



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**FARKLI KOMPOZİT MATERYALLERİNİN İNSAN DİŞ ETİ VE  
PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARI ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİSİTE VE ADHEZYON PROTEİN EKSPRESYONU  
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ:  
BİR *IN-VITRO* ÇALIŞMA**

GAMZE KAVUNCU

UZMANLIK TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖMER BİRKAN AĞRALI

2019-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**FARKLI KOMPOZİT MATERYALLERİNİN İNSAN DİŞ ETİ VE  
PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARI ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİSİTE VE ADHEZYON PROTEİN EKSPRESYONU  
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ:  
BİR *IN-VITRO* ÇALIŞMA**

GAMZE KAVUNCU

UZMANLIK TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖMER BİRKAN AĞRALI

2019-İSTANBUL

# TEZ ONAYI



Diş Hekimliği  
Fakültesi

## UZMANLIK TEZ SINAVI TUTANAK FORMU

SAYI :

11.11.2019

### DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA,

Fakültemiz ... Perinbalıys... Anabilim Dalı Uzmanlık öğrencisi

Dt... Çoşun Karanay'ın "Farklı Kompozit Materyallerin Sinerjisi ve Perinbalıys  
Higromerik Fibratlarla Üzerindeki Sinerjistik ve Adayın Ekspresyonu Farklılıklarını  
Değerlendirmek Üzerine Çalışma

konulu Uzmanlık Tez Sınav Tutanağı aşağıdadır.

Saygılarımla arz ederim.

Anabilim Dalı Başkanı  
Prof. Dr. Leyla KURU

### SINAV TUTANAĞI

Uzmanlık Tez Sınav Jürimiz 11.11.2019 tarihinde toplanmış ve adı geçen öğrenciyi Uzmanlık Tez Sınavına tabi tutmuştur. Sınav sonucunda adayın tezi hakkında aşağıdaki karar verilmiştir.

- KABUL  
 RED  
 DÜZELTME

Tez Sınav Jürisi	Ünvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Leyla KURU	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Öneri BİLİR	
Üye	Doç. Dr. Burcu KARADUMAN	

Eki : Tez Değerlendirme Formu (Her bir jüri için).

M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi  
Başbüyük / Maltepe / İSTANBUL  
Tel : 0216 421 16 21 Fax : 0216 421 02 91  
Web : <http://dhf.marmara.edu.tr> e-mail : [dishekimligi@marmara.edu.tr](mailto:dishekimligi@marmara.edu.tr)

FORM: 8b

## BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gamze Kavuncu



## I. TEŞEKKÜR

*Akademik ve klinik konularda bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, eğitimimde ilerlememe yol gösteren ve ışık tutan, özverili, samimi ve içten tavrıyla manevi desteğini her zaman hissettiğim, kıymetli hocam ve danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ömer Birkan Ağralı'ya,*

*Derin bilgi ve tecrübesini büyük bir özveriyle paylaşan, bir parçası olma fırsatını edindiğim Marmara Üniversitesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nda geçirdiğim süre boyunca hissettiğim huzur ve samimiyetin inşa edilmesinde büyük emekleri olan, mesleki gelişimim yanında hayata dair kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Prof. Dr. Leyla Kuru'ya,*

*Mesleki duruşuna saygı duyduğum, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, içten desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Prof Dr. Başak Doğan'a,*

*Pratik ve teorik konularda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Kemal Naci Köse, Dr. Öğr. Üyesi Hatice Selin Yıldırım ve Dr. Öğr. Üyesi Hafize Öztürk Özener'e,*

*Çalışmamın şekillenmesinde büyük katkıları olan, pozitif ve yapıcı yaklaşımıyla karşılaştığım zorlukları aşmamı kolaylaştıran değerli hocam Doç Dr. Betül Karademir'e,*

*Çalışmamda fikir ve bilgisini benden esirgemeyen, güler yüzlü tavrıyla kapısını her zaman çalabildiğim sayın hocam Doç. Dr. Pınar Yılmaz Atalı'ya,*

*Birlikte çalışma imkanını edindiğim, laboratuvar ortamına dair incelikleri benimle paylaşan, birlikte çalışmaktan keyif aldığım Dr. Arş. Gör. Ayşe Mine Yılmaz'a.*

*Uzmanlık eğitimimi keyifle geçirmemi sağlayan, yol arkadaşlarım, Dt. Damla Öztürk, Dt. Aydın Akçakoca, Dt. Halil Çelik, Dt. Buse Öncü'ye ve Periodontoloji Kliniği'ndeki tüm asistan arkadaşlarıma,*

*Çalışma sürecimde bana yardımcı olan sevgili Meftine Uysal, hemşiremiz Hatice Çiftçi ve personel arkadaşlarıma,*

*Bana güç ve huzur veren, beni benden daha çok düşünen, sevgisini derinliklerde sakladığım, beni tamamlayan sevgili Erdi Malkoç'a*

*Hayatı birlikte öğrendiğim, fikirlerine saygı duyduğum ve başvurduğum, yaşadığım en sıkıntılı anlarda 'korkma ben varım' diyen ve yanımda olan, kardeşim Furkan Kavuncu'ya*

*Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip, koşulsuz sevgi ve fedakarlıklarıyla tüm kararlarımda bana güvenen ve beni destekleyen, güçlü olmamı sağlayan ve kızları olmaktan gurur duyduğum annem Mihriban Kavuncu ve babam Rıdvan Kavuncu'ya*

*Sonsuz teşekkürlerimi sunarım....*



*Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-SAG-C-DUP-131217-0657 numaralı proje ile desteklenmiştir.*

## II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	iii
II. İÇİNDEKİLER	v
III. KISALTMALAR VE SİMGELER	viii
IV. ŞEKİLLER LİSTESİ	x
V. RESİMLER LİSTESİ	xii
VI. TABLOLAR LİSTESİ	xii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Periodonsiyum	7
4.1.1. Diş eti	7
4.1.2. Alveol Kemiği	9
4.1.3. Periodontal Ligament	9
4.1.4. Sement	10
4.2. Diş Eti Fibroblastları ve Periodontal Ligament Fibroblastları	11
4.3. Hücre Dışı Matriks	12
4.3.1 Tip I ve Tip III Kolajen	13
4.3.2. İntegrin $\beta_1$	15
4.4. Periodontal – Restoratif İlişki	17
4.4.1. Kullanılan Restoratif Materyaller	19
4.4.2. Kompozitler	21
5. GEREÇ VE YÖNTEM	25
5.1. Kompozit Disk Örneklerin Hazırlanması	25

5.2. Hücrelerin çözülmesi, pasajlanması, çoğaltılması ve sayılması	28
5.3. Sitotoksosite testi	30
5.3.1. MTT testinin uygulanması	31
5.4. Hücrelerden protein eldesi ve protein konsantrasyonunun hesaplanması	34
5.5. Western blot ile tip I kolajen, tip III kolajen ve integrin $\beta$ 1 proteinlerinin tayin edilmesi	38
5.5.1. Western Blot jelinin hazırlanması	38
5.5.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi	38
5.5.4. Protein Tayini	42
5.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz	43
6. BULGULAR	44
6.1. Kompozitlerin Hgf Hücreleri Üzerindeki 24 Saat Süreli Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması	44
6.1. Kompozitlerin Hgf Hücreleri Üzerindeki 1 Hafta Süreli Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması	48
6.3. Kompozitlerin Hpdlf Üzerindeki 24 Saat Süreli Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması	48
6.3. Kompozitlerin Hpdlf Üzerindeki 24 Saat Süreli Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması	49
6.4. Kompozitlerin Hpdlf Hücreleri Üzerindeki 1 Hafta Süreli Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması	51
6.5. Kompozit gruplarının 24 Saat ve 1 Hafta Sürelerinde Hgf hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Değerlendirilmesi	52
6.6. Kompozit gruplarının 24 Saat ve 1 Hafta Sürelerinde Hpdlf hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Değerlendirilmesi	55
6.7. Kompozit Gruplarının Hgf hücrelerinin Tip I Kolajen Miktarı Üzerindeki Etkilerinin 24 saat süresinde Değerlendirilmesi	58

6.8. Kompozit Gruplarının Hgf hücrelerinin Tip III Kolajen Miktarı Üzerindeki Etkilerinin 24 saat süresinde Değerlendirilmesi	61
6.9. Kompozit Gruplarının Hgf hücrelerinin Integrin $\beta_1$ Protein Miktarı Üzerindeki Etkilerinin 24 saat süresinde Değerlendirilmesi	62
8. KAYNAKLAR	71
9. ÖZGEÇMİŞ	92



### III. KISALTMALAR VE SİMGELER

°C: Santigrad derece

AF: Admira Fusion

**Bis-GMA:** Bisfenol A-glisidil dimetakrilat

CT: Charisma Topaz

**ddH<sub>2</sub>O:** iki kez distile edilmiş su

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagles Medium

**EDMA:** etilen dietil metakrilat

**EDTA:** Etilendiamin Tetraasteit Asit

**EQS:** Estelite Quick Sigma

**g:** gram

**GAPDH:** Gliseraldehit-3-Fosfat-Dehidrojenaz

**Gingival Fibroblast:** Gingival Fibroblast

**h:** hafta

**Hgf:** *Human Gingival Fibroblast*

**Hpdlf:** *Human Periodontal Ligament Fibroblast*

**HRP:** *Horseradish Peroxidase*

**HDM:** Hücre Dışı Matriks

**kDA:** kilo Dalton

**LED:** *Light Emitting Diode*

**µg:** mikrogram

**µl:** mikro litre

**µm:** mikrometre

**mA:** mili Amper

**mAB:** *monoclonal Antibody*

**mg:** miligram

**MSS:** mine semet sınırı

**mm :** milimetre

**mM:** mili Mol

**MMA:** metil metakrilat

**mw/cm<sup>2</sup>:** minivolt/santimetrekare

**nm:** nanometre

**PBS:***Phosphate buffered saline*

**Pdlf:** Periodontal Ligament Fibroblastı

**RGD Peptid:** Arjinil/glisil/aspartik asit

**rpm:** *revolutions per minute*

**TEGDMA:** trietilen glikol dimetakrilat

**UDMA:** Uretan dimetakrilat

**w/v:** hacimde ağırlıkça yüzde



## IV. ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 4.1.** Periodonsiyum komponentleri

**Şekil 4.2.** İntegrin Molekölünün Şematik Gösterimi (Albelda ve Buck, 1990)

**Şekil 4.3.** İntegrin alt gruplarının Şematik gösterimi

**Şekil 5.1.** Kompozit Disk ÖrneKlerin Hazırlanması

**Şekil 6.1.** Kontrol grubu, AF, CT, EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki 24 saat yüzde sitotoksisite etkilerinin karşılaştırılması

**Şekil 6.2.** Kontrol grubu, AF, CT, EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki 24 saat yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

**Şekil 6.3.** Kontrol grubu, AF, CT, EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki 1 hafta yüzde sitotoksiste etkilerinin karşılaştırılması

**Şekil 6.4.** Kontrol grubu, AF, CT, EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki 1 hafta yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

**Şekil 6.5.** Kontrol grubu, AF, CT, EQS materyallerinin Hpdlf hücreleri üzerindeki 24 saat yüzde sitotoksisite etkilerinin karşılaştırılması

**Şekil 6.6.** Kontrol, AF, CT, EQS gruplarını Hpdlf hücreleri üzerindeki 24 saat yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

**Şekil 6.7.** Kontrol, AF, CT, EQS grubunun Hpdlf hücreleri üzerindeki 1 hafta yüzde sitotoksisite etkilerinin karşılaştırmaları

**Şekil 6.8.** Kontrol, AF, CT, EQS grubunun Hpdlf hücreleri üzerindeki 1 hafta yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırmaları

**Şekil 6.10.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki yüzde sitotoksiste etkilerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması

**Şekil 6.11.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hpdlf hücreleri üzerindeki yüzde sitotoksisite etkilerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması

**Şekil 6.12.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hpdlf hücreleri üzerindeki yüzde canlılık etkilerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması



**Şekil 6.13.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının 24 saat süresinde Hgf hücrelerinin tip I kolajen miktarı üzerinde yaptıkları etkinin karşılaştırılması

**Şekil 6.14.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının 24 saat süresinde Hgf hücrelerinin tip III kolajen miktarı üzerine yaptıkları etkinin karşılaştırılma

**Şekil 6.15.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının 24 saat süresinde Hgf hücrelerinin integrin  $\beta 1$  protein miktarı üzerinde yaptıkları etkinin karşılaştırılması



## V. RESİMLER LİSTESİ

**Resim 5.1.** Hazırlanan kompozit disk örnekler

**Resim 5.2.a.** Steril ortam **b.** DMEM

**Resim 5.3. a.** Hücre kültür ortamı (flask) **b.** İnkübatör

**Resim 5.4.** Flaskın %70-80'ini dolduran **a.** Hgf hücrelerinin ve **b.** Hpdlf hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü (10X)

**Resim 5.5.** Tripan mavisi ile boyanan hücrelerin toma lamı üzerinde ışık mikroskobunda sayılması (10X)

**Resim 5.6.** Deney için hücrelerin 24 kuyucuklu plakalara ekimi

**Resim 5.7.** Hgf ile planlanan 24 saatlik deney planında **a.** 24 kuyucuklu plakalarda, her kuyucukta  $10^5$  hücre olacak şekilde 24 saat inkübe edilen ve 24 saat önceden  $n=3$  deney sayısında U.V ile 1 saat steril edilmiş kompozit diskler **b.** Her kuyucuğa bir disk yerleştirilmesi **c.** 24 kuyucuklu plakada boş, kontrol, AF uygulanmış, CT uygulanmış ve EQS uygulanmış gruplara ayrılmış plakanın 24 saat medyumda bekletilmesi

**Resim 5.8.a.** 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium **b.** MTT 0.1 g tartılması **c.** 0,1g MTT / 10 ml PBS ana stok solüsyonun hazırlanması

**Resim 5.9. a.** Her kuyucuğa kuyucuk konsantrasyonu  $0.33 \mu\text{l g/ml}$  olacak şekilde  $0.66 \mu\text{l}$  MTT solüsyonu eklenmesi **b.**  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  ortamda 2 saat inkübasyon

**Resim 5.10. a.** 2 saat inkübasyon ardından 24 kuyucuklu plaka görüntüsü **b.** Hücrelerdeki boyanmanın mikroskop görüntüsü (10 X) **c.** Her kuyucuktan okuma için  $100 \mu\text{l}$  karışımın 96 kuyucuklu plakaya aktarılması. **d.** 96 kuyucuklu plaka görüntüsü

**Resim 5.11. a.** 24 kuyucuklu plakada kalan hücre ortamının boşaltılması **b.** çözücü tampon **c.** Çözücü tampon 24 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1 ml olacak şekilde koyulduktan sonra açığa çıkan formazona bağlı renklenme

**Resim 5.12. a.** 96 kuyucuklu plakalara 2 X 100  $\mu$ l eklenen örnekler **b.** *PerkinElmer Enspire multimode plate reader* **c.** Absorbans değerlerinin ölçülmesi için 96 kuyucuklu plakanın cihaza yerleştirilmesi **d.** Yapılan okuma sonucu alınan absorbans değerleri

**Resim 5.13. a.** Kompozit disklerin petri kaplarına hücrelerle direkt temasta yerleştirilmesi ve **b.** 24 saat inkübasyonu

**Resim 5.14.a.** Kompozit disklerin petri kabından uzaklaştırılması **b.** Petri kabındaki DMEM'in falkon tüplere aktarılması **c.** PBS ile yıkamanın ardından 400  $\mu$ l lizis tamponu eklenerek 5 dk. buz üzerinde dinlendirilmesi

**Resim 5.15.a.** Soğutmalı santrifüj **b.** Petri kabındaki hücrelerin kazınması ve **c.** eppendorf tüplere aktarılması

**Resim 5.16.a.** 2 mg/ml Albumin (BSA) içeren 1 ml ampul **b.** Farklı dilüsyonlarda hazırlanan 9 adet standart ve n=2 olarak hazırlanmış örnekleri içeren eppendorf tüpler

**Resim 5.17. a.** Poliakrilamid jelde hazırlanmış kuyucukların görüntüsü **b.** İlk kuyucuğa protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak “*Precision Plus Protein Standards*” konulması **c.** Homojenatların kuyucuklardaki görüntüsü

**Resim 5.18.a.** 4°C’de elektroforez işleminin gerçekleştiği tank **b.** 110 volt akımda 2 saat süreyle yürütme işlemi

**Resim 5.19. a.** Jelin dikkatlice çıkartılması **b.** Jel üzerindeki kuyucukların uzaklaştırılması

**Resim 5.20. a.** Jel ve membranın kasete yerleştirilmesi **b.** Filtreler arasında hava kalmamasına özen gösterilmesi **c.** Kasetlerin tanka yerleştirilmesi ve transfer tampon ile doldurulması

**Resim 5.21.a.** Hedef protein dışındaki alanların % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat salımla bloke edilmesi **b.** Kullanılan Col 1A1 (tavşan), Col 3A1 (fare), Integrin  $\beta$ 1 (tavşan) antikoları **c.** Hazırlanmış primer antikor çözeltileri

**Resim 5.22. a.** Kemiluminesans kit **b.** Protein yoğunluklarını görüntüleme sistemi *ChemiDoc™ MP Imaging System* **c.** Elde edilen protein bantlarının görüntüsü



## VI. TABLOLAR LİSTESİ

**Tablo 4.1.** Kolajen Ailesi (Van der Rest ve Garrone, 1991)

**Tablo 5.1.** Çalışmada kullanılan kompozit materyallerin içerik ve üretici firma bilgisi

**Tablo 5.2a.** Sitotoksosite ve canlılık deneylerinde zaman aralıklarına ve hücrelere göre kullanılan kompozit disk örneklerinin sayısı

**Tablo 5.2b.** Protein ekspresyonu deneyinde kullanılan kompozit disk örneklerinin sayısı

**Tablo 5.2c.** Deneylerde kullanılan kompozit disklerinin toplam sayısı

**Tablo 5.3.** Homojenatların hazırlığında kullanılan örnek ve Laemmlı Tamponu miktarları

**Tablo 6.1.** Uygulama gruplarının tüm hücre ve zaman aralıklarındaki yüzde sitotoksosite değerlerinin çoklu ve ikili karşılaştırmaları

**Tablo 6.2.** Uygulama gruplarının tüm hücre ve zaman aralıklarındaki yüzde canlılık değerlerinin çoklu ve ikili karşılaştırmaları

**Tablo 6.3.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki yüzde sitotoksosite değerlerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması

**Tablo 6.4.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerinde 24 saat ve 1 hafta sürelerinde yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

**Tablo 6.5.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hpdlf hücreleri üzerinde 24 saat ve 1 hafta sürelerinde yüzde sitotoksosite etkilerinin karşılaştırılması

**Tablo 6.6.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hpdlf hücreleri üzerinde 24 saat ve 1 hafta sürelerinde yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

**Tablo 6.7.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerinde 24 saat süresinde tip I, tip III kolajen ve interin  $\beta$ 1 protein miktarları üzerindeki etkilerin çoklu ve ikili karşılaştırmaları

# Farklı Kompozit Materyallerinin İnsan Dişeti ve Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite ve Adhezyon Protein Ekspresyonu Etkilerinin Değerlendirilmesi: Bir *In-Vitro* Çalışma

**Öğrencinin Adı:** Gamze Kavuncu

**Danışmanı:** Dr. Öğr. Üyesi. Ömer Birkan Ağralı

**Anabilim Dalı:** Periodontoloji Anabilim Dalı

## 1. ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı; 3 farklı içerikteki kompozit materyalinin, diş eti ve periodontal ligament fibroblast hücre dizileri üzerindeki sitotoksosite etkileri ile diş eti fibroblast hücreleri üzerinde oluşturdukları protein ekspresyonu değişikliklerinin incelenmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, içeriklerine göre farklı 3 kompozit türü olan nano-hibrid organik monomer esaslı Admira Fusion, supra-nano dolduruculu rezin esaslı Estelite Quick Sigma, nano-hibrid *Bis-(akryloyloxymethyl) tricyclo [5.2.1.0.sup.2,6] decane* matriks esaslı Charisma Topaz (CT) materyallerinin insan periodontal ligament fibroblast hücreleri (Hpdlf) ve insan dişeti fibroblast hücreleri (Hgf) üzerindeki sitotoksosite etkisi 24 saat ve 1 hafta zaman aralıklarında MTT analizi ile değerlendirildi. Hgf hücrelerinin tip I ve III kolajen ile İntegrin  $\beta 1$  protein ekspresyonu Western-Blot kiti kullanılarak 24 saat zaman aralığında değerlendirildi.

**Bulgular:** Kompozit gruplarından CT, Hgf hücreleri üzerinde 24 saat ve 1 hafta uygulamada, Hpdlf hücreleri üzerinde ise 1 hafta uygulamada sitotoksik olarak tespit edildi ( $p=0,002$ ,  $p=0,009$ ,  $p=0,01$ ) Materyallere maruziyet süresinin sitoksisite ve canlılık üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, Hgf hücrelerinde sadece CT grubunda sitotoksosite zamanla artar iken Hpdlf hücrelerinde tüm kompozit gruplarında sitotoksik etkinin zamanla arttığı tespit edildi (CT  $p= 0,04$ , AF  $p=0,02$ , CT  $p=0,02$ , EQS  $p=0,04$ ). Kompozit gruplarının protein ekspresyonuna etkisi değerlendirildiğinde, CT kompozit grubunun, Hgf hücrelerinin tip I kolajen miktarında anlamlı artış oluşturduğu tespit edildi ( $p= 0,02$ ). EQS grubunun ise Hgf hücrelerinin tip III kolajen miktarında artışa yol açtığı gözlemlendi ( $p= 0,02$ ). Hgf

hücrelerinin İntegrin  $\beta 1$  protein ekspresyonunda, gruplar arası anlamlı fark gözlenmedi.

**Sonuç:** Bu çalışma farklı içeriklere sahip kompozit materyallerinin Hgf ve Hpdlf hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin zamana ve uygulanan hücre grubuna göre değişkenlik gösterdiğini, bununla birlikte tip I, III kolajen ve integrin  $\beta 1$  protein ekspresyonunun materyal uygulamalarından farklı olarak etkilendiğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar sözcükler:** fibroblastlar, integrinler, kompozit rezin, sitotoksosite, tip I kolajen, tip III kolajen



# **Effects of Different Composite Materials on Cytotoxicity and Adhesion Protein Expression of Human Gingival and Periodontal Ligament Cell Lines: An In-Vitro Study**

**Student Name:** Gamze Kavuncu

**Supervisor:** Dr. Öğr. Üyesi Ömer Birkan Ağralı

**Department:** Department of Periodontology

## **2. SUMMARY**

**Aim:** The aim of this study is to determine the effects of different composite materials on cytotoxicity and protein expressions of human periodontal cell lines.

**Material and Method:** Three different types of composite materials were selected such as; nano-hybrid organic monomer based Admira Fusion (AF), resin based Estelite Quick Sigma (EQS), nano-hybrid Bis-(akryloyloxymethyl) tricyclo [5.2.1.0.sup.2,6] decane based Charisma Topaz (CT). Human gingival fibroblasts (Hgf) and human periodontal ligament fibroblasts (Hpdlf) were selected as cell lines. MTT Assay was used to assess the cytotoxicity effects of composite materials. Western Blot assay was used to analyse the amount of adhesion protein expressions such as collagen type I, type III and integrin  $\beta$ 1.

**Results:** CT showed statistically significant cytotoxic effect on Hgf cells in 24 hours and 1 week evaluation periods and was found more cytotoxic on Hpdlf cells compare to the control group in 1 week ( $p=0,002$ ,  $p=0,009$ ,  $p=0,01$ ). Cytotoxic effect of CT increased by the time in Hgf cells ( $p= 0,04$ ). Also, cytotoxicity was increased by the time in Hpdlf cells for all composite materials (AF  $p=0,02$ , CT  $p=0,02$ , EQS  $p= 0,04$ ). CT group Western Blot analysis exhibited a significant increase in type I collagen expression in Hgf cells ( $p= 0,02$ ). EQS group revealed significant increase in Type III collagen expression in 24 h ( $p= 0,02$ ). No significant difference was observed in integrin  $\beta$ 1 expression for all composite groups.

**Conclusion:** The cytotoxic effects of composite materials vary according to time and type of cells applied. Type I, III collagen and Integrin  $\beta$ 1 protein expressions were differently affected from composite materials.



**Key words:** collagen type I, collagen type III, composite resin, cytotoxicity, fibroblasts, integrins



### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dental restorasyonlar, diş yüzey bütünlüğünü sağlayarak, fonksiyon ve estetiğin geri kazanılması amacıyla kullanılmaktadır (Albandar ve ark., 1995). Restoratif materyaller, dişlerin fiziksel ve morfolojik özelliklerini taklit edecek şekilde geliştirilmiştir, ancak 'ideal materyal' henüz tanımlanmamıştır (Albandar ve ark., 1995).

