proteins on Ti occurred selectively as it does on HA surfaces. This selectivity did not show any difference when HA and Ti extracted samples were compared. There was no protein specific to Ti. However, low molecular weight cationic proteins seem to have special affinity for Ti. Albumin, IgA, IgG, Lf, Lz, were characterized and quantitated.

These data suggest that it would be of interest to further study. The specific role of low molecular weight proteins in selective adherence of S.Mitior on Ti surfaces.

**K A Y N A K L A R**

- 1- Adell,R., Lekholm,U., Rockler,B. and Branemark,P.I. 15 years study of osseointegrad implants in the treatment of the edentulous jaw. J.Oral Surg 10:387-416, 1981.
- 2- Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M. and Roberts,K. In; Macromolecules in molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. New York, London, 1983.
- 3- Albrektsson,T. Direct bone anchorage of dental implants. J.Prost. Dent. 50 (2):255 1983.
- 4- Albrektsson,T., Arnebrandt,T., Larsson,K., Nylander,T. and Sennerby,L. Transactions of the 5th European Conferance on biomaterials. pp 151-152, 1985.
- 5- Albrektsson,T., Branemark,P.I., Hanson,H.A. and Lundstrom,I., Osseointegrated Ti implants requirements for ensuring a-long-lasting-direct bone to implant anchorage in man. Acta. Orthop. Scand. 52:155-170, 1981.

- 6- Albrektsson,T., Branemark,P.I., Hansson,H.A. and Lindstrom,J., Osseointegrated Titanium implants. *Acta Orthop. Scand* 52:155-170, 1981.
- 7- Baier,R.E., Comments on cell adhesion to biomaterial surfaces. Conflicts and concerns. *J. Biomed. Mat. Res.* 16:173-175, 1982.
- 8- Baier,R.E. Selected methods of investigation for blood contact surfaces. *Ann. NY Acad. Sci.* 516:68, 1987.
- 9- Baier,R.E. Surface chemical factors presaging bioadhesive event. *Ann.NY Acad. Sci.* 416:34, 1983.
- 10- Bangall,R.D. Adsorption of plasma proteins on hydrophobic surfaces. Fibrinogen and fibrinogen containing protein mixtures. *J. Biomed. Mat. Res.* 12:203-217, 1978.
- 11- Beachey,E.H. Bacterial Adherence. Adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J.Infect. Dis.* 143:325-345, 1981.
- 12- Bennick,A., Cannon,M., Quantitative study of the interaction of salivary acidic proline rich proteins with H.A. *Caries Res.* 12:159-169, 1978.
- 13- Bennick,A. The role of human salivary acidic rich proteins in the formation of acquired dental pellicle and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch. Oral Biol.* 28:19-27, 1983.



- 14- Bjursten,L.M., Ericson,L.E., Hed,J., Kasemo,B., Lausmaa,J. and Thomsen,P. Interfacial mechanism at tissue integrated prostheses. In; Oral interfacial reactions of bone, soft tissue and saliva. Ed.P.O.. Glantz,S.A. Leach,T. Ericson IRL Press Limited, Oxford, England, 1983.
- 15- Boat,T.F., Weismann,V.N., Pollavicini,J.C. Phosphoprotein analysis of Saliva in man. Fed. Proc., Fed Am. Soc. Exp. biol (29, 861, 1970).
- 16- Boat,T.F., Weismann,U.N. and Pollavicini,J.C. Characterization of Capp in human saliva.
- 17- Bränemark,P.I., Tissue Integrated prostheses. Quintessence. Chicago CH1, 1985.
- 18- Burnette,W.N. "Western blotting" electrophoretic transfer of proteins from SDS gels to unmodified nitro-cellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. A.Analyt. Biochem 112; 195-203 1981.
- 19- Dankert,J, Hogt,A.H. and Feijen,J. Biocompatibility .Crit. Rev. Biocomp. 2:219, 1986.
- 20- Dawes,C., Jenkins,G.N. and Tonge,C.H. The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. Brit.Dent.J. 115:65-68, 1963.
- 21- Fine,D.H., Wilton,M.A. and Caravana,C. In Vitro sorption of albumin, IgG and lysozyme to enamel and cementum from human teeth. Infect. and Immun. 44(2):332-338, 1984.