Yapılan çalışmalarda, dental restorasyonların diş eti enflamasyonuna ve periodontal ataşman kaybına yol açabileceği ortaya konmuştur (Silness ve Røynstkand, 1984; Matthews ve Tabesh, 2004; Ababneh ve ark., 2011).

Rezin esaslı kompozit materyaller 20. yy ortalarında restoratif diş hekimliğinde çığır açmıştır. Estetik başarılarının yanında, ağız ortamındaki stabiliteleri ve kolay uygulanabilir olmaları gibi avantajları mevcuttur. Ancak rezin esaslı kompozitler, polimerizasyon büzülmesi, rezin ve dentin arasındaki başarısız bağlantıya bağlı sekonder çürük riski, yüksek termal genleşme kat sayısı ve metal bazlı restorasyonlara göre düşük aşınma direnci gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca kompozitlerden sızan polimerize olmamış monomerlerin çevre dokulara zararlı olabileceği bildirilmiştir. (Geurtsen, 2000; Jandt ve Sigusch, 2009). Günümüzde pek çok rezin esaslı kompozit materyal geliştirilmiştir.

Periodontal-restoratif ilişki, derin sınıf II, sınıf III ve sınıf V dolgulara komşu bölgelerde, klinik olarak sıklıkla gözlenmektedir. Bu gibi durumlarda kullanılan restoratif materyal tipleri ve restoratif materyallerin etkileri son dönemdeki araştırmaların konusu olmuştur. Bazı kompozit materyallerin, subgingival alanda kullanılmasının dişeti enflamasyonuna sebep olabileceği bildirilmiştir (Willershausen ve ark., 2001; Paolantonio ve ark., 2004).

Dişeti çekilmelerinin olduğu bölgelerde kök yüzeyi çürükleri ve abrazyon defektleri yaygın olarak görülmektedir. Bu nedenle dişeti çekilmesinin tedavisi amacıyla uygulanabilecek mukogingival cerrahi öncesi kök yüzeyi çürük ve defektlerinin restorasyonu gerekmektedir (McGuire, 1996; Camargo ve ark., 2001; Martins ve ark., 2007). Literatürde servikal çürük ve abrazyon defektlerinde mukogingival cerrahi öncesi kullanılacak materyallerle ilgili farklı sonuçlar veren pek çok çalışma

bulunmaktadır (Alkan ve ark., 2006; Zucchelli ve ark., 2006; Santos ve ark., 2007; Santamaria ve ark., 2009; Cairo ve Pini-Prato, 2010).

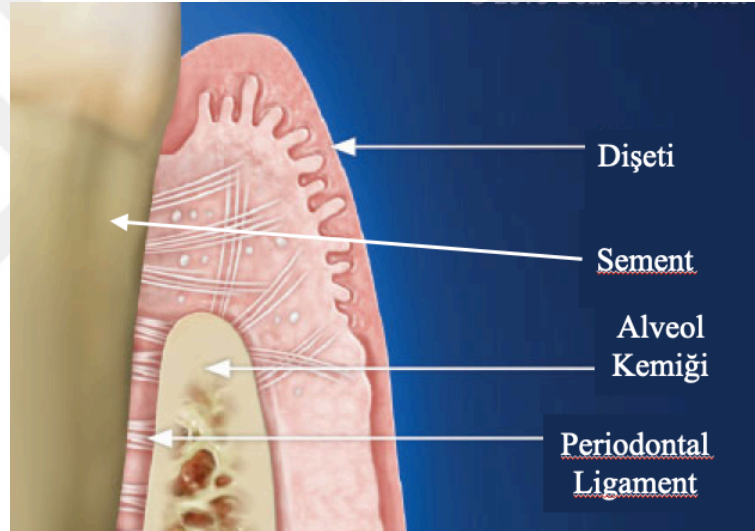
Kompozit materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirildiği çalışmalarda öne çıkan yöntemlerden biri de *in-vitro* koşullarda bu materyallerin, hücre dizileri üzerindeki sitotoksosite ve diğer hücresel etkilerinin değerlendirilmesidir (Hanks ve ark., 1981; Geurtsen, 1998; Goldberg, 2008). Kompozitlere yönelik sitotoksosite çalışmalarında üzerinde durulan en temel konu, kompozitleri oluşturan monomerler ve polimerizasyon sonrası salınabilen bu monomerlerin etkileri olmuştur (Lee ve ark., 1998; Bakopoulou ve ark., 2009; Urcan ve ark., 2010).

Bu çalışmada, periodontal restoratif ilişki düşünülerek farklı içeriklere sahip 3 kompozit dolgu maddesinin [nano-hibrit organik monomer esaslı Admira Fusion (AF) supra-nano dolduruculu rezin esaslı Estelite Quick Sigma (EQS), nano-hibrid *Bis-(akryloyloxymethyl) tricyclo [5.2.1.0.sup.2,6]decane* (TCD-DI-HEA) esaslı Charisma Topaz (CT)] insan dişeti fibroblastı (Hgf) ve insan periodontal ligament fibroblastı (Hpdlf) hücre dizileri üzerindeki sitotoksosite etkisi ile Hgf hücrelerindeki tip I, tip III kolajen ve integrin  $\beta$ 1 protein ekspresyonu etkileri değerlendirildi.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Periodonsiyum

Periodonsiyum sement, periodontal ligament, alveol kemiği ve dişeti dahil olmak üzere dişi destekleyen tüm dokuları tanımlayan bir terimdir (Şekil 4.1). Periodonsiyumun her bir ögesi kendi içinde özel olmakla birlikte, tüm bu kompleks yapı dişin alveol kemiği içinde kalmasını sağlamaktadır (Cho ve Garant, 2000; Garant, 2003).



Şekil 4.1. Periodonsiyum komponentleri

#### 4.1.1. Diş eti

Diş eti, alveol kemiği ve diş kök yüzeyini mine-sement birleşiminin kuraline kadar örten dokudur (Newman ve ark., 2012). Anatomik olarak; diş eti kenarı, yapışık diş eti ve interdental diş eti olmak üzere 3 bölüme ayrılmıştır. Her bölüm fonksiyonuna göre histolojik özellikleri, epitel kalınlığı ve farklılaşma kapasitesi açısından özelleşmiştir (Ainamo ve Talari, 1976).

Diş eti histolojik olarak incelendiğinde çok katlı yassı epitel ve altındaki bağ dokusundan oluşmaktadır. Epiteldeki baskın hücreler keratinositlerdir. Bununla birlikte, Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri ve melanositler epitelde bulunan diğer

hücrelerdir (Newman ve ark., 2012). Diş eti epitelinin temel görevi, ağız ortamı ile daha derin yapılar arasında yarı geçirgen bir bariyer oluşturmaktır. Epitel, altındaki bağ dokusuna 300-400 Å kalınlığındaki bazal lamina ile bağlanmaktadır (Schroeder ve Theiade, 1966). Bazal lamina, lamina lusida ve lamina densa olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Lamina lusida, epitel hücrelerinin hemidesmozomlar aracılığıyla bazal laminaya bağlandığı bölgedir. Bir glikoprotein olan laminin açısından zengindir. Lamina densa ise bazal laminanın altındaki bağ dokusuna bakan kısımdır. Hücresel yoğunluğu az ve tip IV kolajen açısından zengin bir yapıya sahiptir (Newman ve ark., 2012). Bazal laminanın lamina densa tabakasında daha yoğun olduğu gözlemlenen kolajen lifler, diş eti bağ dokusu ve diş eti epiteli arasındaki bağlantıda görev almaktadır (Newman ve ark., 2012).

Diş eti bağ dokusu *lamina propria* olarak da isimlendirilmektedir ve temel olarak kolajen lifler (hacimce %60), fibroblastlar (% 5), damarlar, sinirler ve hücre dışı matriksten (yaklaşık % 35) oluşmaktadır (Newman ve ark., 2012). Diş eti bağ dokusunun temel hücreleri fibroblastlardır. Mezenkimal kökenli olan bu hücreler diş eti bağ dokusunun gelişiminde, devamlılığında ve tamirinde görevlidir. Fibroblastlar, kolajen ve elastik lif sentezinin yanında hücre dışı matriks, glikoprotein ve glikozaminoglikan sentezlemektedir. Ayrıca kolajen yıkımında, kolajenaz sentezi ve fagositozdan sorumludur (Schor ve ark., 1996).

Hücre dışı matriks, hücreler arasındaki amorf yapıda yüksek su içerikli maddedir. Diş eti bağ dokusunun hücre dışı matriksinin içeriğindeki kolajen olmayan proteinleri, proteoglikanlardan temel olarak dermatan sülfat ve heparan sülfat, glikoproteinlerden temel olarak fibronektin oluşturmaktadır (Bartold ve ark., 1981). Fibronektin, hücreler arası bağlantı, hücre göçü, fagositoz ve hücre dışı matriks organizasyonu gibi doku devamlılığını sağlayan pek çok görevde rol oynamaktadır (Mariotti, 1993). Laminin dişeti bağ dokusu hücre dışı matriksinde bulunan diğer glikoproteinlerden biridir. Daha çok bazal laminaya yakın bölgelerde gözlemlenen laminin, hücreler arası bağlantı, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında görev almaktadır (Beck ve ark., 1990). Hücre dışı matrikste kolajen, retiküler ve elastik lifler olmak üzere 3 tip bağ dokusu lifi bulunmaktadır. Bunlardan en yoğun olan tip I kolajen *lamina proprianın* büyük bir kısmını oluşturmakta ve diş etine gerilme direnci kazandırmaktadır (Løe ve Karring, 1969). Diş eti bağ dokusunda yaygın olarak bulunan diğer kolajen, tip III

kolajendir ve bazal laminaya yakın bölgelerde daha yaygın dağılım göstermektedir (Bartold ve ark., 2000).

#### **4.1.2. Alveol Kemiği**

Alveol kemiği, alt çene ve üst çene kemiklerinin diş soketini destekleyen bölümüdür (Newman ve ark., 2012). Alveol kemiği, diş oluşumu ve sürmesi ile şekillenmektedir. Bu nedenle dişlerin büyüklüğü, yeri, şekli ile dişler aracılığıyla iletilen kuvvetler alveol kemiğinin şeklini ve yapısını etkilemektedir (Schroeder, 1991).

Alveol kemiği 2 kısımda incelenmektedir. Dişi ve periodontal ligamenti saran alveol kemiği, kortikal yapıdadır ve alveol kemiğinin iç ve dış yüzeyini sarmaktadır. Destekleyen alveol kemiği ise süngerimsi kemik yapısındadır ve diş ile periodontal ligamenti saran alveol kemiğini desteklemektedir. Alveol kemiğinde, dişlerin yerleştiği soket duvarı, ince, kompakt ve gözenekli bir yapıya sahiptir. Bu gözenekli yapı, alveol kemiğinin merkezindeki süngerimsi kemik bölgesinden periodontal ligamente nörovasküler demetlerin iletilmesini sağlamaktadır (Newman ve ark., 2012; Caglayan, 2018).

#### **4.1.3. Periodontal Ligament**

Periodontal ligament, diş çevreleyen ve alveol kemiğinin iç duvarına bağlayan kan damarından zengin, yüksek miktarda hücresel içeriğe sahip bağ dokusudur (McKee ve ark., 1996). Periodontal ligament ortalama 0,25 mm genişliktedir. Periodontal ligament dişlerin alveol kemiğine tutunmasını sağlamaktadır. Çiğneme kuvvetleri periodontal ligament aracılığıyla alveol kemiğine iletilmektedir. (Caglayan, 2018).

Periodontal ligamenti oluşturan en önemli yapı periodontal fibrillerdir. Periodontal fibriller, kolajen lif demetlerinden oluşmaktadır. Alveol kemiği ve sement arasında uzanan kolajen lif demetlerine *Sharpey* fibrilleri adı verilmektedir. *Sharpey* fibrilleri, alveol kemiğine bağlandıkları bölgelerde kısmen kalsifiye olmaktadır. Periodontal

ligament fibrilleri temel olarak 6 grupta ele alınmaktadır: transseptal fibriller, alveol kret fibrilleri, horizontal fibriller, oblik fibriller, apikal fibriller ve interradiküler fibriller (Newman ve ark., 2012).

Periodontal ligament histolojik olarak, bağ dokusu hücrelerini, epitelyal kalıntı hücrelerini, immün sistem hücrelerini ve nörovasküler sistemle ilgili hücreleri içermektedir (Ko ve Bernard, 1981). Bağ dokusu hücreleri; fibroblastlar, sementoblastlar, osteoblastlar ve osteoklastlardır. Periodontal ligament bağ dokusunda en yaygın görülen hücreler olan fibroblastlar, kolajen ve hücre dışı matriks sentezinin yanında kolajen yıkımını da gerçekleştirmektedir (Cate ve Deporter, 1975). Periodontal ligament bağ dokusunda bulunan diğer hücreler, periodontal ligamentin dişe ve alveol kemiğine yakın olan bölgelerinde görülmektedir (Newman ve ark., 2012). Enflamasyon, tamir ve rejenerasyon durumlarında periodontal ligament bağ dokusunda yer alan hücreler sementin ve alveol kemiğinin yıkım, tamir ve yapımında önemli rol almaktadır (McCulloch ve ark., 2000). Vücutta bulunan diğer ligament ve tendon benzeri dokular ile kıyaslandığında periodontal ligament vasküler açıdan zengin bir dokudur. Bu sayede, dişeti, kemik ve avasküler sement dokularının beslenmesine katkıda bulunmaktadır (McCulloch ve Melcher, 1983).

#### 4.1.4. Sement

Sement, diş kökünü saran, kalsifiye, avasküler, mezenkimal kökenli dokudur. Sementin inorganik içeriği (hidroksiapatit) % 45 - % 50 aralığındadır. Bu oran kemikten (% 65), dentinden (% 70) ve mineden (% 97) azdır (Newman ve ark., 2012). Hücresel içeriğine göre, hücresiz (primer) ve hücreli (sekonder) olmak üzere iki temel tip sement tanımlanmıştır (Gottlieb, 1942). Bunların her ikisi de kalsifiye interfibriler matriks ve kolajen lifler içermektedir. Sementin temel kolajen kaynağını, periodontal ligament bağ dokusunda yer alan fibroblastların senteziyle oluşan *Sharpey* fibrilleri oluşturmaktadır. *Sharpey* fibrillerinin semente gömüldüğü bölgelerdeki kolajen demetleri sementin *ekstrinsik* fibrilleri olarak ifade edilmektedir. Sement dokusunu oluşturan sementoblast hücrelerinin sentezlediği kolajen lifler ise sementin *intrinsik* fibrilleri olarak isimlendirilmektedir (Selvig, 1965). Sementoblastlar ayrıca, sementin

interfibriler matriksinde yer alan proteoglikanların, glikoproteinlerin ve fosfoproteinlerin sentezini gerçekleştirmektedir. Özellikle proteoglikanlar, sementin rejenerasyonunda hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks etkileşiminde düzenleyici rol almaktadırlar (Bartold ve Narayanan, 1998). *Sharpey* fibrilleri sement organik içeriğinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu sebeple tip I kolajen sement dokusunda yaygın olarak bulunan kolajendir (%90) (Rao ve ark., 1979). Tip III kolajen ise histolojik olarak *Sharpey* fibrilleri etrafında gözlenmiştir (%5) (Bartold, 1995).

#### 4.2. Diş Eti Fibroblastları ve Periodontal Ligament Fibroblastları

Fibroblastlar, diş eti bağ dokusunda ve periodontal ligamentte bulunan baskın hücrelerdir. Fibroblastlar buldukları dokunun devamlılığı, tamiri ve rejenerasyonunda önemli rol üstlenmektedirler. *Scanning* elektron mikroskobu incelemelerinde Hgf ve Hpdlf benzer yapıda hücreler olarak gözlenmiştir. Fibroblastlar, oval uzun şekilli, çekirdekleri genellikle merkezde konumlanmış hücrelerdir. Yapışkan hücreler olarak da ifade edilen fibroblastların tutunma kabiliyeti *psödopod* adı verilen hücresel uzantılarıyla ilişkilidir (Giannopoulou ve Cimasoni, 1996). Hgf ve Hpdlf hücreleri ile yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda, bu hücrelerin adhezyon ve protein sentezi gibi benzer özelliklerinin yanında çoğalma ve olgunlaşma açısından farklılıklar içerdikleri belirtilmiştir (Mariotti ve Cochran, 1990; Kuru ve ark., 1998). Mariotti ve ark. (Mariotti ve Cochran, 1990) Hgf ve Hpdlf hücrelerinin bölünme hızlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, Hgf hücrelerinin 4. güne kadar, Hpdlf hücrelerinin ise 6. güne kadar hızlı bölünme gösterdiklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, olgunlaşan Hgf ve Hpdlf hücrelerinin, hücresel protein içeriğinin benzer olduğu tespit edilmiştir (Mariotti ve Cochran, 1990). Hpdlf hücrelerinin farklılaşma kabiliyeti Hgf hücrelerinden ayrılmaktadır. *In-vitro* çalışmalarda Hpdlf hücrelerinin sementoblast ve osteoblastlara dönüşebildiği gösterilmiştir (Cho ve Garant, 1996). Bu kabiliyeti sayesinde Hpdlf hücrelerinin periodonsiyumun tamir ve rejenerasyonunda görev alan en temel hücrelerden biri olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Kuru ve ark. (Kuru ve ark., 1998) yaptıkları çalışmada Hpdlf hücrelerinin fibronektin ve tip I kolajen sentezinin Hgf hücrelerinden



fazla olduğunu göstermiş ve bu bulgunun Hpdlf hücrelerinin yara iyileşmesi ve rejenerasyonda aldığı rol ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

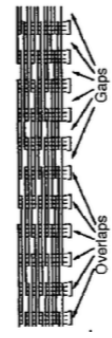
### 4.3. Hücre Dışı Matriks

Hücre dışı matriks, hücreler arasında yer alan, amorf yapıda, çeşitli makromoleküllerden oluşan maddedir (Mariotti ve Cochran, 1990). Hücre dışı matriks hücre göçü, proliferasyonu ve metabolizması gibi hücresel davranışların düzenlenmesinde kompleks ve oldukça önemli bir fonksiyona sahiptir (Kuru ve ark., 1998). Fibroblast hücreleri, hücre dışı matriks proteinlerini sentezlemektedir. Hücre dışı matriksin bu protein içeriği, periodontal patolojinin başlaması ve ilerlemesinin yanı sıra yara iyileşmesinde de önemli bir yere sahiptir. Hücre dışı matriks ve fibroblastlar arasındaki interaktif ilişki pek çok çalışmada incelenmiştir (Chavrier ve ark., 1984; Mariotti, 1993; Cho ve Garant, 1996; Palaiologou ve ark., 2001). Palaiologou ve ark. (Palaiologou ve ark., 2001) Hpdlf ve Hgf hücrelerinin, hücre dışı matriksinde bulunan, fibronektin, laminin, Arjinil-glisil-aspartik asit (RGD) peptid, vitronektin, tip I ve tip IV kolajen proteinlerine bağlantı farklılıklarını incelemişlerdir. Buna göre, Hgf ve Hpdlf hücrelerinin vitronektin, RGD peptid, tip I ve tip IV kolajene benzer şekilde iyi bağlandıklarını, laminin proteinine ise Hpdlf hücrelerinin Hgf hücrelerine göre anlamlı derecede daha iyi bağlandığını göstermişlerdir (Palaiologou ve ark., 2001). Periodonsiyum hücre dışı matriksinde baskın olan proteinler kolajen proteinleridir. Diş eti bağ dokusunda ve periodontal ligamentte baskın kolajen proteinleri tip I ve tip III kolajen olarak izlenmiştir. Bunun yanında diş eti bağ dokusunda tip IV ve tip V, periodontal ligamentte ise tip IV kolajen varlığı tespit edilmiştir (Bartold, 1991). Kolajen ve diğer hücre dışı matriks proteinlerinin hücreler ile olan etkileşiminde hücre membranında yer alan ve integrin adı verilen *transmembran* proteinler görev almaktadır.

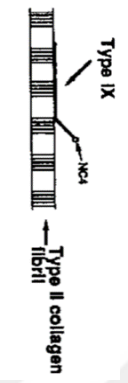
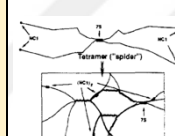

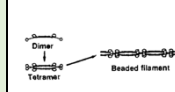
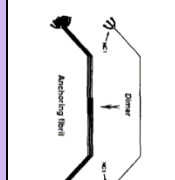
### 4.3.1 Tip I ve Tip III Kolajen

Kolajen proteinleri 1 veya 3 helikal sarmal içeren makromoleküllerdir. En az 14 farklı kolajen molekülünü kodlayan 25 ilişkili gen bulunmuştur (Uitto ve ark., 1986). Kolajen molekülü 3 ayrı polipeptid zincirden oluşmaktadır. Alfa zinciri homotrimetrik veya heterotrimetrik alanlar oluşturmaktadır. Üçlü helikal yapının oluşumu proteinin aminoasit içeriğine ve polipeptid zincirlerin sarımına bağlıdır. Üçlü helikal yapının amino asit dizilimine bakıldığında glisin-X-Y dizisiyle karşılaşılmıştır. X ve Y % 30'luk bir oranla prolin ve hidroksprolin aminoasitlerinden oluşmaktadır. Üçlü helikal yapının oluşması için en küçük aminoasit olan glisin önemlidir ve üç zincirin birleştiği alanda konumlanmıştır (Mariotti, 1993). Kolajen protein ailesi moleküler yapılarına ve fonksiyonlarına göre sınıflanmıştır (Van der Rest ve Garrone, 1991) (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1.** Kolajen Ailesi (Van der Rest ve Garrone, 1991)

Kolajen Tipi	Moleküler Ağırlık (kDa)	Moleküler Organizasyon	Çökeltiler (Şematik)	Doku Dağılımı	Fonksiyonu
<b>a.Fibriler</b>					
I	285	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)[\alpha 1(I)]_3$		Dişeti, periodontal ligament, sement, kemik, dentin, deri, tendon vb. çoğu bağ dokuda bulunmaktadır.	Gerilim kuvvetlerine dayanıklılık sağlar.
II	285	$[\alpha 1(II)]_3$		Kıkırdak ve vitröz humör	Gerilim kuvvetlerine dayanıklılık sağlar.
III	285	$[\alpha 1(III)]_3$		Dişeti, periodontal ligament, sement, deri, kan damarı ve fetal dokularda baskın olarak bulunur	Gerilim kuvvetlerine dayanıklılık sağlar.
V	300	$[\alpha 1(V)]_3$ $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ $\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$		Daha çok deri, kan damarları, iskelet kası, düz kas, dişeti, periodontal ligament gibi dokularda, dokular arası maddede bulunur.	Basal membran ve stroma arasındaki bağlantıda yer alır, hücre atışmanı ve göçünü düzenler
XI	300	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)$ $\alpha 3(XI)$		Kıkırdak, intervertebral disk, kulak elastik kıkırdağı, vitröz humör ve notokord kılıfıta bulunmaktadır.	Tip II kolajen boyutunu düzenler, kolajen-proteoglikan ilişkisine öncülük eder.

**Tablo 4.1. Kolajen Ailesi Devamı (Van der Rest ve Garrone, 1991)**

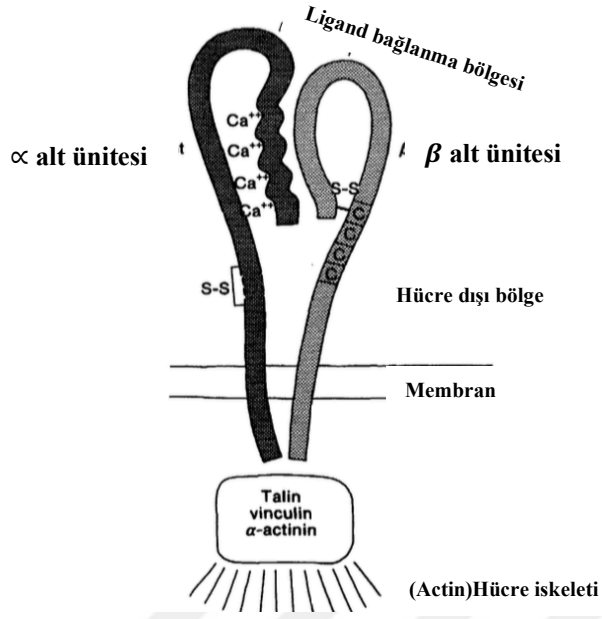
Kolajen Tipi	Moleküler Ağırlık (kDa)	Moleküler Organizasyon	Çöktürler (Şematik)	Doku Dağılımı	Fonksiyonu
<b>b. Kesilen üçlü sarmalları olan fibrille ilişkili kolajenler</b>					
IX	210	$\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX}) \alpha 3(\text{IX})$		Vitröz Humor, kırıkardt hücre çevresi alan	Tip II kolajene bağlanır ve diğer bağ doku elemanlarının bağlantısına öncülük eder.
XII	210	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$		Embriyonik cilt ve tendon ile periodontal ligament	Tip I kolajene bağlanır ve diğer bağ doku elemanlarının bağlantısına öncülük eder.
XIV	220	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$		Cilt,tendon	Bilinmiyor.
<b>c.Tabaka oluşturan fibriller</b>					
IV	540	$[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$		Tüm bazal membranlar	Laminin ve heparan sülfat ile ilişkide, bazal membranın temel yapısal bileşenidir.
VIII	402	$[\alpha 1(\text{VIII})]_3\alpha 2(\text{VIII})$		Çoğu mezenkimal dokunun minör bileşeni Descemet zarı	Hüresel fenotip stabilizasyonu ve hüresel bütünlüğün devamlılığını sağlar.
<b>d.Boncuklu Filamentler</b>					
VI	530	$\alpha 1(\text{VI}) \alpha 2(\text{VI}) \alpha 3(\text{VI})$		Kan damarları, cilt uterus, karaciğer, böbrek,Matris düzeneci: bağ periodontal ligament vedokuya hücreleri dişetini içeren çoğu bağbağlar. doku	
<b>e.Anchor fibrilleri</b>					
VII	510	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$		Cilt, göz, boyun ve oral mukozayı içeren pek çok bağ dokuda	Epitel bazal tabakasını kalınlıkta bağ dokuya bağlar
<b>f. Büyüme alanına özgü</b>					
X	147	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	?	Endokonriyal büyüme plağı, fetal iskelet ve kalsifiye kırıkardak	Hipertrofik kırıkardağın silinmesini kolaylaştırır, kırıkardağın kemiğe dönüşümünü kolaylaştırır.
<b>g. Çok yönlü</b>					
XIII	?	?	?	Cilt, intestinal mukoza ve kırıkardak	Bilinmiyor

Tip I kolajen ( $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2[I][\alpha 1(I)]_3$ ) 285 kDA molekül ağırlığındadır. Fibriler kolajen ailesinin en önde gelen üyesidir. Vücudun; cilt, tendon, kemik, dentin, sement, periodontal ligament ve diş eti gibi pek çok dokusunda bulunmaktadır. Bulunduğu dokulara gerilme kuvvetlerine karşı direnç kazandırmaktadır (Narayanan, 1983). Tip III kolajen ( $[\alpha 1(III)]_3$ ) 285 kDA molekül ağırlığında fibriler kolajen ailesinin diğer bir üyesidir. Fetal dokularda yaygın görünen tip III kolajen, diş eti, periodontal ligament, sement, deri ve kan damarlarında bulunmaktadır (Mariotti, 1993). Yapılan çalışmalar, periodonsiyumda erken enflamatuvar yanıt ve erken yara iyileşmesi dönemlerinde tip III kolajen ve tip V kolajen miktarında artış olduğunu belirtmiştir (Narayanan, 1983). Periodontal hastalıklarda meydana gelen doku hasarı ile birlikte ise %70'e kadar kolajen yıkımı olabileceği belirtilmiştir (Narayanan, 1983). Doku devamlılığında kolajen ve diğer hücre dışı matriks proteinlerinin hücreler ile olan etkileşimi önem arz etmektedir.

#### 4.3.2. İntegrin $\beta_1$

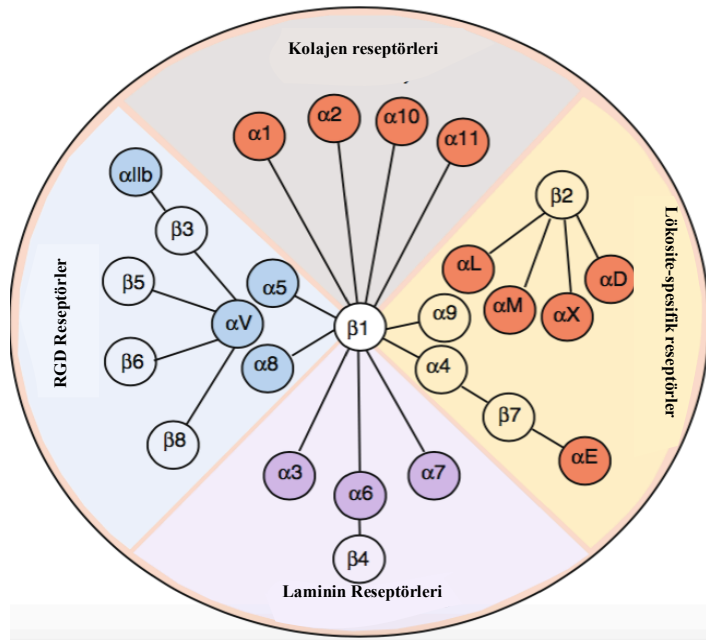
Hücre membranında yer alan integrin molekkülleri hücre-hücre dışı matriks etkileşiminde rol oynayan proteinlerdir (Tamkun ve ark., 1986). İntegrin molekkülleri *transmembran* glikoproteinlerdir (Tamkun ve ark., 1986). Reseptör olarak çalışan integrin proteinleri hücre dışı matriks ve hücre arasındaki haberleşmeyi sağlayarak hücre proliferasyonu, farklılaşması ve protein sentezi gibi hücre işlevlerini düzenlenmektedir (Jokinen ve ark., 2004).

Her bir integrin glikoproteini  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinden oluşmaktadır (Hynes, 1992). İntegrin molekülünün her bir  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimi de hücre dışına uzanan bölge, hücre membranı üzerinde yer alan bölge, ve hücre içerisine uzanan sitoplazmik bölge olmak üzere 3 kısım içermektedir (Schoenwaelder ve Burridge, 1999) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İntegrin Molekülünün Şematik Gösterimi (Albelda ve Buck, 1990)

İntegrinler için tanımlanan birbirinden 9  $\alpha$  ve 16  $\beta$  alt birimi bulunmaktadır. Bu alt birimlerin kombinasyonu ile oluşan integrin proteinleri fonksiyonlarına göre  $\beta_1$  integrinler,  $\beta_2$  integrinler ve  $\alpha_v$  integrinler olmak üzere 3 ana alt gruba ayrılmıştır (Barczyk ve ark., 2010) (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. İntegrin alt gruplarının şematik gösterimi

Hücrelerin, hücre dışı matrikse bağlanmasında  $\beta_1$  integrinler önemli rol üstlenmektedirler (Brakebusch ve Fässler, 2005). Periodonsiyum bağ dokusunun devamlılığını sağlayan Hgf ve Hpdlf hücrelerinin integrin ekspresyonunda farklılıklar tespit edilmiştir. Hgf hücreleri  $\alpha_2, \alpha_3, \alpha_5, \alpha_v$  ve  $\beta_1$  integrinleri eksprese ederken, Hpdlf hücreleri  $\alpha_4, \alpha_5, \alpha_v$  ve  $\beta_1$  integrinleri eksprese etmektedir (Häkkinen ve ark., 1994; Van Der Pauw ve ark., 2002). Hgf ve Hpdlf hücrelerinin, periodonsiyumun hücre dışı matriksinin temel bileşeni olan kolajen proteinleri ile ilişkisi değerlendirildiğinde, tip I, tip II, tip III, tip IV ve tip V kolajenler ile ilişkili başlıca integrin reseptörleri  $\alpha_1\beta_1$  ve  $\alpha_2\beta_1$  olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte daha az bilinen  $\alpha_{10}\beta_1$ ,  $\alpha_{11}\beta_1$  integrinlerin de kolajenler ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Jokinen ve ark., 2004). Fibroblastların, semente tutunmasını  $\alpha_5\beta_1$  integrinlerin rol aldığı belirtilmiştir (Ivanovski ve ark., 1999). Van Der Pauw ve ark. (Van Der Pauw ve ark., 2002) yaptıkları çalışmada integrin  $\beta_1$  proteinini bloke etmek için anti- $\beta_1$  antikorunu kullanmışlardır. Hgf ve Hpdlf hücrelerinin  $\beta_1$  integrin yokluğundaki davranışlarını inceledikleri araştırmalarında, Hgf ve Hpdlf hücrelerinin yayılma ve bağlanma davranışlarında azalma tespit etmişlerdir. Farklı titanyum yüzeylerde Hpdlf hücrelerinin bağlantısını integrinler üzerinden değerlendiren bir çalışmada, titanyum yüzeylere Hpdlf hücrelerinin bağlantısı için integrinlerin gerekli olduğu ancak farklı implant yüzeylerinde, farklı integrinlerin reseptör olarak görev alabileceği belirtilmiştir (Kramer ve ark., 2009).

#### 4.4. Periodontal – Restoratif İlişki

Dental restorasyonlar ile periodontal sağlık arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalar, bu ilişkiyi farklı açılardan değerlendirmektedir. Diş eti kenarıyla uyumlu restorasyon sınırı, restorasyon kenarındaki taşkınlıkların varlığı, marjinal sızıntının varlığı, yüzeyin pürüzlülüğü gibi durumların ve restoratif materyal tipinin periodontal sağlık üzerine etkileri özellikle incelenen konulardır (Waerhaug, 1956; Paolantonio ve ark., 2004; Sunnegårdh-Grönberg ve ark., 2009; Van Landuyt ve ark., 2011).

Biyolojik genişlik, restorasyonların yerleşimi ile ilgili dikkate alınması gereken önemli bir kavramdır. İlk kez Gargiulo ve ark. (Gargiulo ve ark., 1961) tarafından,

kadavra çalışmalarında tanımlanmıştır. Bu tanıma göre alveol kemiği ve yumuşak doku arasındaki mesafe oluk derinliği, 0,67 mm epitelyal ataşman ve 1,07 mm bağ doku ataşmanını içermektedir ve ortalama 3 mm olarak ifade edilmektedir (Gargiulo ve ark., 1961; Newman ve ark., 2012). Biyolojik genişlik özellikle protetik restorasyonlarda öne çıkan bir kavramdır. Biyolojik genişlik korunmadığı takdirde, epitelyal ataşman ve bağ doku ataşmanına zarar verileceğinden enflamasyon artışı, klinik ataşman kaybı ve diş eti çekilmesi riski ortaya çıkmaktadır (Schätzle ve ark., 2001). Kök yüzeyine uzanan diş dokusu kayıpları, supragingival diş dokusunun restorasyon tutuculuğu açısından yetersiz olduğu diş harabiyetleri, kural 1/3'te yer alan kök perforasyonları gibi durumların tedavisinin, biyolojik genişlik korunarak gerçekleştirilebilmesi amacıyla uygulanabilen kural boyu uzatma cerrahisi ilk kez D.W Cohen tarafından tanımlanmıştır (Cohen, 1962). Kural boyu uzatma işlemi, flep operasyonu ile birlikte rezektif kemik cerrahisini kapsayan biyolojik genişliğin yeniden tayin edilmesine imkan veren periodontal cerrahi işlemdir (Cohen, 2007). Ancak kural boyu uzatma cerrahisi, kural-kök oranındaki yetersizlik, estetik problemler, yüksek furkasyon varlığı, diş ark ilişkisindeki uyumsuzluklar gibi kontraendikasyonlar içermektedir (Gupta ve ark., 2015). Restoratif materyallerde meydana gelen gelişmelerle birlikte, diş dokusu kaybının fazla ve kural boyu uzatma cerrahisinin kontraendike olduğu durumlarda, periodontal dokular üzerindeki etkisi de dikkate alınarak kullanılması en uygun olan restoratif materyale yönelik araştırmalar artmıştır (van Dijken ve ark., 1987; Paolantonio ve ark., 2004; Oppermann ve ark., 2016).

Van Dijken ve ark. (van Dijken ve ark., 1987) yaptıkları randomize klinik çalışmada, kök yüzeyine uzanan sınıf III diş doku kaybı olan hastalarda; rezin modifiye cam iyonomer siman, poliasit modifiye rezin kompozit ve rezin kompozit restorasyonların diş eti enflamasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Hastaların bir hafta boyunca dişlerini fırçalamaması üzerine oluşturdukları gingivitis modelinde 0. ve 7. gün Plak İndeksi (PI), Gingival İndeks (GI) (Löe, 1967) skorlarını ve diş eti oluşu sıvısı (DOS) miktarlarını değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda sağlıklı mine yüzeyinin de kontrol grubu olarak dahil edildiği 0. ve 7. gün PI ve GI verilerinde gruplar arası anlamlı farklılık kaydetmemişler ancak 7. gün DOS miktarının kontrol grubunda daha az olduğunu belirtmişlerdir (van Dijken ve ark., 1987).

Diş eti çekilmesi olan hastalarda periodontal tedavi seçeneği olarak mukogingival cerrahi yöntemler kullanılmaktadır (Allen ve Miller Jr, 1989; Pini Prato ve ark., 2005; Cairo ve Pini-Prato, 2010). Dişeti çekilmesi sonucunda kök yüzeyinin ağız ortamına açılmasıyla birlikte kök yüzeyi çürüklerinde ve kök yüzeyinde meydana gelmiş abrazyiv defektlerde artış gözlenmektedir (Goldstein ve ark., 2002; Zucchelli ve ark., 2006). Mukogingival cerrahi öncesinde varlığı teşhis edilen kök yüzeyi çürüklerinin ve abrazyiv defektlerin restorasyonu önerilmektedir. Böylece var olan doku kaybı sebebiyle kaybolmuş mine-sement sınırının yeniden tayin edilmesinin, hassasiyet probleminin giderilmesinin, flep adaptasyonunun artırılmasının cerrahi başarıyı arttıracığı bildirilmiştir (Terry ve ark., 2003; Zucchelli ve ark., 2006; Lucchesi ve ark., 2007; Santamaria ve ark., 2009; Cairo ve Pini-Prato, 2010).

#### **4.4.1. Kullanılan Restoratif Materyaller**

Periodonsiyum ile yakın ilişkide ve periodontal cerrahi alanda kullanılabilecek olan restoratif materyallerin etkileri klinik ve *in-vitro* çalışmalarla incelenmektedir(Dragoo, 1997; Reichl ve ark., 2006; Goldberg, 2008). Gümüş amalgam restorasyonlardan salınan cıvanın insan vücudunda toksik etkiler yaratabileceğini belirten çalışmaların ve estetik taleplerin artmasıyla birlikte, rezin esaslı cam iyonomer ve kompozit gibi restoratif materyallerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Geurtsen, 2000; Clarkson ve Magos, 2006). Bu gelişmeler, araştırmaların yönünü restoratif materyallerin yüzey özelliklerine, materyal üzerinde değişen biyofilm kompozisyon farklılıklarına ve materyallerin periodontal dokular üzerindeki etkilerine yönlendirmiştir.

Cam iyonomer simanlar, 1960'ların sonunda floro alümina silikat toz ve poliakrilik asit arasında su varlığında gerçekleşen asit-baz reaksiyonuna dayandırılarak geliştirilmiştir (Wilson, 1972). Hidrofilik özelliklere sahip bu materyalin dentin ve mineye bağlanma mekanizması, poliakrilik asitin kalsiyum ile kompleks oluşturmasına dayanmaktadır. Böylece organik polimerler kolajen ile hidrojen bağları oluşturmaktadır (Craig ve Powers, 1989; Lohbauer, 2009).



Cam iyonomer restoratif materyallerin fiziksel özellikleri geliştirilerek günümüzde kendiliğinden polimerize olan konvansiyonel ve rezin modifiye cam iyonomer simanlar ön plana çıkmıştır. Konvansiyonel cam iyonomer simanların hidrofilik olmaları cerrahi sahada kullanılmalarına yönelik önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca cam iyonomer simanlardan flor salınımı gerçekleşmektedir. Flor salınımının yarattığı bakteriostatik etkinin, plak florası üzerinde de etkili olabileceği belirtilmiştir (Seppa ve ark., 1993; Hayacibara ve ark., 2003). Ancak yüzey pürüzlülüğü ve plak retansiyonunu arttırabileceğine dair çalışmalar da bulunmaktadır (Carlen ve ark., 2001).

Alkan ve ark.(Alkan ve ark., 2006) yapmış oldukları klinik çalışmada, anterior bölgede kök yüzeyi defekti olan hastalarda cam iyonomer restorasyonlar ile kombine edilmiş mukogingival cerrahi tedavinin başarısını değerlendirmişlerdir. Mukogingival tedavinin tek başına uygulandığı kontrol grubu ile yaptıkları karşılaştırmada, 9 aylık takipte sondalama derinliği ve klinik ataşman seviyesi açısından gruplar arasında anlamlı fark olmadığını belirtmişlerdir (Alkan ve ark., 2006). Başka bir hayvan çalışmasında, supragingival ve subgingival yerleşimli amalgam ve cam iyonomer restorasyonların enflamatuvar etkisi histolojik açıdan incelenmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre supragingival restorasyonların subgingival restorasyonlara göre daha az enflamatuvar yanıt oluşturduğu ve subgingival restorasyonlar içinde amalgam restorasyonların cam iyonomer restorasyonlardan daha fazla enflamatuvar yanıtı sebep olduğu bildirilmiştir (Gomes ve ark., 2005).

Cam iyonomer restorasyonların hidrofilik olmaları sebebiyle doku sıvıları ve tükürükle uzun dönemde temas sonucu yapıları bozulmaktadır. Ayrıca cam iyonomer restorasyonların mekanik özellikleri açısından stres kuvvetlerine dayanıklılıkları düşüktür. Bu durumlar, cam iyonomer restorasyonların daimi restoratif materyal olarak kullanılmalarını ve stres kuvvetlerinin daha fazla olduğu posterior bölgedeki sınıf II ve sınıf I restorasyonlarda kullanılmalarını sınırlandırmaktadır (Uno ve ark., 1996).

#### 4.4.2. Kompozitler

Kompozit dolgu materyalleri artan estetik talepler ve klinik uygulamalardaki gelişmelerle 1960'ların başında tanımlanmış organik, inorganik ve bağlayıcı matriks olmak üzere üç ayrı matriks bileşeninden oluşan materyallerdir (Peutzfeldt, 1997; Kim ve ark., 2006). Bu matriksler kompozit rezinlerin fiziksel, mekanik ve estetik özelliklerini belirlemektedir (Ferracane, 2011)

Organik matriks kompozitlerin polimerizasyon sonrası rijit yapıya dönüşmelerini sağlayan bileşendir. En sık kullanılan organik matriks içeriği Bisfenol A-glisidil dimetakrilat (Bis-GMA) olmuştur (Bowen ve Marjenhoff, 1992). Diğer sık kullanılan organik matriks bileşeni uretan dimetakrilat (UDMA) olup Bis-GMA'ya göre kompozite akışkanlık özelliğini kazandırır ancak molekül ağırlığı düşüktür. Bu sebeple polimerizasyon sonrası daha fazla büzülme yaratmaktadır (Ferracane, 1995). Kompozitlerin viskozitesini azaltıp akışkanlığı arttırmak için trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA), metil metakrilat (MMA), etilen dietil metakrilat (EDMA) monomerleri organik matriks olarak kullanılmaktadır (Bayne ve ark., 2006; García ve ark., 2006).

İnorganik matriks ise organik matriksin içine dağılmış farklı büyüklüklerdeki lityum, alüminyum silikat, kuartz, cam partikülleri ve bor silikat gibi dolduruculardan oluşmaktadır ve materyale fiziksel özelliklerini kazandırmaktadır. İnorganik doldurucular aynı zamanda mekanik dayanıklılık, estetik ve polimerizasyon büzülmesinin azaltılmasına katkı sağlamaktadır (Ferracane, 1995; Bayne ve ark., 2006) Çinko, yitrium, baryum gibi metaller radyoopasite amacıyla inorganik faza eklenirken silika içeriği mekanik dayanıklılık yanında ışık geçirgenliğini artırarak kompozit materyallerinin estetik özelliklerini arttırmaktadır (Nicholson ve Connor, 2002).

Organik ve inorganik fazlar arasındaki bağlayıcı matriks, silan olarak adlandırılan silisyum bileşikleriyle sağlanmaktadır (Bowen ve Marjenhoff, 1992). Silanlar çift fonksiyonlu moleküllerdir; hem silika partiküllerinin yüzeyindeki hidroksil grubuyla, hem de organik matriksteki metakrilat gruplarıyla kovalent bağlar yapar (Zimmerli ve ark., 2010).

Kompozitler, çeşitli özelliklerine göre genellikle de inorganik doldurucunun büyüklüğü, miktarı ve kompozisyonuna göre 3 temel gruba ayrılmıştır. Bunlar (1) Geleneksel kompozitler, (2) mikro dolduruculu kompozitler (3) hibrit kompozitlerdir. Kompozit yapısındaki son gelişmeler, akıcı, *packable* (taşınabilir) ve nano dolduruculu kompozitler gibi pek çok farklı tip kategori ortaya çıkartmıştır (Roberson ve ark., 2006).

Geleneksel kompozitler ağırlıklarının %75-80'i oranında doldurucu içermektedirler (Roberson ve ark., 2006). 1980'lerde kullanılan geleneksel kompozitlerin partikül büyüklüğü 8 mm olmakla birlikte büyük partiküller pürüzlü yüzey yaratması, renklenme problemi ve aşınma dayanıksızlığı yaratmıştır (Craig, 1981) 1970'lerin sonunda geliştirilen mikro dolduruculu kompozitlerde partikül boyutu 0,01- 0,04 mm olan koloidal silika partikülleri kullanılmıştır (Roberson ve ark., 2006). Tipik olarak mikrodoldurucu kompozitler hacim olarak ortalama % 35-60 oranında doldurucu içermektedir, bu da fiziksel özelliklerini geleneksel ve hibrit kompozitlere göre düşürmektedir (Roberson ve ark., 2006). Hibrit kompozitler ise geleneksel ve mikrodolduruculu kompozitlerin avantajlarını kombinasyonu amacıyla 0,04 – 1 mm partikül boyutunda ve ağırlıklarının % 75-80'i kadar doldurucu içerecek şekilde dizayn edilmişlerdir (Roberson ve ark., 2006).

Son dönemde kompozitlerin üretiminde nanoteknolojinin kullanılmasıyla özelliklerinde önemli gelişmeler elde edilmiştir. Günümüzde nanopartiküller içeren iki tip kompozit bulunmaktadır (Çelik, 2017)

- a) *Nanofiller*: Rezin matrisi içerisinde 1-100 nm boyutunda nanopartiküller içermektedirler. Daha büyük doldurucular bulunmamaktadır.
- b) *Nanohibrit*: Nano partiküllere ek olarak 0,4 – 5  $\mu\text{m}$  boyutunda partiküller içermektedirler.

Nanohibrit kompozitlerin sağladığı en temel avantaj mikrohbritlerin mekanik gücü ve mikrodolduruculu kompozitlerin yüzey polisajlama özelliklerine sahip olması olarak belirtilmiştir (Çelik, 2017).

Ormoserler, 2000'lerin başında piyasaya tanıtılmış, 'organik modifiye seramik' sözcüklerinin akronimiyle tanımlanmış yeni nesil kompozitlerdir (Hickel ve ark., 1998) Organik olarak modifiye edilmiş metalik olmayan inorganik kompozitler olarak da tanımlanan ormoserlerin temel yapısını polikondensasyon ile oluşturulmuş organik

bir ağ oluşturmaktadır. Bu temel yapı, silikon dioksit tabanlıdır (Circular, 2000; Al-Hiyasat ve ark., 2005). Ormoserlerin doldurucu partiküllerinin boyutu 1-1,5  $\mu\text{m}$ 'dir. Ormoserler %61 oranında doldurucu partikül içermektedir (Çelik, 2017). Polimerizasyon büzülmesinin az olması, aşınma direncinin fazla olması ve çürük önleyici etkinliklerinin (Çelik, 2017) yanında monomer salınımının az olması ve buna bağlı biyouyumlulukları avantajları olarak gösterilmiştir (Al-Hiyasat ve ark., 2005; Brackett ve ark., 2007; Anand ve Balasubramanian, 2014; Çelik, 2017).

Günümüzde farklı içeriklere sahip pek çok materyal piyasada bulunmaktadır. Kompozitleri oluşturan monomrlerin polimerizasyon sonrasında dahi dokulara sızması ve kimyasal olarak bozulmaları uzun dönem stabilitelerini ve biyouyumluluklarını etkilemektedir (Lee ve ark., 1998; Reichl ve ark., 2006; Bakopoulou ve ark., 2009). Yapılan *in-vitro* çalışmalarda, kompozit bileşenlerinin sitotoksik, genotoksik, mutojenik ve östrojenik etkiler yaratabileceği belirtilmiştir (Schmalz, 1994; Kleinsasser ve ark., 2004; Lee ve ark., 2006).