- 22- Gibbons,R.J., Moreno,E.C. and Spinell,D.M. A mode delineating the effects of a salivary pellicle on the adsorption of Streptococcus mitior on to HA. Infection and Immunity 14:1109-1112, 1976.
- 23- Gomer,R. Surface diffusion. Sci Am. 247: 92-101, 1982.
- 24- Grinnel,F. Adhesiveness and extra cellular substrate. Int. Rev. Cytol. 53:65-144, 1978.
- 25- Gristina,A.G. Biomaterial centered infection. Science 237:1588, 1987.
- 26- Gugler,E., Pollavicini,C.J., Swerdlow,H., and Sant'Agnese, P.A.,  
Quantitative analysis of submandibular saliva, J. Dent. Res. 71:585-588 1967.
- 27- Hay,D.I., Gibbons,R.J. and Spinell,D.M. Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregation activity from whole saliva and dental plaque. Caries Res. 5:111-116, 1971.
- 28- Hay,D.I. The interaction of human parotid salivary protein with HA. Arch.Oral Biol. 18:1517-1530, 1973.
- 29- Hay,D.I., Moreno,E.C. Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatitic surfaces. J.Dent.Res. 58B:45-58, 1979.
- 30- Hillman,J.D., Van Houte,J. and Gibbons,R.J., Sorption of plaque, bacteria to human enamel powder. Arch.Oral Biol. 15:899, 1970.
- 31- Hoffman,A., Blood -biomaterial interactions; an overview, in biomaterials; interfacial phenomena and applications. Advances in Chem. Series. 119:3, 1982.

- 32- Hogg,S.D., Embery,G. The isolation and partial characterisation of a sulphated glycoprotein from human whole saliva which aggregates strains of *Streptococcus sanguis* but not *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 24:791-797, 1979
- 33- Horbett,T.A. Mass action effects on competitive adsorption of fibrinogen from hemoglobin solutions and from plasma. *Thrombosis and haemostasis* 51:174, 1984.
- 34- Iacona,V.J., Mackay,B.J., Pollock,J.J., Boldt,P.R., Ladenhaeim,S., Grossbard,B.L. and Rochon,M.I., Role of lysozyme in the host response to periodontopathic micro organisms. In, *Host-Parasite interactions in periodontal disases.* pp 318-342 (ed) R.J. Genco and S.E.Mergenhagen, 1982.
- 35- Imobedorf,M. Factors that influence the attachment of colonizing bacteria to Ti surfaces. *Doktora Tezi*, 1988.
- 36- Ivarsson,B., Lundstrom,I. Physical characaterization of protein adsorption on metal and metal oxide surfaces. *CRC. Critical Rev. in biocompatibility* 2, Issue, 4. 1986.
- 37- Juriaanse,A.C., Arends,J. and Ten Bosh,J.J. The adsorption of homopoly peptides to whole bovine dental enamel. *J Colloid Interface Sci.* 76:212-220, 1980.
- 38- Juriaanse,A.C., Arends,J. and Ten Bosh,J.J. The role of surface ions in a model for peptide adsorption to bovine dental enamel. *J.Colloid Interface Sci.* 76:212-220, 1980.

- 39- Juriaanse,A.C., Booji,M., Arends,J. and Ten Bosh,J.J. The adsorption of in vitro of purified salivary proteins on bovine dental enamel. Arch. Oral Biol. 26:91-68, 1981.
- 40- Kasemo,B., Biocompatibility of Ti implants: Surface science aspect. J. Prost. Dent. 49:(6) 832, 1983.
- 41- Kashket,S. and Guilmette,K.M. Further evidence for the nonimmunoglobulin nature of the bacterial aggregating factor in saliva. Caries Res. 12:170-172, 1978.
- 42- Kraus,F.W., Orstavik,D., Hurst,D.C. and Cook,C.H. The acquired pellicle: Variability and subject dependence of specific proteins. J. Oral Path. 2:165-173, 1973.
- 43- Lee,G.R., Adamson,C., Kim,S.W., Competitive adsorption of plasma proteins onto polymer surfaces. Thrombosis Research 4:485-490, 1974.
- 44- Lekholm,U. Clinical procedures for treatment with osseointegrated dental implants. J of Prost. Dent. 50 (2): 116-119, 1983.
- 45- Liljemark,F.W., Bloomquist,C.G., Ofstehage,J.C. Aggregation and adherence of streptococcus sanguis: Role of human salivary immunoglobulin A. infect. and immun,26 (3): 1104-1110, 1979.
- 46- Mandel,I.D. Human submaxillar, sublingual and parotid glycoproteins. Academic Press Inc. New York, San Francisco, London, 1977.