Schubert ve ark. (Schubert ve ark., 2019) yaptıkları çalışmada, nanohibrit kompozit, nanohibrit ormoser (AF) ve *nanofiller* kompozitlerin fare L929 fibroblastı ile Hgf hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini 48 saat ve 72 saat sürelerinde değerlendirmişlerdir. 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda L929 fibroblast ve Hgf hücrelerine en düşük sitotoksik etki ormoser kompozit gurubunda tespit edilmiştir. Bununla birlikte inkübasyon zamanının hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiş, L929 fibroblast hücrelerinde ormoser kompozitlerin sitotoksik etkisinin zamanla anlamlı olarak azaldığı, nanohibrit ve *nanofiller* kompozitlerin sitotoksik etkisinin ise zamanla arttığı görülmüştür (Schubert ve ark., 2019).

Yang ve ark.(Yang ve ark., 2018), 5 farklı kompozit materyalinden salınan monomerleri ve bu monomerlerin Hgf hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini 72 saatlik inkübasyon süresinin ardından değerlendirmişler ve hücre kültürü ortamına salınan 12 kimyasal molekülden özellikle kompozitlerin organik matriksini oluşturan metakrilat içerikli monomerlerin (2- Hidroksietil metakrilat (HEMA), TEGDMA, etilen glikol dimetrakrilat (EGDMA)) konsantrasyonunun fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Salınan bu monomerlerin Hgf hücreleri üzerinde anlamlı bir sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuşlardır. Ancak Bis-GMA içerikli mikro

hibrit özellikte iki farklı kompozitten salınan bileşiklerin, DNA çift zincir kırılmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir (Yang ve ark., 2018).

Falconi ve ark. (Falconi ve ark., 2007), kompozit organik matriksinde bulunan HEMA monomerinin Hgf hücrelerinde tip I kolajen miktarına olan etkisini; 24 saat, 72 saat ve 96 saat inkübasyon sürelerinde değerlendirmişler ve Hgf hücrelerindeki tip I kolajen miktarının 24 saat, 72 saat ve 96 saat sürelerinde giderek azaldığını ortaya koymuşlardır.

Hakki ve ark. (Hakki ve ark., 2012) kök perforasyonlarında kullanılabilecek çinko oksitijenol, kompomer, Mineral Toksik Agregat (MTA), kendinden polimerize olabilen rezin kompozit ve amalgam restoratif materyallerinin Hpdlf hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini ve tip I kolajen ekspresyonunu 48 saat ve 96 saat sürelerinde araştırmışlardır. Sitotoksik etkisi anlamlı olarak en düşük materyali MTA olarak tespit etmişlerdir. Tip I kolajen ekspresyonu ise amalgam dışındaki tüm gruplarda anlamlı olarak artmış öte yandan amalgam grubunda anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir (Hakki ve ark., 2012).

Bu çalışmada, periodontal restoratif ilişki düşünülerek farklı içeriklere sahip 3 kompozit dolgu materyali AF, EQS ve CT'nin Hgf ve Hpdlf hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisi 24 saat ve 1 hafta inkübasyon sürelerinde değerlendirildi. Aynı zamanda, AF, EQS ve CT kompozit materyallerinin, Hgf hücreleri üzerine tip I, tip III kolajen ve integrin  $\beta$ 1 protein ekspresyonu etkileri 24 saat inkübasyon süresi sonunda değerlendirildi.

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1. Kompozit Disk Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmada, seçilen 3 farklı içerikli AF<sup>1</sup>, EQS<sup>2</sup> ve CT<sup>3</sup> kompozit materyaline ait detaylı bilgi tabloda verildi (Tablo 5.1).

**Tablo 5.1.** Çalışmada kullanılan kompozit materyallerin içerik ve üretici firma bilgisi

Materyal	Kategori	İçerik* (Temel Monomerler)	Üretici
Admira® Fusion	Nano-Hibrit-ormoser	Silikon oksit	VOCO GmbH, Cuxhaven Germany
Estelite® Σ Quick Sigma	Supra-Nano-Fill Rezin	Bis-GMA ve Triethylen Glycol Dimetacrylate, Radical Amplified Photo- Polymerization Initiator (RAP Technology™)	Tokuyama Dental, Tokyo, Japan
Charizma® Topaz	Nano-Hibrid Kompozit	TCD-Urethan Monomer (TCD-DI- HEA)	Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany

\* Üretici firma tarafından verilen bilgilere göre düzenlenmiştir.

Her kompozit materyalinden, çapı 7 mm kalınlığı 2 mm olacak şekilde disk örnekler ISO 10993-12:2012 standartlarına göre, n=3 deney sayısı dikkate alınarak hazırlandı (Tablo 5.2a, 5.2b, 5.2c). Hazırlanan 7 mm çaplı, 2 mm kalınlıktaki kompozit disk örneklerinin yüzey alanı 120,89 mm<sup>2</sup> olarak hesaplandı.

<sup>1</sup> Nano-Hibrit-Ormoser, Admira® Fusion, VOCO GmbH, Cuxhaven, Almanya

<sup>2</sup> Supra-Nano-Fill Rezin Kompozit, Estelite® Σ Quick Sigma, Tokuyama Dental, Tokyo, Japonya

<sup>3</sup> Nano-Hibrit Kompozit Charizma® Topaz, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Almanya

**Tablo 5.2a.** Sitotoksosite ve canlılık deneylerinde zaman aralıklarına ve hücrelere göre kullanılan kompozit disk örneklerinin sayısı

Kompozit	Hücre Dizisi	24 saat	1 hafta	Toplam
Admira® Fusion	Hgf	n =3	n =3	12 disk
	Hpdlf	n =3	n =3	
Estelite® Σ Quick Sigma	Hgf	n =3	n =3	12 disk
	Hpdlf	n =3	n =3	
Charizma® Topaz	Hgf	n =3	n =3	12 disk
	Hpdlf	n =3	n =3	

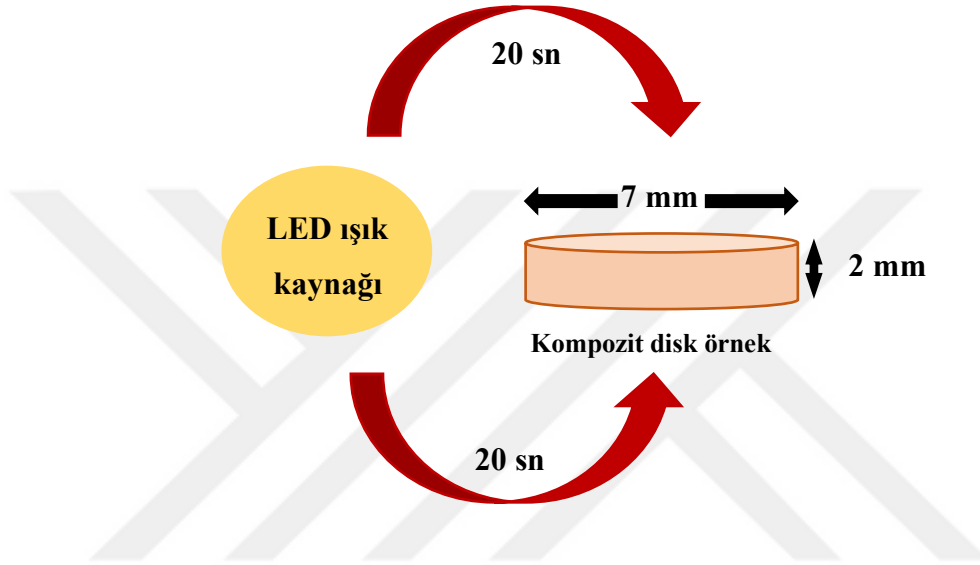
**Tablo 5.2b.** Protein ekspresyonu deneyinde kullanılan kompozit disk örneklerinin sayısı

Kompozit	Hücre Dizisi	Tip I Kolajen / Tip III Kolajen /İntegrin β <sub>1</sub> 24 saat Etkileri için Gerekli Disk Sayısı	Toplam
Admira® Fusion	Hgf	14 X 2	28 disk
Estelite® Σ Quick Sigma	Hgf	14 X 2	28 disk
Charizma® Topaz	Hgf	14 X 2	28 disk

**Tablo 5.2c.** Deneylerde kullanılan kompozit disklerinin toplam sayıları

Kompozit	Toplam Disk Sayısı
Admira® Fusion	40
Estelite® Σ Quick Sigma	40
Charizma® Topaz	40

Steril teflon kalıplara doldurulan kompozitlerden taşan materyal steril spatül kullanılarak uzaklaştırıldı. Polimerizasyon sırasında oluşabilecek oksijen inhibisyon tabakasını önlemek için numunelerin üzerine şeffaf plastik şerit yerleştirildi. Numuneler ışık gücü  $650 \text{ mW/cm}^2$  olan *Light Emitting Diode* (LED)<sup>1</sup> her iki yüzeyden 20 sn süreyle ışınlandı (Şekil 5.1.).

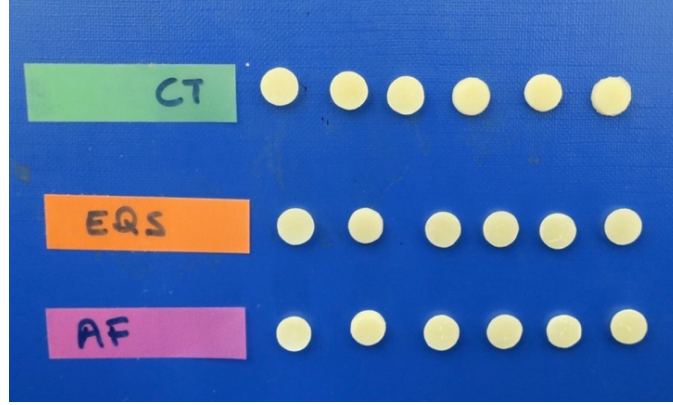


**Şekil 5.1.** Kompozit Disk Örneklerin Hazırlanması

Hazırlanan kompozit disk örnekler UV altında 1 saat bekletilerek sterilize edildi, ardından deney öncesi 24 saat süreyle karanlık ortamda, oda sıcaklığında ( $21^\circ\text{C}$ ) dinlendirildi.

<sup>1</sup> LED ışın kaynağı, VALO<sup>®</sup>, *Cordless Curing Light*; Ultradent, A.B.D





Resim 5.1. Hazırlanan kompozit disk örnekler

## 5.2. Hücrelerin çözülmesi, pasajlanması, çoğaltılması ve sayılması

Hgf<sup>1</sup> ve Hpdf<sup>2</sup> hücre dizilerinin beslenme koşulları; sodyum pirüvat, glutamin, yüksek D-glukoz<sup>3</sup> ve sodyum bikarbonat içeren *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM)<sup>4</sup> besi yeri ile sağlandı. (Resim 5.2a., Resim 5.2b.) Hücreler -152 °C'de sıvı azot tankından alınarak hızla çözünmesi sağlandı. Çözünen hücreler içerisinde 10 ml besi yeri bulunan 15 ml'lik tüplere aktarılarak 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj<sup>5</sup> edildi.



Resim 5.2.a. Steril ortam b. DMEM

<sup>1</sup> *Human Gingival Fibroblast* – Kat No: CRL-2014, ATCC, A.B.D

<sup>2</sup> *Human Periodontal Ligament Fibroblastı* – Kat No: CC7049, LONZA, İsviçre

<sup>3</sup> D-Glukoz – Kat No: G8270, Sigma Aldrich, Almanya

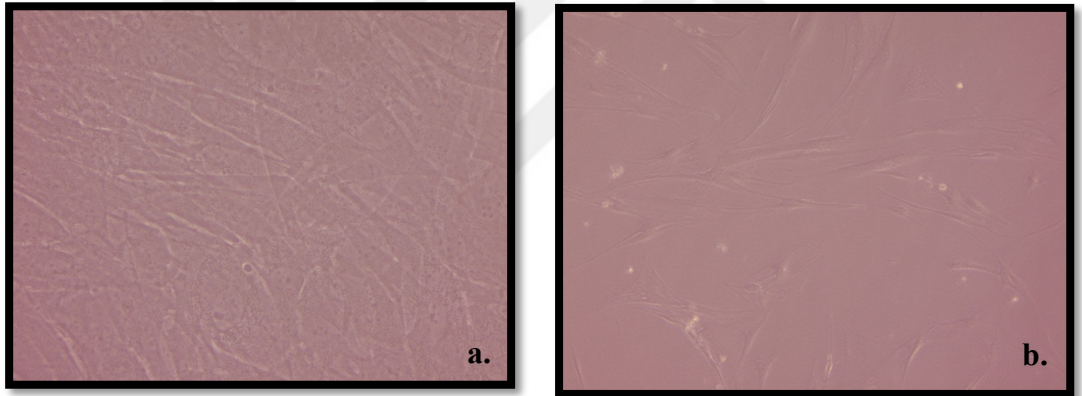
<sup>4</sup> DMEM – Kat No: P04-02500, Pan Biotech, Almanya

<sup>5</sup> Santrifüj cihazı – Biosafe Avanti J-30I, Beckman Coulter, A.B.D

Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra palet resüspanse edilerek, besi yeri içeren flasklara ekildi. Hücreler 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona<sup>1</sup> bırakıldı ve hücre çoğalması her gün takip edildi (Resim 5.3). Pasaj yapmak için hücrelerin ekildikleri flaskları %70-80 oranında doldurmaları beklendi (Resim 5.4).



**Resim 5.3. a.** Hücre kültür ortamı (flask) **b.** İnkübatör



**Resim 5.4.** Flaskın %70-80'ini dolduran **a.** Hgf hücrelerinin ve **b.** Hpdlf hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü (10X)

*Phosphate Buffered Saline* (PBS)<sup>2</sup> ile üç kez yıkanan hücreler, eklenen tripsin-EDTA<sup>3</sup> ile 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tripsinin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla eklenen besi yeri ile birlikte 15 ml'lik tüplere toplanan hücreler 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjün ardından paletin miktarına göre besi yeri ile resüspanse edilerek flasklara ekildi. Hücrelerin sayılması amacıyla, 10 µl hücre

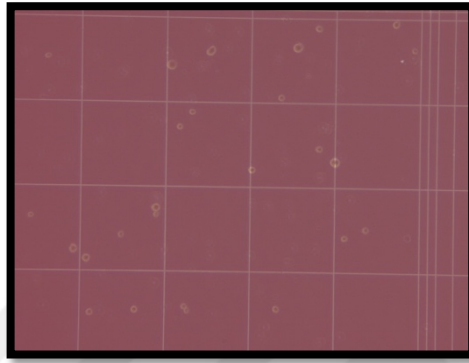
<sup>1</sup> CO<sub>2</sub> inkübatör – MCO 18 AIC, Sanyo, A.B.D

<sup>2</sup> *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 10X – Kat No: BE17-517Q, LONZA, İsviçre

<sup>3</sup> Tripsin-EDTA – Katalog no: P10-0235SP, Pan-Biotech, Almanya

süspansiyonu 10 µl tripan mavisi<sup>1</sup> ile karıştırıldı, toma lamı ve lamel arasına boyanan hücre süspansiyonu ve tripan mavisi karışımından 10 µl konularak ışık mikroskopunda 10X büyütmede hücreler sayıldı (Resim 5.5.). Tripan mavisi ile boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirildi ve aşağıdaki formüle göre ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

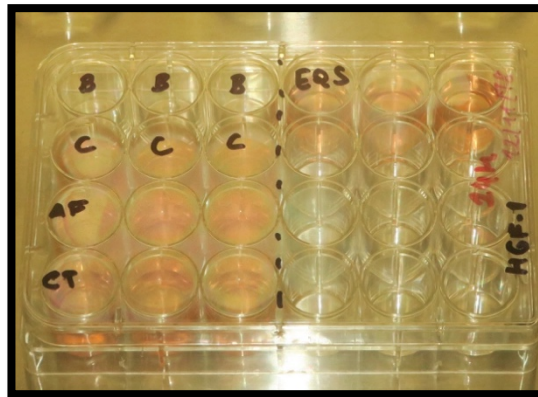
$$\text{Hücre sayısı/ml} = \text{Ortalama sayım değeri} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$



**Resim 5.5.** Tripan mavisi ile boyanan hücrelerin toma lamı üzerinde ışık mikroskopunda sayılması (10X)

### 5.3. Sitotoksite testi

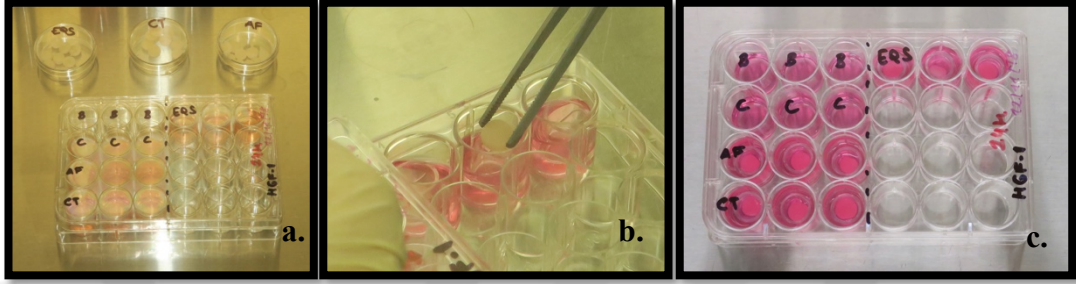
Hgf ve Hpdlf hücreleri, 10<sup>5</sup> hücre / kuyucuk olacak şekilde, 2 ml besi yeri/kuyu içeren 24 kuyucuklu plakalara ekildi ve 24 saat 37 °C'de kuyulara tutunmaları için inkübasyona bırakıldı (Resim 5.6).



**Resim 5.6.** Deney için hücrelerin 24 kuyucuklu plakalara ekimi

<sup>1</sup> Tripan Mavisi – Kat.No: 72-57-1, Sigma Aldrich, Almanya

Ardından DMEM tazelenerek, Hgf ve Hpdlf hücreleri 24 saat ve 7 gün sürelerinde 24 kuyucuklu plakalarda, kompozit diskler ile direk temas halinde inkübasyona bırakıldı (Resim5.7). Disk örnek yüzey alanı ve kuyucuk yüzey alanları arasındaki oran %18,15 olarak hesaplandı.

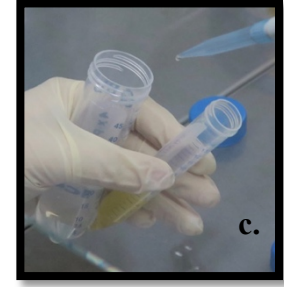
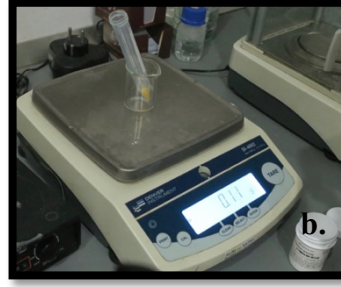


**Resim 5.7.** Hgf ile planlanan 24 saatlik deney planında **a.** 24 kuyucuklu plakalarda, her kuyucukta  $10^5$  hücre olacak şekilde 24 saat inkübe edilen ve 24 saat önceden  $n=3$  deney sayısında U.V ile 1 saat steril edilmiş kompozit diskler **b.** Her kuyucuğa bir disk yerleştirilmesi **c.** 24 kuyucuklu plakada boş, kontrol, AF uygulanmış, CT uygulanmış ve EQS uygulanmış gruplara ayrılmış plakanın 24 saat medyumda bekletilmesi

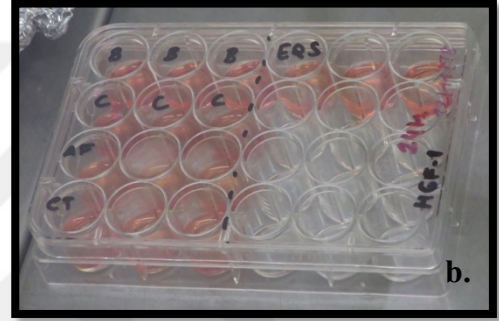
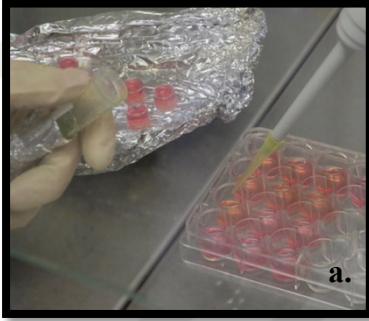
### 5.3.1. MTT testinin uygulanması

Hgf ve Hpdlf hücre dizilerine, 24 saat ve 1 hafta süreli materyal uygulamalarının ardından kompozit diskler kuyucuklardan uzaklaştırıldı. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)<sup>1</sup> solüsyonu ana stok 0,1 g MTT / 10 ml PBS olacak şekilde hazırlandı (Resim 5.8). Daha sonrasında her kuyucukta son konsantrasyonu  $0.33 \mu\text{g/ml}$  olacak şekilde her kuyucuğa  $0.66 \mu\text{l}$  MTT solüsyonu eklendi ve  $37^\circ\text{C}$  ,  $5\% \text{CO}_2$  ortamda 2 saat inkübasyona bırakıldı (Resim 5.9).

<sup>1</sup> 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, MTT, Glentham Life Sciences, İngiltere



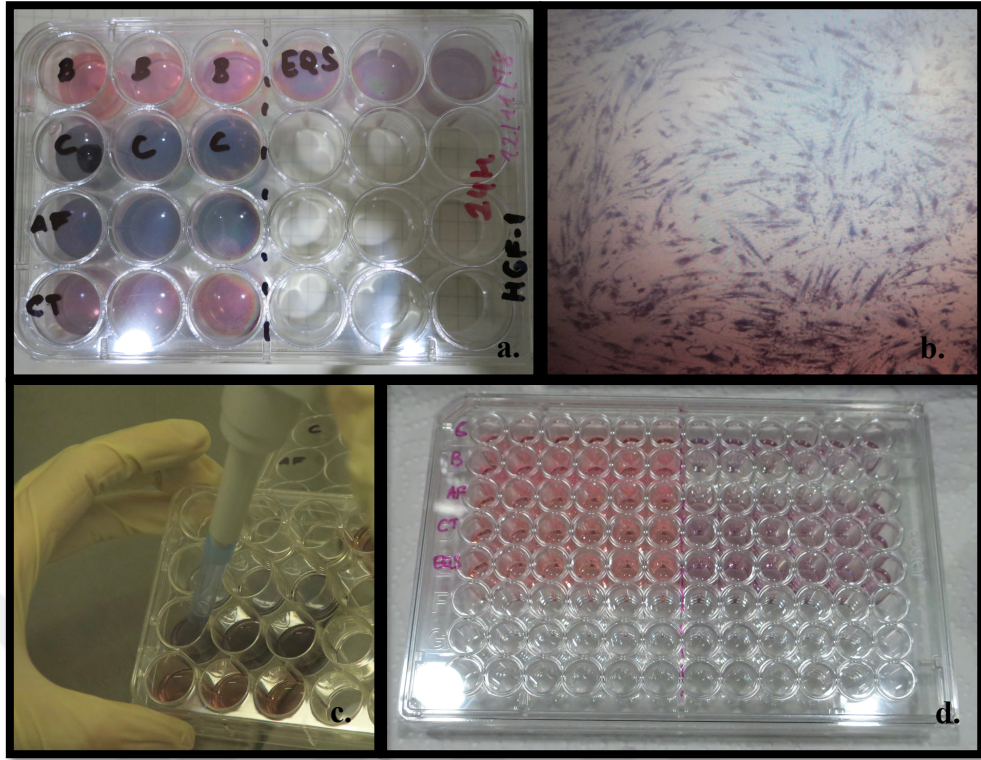
**Resim 5.8.a.** 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium **b.** MTT 0.1 g tartılması **c.** 0,1g MTT / 10 ml PBS ana stok solüsyonun hazırlanması



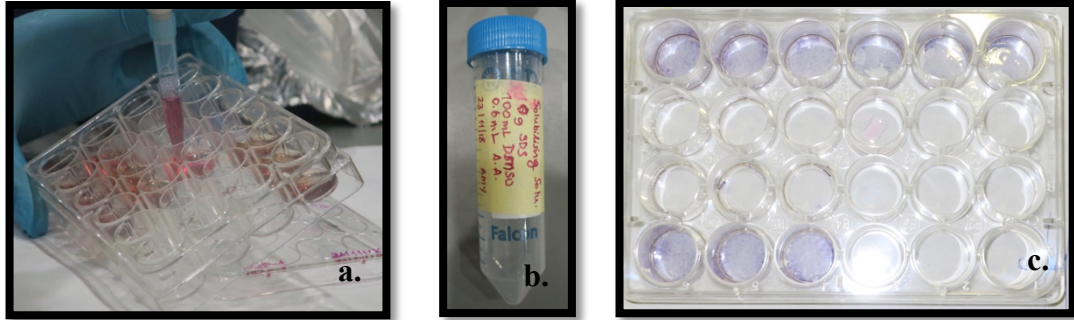
**Resim 5.9. a.** Her kuyucuğa kuyucuk konsantrasyonu  $0.33 \mu\text{l g/ml}$  olacak şekilde  $0.66 \mu\text{l}$  MTT solüsyonu eklenmesi **b.**  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  ortamda 2 saat inkübasyon

İnkübasyon periyodu ardından, her kuyucuktan  $2 \times 100 \mu\text{l}$  hücre ortamı alınarak 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı (Resim 5.10). 24 kuyucuklu plakada kalan hücre ortamı boşaltılarak MTT formazonu açığa çıkarmak için 1 ml çözücü tampon (10g SDS/ 99.4 DMSO + 0.6 ml asetik asit) kuyucuklara eklendi (Resim 5.10).



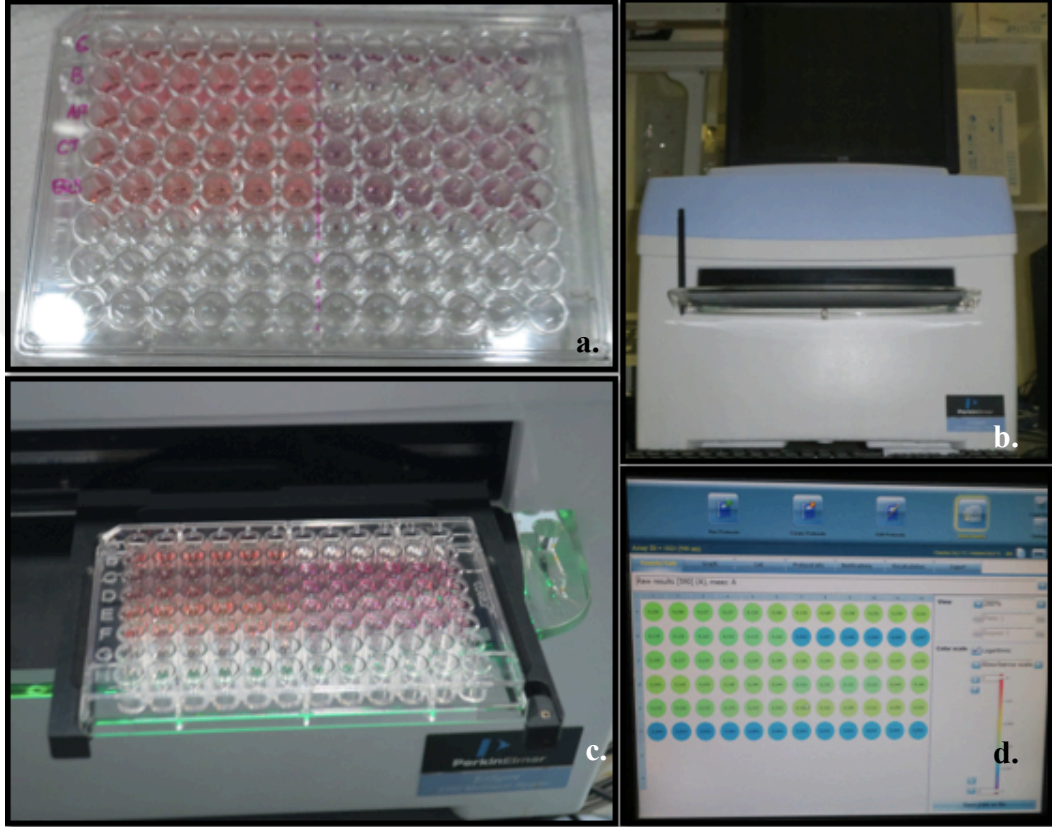


**Resim 5.10.** a. 2 saat inkübasyon ardından 24 kuyucuklu plaka görüntüsü b. Hücrelerdeki boyanmanın mikroskop görüntüsü (10 X) c. Her kuyucuktan okuma için 100  $\mu$ l karışımın 96 kuyucuklu plakaya aktarılması. d. 96 kuyucuklu plaka görüntüsü



**Resim 5.11.** a. 24 kuyucuklu plakada kalan hücre ortamının boşaltılması b. çözücü tampon c. Çözücü tampon 24 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1 ml olacak şekilde koyulduktan sonra açığa çıkan formazona bağlı renklenme

Çözücü tampon eklenen kuyucuklardan alınan 2 X 100  $\mu$ l örnekler yine 96 kuyucuklu plakalara konularak absorbans değerleri *PerkinElmer Enspire multimode plate reader*<sup>1</sup>'da 590 nm'de okundu. (Resim 5.12). Elde edilen absorbans değerleri yüzde sitotoksisite ve yüzde canlılık değerlerine çevrildi.



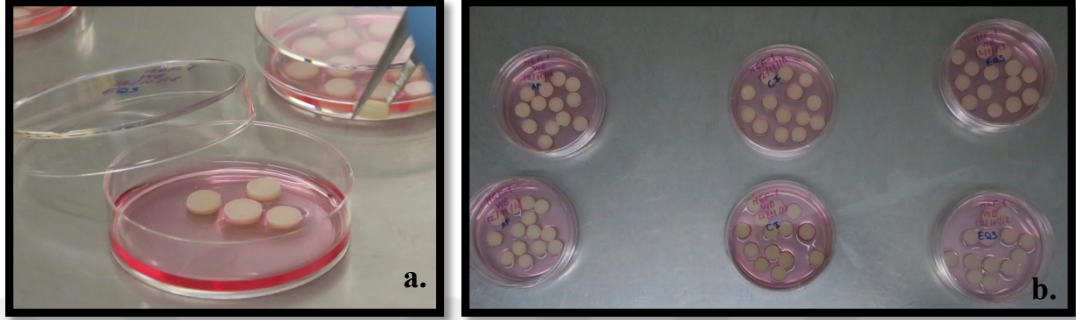
**Resim 5.12.** a. 96 kuyucuklu plakalara 2 X 100  $\mu$ l eklenen örnekler b. *PerkinElmer Enspire multimode plate reader* c. Absorbans değerlerinin ölçülmesi için 96 kuyucuklu plakanın cihaza yerleştirilmesi d. Yapılan okuma sonucu alınan absorbans değerleri

#### 5.4. Hücrelerden protein eldesi ve protein konsantrasyonunun hesaplanması

Protein ekspresyon deneyinin sitotoksisite deneyi takibinde aynı standartlarda devam etmesi için Hgf hücreleri 100'lük petri kaplarına ekildi. 24 kuyucuklu plaka gözlerinin

<sup>1</sup> *PerkinElmer Enspire multimode plate reader*, Perkin Elmer, Boston, A.B.D

ve 100'lük petri kabının yüzey alanı oranlandı ve aradaki fark 14 kat olarak hesaplandı. Bu hesaplama göre 100'lük petri kaplarına  $14 \times 10^5$  hücre ekildi ve her petri kabına 14 kompozit disk yerleştirildi. Deney sayısı  $n=2$  olarak tekrarlandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı (Resim 5.13).



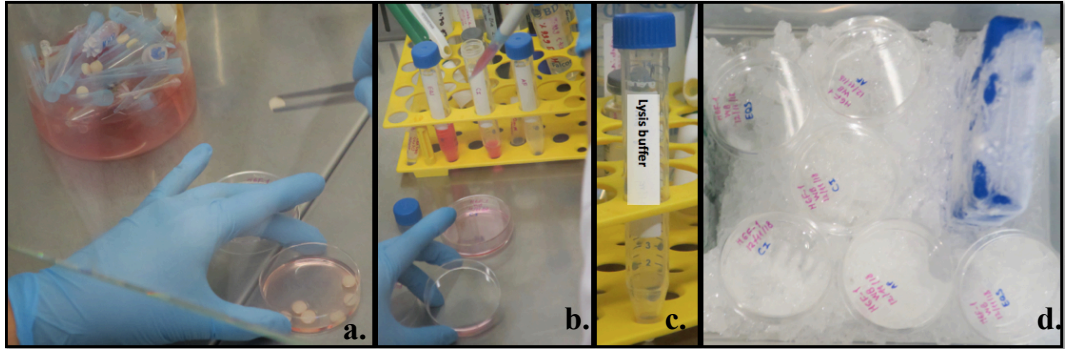
**Resim 5.13.** a. Kompozit disklerin petri kaplarına hücrelerle direkt temasta yerleştirilmesi ve b. 24 saat inkübasyonu

Uygulamanın ardından diskler uzaklaştırılarak hücrelerin protein içeriğinin açığa çıkarılması için “*Cell Lysis Buffer*<sup>1</sup>” (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 Mm Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, %1 Triton, 2.5 mM sodyum pirofosfat, 1 mM betagliserofosfat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml löpeptin, 1 mM PMSF) kullanıldı. Besiyerleri her bir uygulama için ayrı bir falkon tüpe toplandı. Petri kapları PBS ile yıkanarak DMEM'in tam olarak uzaklaştırılması ve lizis tamponun hücrelerle maksimum oranda temas etmesi sağlandı. Her 10 ml lizis tampon içine 1 ml proteaz inhibitörü (*Protease Inhibitor Cocktail*)<sup>2</sup> eklendi ve her 10 ml tampon 1 ml ddH<sub>2</sub>O ile dilue edilerek 1x lizis tampon hazırlandı ve her petri kabına 1x lizis tamponundan 400 µl eklenerek 5dk. buz ile temasta dinlendirildi (Resim 5.14).

<sup>1</sup> *Cell Lysis Buffer*<sup>1</sup>- Kat. No: 9833S, Cell Signaling Technology, Massachusetts, A.B.D(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 Mm Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, % 1 Triton, 2.5 mM sodyum pirofosfat, 1 mM betagliserofosfat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml löpeptin, 1 mM PMSF)

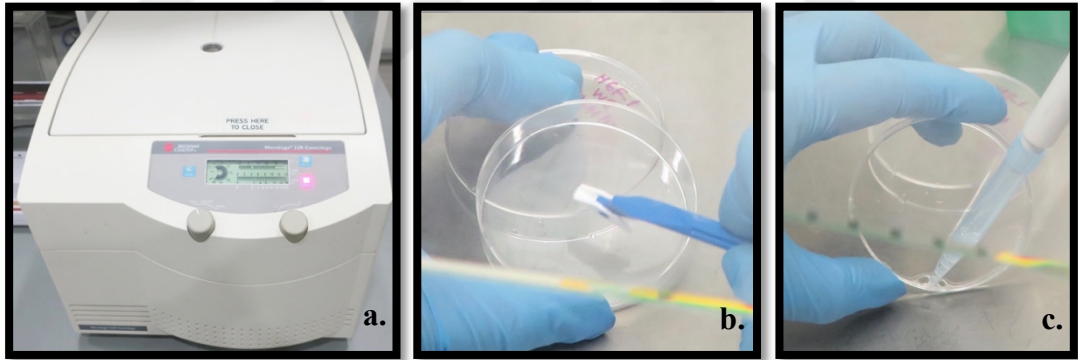
<sup>2</sup> Proteaz İnhibitörü, *Protease Inhibitor Cocktail*, Kat. No: G6521, Promega, ABD





**Resim 5.14.a.** Kompozit disklerin petri kabından uzaklaştırılması **b.** Petri kabındaki DMEM'in falkon tüplere aktarılması **c.** PBS ile yıkamanın ardından 400 µl lizis tamponu eklenerek 5 dk. buz üzerinde dinlendirilmesi

Falkon tüpe toplanan besiyerleri 15 dk. süreyle santrifüj<sup>1</sup> edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet, lizis tamponu eklenerek eppendorf tüpe aktarıldı. Petri kabındaki hücreler de kazınarak aynı eppendorf tüplere aktarıldı (Resim 5.15).



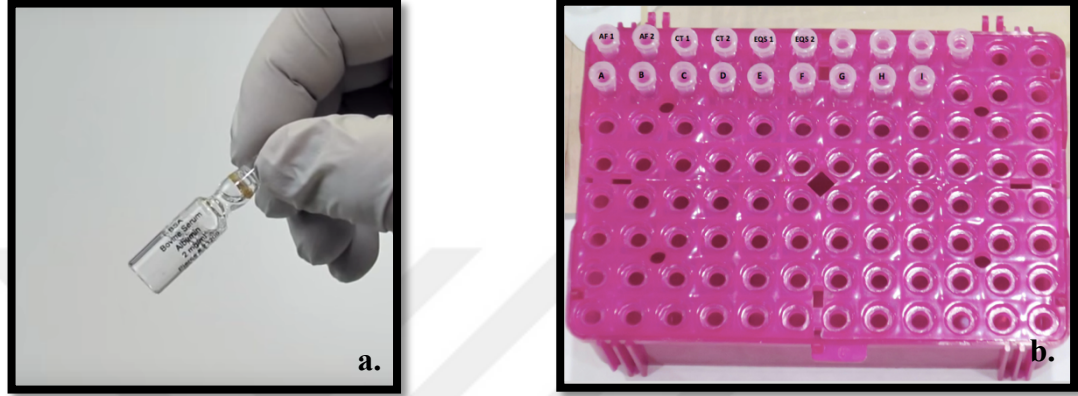
**Resim 5.15.a.** Soğutmalı santrifüj **b.** Petri kabındaki hücrelerin kazınması ve **c.** eppendorf tüplere aktarılması

Eppendorf tüplere aktarılan örnekler 30 dk buzda bekletildi. Ardından hücrelerin tam olarak parçalanması ve proteinlerin açığa çıkarılması için 10 kez 32 Gauge'luk enjektörlerden geçirilerek dondurup çözme işlemi 3 kez tekrarlandı. Son aşamada 30 dk. santrifüjün ardından hücre zarı ve diğer hücre artıkları çökerek pelleti

<sup>1</sup> Soğutmalı santrifüj, 22r, Microfuge, Beckman Coulter, A.B.D

oluştururken protein içeriği supernatant olarak ayrıldı ve protein tayini Pierce BCA Protein Kiti<sup>1</sup> ile gerçekleştirildi.

Pierce BCA Protein Kiti protokolüne uygun olarak, 1 ml 'de 2 mg/ml Albümin (BSA) standardı içeren ampül kullanılarak farklı dilüsyonlarda 9 adet standart hazırlandı (Resim 5.16).



**Resim 5.16.a.** 2 mg/ml Albumin (BSA) içeren 1 ml ampul **b.** Farklı dilüsyonlarda hazırlanan 9 adet standart ve n=2 olarak hazırlanmış örnekleri içeren eppendorf tüpler

Standartların hazırlanması ve protein ekstraksiyonu sonrası 96 kuyucuklu plakalarda kuyucuklar işaretlenerek n=2 prensibine göre her kuyucuğa 25  $\mu$ l standart ve örnekler konuldu. Ardından çalışma reaktifi (50:1 Reaktif A:B) her kuyucuğa 200  $\mu$ l çalışma reaktifi (50:1 Reaktif A:B) eklendi ve 37°C , 5% CO<sub>2</sub> ortamda 30 dk inkübasyon sonrası oluşan renk değişikliğinin absorbans değerleri, 562 nm'de *Perkin Elmar Enspire Multimode Plate Reader* ile okundu. Absorbans değerlerine göre standart eğri çizilerek örneklerdeki total protein miktarı tayin edildi.

<sup>1</sup> Pierce BCA Protein Kiti, Thermo Fisher Scientific, A.B.D

## **5.5. Western blot ile tip I kolajen, tip III kolajen ve integrin $\beta$ 1 proteinlerinin tayin edilmesi**

### **5.5.1. Western Blot jelinin hazırlanması**

Çok iyi şekilde temizlenmiş camlar aralarına çubuk konularak düzeneğe yerleştirildi. Camların tabanında sızıntı olmamasına dikkat edildi. Ardından %12 ayırma (1.5 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS (Sodyum dodesil sülfat), % 0.05 (w/v) APS, % 0,05 (w/v) TEMED eklenerek pH: 8,8'de hazırlandı) jeli hızlıca iki cam aralığına pipetle konuldu. Düzgün bir yüzey oluşturmak ve hava almaması için üzerine 0,5 cc kadar izopropopranol eklendi. Jel tamamen polimerleştikten sonra alkol boşaltıldı ve % 5 yükleme jeli (1 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0,05 (w/v) APS ve % 0,05 (w/v) TEMED eklenerek pH: 6,8'de hazırlandı) aynı şekilde hızlıca pipetle ilave edildikten sonra 'Tarak' yerleştirilerek kuyucuklar oluşturulmuş oldu. Aynı şekilde 6 adet jel hazırlanarak polimerleşmeye bırakıldı.

### **5.5.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi**

Örneklerdeki protein yoğunluğu (mg/ml) hesaplandıktan sonra her pipetlemede alabilmek için kaç ml homojenat pipetlenmesi gerektiği hesaplandı (Tablo 5.3) Üzerine  $\frac{3}{4}$  oranında Laemli Tamponu<sup>1</sup> eklenerek 95 °C'de 4 dk ısıtılarak denatüre edildi.

---

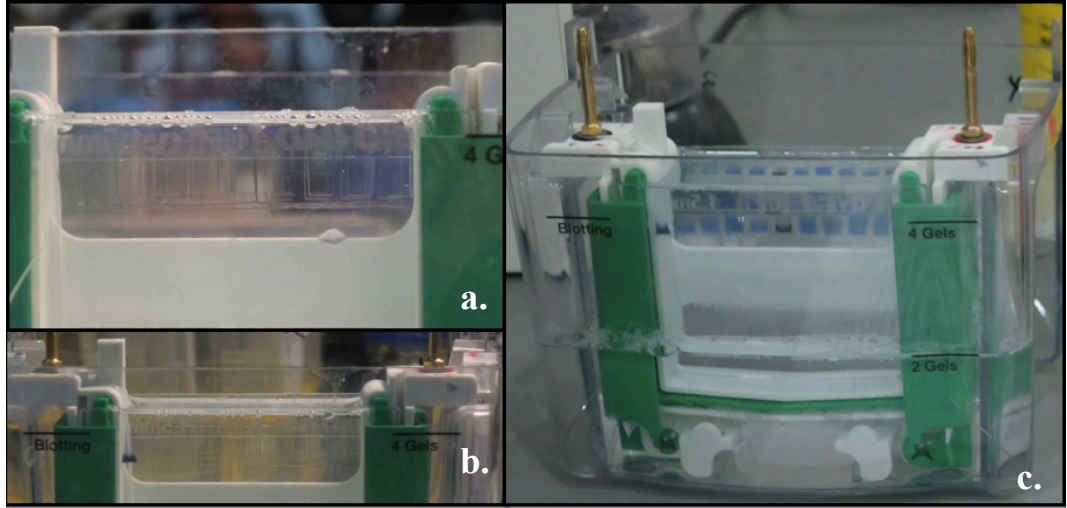
<sup>1</sup> Laemli Tamponu, Kat No: 1610747, Life Science Research, Bio-Rad, California, A.B.D.

**Tablo 5.3.** Homojenatların hazırlığında kullanılan örnek ve Laemmlı Tamponu miktarları

<b>Homojenat Hazırlığında Kullanılacak Pipetleme Miktarları</b>			
<b>Örnek Kodları</b>	<b>30 g protein içeren örnek miktarları (l)</b>	<b>Laemmlı Tampon Miktarı (l)</b>	<b>Total Pipetleme Miktarları (l)</b>
Kontrol 1	19,9	6,6	26,5
Kontrol 2	29,4	9,8	39,2
AF1	25,8	8,6	34,4
AF2	30,9	10,3	41,2
CT1	38,3	12,8	51,0
CT2	34,1	11,4	45,5
EQS1	21,3	7,1	28,4
EQS2	34,5	11,5	46,0

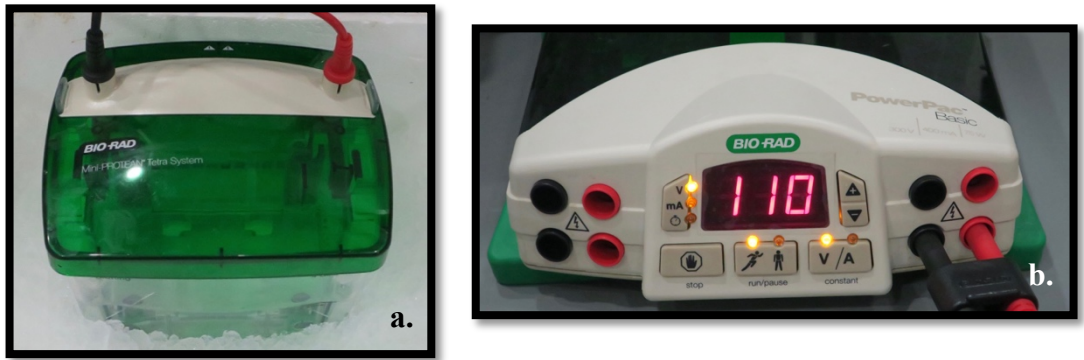
Hazırlanan jellerdeki taraklar çıkarılarak kuyucuklar distile su ile yıkandı (Resim 5.17a). Ardından ilk kuyucuğa protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak “*Precision Plus Protein Standards*”<sup>1</sup> konuldu (Resim 5.17b). Hesaplanan miktardaki homojenatlar diğer kuyucuklara hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dikkatle yerleştirildi (Resim 5.17c).

<sup>1</sup> *Precision Plus Protein Standards*”, Life Science Research, Bio-Rad, California, A.B.D.



**Resim 5.17.** a. Poliakrilamid jelde hazırlanmış kuyucukların görüntüsü b. İlk kuyucuğa protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak "Precision Plus Protein Standards" konulması c. Homojenatların kuyucuklardaki görüntüsü

Tank içerisine yerleştirilmiş kasetlerdeki iç havuz kuyucuklar tamamen örtülecek şekilde 250 ml yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra proteinlerin indirgenmiş halde kalmaları için 600  $\mu$ l antioksidan çözelti eklendi. Ardından tankın tamamı yürütme tamponu ile dolduruldu ve 110 volt akımda 2 saat süreyle 4°C'de elektroforez<sup>1</sup> gerçekleştirildi (Resim 5.18).

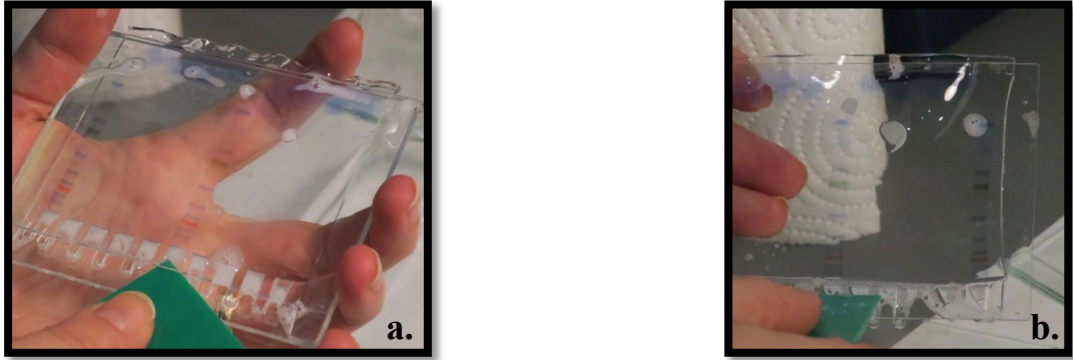


**Resim 5.18.a.** 4°C'de elektroforez işleminin gerçekleştiği tank b. 110 volt akımda 2 saat süreyle yürütme işlemi

<sup>1</sup> Mini PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad, A.B.D

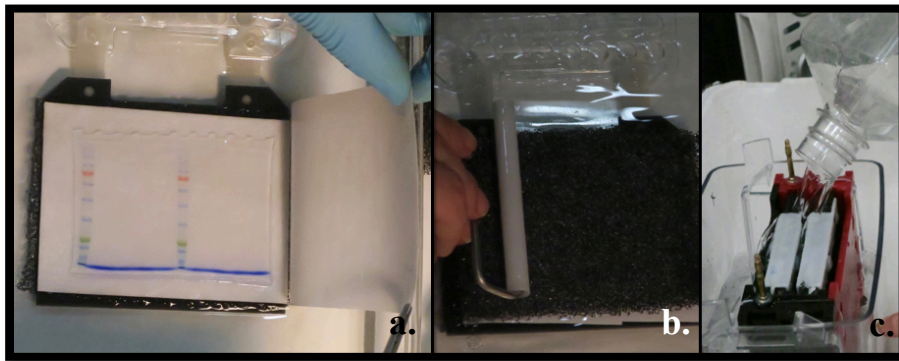


Elektroforez tamamlanıp proteinler ayrıştırıldıktan sonra kasetler açıldı ve jeller çıkarılarak kuyucuk kısımları uzaklaştırıldı (Resim 5.19).