- 47- Mandel, I.D. Relation of saliva and plaque to caries. *J. Dent. Res.* 53:246-266, 1974.
- 48- Mc Alerney, M. Adsorption of complement C3 versus metallurgical structure of titanium observed by TEM immuno-gold staining. *Doktora Tezi*, 1989.
- 49- McQuenn, E., Sundgren, J.E., Ivarsson, B., Lundstrom, I., Ekenstam, B., Suensson, A., Branemark, P.I. and Albrektsson, T. Electro spectroscopic studies of Ti implants. *Clinical applications of biomaterials*. John Wiley & Sons New York 1977.
- 50- Merrill, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A., and Ebert, M.H. Ultra sensitive stain for proteins in polyacrylamide gels show regional variations in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211:1437, 1981.
- 51- Morrissey, B.W. The adsorption and conformation of plasma proteins. A physical approach. *Ann. New York Acad. Sci.* 283:50. 1977.
- 52- Murray, P.A., Levine, M.S., Tabak, L. and Reddy, M.S. Specificity of salivary bacterial interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106:390-396, 1982.
- 53- Nesbitt, W.E., Doyle, R.J. and Taylor, K.G. Hydrophobic interactions and the adherence of *Stp. Sanguis* to HA infect-*Immun* 38:637-644, 1982.
- 54- Nriagu, J.O. Phosphate minerals: Their properties and general mode of occurrence, 1n; *Phosphate minerals*. P.B. Springer Verlag Berlin. 1984.

- 55- Orstavik,D. The in vitro attachment of an oral streptococcus sanguis to the acquired tooth enamel pellicle. Arch. Oral Biol. 23:167-173, 1978.
- 56- Page,C.R. Gingivitis. J. Clin. Periodontol. 13:345-355, 1986.
- 57- Pashley,R.M., Mc Guiggan,P.M., Ninham,B.W. and Evans,D.F. Attractive forces between uncharged hydrophobic surfaces. Science 229:1088, 1985.
- 58- Pollock,Y.Y., Lacono,V.J., Bicker,H.G., Madar,B.J., Katona,L.I., Taichman,L.B., Thomas.E. The binding aggregation and lytic activity of lysozyme. In; Microbial aspects of dental caries. Stiles, H.M., Loesche,W.Y., O'Brian,T.C. eds. London and Washington,D.C. IRL Press, 1976.
- 59- Rams,T.E., Link,Jr.C. Microbiology of failing dental implants in human: Electron microscopic observations. J. Oral Imp. 11:93-100, 1983.
- 60- Revel,J.P., Volken,K. electronmicroscopic investigations of the underside of cells in culture. Exp. Cell Res. 78:1-14, 1973.
- 61- Rolla,G., Ciardi,J.E., and Bowen,W.H. Identification of IgA, IgG, Lz, albumin, amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to HA from whole saliva. Scand. J. Dent.Res. 91:186-90, 1983.
- 62- Ruan,M., Di Paola,C. and Mandel,I.D. Quantitative immunochemistry of salivary proteins adsorbed in vitro to enamel and cementum from caries resistant and caries-susceptible human adults. Archs. Oral. Biol. 31 (9): 597-601, 1986.

- 63- Russel,R. Glucan-binding proteins of streptococcus mutans serotype. J. Gen. Microbiol. 112:197-201, 1979.
- 64- Saxton,C.A. Scanning Electron Microscope Study of the formation of dental plaque. Caries Res. 7:102-119, 1973.
- 65- Schakenraad,J.M., Busscher,H.J., Widevuur,C.R.H. and Arends,J. The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins. J. Biomed. Mat. Res. 20:773-784, 1986.
- 66- Schakenraad,J.M., Arends,J., Busscher,H.J., Dijk,F., Wachem,P.B. and Wildevuur,C.R.H. Kinetics of cell spreading on protein precoated substrata: a study of interfacial aspects. Biomaterials 10:43-50, 1989.
- 67- Shelby,K. and Guilmette,M.K. Further evidence for the non-immunoglobulin nature of the bacterial aggregating factor in saliva. Caries Res. 12:170-172, 1978.
- 68- Skalak,R. Biomedical considerations in osseointegrated prostheses. J Prost. dent. 49(6): 843-847, 1984.
- 69- Slomiany,B.L., Murty,V.L.N., Zdebska,E., Slomiany,A., Gwozdziński,K. and Mandel,I.D. Tooth surface pellicle lipids and their role in protection of dental enamel against lactic acid diffusion in man. Arch. Oral Biol. 31:187-191, 1986.
- 70- Sonju,T., Rolla,G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Caries Res, 7:30-38, 1973.