**Resim 5.19.** a. Jelin dikkatlice çıkartılması b. Jel üzerindeki kuyucukların uzaklaştırılması

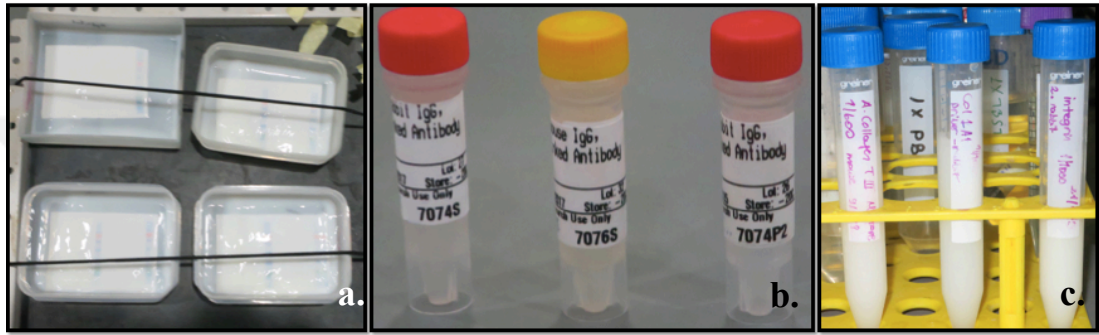
Proteinlerin ayrıştırıldığı jelin dikkatlice çıkarılmasının ardından nitroselülöz membrana transfer için edilmesi transfer tamponu (25 mM Tris-baz, 192 mM glisin ve % 20 v/v metanol pH: 8,3) içeren ortamda sünger, filtre, jel, 0,2 µm kalınlıktaki nitroselülöz membran, tekrar filtre, ve sünger sıralamasıyla arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde transfer kasetlerine yerleştirildi (Resim 5.20). Her tanka iki jel yerleştirilerek transfer tamponu ile tanklar dolduruldu ve 90 dk 85 v 160 mA akımda, proteinlerin jelden membrana transferi gerçekleştirildi.



**Resim 5.20.** a. Jel ve membranın kasete yerleştirilmesi b. Filtreler arasında hava kalmamasına özen gösterilmesi c. Kasetlerin tanka yerleştirilmesi ve transfer tamponu ile doldurulması

#### 5.5.4. Protein Tayini

Antikor ile tayininde ilk aşama olarak membrandaki hedef proteinlerden yoksun alanların kaplanması için %5 süt tozu-TBST ile 1 saat bloke edildi (Resim 5.21a). Daha sonra membran %1 süt tozu-TBST ile 1/5000 oranında dilüe edilmiş tip I kolajen için, Col1A1 tavşan mAB<sup>1</sup>, tip III kolajen için Col 3A1 fare mAB<sup>2</sup> ve Integrin  $\beta_1$  tavşan mAB<sup>3</sup> antikorları ile 14 saat 4 °C derecede inkübe edildi (Resim 5.21).



**Resim 5.21.a.** Hedef protein dışındaki alanların % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat salımla bloke edilmesi **b.** Kullanılan Col 1A1 (tavşan), Col 3A1 (fare), Integrin  $\beta_1$  (tavşan) antikorları **c.** Hazırlanmış primer antikor çözeltileri

Bağlanmamış antikorların PBST ile yıkanmasından sonra membran, 1/5000 oranında dilüe edilmiş *Horseradish Peroksidaz* (HRP)<sup>4</sup> işaretli primer antikor ile uyumlu hayvana ait sekonder antikor ile 1 saat inkübe edildi. PBST ile yıkamının ardından membran kemiluminesans kit<sup>5</sup> 1 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakılarak oluşan ışımaya görüntülendi (Resim 5.22a). Protein bantlarının yoğunlukları *ChemiDoc™ MP Imaging System*<sup>6</sup> ile hesaplandı (Resim 5.22b). Normalizasyon için protein bant yoğunlukları Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) protein yoğunluğuna bölündü ve değerler kontrol grubu 100 kabul edilerek hesaplandı.

<sup>1</sup> Col1a1 Tavşan mAB, Katalog no: 84336S, *Cell Signaling Technology*, A.B.D.

<sup>2</sup> Col 3a1 Fare mAB, Kat. No: MAB3392, Millipore, A.B.D.

<sup>3</sup> Integrin  $\beta_1$  (D6S1W) Tavşan mAB, Kat No: 34971S, *Cell Signaling Technology*, A.B.D.

<sup>4</sup> Horseradish peroksidaz (HRP), Kat. No: 31490, *Pierce™, Thermo Fisher Scientific*, A.B.D)

<sup>5</sup> Kemiluminesans Kit, 20X LumiGLO ve 20X Peroxide, Kat. No: 7003, *Cell Signaling Technologies*, A.B.D.

<sup>6</sup> *ChemiDoc™ MP Imaging System*, Life Science Research, Bio-Rad, California, A.B.D



**Resim 5.22.** a. Kemiluminesans kit b. Protein yoğunluklarını görüntüleme sistemi *ChemiDoc™ MP Imaging System* c. Elde edilen protein bantlarının görüntüsü

### 5.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz

Veriler bilgisayarda SPSS 25.0 programı<sup>1</sup> kullanılarak analiz edildi. Tanımlayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerler şeklinde gösterildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. İki'den fazla grubun normal dağılıma uymayan değişkenlerin karşılaştırmasında Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmaları (post-hoc) için ise Mann-Whitney U testi yapıldı. Sonuçlar Bonferroni düzeltmesi yapılarak yorumlandı. Grup içi zamana bağlı değişim Wilcoxon testi ile değerlendirildi.  $p < 0,05$  olması durumunda aradaki fark anlamlı kabul edildi.

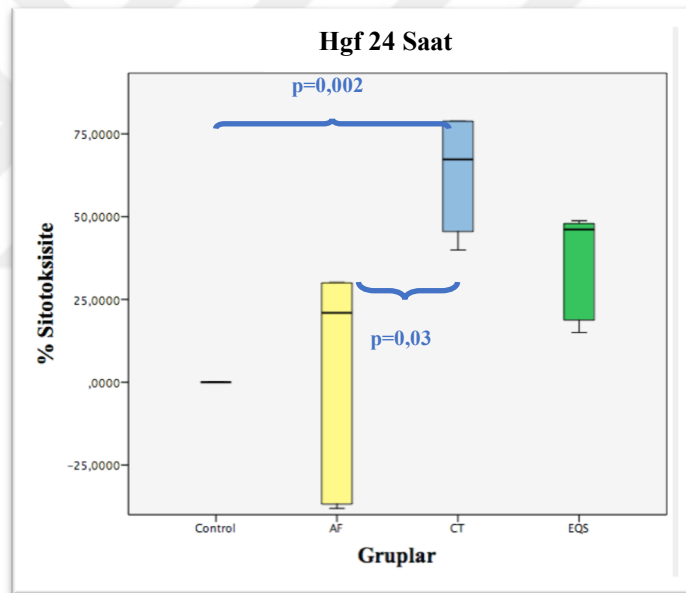
<sup>1</sup> SPSS 25.0 (Statistical Packages of Social Sciences), IBM Inc., ABD



## 6. BULGULAR

### 6.1. Kompozitlerin Hgf Hücreleri Üzerindeki 24 Saat Süreli Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması

Yapılan gruplar arası karşılaştırmada yüzde sitotoksosite değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,001$ ) (Tablo 6.1) (Şekil 6.1). Yapılan ikili karşılaştırmada CT uygulanan Hgf hücrelerinde yüzde sitotoksosite değerlerinin kontrol ve AF uygulanan hücelere göre anlamlı derecede arttığı tespit edildi ( $p=0,002$  ve  $p=0,031$ ) (Tablo 6.1) (Şekil 6.1).



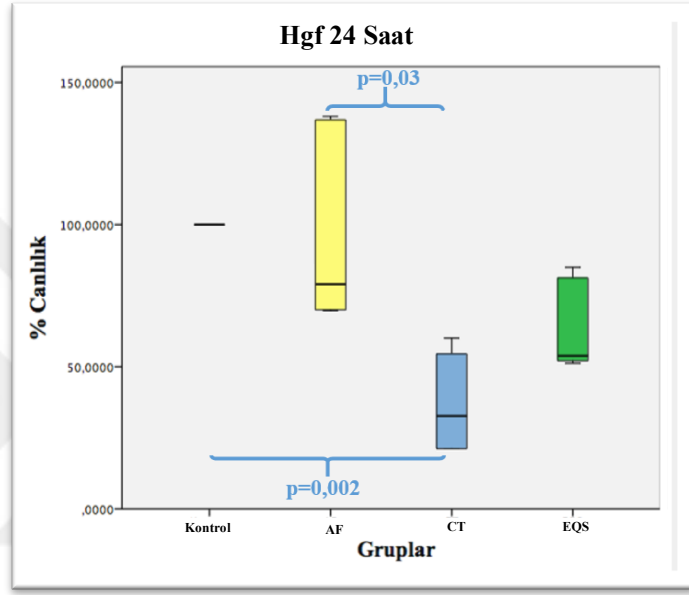
Şekil 6.1. Kontrol grubu, AF, CT, EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki 24 saat yüzde sitotoksosite etkilerinin karşılaştırılması

**Tablo 6.1.** Uygulama gruplarının tüm hücre ve zaman aralıklarındaki yüzde sitotoksosite değerlerinin çoklu ve ikili karşılaştırmaları

Hücre/zaman	Gruplar (N= 6) Medyan Min — Max (Ort ± SS)										
	Kontrol <sup>a</sup>	AF <sup>b</sup>	CT <sup>c</sup>	EQS <sup>d</sup>	p <sup>*</sup>	p <sup>^(a-b)</sup>	p <sup>^(a-c)</sup>	p <sup>^(a-d)</sup>	p <sup>^(b-c)</sup>	p <sup>^(b-d)</sup>	p <sup>^(c-d)</sup>
Hgf/24 sa	0,00 0,00 — 0,00 (0,00 ± 0,00)	20,95 -38,09 — 30,20 (4,53 ± 32,77)	67,29 39,92 — 78,82 (62,91 ± 6,58)	46,14 15,01 — 48,78 (37,12 ± 15,75)	<b>0,001</b>	1,00	<b>0,002</b>	0,08	<b>0,031</b>	0,59	1,00
Hgf/1 hafta	0,00 0,00 — 0,00 (0,00 ± 0,00)	-69,44 -488,09 — 1,09 (123,77 ± 183,63)	101,78 48,61 — 655,55 (202,67 ± 228,76)	17,36 4,16 — 55,55 (20,69 ± 19,02)	<b>0,001</b>	1,00	<b>0,009</b>	0,46	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>	0,97
Hpdlf/24 sa	0,00 0,00 — 0,00 (0,00 ± 0,00)	-28,73 -50,00 — -18,96 (-21,73 ± 10,66)	-22,91 -38,18 — -1,56 (-21,23 ± 12,25)	-44,44 -123,63 — -20,31 (-60,70 ± 40,76)	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	0,17	<b>0,001</b>	1,00	1,00	0,63
Hpdlf/1 hafta	0,00 0,00 — 0,00 (0,00 ± 0,00)	6,17 -1,76 — 12,29 (7,02 ± 4,06)	31,02 13,27 — 37,90 (27,10 ± 9,88)	2,86 -6,36 — 6,89 (1,97 ± 5,29)	<b>0,001</b>	0,2	<b>0,01</b>	1,00	0,3	1,00	<b>0,008</b>

\*Kruskal Wallis testi, <sup>#</sup>Boneferroni düzeltmeli Mann Whitney-U testi, Hgf: Human Gingival Fibroblast, Hpdlf: Human Periodontal Ligament Fibroblast, AF<sup>a</sup>., Admira<sup>®</sup> Fusion, CT<sup>c</sup>: Charizma<sup>®</sup> Topaz, EQS<sup>d</sup>., Estelite<sup>®</sup> Σ Quick Sigma, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart Sapma

Yüzde canlılık değerlerinin gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,001$ ) (Tablo 6.2) (Şekil 6.2). Yapılan ikili karşılaştırmada sitotoksosite bulgularıyla uyumlu olarak 24 saat CT uygulanan Hgf hücrelerinin, kontrol grubundaki ve AF grubundaki hücelere göre yüzde canlılık değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ( $p=0,002$  ve  $p=0,031$ ) (Şekil 6.2) (Tablo 6.2).



**Şekil 6.2.** Kontrol grubu, AF, CT, EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki 24 saat yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

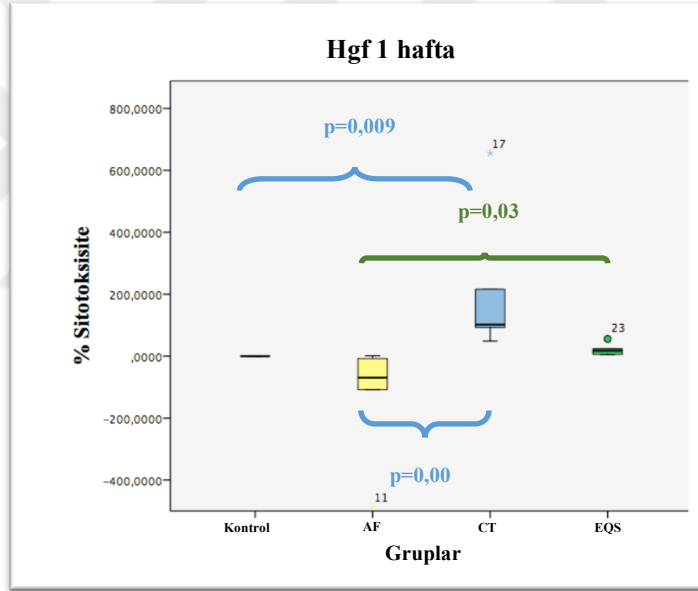
**Tablo 6.2.** Uygulama gruplarının tüm hücre ve zaman aralıklarındaki yüzde canlılık değerlerinin çoklu ve ikili karşılaştırmaları

Hücre/zaman	Gruplar (N= 6)											
	Medyan Min — Max (Ort ± SS)											
	Kontrol <sup>a</sup>	AF <sup>b</sup>	CT <sup>c</sup>	EQS <sup>d</sup>	p <sup>*</sup>	p <sup>#(a-b)</sup>	p <sup>#(a-c)</sup>	p <sup>#(a-d)</sup>	p <sup>#(b-c)</sup>	p <sup>#(b-d)</sup>	p <sup>#(c-d)</sup>	
Hgf/24 saat	100 100 — 100 (100 ± 0,00)	79,04 69,79 — 138,09 (95,46 ± 32,77)	32,70 21,17 — 60,07 (37,06 ± 16,58)	53,85 51,21 — 84,98 (62,87 ± 15,75)	<b>0,001</b>	1,00	<b>0,002</b>	0,08	<b>0,031</b>	0,59	1,00	
Hgf/1 hafta	100 100 — 100 (100 ± 0,00)	169,44 98,90 — 588,88 (223,77 ± 183,63)	-1,78 -555,55 — 51,38 (-102,67 ± 228,76)	82,63 44,44 — 95,83 (79,30 ± 19,02)	<b>0,00</b>	1,00	<b>0,009</b>	0,46	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>	0,97	
Hpdlf/24 saat	100 100 — 100 (100 ± 0,00)	128,73 118,96 — 150,00 (130,62 ± 10,66)	122,91 101,56 — 138,18 (121,23 ± 12,25)	144,44 120,31 — 223,63 (160,70 ± 40,76)	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	0,17	<b>0,001</b>	1,00	1,00	0,63	
Hpdlf/1 hafta	100 100 — 100 (100 ± 0,00)	93,82 87,70 — 98,23 (92,97 ± 4,06)	68,97 62,09 — 86,72 (72,89 ± 9,88)	97,13 93,10 — 106,36 (98,02 ± 5,29)	<b>0,001</b>	0,2	<b>0,001</b>	1,00	0,36	1,00	<b>0,008</b>	

\*Kruskal Wallis testi, #Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney-U testi, Hgf: Human Gingival Fibroblast, Hpdlf: Human Periodontal Ligament Fibroblas, AF<sup>b</sup>: Admira® Fusion, CT<sup>c</sup>: Charizma® Topaz, EQS<sup>d</sup>: Estelite® Σ Quick Sigma, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart Sapma

## 6.1. Kompozitlerin Hgf Hücreleri Üzerindeki 1 Hafta Süreli Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması

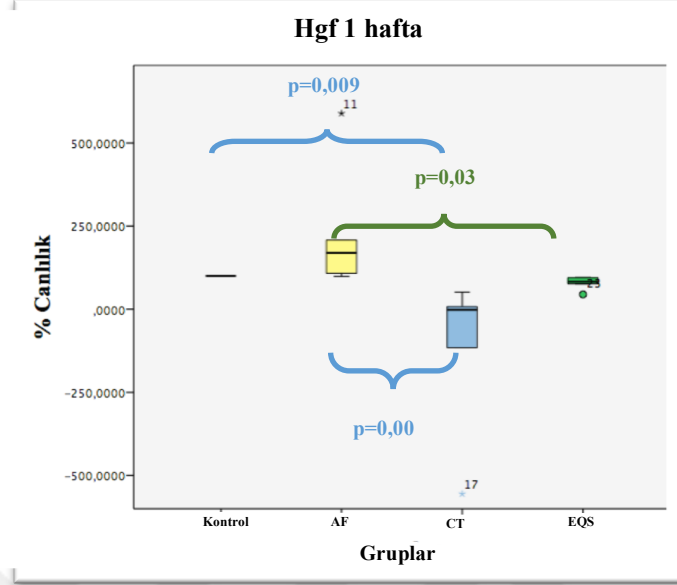
Hgf hücreleri üzerinde 1 hafta süreli inkübasyonun ardından yüzde sitotoksosite değerlerinde, kontrol grubu, AF, CT ve EQS grupları arasında yapılan çoklu karşılaştırma istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $p=0,001$ ) (Şekil 6.3) (Tablo 6.1). Yapılan ikili karşılaştırmada, CT grubunun sitotoksik etkisinin kontrol grubundan fazla olduğu tespit edildi ( $p=0,09$ ). Aynı zamanda CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin AF grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede fazla olduğu kaydedildi ( $p=0,00$ ,  $p=0,03$ ).



Şekil 6.3. Kontrol grubu, AF, CT, EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki 1 hafta yüzde sitotoksiste etkilerinin karşılaştırılması

Hgf hücrelerinin yüzde canlılık sonuçları, kompozit materyaller ile 1 hafta inkübasyonu takiben değerlendirildiğinde, gruplar arası karşılaştırmada anlamlı fark bulundu ( $p=0,001$ ) (Tablo 6.2). Yapılan ikili karşılaştırmalarda CT grubunun kontrol ve AF grubuna göre hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı saptandı ( $p=0,009$ ,  $p=0,00$ ) (Tablo 6.2) (Şekil 6.2). Ayrıca EQS grubunun Hgf hücrelerinin canlılığını AF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı tespit edildi ( $p=0,03$ )

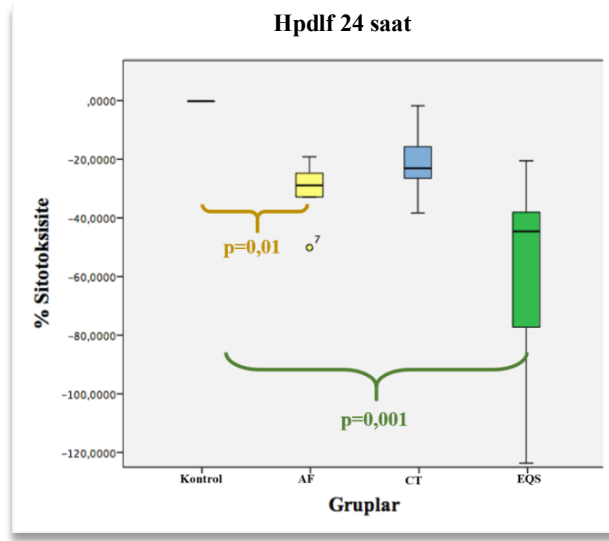
(Tablo 6.2) (Şekil 6.2). Bu bulguların, kompozit materyallerin Hgf hücreleri ile 1 hafta inkübasyonunu takiben elde edilen yüzde sitotoksosite etkileriyle uyumlu olduğu görüldü.



**Şekil 6.4.** Kontrol grubu, AF, CT, EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki 1 hafta yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

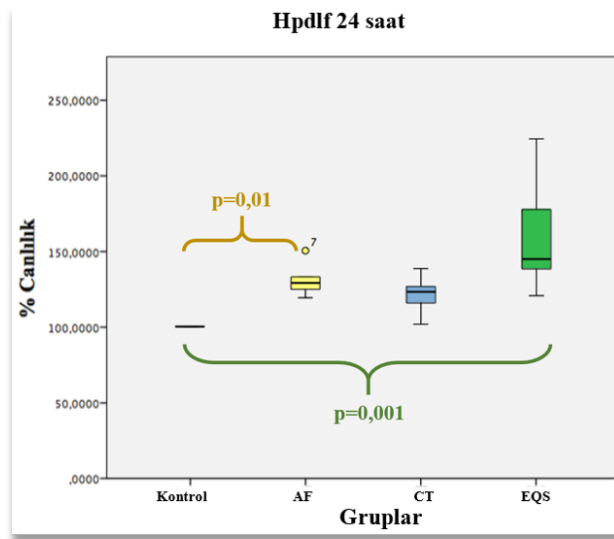
### 6.3. Kompozitlerin Hpdlf Hücreleri Üzerindeki 24 Saat Süreli Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması

Hpdlf hücreleri üzerindeki, kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının 24 saat yüzde sitotoksosite etkilerinin gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi ( $p=0,001$ ) (Tablo6.1) (Şekil 6.5). İkili karşılaştırmalarda AF ve EQS gruplarının kontrol grubuna göre sitotoksik etkilerinin anlamlı derecede az olduğu tespit edildi ( $p=0,01$ ) ( $p=0,001$ ) (Tablo6.1) (Şekil 6.5).



**Şekil 6.5.** Kontrol grubu, AF, CT, EQS materyallerinin Hpdlf hücreleri üzerindeki 24 saat yüzde sitotoksosite etkilerinin karşılaştırılması

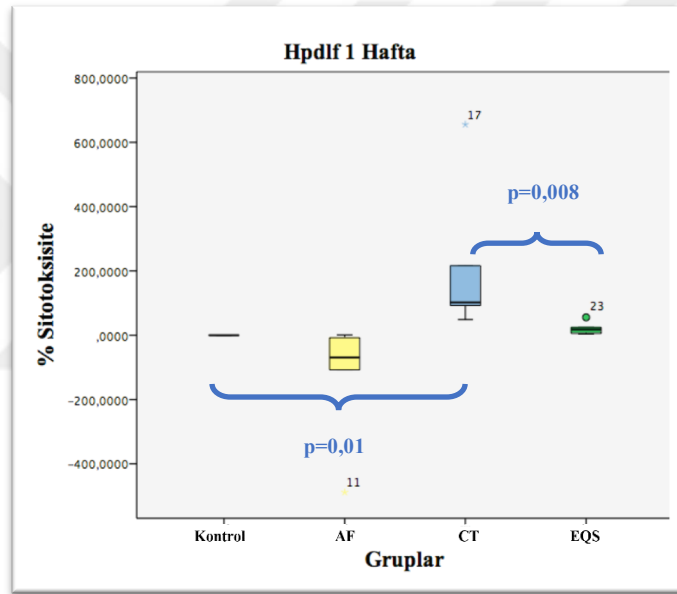
Hpdlf hücrelerinin 24 saat inkübasyon süresinde AF, CT ve EQS grup uygulamalarından yüzde canlılık açısından ne kadar etkilendiği değerlendirildiğinde, gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ( $p=0,01$ ) (Tablo 6.2) (Şekil 6.6). AF ve EQS gruplarının sitotoksik etkileriyle uyumlu olarak, kontrol grubuna göre Hpdlf hücrelerinin canlılığını arttırdığı belirlendi ( $p=0,01$ ,  $p=0,001$ ) (Tablo 6.2) (Şekil 6.6).



**Şekil 6.6.** Kontrol, AF, CT, EQS gruplarını Hpdlf hücreleri üzerindeki 24 saat yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

#### 6.4. Kompozitlerin Hpdlf Hücreleri Üzerindeki 1 Hafta Süreli Sitotoksisite ve Canlılık Etkilerinin Karşılaştırılması

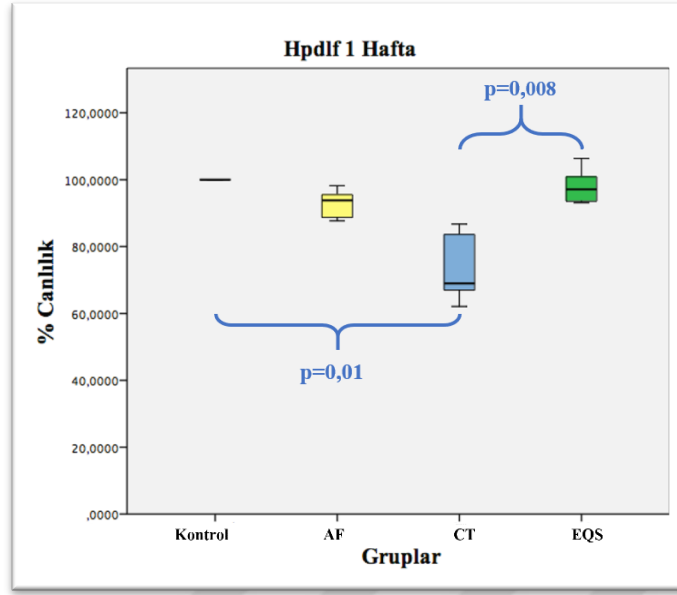
Hpdlf hücreleri üzerindeki 1 hafta süreli kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının yüzde sitotoksisite etkilerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı farklılık tespit edildi ( $p=0,001$ ) (Tablo 6.1) (Şekil 6.7). CT grubunun Hpdlf hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin kontrol ve AF grubundan fazla olduğu belirlendi ( $p=0,01$  ve  $p= 0,008$ ) (Tablo 6.1) (Şekil 6.7).