- 71- Stinson,M.W., Levine,M.J., Cavese,J.M., Prakobphol,A., Murray,P.A., Tabak,L.A. and Reedy,M.S. Adherence of *Strep. sanguis* to salivary mucin bound to glass. *J.Dent. Res.* 61:1390-1393, 1982.
- 72- Syrussel,J., Görg,A., Postel,J., Weser,H.W., Schiwara,W. and Boesken,A. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for urinary proteins analysis. *Sci. Tool*, 32(1):5-9, 1985.
- 73- Tabak,L.A., Levine,M.J., Jain,N.K., Bryan,A.R., Cohen,R.E., Monte,L.D., Zawacki,S., Nancollas,G.H., Slomiany,A., and Slomiany,B.L. Adsorption of human salivary mucins to HA. *Archs. Oral Biol* 30(5):423-427, 1985.
- 74- Tabak,L.A. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity *J. Oral Path.* 11:1-7, 1982.
- 75- Towbin,H., Staehelin,T. and Gordon,J, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrlamide gel to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc.Nat.Acad, Sci.* 76:4350 1979.
- 76- Tromp,R.M., Hamers,R.J., Demuth,J.E., Quantum states and atomic sturcture of silicon surfaces. *Science* 234-304, 1986.
- 77- Van der Valk,P., Van Pelt,A.W., Busscher,H.J., De jong,H.P., Wildevuur,R.H. and Arends,S.J., Interactions of fibroblast and polymer surfaces, relationship between surface free energy and fibroblast spreading, *J.Biomed. Mat. Res.* 17:807-817, 1983.



- 78- Vroman,L., Adams,A.L., Klings,M., Fisher,G.C., Munos,P. and Solensky,P. Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces. Blood 55:156, 1980.
- 79- Weast,R. Handbook of chemistry and physics pp 34-35 CRC Press, 1974.
- 80- Weeke,B. Crossed immunoelectrophoresis In; A manual of quantitative electrophoresis. pp 47-56 Oslo Univ. Forlaget, 1973.
- 81- Zahradnick,R.T., Moreno,E.C. and Burke,E.J. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. J. Dent. Res. 55:664-670, 1976.
- 82- Zahradnick,R.T. Modifications by salivary pellicles of in vitro enamel remineralization. J.Dent. Res. Modification by salivary pellicles of in vitro enamel remineralization. 58:2066-2073, 1979.
- 83- Dr.I.Mandel'le kişisel görüşmeler.

## TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin bu ilk safhasında araştırmacılığın ve analizci düşüncenin temel prensiplerini ve hümanistik duygularla bütünleşmiş klinik deneyimlerini aktararak, mesleki biçimlenmemde olduğu kadar bu tezin hazırlanmasında da desteklerini gördüğüm hocam, Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Necla Timoçin'e, ayrıca, çalışmamın yurt dışında yapılan kısımlarının tamamlanmasında tam desteklerini gördüğüm, karşılıksız her türlü olanağı sağlayan ve sonsuz bilgi birikimlerini aktarmaktan çekinmeyen A.B.D., New York, Columbia University School of Dental Surgery, Oral Biology and Preventive Dentistry Bölüm Başkanı, Prof.Dr.Daniel Fine'a, Clinical Research Center Bölüm başkan yardımcısı Doç.Dr.Roy Steven's'a, Kimyager Uzman Miriam Herrera'ya, Oral and Maxillo-Facial Surgery Bölüm Başkan Yardımcısı Prof.Dr.Louis Mandel'e ve özellikle Clinical Research Center Bölüm Başkanı Prof.Dr.Irwin Mandel'e sonsuz şükran duygularıyla...

## Ö Z G E Ç M İ Ő İ M

1957 yılında İstanbul'da doğmuşum. Annem Azize Kaynar, babam merhum Dt.Hekimcan Kaynar'dır. İlk eğitimimi, Koca Ragıp Paşa İlkokulu orta ve lise eğitimimi ise İstanbul Kız Lisesinde tamamladım. Orta eğitimle paralel olarak devam ettiğim İstanbul Belediyesi Konservatuvarı Piano Yüksek Bölümünü 1981 yılında, 1975 yılında girdiğim Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesini 1981 yılında bitirdim. 1982 yılına kadar serbest hekimlik yaptıktan sonra A.B.D. New York Columbia Üniversitesinde mezuniyet sonrası kurslara katıldım. 1985 yılında İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Ana Bilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak girdim. Doktor çalışmalarımı yapmak üzere 1989 yılında gittiğim A.B.D. New York Columbia University Department of Oral and Maxillo-Facial Surgery bölümünde Honorary Resident ve Clinical Research Center bölümünde Research Fellow olarak 1991 yılına kadar çalıştım.

Halen İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Ana Bilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.