Şekil 6.7. Kontrol, AF, CT, EQS grubunun Hpdlf hücreleri üzerindeki 1 hafta yüzde sitotoksisite etkilerinin karşılaştırmaları

Hpdlf hücrelerinin kontrol, AF, CT ve EQS gruplarında 1 hafta süresindeki yüzde canlılık değerleri arasında sitotoksisite bulgularıyla uyumlu olarak anlamlı farklılık belirlendi ( $p=0,001$ ) (Tablo 6.2) (Şekil 6.8). CT grubunun Hpdlf hücrelerinin yüzde canlılığını 1 hafta süresinde kontrol ve EQS grubuna göre anlamlı olarak azalttığı saptandı ( $p=0,01$ ,  $p=0,08$ ) (Tablo 6.2) (Şekil 6.8).

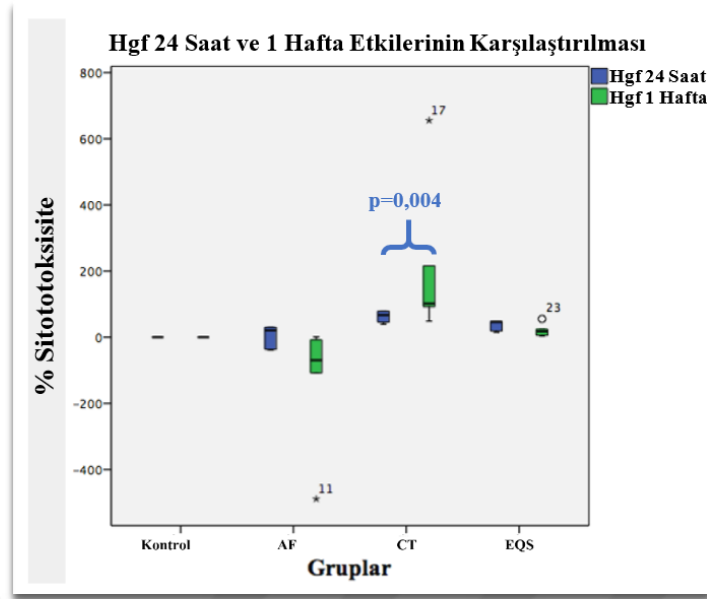




**Şekil 6.8.** Kontrol, AF, CT, EQS grubunun Hpdlf hücreleri üzerindeki 1 hafta yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırmaları

### 6.5. Kompozit gruplarının 24 Saat ve 1 Hafta Sürelerinde Hgf hücreleri Üzerindeki Sitotoksikite ve Canlılık Etkilerinin Değerlendirilmesi

Hgf hücreleri üzerindeki kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının sitotoksik etkilerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerindeki ikili karşılaştırmalarında CT grubunun sitotoksik etkisinin 1 hafta süresinde 24 saate göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edildi ( $p=0,04$ ) (Şekil 6.9) (Tablo 6.3).



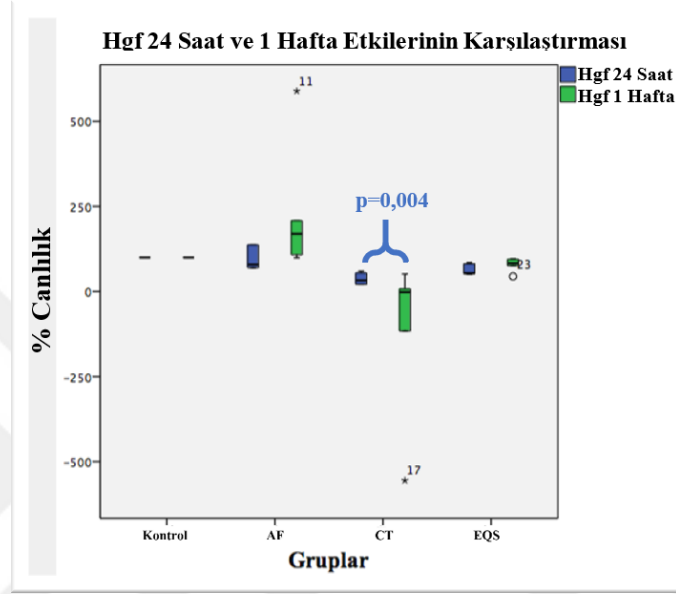
Şekil 6.9. Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki yüzde sitotoksiste etkilerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması

Tablo 6.3. Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki yüzde sitotoksiste değerlerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması

Uygulanan Hücre	Uygulanan Materyaller	Zaman		P*
		24 saat	1 hafta	
Hgf	Kontrol	0,00 0,00 — 0,00 (0,00 ± 0,00)	0,00 0,00 — 0,00 (0,00 ± 0,00)	1,00
	AF	20,95 -38,09 — 30,20 (4,53 ± 32,77)	-69,44 -488,88 — 1,09 (-123,77 ± 183,63)	0,11
	CT	67,29 39,92 — 78,82 (62,93 ± 16,58)	101,78 48,61 — 655,55 (202,67 ± 228,76)	0,04
	EQS	46,14 15,01 — 48,78 (37,12 ± 15,75)	17,36 4,16 — 55,55 (20,69 ± 19,02)	0,34

\*Wicoxon testi, Hgf: Human Gingival Fibroblast, AF<sup>b</sup>: Admira<sup>®</sup> Fusion, CT<sup>c</sup>: Charizma<sup>®</sup> Topaz, EQS<sup>d</sup>: Estelite<sup>®</sup> Σ Quick Sigma, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart Sapma

Hgf hücrelerinin kontrol, AF, CT ve EQS gruplarındaki 24 saat ve 1 hafta sürelerindeki yüzde canlılık değerleri karşılaştırıldığında sitotoksik etkiyle benzer olarak CT grubunda Hgf hücre canlılığının 1 hafta süresinde 24 saat süresine göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p=0,04$ ) (Şekil 6.10) (Tablo 6.4).



Şekil 6.10. Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerindeki yüzde canlılık etkilerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması

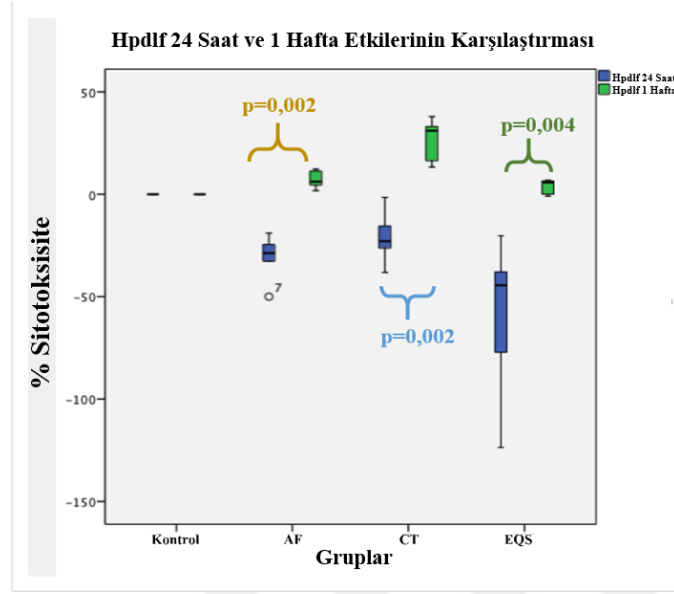
**Tablo 6.4.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerinde 24 saat ve 1 hafta sürelerinde yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

Uygulanan Hücre	Uygulanan Materyaller	Zaman Medyan Min – Max (Ort ± SS)		P*
		24 saat	1 hafta	
Hgf	Kontrol	100 100 – 100 (100 ± 0,00)	100 100 – 100 (100 ± 0,00)	1,00
	AF	79,04 69,79 – 138,09 (95,46 ± 32,77)	169,44 98,90 – 588,88 (223,77 ± 83,63)	0,11
	CT	32,70 21,17 – 60,07 (37,06 ± 16,58)	-1,78 -555,55 – 51,38 (-102,67 ± 228,76)	0,04
	EQS	53,85 51,21 – 84,98 (62,87 ± 15,75)	82,63 44,44 – 95,83 (79,30 ± 19,02)	0,34

\*Wicoxon testi, Hgf: Human Gingival Fibroblast, AF<sup>b</sup>: Admira<sup>®</sup> Fusion, CT<sup>c</sup>: Charizma<sup>®</sup> Topaz, EQS<sup>d</sup>., Estelite<sup>®</sup> Σ Quick Sigma, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart Sapma

### 6.6. Kompozit gruplarının 24 Saat ve 1 Hafta Sürelerinde Hpdlf hücreleri Üzerindeki Sitotoksosite ve Canlılık Etkilerinin Değerlendirilmesi

Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının 24 saat ve 1 hafta sürelerinde Hpdlf hücreleri üzerindeki yüzde sitotoksosite etkileri değerlendirildi ve tüm kompozit gruplarının Hpdlf hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin 1 hafta süresinde, 24 saat süresine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi (p=0,02, p=0,02, p=0,04) (Şekil 6.11) (Tablo 6.5).



Şekil 6.11. Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hpdlf hücreleri üzerindeki yüzde sitotoksiste etkilerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması

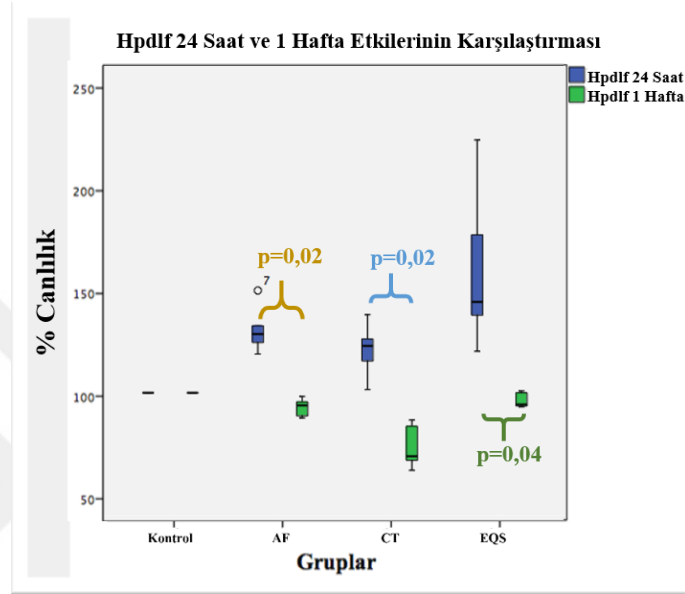
Tablo 6.5. Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hpdlf hücreleri üzerinde 24 saat ve 1 hafta sürelerinde yüzde sitotoksiste etkilerinin karşılaştırılması

Uygulanan Hücre	Uygulanan Materyaller	Zaman		P*
		Medyan	Min — Max	
		(Ort ± SS)		
		24 saat	1 hafta	
Hpdlf	Kontrol	0,00 0,00 — 0,00 (0,00 ± 0,00)	0,00 0,00 — 0,00 (0,00 ± 0,00)	1,00
	AF	-28,73 -50,00 — -18,96 (-21,13 ± 10,66)	6,17 1,76 — 12,29 (7,02 ± 4,06)	0,02
	CT	-22,91 -38,18 — -1,56 (-21,23 ± 12,25)	31,02 13,27 — 37,90 (27,10 ± 9,88)	0,02
	EQS	-44,44 -123,63 — -20,31 (-60,70 ± 40,76)	2,86 -6,36 — 6,89 (1,97 ± 5,29)	0,04

\*Wicoxon testi, Hpdlf: Human Periodontal Ligament Fibroblast, AF<sup>b</sup>: Admira<sup>®</sup> Fusion, CT<sup>c</sup>: Charizma<sup>®</sup>

Topaz, EQS<sup>d</sup>: Estelite<sup>®</sup> Σ Quick Sigma, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart Sapma

Hpdlf hücrelerinin yüzde canlılık değerleri kontrol, AF, CT ve EQS grupları için 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırıldığında AF, CT ve EQS gruplarının tamamındaki Hpdlf hücre canlılığının 1 hafta süresinde 24 saat süresine göre daha az olduğu tespit edildi ( $p=0,02$ ,  $p=0,02$ ,  $p=0,04$ ) (Şekil 6.12) (Tablo 6.6).



Şekil 6.12. Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hpdlf hücreleri üzerindeki yüzde canlılık etkilerinin 24 saat ve 1 hafta sürelerinde karşılaştırılması

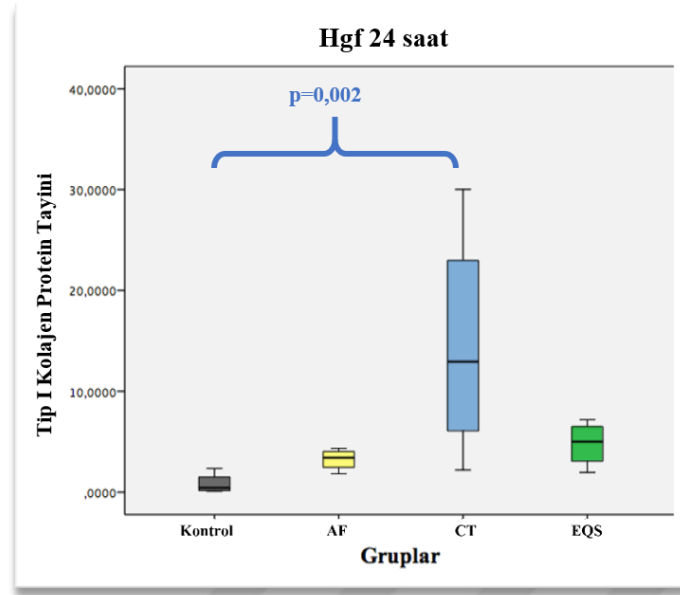
**Tablo 6.6.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hpdlf hücreleri üzerinde 24 saat ve 1 hafta sürelerinde yüzde canlılık etkilerinin karşılaştırılması

Uygulanan Hücre	Uygulanan Materyaller	Zaman Medyan Min — Max (Ort ± SS)		P*
		24 saat	1 hafta	
Hpdlf	Kontrol	100 100 — 100 (100 ± 0,00)	100 100 — 100 (100 ± 0,00)	1,00
	AF	128,73 118,96 — 150,00 (130,62 ± 10,66)	93,82 87,70 — 98,73 (92,97 ± 4,06)	<b>0,02</b>
	CT	122,91 101,56 — 138,18 (121,23 ± 12,25)	68,97 62,09 — 86,72 (72,89 ± 9,88)	<b>0,02</b>
	EQS	144,44 120,31 — 223,63 (160,70 ± 40,76)	97,13 93,10 — 106,36 (98,02 ± 5,29)	<b>0,04</b>

\*Wicoxon testi, Hpdlf: HumanPeriodontal Ligament Fibroblast, AF<sup>b</sup>: Admira<sup>®</sup> Fusion, CT<sup>c</sup>: Charizma<sup>®</sup> Topaz, EQS<sup>d</sup>: Estelite<sup>®</sup> Σ Quick Sigma, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart Sapma

### 6.7. Kompozit Gruplarının Hgf hücrelerinin Tip I Kolajen Miktarı Üzerindeki Etkilerinin 24 saat süresinde Değerlendirilmesi

Hgf hücrelerinin tip I kolajen miktarındaki değişim 24 saat süresinde kontrol, AF, CT ve EQS gruplarında karşılaştırıldı. Gruplar arası çoklu karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p=0,03$ ) (Şekil 6.13) (Tablo 6.7). CT kompozit grubunun kontrol grubuna göre Hgf hücrelerinin tip I kolajen miktarını arttırdığı gözlemlendi ( $p=0,02$ ) ve diğer kompozit gruplarının Hgf hücrelerinin tip I kolajen miktarına etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.13) (Tablo 6.7)



**Şekil 6.13.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının 24 saat süresinde Hgf hücrelerinin tip I kolajen miktarı üzerinde yaptıkları etkinin karşılaştırılması



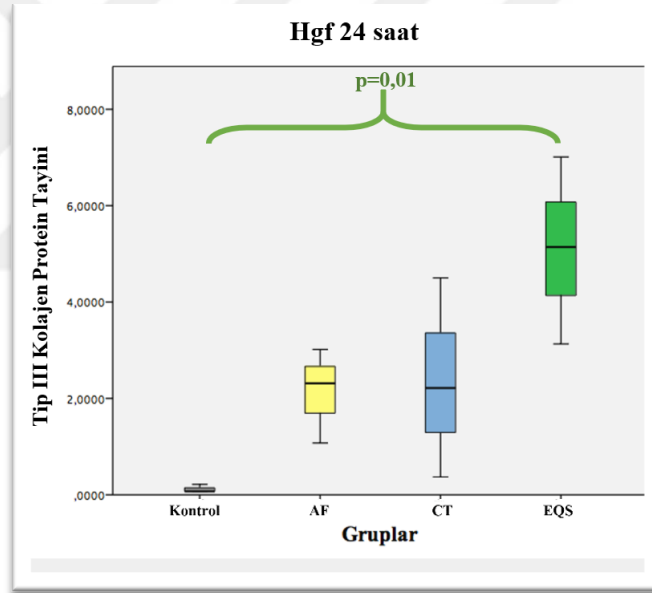
**Tablo 6.7.** Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının Hgf hücreleri üzerinde 24 saat süresinde tip I, tip III kolajen ve interin  $\beta_1$  protein miktarları üzerindeki etkilerin çoklu ve ikili karşılaştırmaları

Hücre/Zaman Protein	Gruplar (N= 6)										
	Medyan Min — Max (Ort $\pm$ SS)				p*	p <sup>#(a-b)</sup>	p <sup>#(a-c)</sup>	p <sup>#(a-d)</sup>	p <sup>#(b-c)</sup>	p <sup>#(b-d)</sup>	p <sup>#(c-d)</sup>
	Kontrol <sup>a</sup>	AF <sup>b</sup>	CT <sup>c</sup>	EQS <sup>d</sup>							
<b>Hgf/24saat</b>	0,43	3,41	12,93	5,00							
<b>Tip I Kolajen (N=4)</b>	0,10 — 2,34 (0,82 $\pm$ 1,03)	1,82 — 4,34 (3,24 $\pm$ 1,07)	2,19 — 30,01 (14,52 $\pm$ 11,75)	1,95 — 7,17 (4,78 $\pm$ 2,24)	<b>0,037</b>	0,95	<b>0,002</b>	0,27	0,95	1,00	1,00
<b>Hgf/24saat</b>	0,07	2,31	2,21	5,14							
<b>Tip III Kolajen (N=3)</b>	0,07 — 0,21 (0,12 $\pm$ 0,08)	1,07 — 3,01 (2,13 $\pm$ 0,98)	0,36 — 4,50 (2,3 $\pm$ 2,06)	3,12 — 7,01 (5,09 $\pm$ 1,94)	<b>0,034</b>	0,06	0,06	<b>0,01</b>	1,00	1,00	1,00
<b>Hgf/24saat</b>	3,08	1,41	1,41	0,54							
<b>Integrin <math>\beta_1</math> (N=3)</b>	0,43 — 3,90 (2,47 $\pm$ 1,81)	0,03 — 1,64 (1,03 $\pm$ 0,86)	0,03 — 1,64 (1,03 $\pm$ 0,86)	0,07 — 0,55 (0,39 $\pm$ 0,27)	0,51	-	-	-	-	-	-

\*Kruskal Wallis testi, #Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney-U testi, Hgf: Human Gingival Fibroblast, AF<sup>b</sup>: Admira® Fusion, CT<sup>c</sup>: Charizma® Topaz, EQS<sup>d</sup>: Estelite®  $\Sigma$  Quick Sigma, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart Sapma

## 6.8. Kompozit Gruplarının Hgf hücrelerinin Tip III Kolajen Miktarı Üzerindeki Etkilerinin 24 saat süresinde Değerlendirilmesi

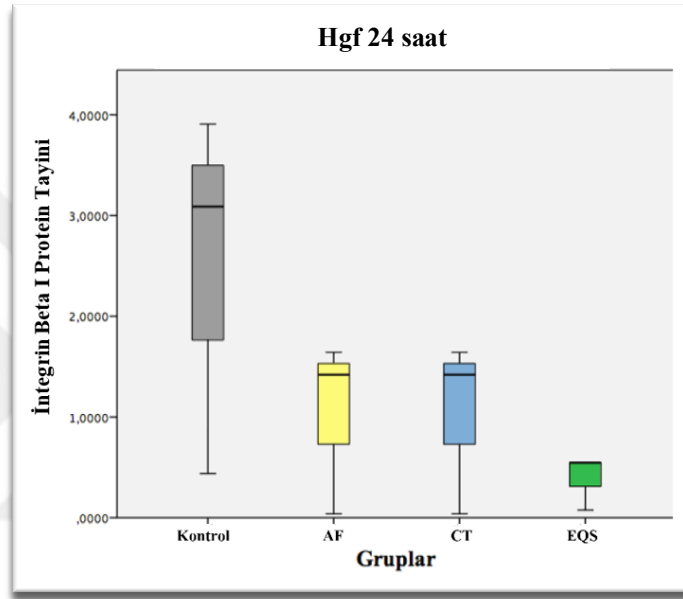
Hgf hücrelerinin tip III kolajen miktarına yönelik 24 saat inkübasyon süresinde kontrol, AF, CT ve EQS grupları arasında yapılan çoklu karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p=0,034$ ) (Tablo 6.8) (Şekil 6.14). Yapılan ikili karşılaştırmalarda EQS grubunun kontrol grubuna göre Hgf hücrelerinin tip III kolajen miktarının arttırdığı belirlendi ( $p=0,01$ ) (Tablo 6.8) (Şekil 6.14). AF ve CT gruplarının ise Hgf hücrelerinin tip III miktarı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etki yaratmadığı saptandı ( $p>0,05$ ) (Tablo 6.8) (Şekil 6.14).



Şekil 6.14. Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının 24 saat süresinde Hgf hücrelerinin tip III kolajen miktarı üzerine yaptıkları etkinin karşılaştırılması

### 6.9. Kompozit Gruplarının Hgf hücrelerinin Integrin $\beta_1$ Protein Miktarı Üzerindeki Etkilerinin 24 saat süresinde Değerlendirilmesi

Hgf hücrelerinin integrin  $\beta_1$  protein miktarındaki değişim 24 saat süresinde kontrol, AF, CT ve EQS grupları arasında yapılan gruplar arası çoklu karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 6.8) (Şekil 6.15).



Şekil 6.15. Kontrol, AF, CT ve EQS gruplarının 24 saat süresinde Hgf hücrelerinin integrin  $\beta_1$  protein miktarı üzerinde yaptıkları etkinin karşılaştırılması

## 7. TARTIŞMA

İleri derecede diş dokusu kaybının olduğu durumlarda, sınıf V, sınıf III ve derin sınıf II çürüklerde, diş eti çekilmesi sonrası gözlenen kök yüzeyinin abraziv defektlerinde periodonsiyum ile yapılacak olan restoratif tedavinin ilişkisi artmaktadır. Bu sebeple restorasyonların periodontal dokular üzerindeki etkisi çeşitli araştırmaların konusu olmuştur (Waerhaug, 1956) ve restorasyon sınırının yerleşiminin (Gullo ve Powell, 1979; Schätzle ve ark., 2001; Willershausen ve ark., 2001; Matthews ve Tabesh, 2004), restoratif materyalin yüzey özelliklerinin (Waerhaug, 1956; Paolantonio ve ark., 2004) ve restorasyon tipinin (van Dijken ve ark., 1987; Geurtsen, 1998; Willershausen ve ark., 2001; Broadbent ve ark., 2006; Kostoryz ve ark., 2007) periodontal dokular üzerindeki etkileri, literatürde incelenen başlıca konulardır. Günümüzde estetik taleplerin artması ile restoratif materyallerdeki gelişmeler, materyallerin periodonsiyum üzerindeki etkilerine ilişkin araştırmaların önemini daha da arttırmıştır. Yapılan çalışmalarda restorasyonların, enflamatuvar yanıt oluşturabileceği ve restoratif materyale komşu kolonize mikroflorayı değiştirebileceği gösterilmiştir (van Dijken ve ark., 1987; Paolantonio ve ark., 2004; Santos ve ark., 2007). Yakın zamanda kompozit üretiminde nanoteknolojik yöntemlerin kullanımındaki artış, kompozitlerin yüzey pürüzsüzlüğü, mekanik dayanıklılığı ve ışık geçirgenliği gibi fiziksel özelliklerinin artırılarak yeni nesil nanohibrit kompozitlerin üretimine yol açmıştır (Çelik, 2017). Bu *in-vitro* çalışma, son dönemde klinik kullanıma sunulan gerek konvansiyonel monomerler olan Bis-GMA ve TEGDMA (EQS) içeriğe, gerekse ormoser (AF) ve TCD *Urethan* gibi yeni keşfedilmiş monomer içeriğine sahip (CT) nanohibrit yapıda üç farklı kompozit materyalinin Hgf ile Hpdlf hücreleri üzerindeki sitotoksosite ve protein ekspresyon etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Biyolojik dokularda materyallerin zararlı etkilerinin araştırılmasında kullanılan *in-vitro* yöntemlerin prensibi, materyal ile hücrelerin teması sonucunda hücrede meydana gelen moleküler ve hücresel değişikliklerin izlenmesine dayanmaktadır (Çelik, 2017). Materyallerin biyouyumluluğuna yönelik yapılan araştırmalarda kullanılan *in-vitro* yöntemler; materyal ile hücrenin doğrudan temasına dayanan “direkt kontak”, materyal ile hücre arasında agar jel ya da *Milipore* filtre gibi ara

tabakanın olduğu “indirekt kontak” ve materyalden açığa çıkan eluatların hücrelere uygulandığı “*extract testi*” olarak sınıflanmaktadır (Cao ve ark., 2005; Franz ve ark., 2007). Direkt kontak testinin materyal toksisitesinin belirlenmesinde hassas sonuçlar veren bir metot olduğu birçok çalışmada ifade edilmiştir (Cao ve ark., 2005; Bhatia ve Yetter, 2008; De Melo ve ark., 2013; Li ve ark., 2015). Çalışmamızda direkt kontakt test metoduyla hücreler ile kompozit disk örnekler temasa getirilerek 24 saat ve 1 hafta bekletildi.

Hücrelerdeki sitotoksitenin değerlendirilmesinde kolorimetrik *MTT* testi kullanımı hızlı, objektif sonuçlar elde edilmesi ve hücre metabolik aktivitesi üzerinden canlılık hakkında bilgi vermesi gibi sebeplerle tercih edilmiştir (Issa ve ark., 2004; Darmani ve ark., 2007; Kostoryz ve ark., 2007; Anand ve Balasubramanian, 2014). Çalışmamızda da güvenilirliğine dayanılarak sitotoksite ve canlılık değerlendirmeleri *MTT* testi ile gerçekleştirildi.

Rezin esaslı kompozitlerin çevre dokularda yaratabileceği etkilere ilişkin yapılan hücre çalışmalarında, kompozit bileşenini oluşturan monomerlerin polimerizasyon sonrası salınımına bağlı gösterdikleri sitotoksik etkilere odaklanılmıştır (Peutzfeldt, 1997; Issa ve ark., 2004; Al-Hiyasat ve ark., 2005; Urcan ve ark., 2010; Madhyastha ve ark., 2015; Putzeys ve ark., 2019). Ayrıca dolguların yüzey alanları ve salınabilecek monomerler arasında ilişki kurulduğunda mezial-okluzal-distal dolgularda yüzey alanı ortalama 95 mm<sup>2</sup>, servikal dolgularda 12 mm<sup>2</sup>, veneer restorasyonlarda 86 mm<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır (Van Landuyt ve ark., 2011). Bununla birlikte kompozitlere yönelik *in-vitro* sitotoksite testlerinde, örnek yüzey alanı ve kültür ortamı hacmi arasındaki oranın da sonuçlar üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Franz ve ark., 2007). Bununla birlikte standardizasyona yönelik ISO 10993-5 kılavuzunda, örnek hücre ile kompozit disk temas yüzey alanının kuyucuk yüzey alanına oranının en az % 10 olması gerektiği öne sürülmüştür (ISO, 1999). Çalışmamızda 7 mm çap ve 2 mm kalınlıkta hazırlanan disklerde yüzey alanı 120,89 mm<sup>2</sup> olarak hesaplandı ve 24 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler ile deney gerçekleştirildi. Kompozit diskin hücre ile temas yüzeyinin kuyucuk yüzey alanına oranı ise %18,15 olarak hesaplandı.

Sitotoksite çalışmalarında, hayvan ve insan kaynaklı hücreler uzun yıllardır kullanılmaktadır. Özellikle 3T3 ve L929 fare fibroblastı gibi devamlı hücre dizileri,

oluşturdukları biyolojik cevabın uygun olması, üretilmelerindeki kolaylık ve kültürlerinin kolay kontrol edilebilmesi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedirler (Geurtsen, 2000; Thonemann ve ark., 2002). Ancak yapılan çalışmalarda, laboratuvarında hedef doku primer hücreleriyle çalışmak hücrelerin ömrünün daha kısa olması ve üremelerinin daha yavaş olması gibi bazı zorluklar içerse de ilgili dokuya ait primer hücrelerin kullanılmasının klinik ilişkiyi korumak adına daha anlamlı sonuçlar ortaya koyacağı bildirilmiştir (Hanks ve ark., 1981; Schmalz, 1994; Geurtsen, 2000; Thonemann ve ark., 2002). Çalışmamızda, *in-vitro* ortam ile klinik ilişkiyi kurabilmek için Hgf ve Hpdlf hücre dizileri kullanıldı.

Nanohibrit kompozitlerin kullanımındaki artışa rağmen bu materyallerle ilgili uzun dönem klinik çalışmalar ve bu materyallerin çevre dokulardaki etkilerine dair literatür verileri kısıtlıdır. Öte yandan sonuçları tutarlılık göstermese de farklı içerikteki kompozitlerin farklı sitotoksik etkileri olabileceğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Jandt ve Sigusch, 2009; Schulz ve ark., 2015; Koohpeima ve ark., 2017; Yang ve ark., 2018). Geleneksel kompozit rezinlere göre ormoser yapıdaki kompozitlerin daha az monomer salınımı yaptığı ve daha az sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Manojlovic ve ark., 2011; Anand ve Balasubramanian, 2014; Schubert ve ark., 2019). Yang ve ark. (Yang ve ark., 2018) içlerinde AF'nin de bulunduğu beş farklı kompozit materyalinin DMEM içerisindeki 72 saatlik monomer salınımını ve açığa çıkan monomerlerin Hgf hücreleri üzerindeki sitotoksikite etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında AF kompozitlerin, hücre canlılığını anlamlı olarak etkilemediğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda sitotoksikite ve canlılık etkileri değerlendirildiğinde 24 saat ve 1 hafta zaman aralıklarının her ikisinde de Hgf hücreleri üzerinde en düşük sitotoksik etki AF grubunda gözlemlendi ( $p > 0,05$ ). Bu bulgu ormoserlere dair literatür verileriyle uyum göstermektedir (Al-Hiyasat ve ark., 2005; Schulz ve ark., 2015; Yang ve ark., 2018) ve bu durum düşük monomer salınımıyla ilişkilendirilebilir. CT, içerdiği yeni nesil monomer TCD-DI-HEA ile diğer kompozitlerden farklılaşmaktadır. Bu monomer içeriğine dair literatürdeki sınırlı sayıdaki çalışmalarda monomer salınımı değerlendirilmiştir (Hulsmann, 1997; Frauscher ve Ilie, 2013; Alshali ve ark., 2015; Putzeys ve ark., 2019). Çalışma bulgularımızda Hgf hücreleri üzerindeki sitotoksikite ve canlılık verileri değerlendirildiğinde 24 saat ve 1 hafta zaman aralıklarında en toksik materyal CT

olarak tespit edildi. Bu sonucun henüz hücre üzerindeki etkileri tam olarak bilinmeyen TCD-DI-HEA monomer ve bu monomerin salınım miktarı ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu monomer için farklı hücreler üzerindeki etkilerine dair ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kompozitlerin gelişen özellikleriyle yapılan çalışmalarda, subgingival yerleşimli restorasyonların ve periodontal cerrahi sırasında kullanılacak restoratif materyallerin klinik başarıları araştırılmıştır (Paolantonio ve ark., 2004; Martins ve ark., 2007; Santos ve ark., 2007; Oppermann ve ark., 2016). Bu durum restoratif materyaller ile subgingival alanda bulunan periodontal ligament hücreleri arasındaki ilişkinin daha detaylı araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. EQS ve çeşitli endodontik simanların Hpdlf üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada birinci günde hiçbir grupta hücre sayısında anlamlı bir değişiklik farkedilmezken sekizinci günde kompozit grubunun hücre sayısının anlamlı derecede azaldığı belirtilmiştir (Jung ve ark., 2014). Ancak farklı içerikteki kompozitlerin Hpdlf hücreleri üzerindeki hücresel etkilerine dair bir çalışma mevcut değildir. 3 farklı kompozit materyalin Hpdlf hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmamızda 24 saat süresinde tüm gruplarda anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmezken, CT grubunda 1 hafta süresinde sitotoksik etki tespit edildi. Bu sonucun, Hpdlf hücrelerinin materyallerin sitotoksik etkisine karşı kısa dönemde daha dayanıklı olmasıyla ilişkili olduğu düşünülebilir (Hanks ve ark., 1981).

Materyallerden monomer salınımının devam etmesi ve bunun yarattığı kümülatif etkiyle ilişkili olarak maruziyet süresi arttıkça sitotoksitenin arttığı öne sürülmüştür (Putzeys ve ark., 2019). Schulz ve ark. (Schulz ve ark., 2015) farklı kompozit materyallerinin Hgf ve insan diş eti keratinosit hücrelerinin gen ekspresyonu üzerindeki 24 saat ve 1 hafta etkilerini inceledikleri çalışmalarında 1 hafta zaman diliminde Hgf hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin arttığını belirtmişlerdir. Anand ve ark. (Anand ve Balasubramanian, 2014) ise insan osteoblast hücrelerinin dozdan bağımsız olarak maruziyet süresine daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda da 24 saat ve 1 hafta zaman aralıklarında Hgf hücreleri üzerinde CT grubunun sitotoksik etkisinin zamanla arttığı gözlemlendi. Hpdlf hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin tüm kompozit gruplarında zamanla artarak hücre canlılığını

olumsuz etkilediği görüldü. Çalışmamızda bulunan sitotoksosite canlılık verileri, hiçbir grupta uygulama sonrası letal doza ulaşmadı.

Kompozit materyallerinin hücrenin protein miktarı üzerindeki etkilerini gözlemek üzere AF, CT ve EQS kompozitlerinin Hgf hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası, Hgf hücrelerinin tip I, tip III kolajen ve integrin  $\beta_1$  proteinleri *Western Blot* yöntemiyle izlendi. *Western Blot* tekniği DNA'dan protein oluşumuna kadar gerçekleşen genetik bilgi akışının son durağı olan proteinlerin, tespit edilmesine ve miktar tayinine olanak sağlayan bir metot olarak 1979'da tanıtılmıştır (Burnette, 1981; Kurien ve Scofield, 2006). DNA'daki genetik bilginin aktarımı, mRNA'ya transkripsiyon ifadesi ile buradan da t-RNA aracılığıyla ribozomlar üzerinden hücrenin tüm yapısal ve enzimatik fonksiyonları için gerekli olan proteinlerin sentezi sayesinde gerçekleşmektedir (Lüleyap, 2008; Üstüner, 2010). Çalışmaların çoğunda hedef proteinler PCR yöntemiyle mRNA seviyesinde incelenmiştir (Oates ve ark., 2005; Pae ve ark., 2009; Hakki ve ark., 2012). Ancak mRNA ekspresyonu proteinler hakkında bilgi verse de total protein miktarı hakkında yeterli sonuç vermemektedir (de Sousa Abreu ve ark., 2009). Bu sebeple çalışmamızda Hgf hücrelerinin protein miktarındaki değişim üzerinden kompozitlerin oluşturabileceği klinik etkileri daha iyi yorumlayabilmek adına *Western Blot* tekniği tercih edilmiştir.

Sağlıklı diş eti ve periodonsiyum hücre dışı matriksinde temel olarak Tip I ve Tip III kolajen tespit edilmiştir (Narayanan, 1983). Özellikle erken yara iyileşmesi sürecinde Hgf hücreleri tarafından Tip I ve Tip III kolajen sentezinde artış olduğu gösterilmiştir (Miller ve ark., 2002). Enflamasyon gibi patolojik durumlarda ise kolajenin yıkım oranının % 70'e kadar çıkabileceği bildirilmiştir (Narayanan, 1983). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda Tip I ve Tip III kolajen miktarları değerlendirildi. Özellikle hücre bağlantısına yönelik araştırmalarda integrin proteinleri giderek önem kazanmaktadır. İntegrinler periodontal yara iyileşmesinde, epitel ve bağ dokusunu içeren adhezyonda iki yönlü allosterik sinyal yoluyla kilit rol oynamaktadır (Larjava ve ark., 1996; Jakhu ve ark., 2018). Bağlantı epitelinde hemidesmosomlar arası  $\beta_1$  aracılı hücresel adhezyonun diş yapıları ve bağlantı epiteli arasındaki sıkı bağlantıda gerekli olduğu tespit edilmiştir (Larjava ve ark., 2011). Başka bir araştırmada,  $\alpha_5 \beta_1$  integrin aracılığıyla fibronektinin implantların osseointegrasyonunda implant ve osteoblastlar arasındaki yüzey adhezyonunu sağladığı bildirilmiştir (Liu ve ark.,



2015). Hgf hücrelerinin  $\alpha_v \beta_1$  indüklemesiyle TGF  $\beta_1$  aktivasyonunu sağladığı ve bu aktivasyonun bağlantı açısından önem arz ettiği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2018) . Periodontal yıkımla ilişkili bir araştırmada, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'a ait bir membran proteininin (Omp29), fibronektin / integrin  $\beta_1$  / FAK (*Focal Adhesion Kinase*) yolağı aracılığıyla epitel apoptozunu tetiklediği ortaya konulmuştur (Yoshimoto ve ark., 2016) . Tüm bu araştırmalar ışığında çalışmamızda nanohibrit kompozitlerin klinik kullanımı sırasında hücrelerin adhezyonu üzerine etkileri ile ilgili bilgi edinmek amacıyla İntegrin  $\beta_1$  ekspresyonu değerlendirildi.

Kompozitlere yönelik çalışmalarda direkt olarak materyallerin kolajen miktarı üzerine olan etkileri değerlendirilmemiştir. Daha çok materyallerden elde edilen eluatların, hücre dışı matriks elemanlarının ekspresyonu üzerine olan etkilerine odaklanılmıştır. Kompozitlere ait konvansiyonel monomer içeriklerinden biri olan HEMA'nın, Hgf hücreleri üzerinde tip I kolajen miktarını azalttığı gösterilmiştir (Falconi ve ark., 2007; Teti ve ark., 2009). Hakkı ve ark. (Hakki ve ark., 2012) kök perforasyonlarında kullanılacak çinko oksitojenol, kompomer, Mineral Toksik Agregat (MTA), kendinden polimerize olabilen rezin kompozit ve amalgamın periodontal ligament üzerindeki tip I kolajen etkilerini mRNA seviyesinde incelemiş ve amalgam dışındaki gruplarda tip I kolajende artış olduğunu amalgam grubunda ise anlamlı farklılık olmadığını ortaya koymuştur. Bis-GMA içerikli nano-hibrit başka bir kompozitle yapılan çalışmada, Bis-GMA monomerinin Hgf hücreleri üzerinde DNA transkripsiyonunu indükleyici etki yaptığı belirtilmiştir (Schulz ve ark., 2015; Jerg ve ark., 2018). Bazı doku dostu materyallerin, ilişkide olduğu dokulardaki protein miktarında önemli değişiklik yaratmadığı gösterilmiştir (Pae ve ark., 2009; Hakki ve ark., 2012). Titanyum ve zirkonyum yüzeylerde Hgf'ler için Tip I kolajen, Tip III kolajen ve İntegrin  $\beta_1$  *Real Time*-PCR yöntemiyle değerlendirilmiş ve her üç proteinin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Pae ve ark., 2009). Tip III kolajen miktarının özellikle erken yara iyileşmesi ve enflamatuvar cevap oluşumunda arttığına dair çalışmalar mevcuttur (Narayanan, 1983; Bartold, 1995). Bizim çalışmamızda tip I kolajenin, CT grubunda anlamlı olarak arttığı tespit edildi tip I kolajen miktarının olumsuz etkilenmemesi, deney gruplarındaki materyallerde HEMA içeriğinin olmaması ile ilişkilendirilebilir. Çalışmamızdaki Hgf hücrelerinin tip III kolajen

ekspresyonu açısından EQS grubunun kontrol grubuna göre tip III kolajen ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edildi. Diğer gruplarda ise anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi. Tip III kolajen ekspresyonundaki artışın yorumlanmasına yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kompozit uygulamalarının integrin ailesi üzerine etkilerine dair kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Jerg ve ark.(Jerg ve ark., 2018) ormoser, siloran, nanohibrit ve kendinden polimerize olabilen iki farklı içerikteki akışkan kompozitin insan dişeti keratinositlerinde ve dişeti fibroblastlarında integrin  $\beta_1$  ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. 24 saat uygulama sonrası integrin  $\beta_1$  ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varmışlardır. Öte yandan 72 saat uygulama sonrası yapılan integrin  $\beta_1$  immunofloresansı değerlendirmesinde siloran grubunda anlamlı bir azalma ( $p<0,01$ ) HEMA içerikli akışkan kompozit grubunda ise anlamlı bir artış tespit etmişlerdir ( $p<0,01$ ). Pae ve ark. (Pae ve ark., 2009) titanyum ve zirkonyum materyallerin Hgf hücrelerindeki tip I, tip III kolajen ve integrin  $\beta_1$  protein ekspresyonundaki etkilerini değerlendirmişler ve Hgf hücrelerinin integrin  $\beta_1$  ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik yaratmadığını gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda da gruplar arasında İntegrin  $\beta_1$  miktarıyla ilgili olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Protein ekspresyonu analizinin daha uzun süreli uygulamalar sonrasında ve farklı hücre dizileri üzerinde de izlenmesi gerektiği düşünülebilir.

Sonuç olarak,

- Ormoser grubu kompozitlerden biri olan AF'nin, Hgf ve Hpdlf hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemesi ve protein ekspresyonunu etkilememesi, diş eti ve periodontal ligament ile yakın ilişkide restorasyon yapılması gereken klinik olgularda, ormoser grubu kompozitlerin biyouyumlu olarak değerlendirilebileceğini düşündürülebilir.
- Yeni bir monomer olan TCD-DI-HEA içerikli CT'nin, Hgf ve Hpdlf hücrelerinde sitotoksik etki göstermesi ve Hgf hücrelerinin Tip I kolajen miktarını arttırması nedeniyle insan periodonsiyum hücreleri üzerine etkilerinin incelendiği daha ileri çalışmalara gerek vardır.
- Geliştirilmiş polimerizasyon teknolojisine sahip Bis-GMA içerikli EQS kompozitin Hgf hücreleri üzerinde tip III kolajen miktarını arttırmış olması nedeni

ile bu materyalin, periodonsiyum hücrelerinin protein ekspresyonu üzerine olan etkilerinin incelendiği daha ileri çalışmalara gerek vardır.



## 8. KAYNAKLAR

Ababneh KT, Al-Omari M, Alawneh TN-E. The effect of dental restoration type and material on periodontal health. *Oral health & preventive dentistry*. 2011;9(4).

Ainamo J, Talari A. The increase with age of the width of attached gingiva. *Journal of Periodontal research*. 1976;11(4): 182-188.

Al-Hiyasat A, Darmani H, Milhem M. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clinical oral investigations*. 2005;9(1): 21-25.

Albandar JM, Buischi YA, Axelsson P. Caries lesions and dental restorations as predisposing factors in the progression of periodontal diseases in adolescents. A 3-year longitudinal study. *J Periodontol*. 1995;66(4): 249-254.

Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *The FASEB Journal*. 1990;4(11): 2868-2880.

Alkan A, Keskiner I, Yuzbasioglu E. Connective tissue grafting on resin ionomer in localized gingival recession. *Journal of periodontology*. 2006;77(8): 1446-1451.

Allen EP, Miller Jr PD. Coronal positioning of existing gingiva: short term results in the treatment of shallow marginal tissue recession. *Journal of Periodontology*. 1989;60(6): 316-319.

Alshali RZ, Salim NA, Sung R, Satterthwaite JD, Silikas N. Qualitative and quantitative characterization of monomers of uncured bulk-fill and conventional resin-composites using liquid chromatography/mass spectrometry. *Dent Mater*. 2015;31(6): 711-720.

Anand VS, Balasubramanian V. Effect of resin chemistry on depth of cure and cytotoxicity of dental resin composites. *Materials Science and Engineering: B*. 2014;181: 33-38.

Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(9): 3861-3899.

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell and tissue research*. 2010;339(1): 269.

Bartold P. Turnover in periodontal connective tissues: dynamic homeostasis of cells, collagen and ground substances. *Oral diseases*. 1995;1(4): 238-253.

Bartold PM. Connective tissues of the periodontium. Research and clinical implications. *Australian dental journal*. 1991;36(4): 255-268.

Bartold PM, Narayanan AS. Biology of the periodontal connective tissues: Quintessence Publishing Company;1998,

Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology* 2000. 2000;24(1): 28-55.

Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connective tissue research*. 1981;9(2): 99-106.

Bayne SC, Thompson JY, Roberson T, Heymann H, Ritter A. *Sturdevant's art and science of operative dentistry*. United States of America, Mosby. 2006;203-211: 203-211.

Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *The FASEB journal*. 1990;4(2): 148-160.

Bhatia SK, Yetter AB. Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. *Cell biology and toxicology*. 2008;24(4): 315-319.

Bowen RL, Marjenhoff WA. Dental composites/glass ionomers: the materials. *Advances in dental research*. 1992;6(1): 44-49.

Brackett MG, Bouillaguet S, Lockwood P, Rotenberg S, Lewis J, Messer RL, Wataha J. In vitro cytotoxicity of dental composites based on new and traditional polymerization chemistries. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2007;81(2): 397-402.

Brakebusch C, Fässler R.  $\beta$  1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2005;24(3): 403-411.

Broadbent JM, Williams KB, Thomson WM, Williams SM. Dental restorations: a risk factor for periodontal attachment loss? *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(11): 803-810.

Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*. 1981;112(2): 195-203.

Caglayan G. *Periodontoloji ve İmplantoloji Cilt 1*. Türkiye: Quintessence Publishin;2018,

Cairo F, Pini-Prato GP. A technique to identify and reconstruct the cemento-enamel junction level using combined periodontal and restorative treatment of gingival

recession. A prospective clinical study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2010;30(6): 573-581.

Camargo P, Lagos R, Lekovic V, Wolinsky L. Soft tissue root coverage as treatment for cervical abrasion and caries. *General dentistry*. 2001;49(3): 299-304.

Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*. 2005;25(2): 101-108.

Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials*. 2001;22(5): 481-487.

Cate AT, Deporter D. The degradative role of the fibroblast in the remodelling and turnover of collagen in soft connective tissue. *The Anatomical Record*. 1975;182(1): 1-13.

Chavrier C, Couble M, Magloire and H, Grimaud J. Connective tissue organization of healthy human gingiva: Ultrastructural localization of collagen types I–III–IV. *Journal of periodontal research*. 1984;19(3): 221-229.

Cho MI, Garant PR. Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 1996;245(2): 342-360.

Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000*. 2000;24(1): 9-27.

Circular VS. Research and development, scientific product information; ormocers, Admira and Admira flow. Voco, Cuxhaven. 2000.

Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical reviews in toxicology*. 2006;36(8): 609-662.

Cohen DW. Lecture, Walter Reed Medical Center. 1962.

Cohen ES. Atlas of cosmetic and reconstructive periodontal surgery: PMPH-USA;2007,

Craig RG. Chemistry, composition, and properties of composite resins. *Dental Clinics of North America*. 1981;25(2): 219-239.

Craig RG, Powers JM. Restorative dental materials. 1989.

Çelik ACT. Bulk fill kompozitlerin biyoyuyumluluğunun değerlendirilmesi [Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi; 2017.

Darmani H, Al-Hiyasat AS, Milhem MM. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. *Quintessence international*. 2007;38(9).

De Melo WM, Maximiano WMA, Antunes AA, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT. Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on osteoblast cell cultures. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013;71(1): 35-41.

de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems*. 2009;5(12): 1512-1526.

Dragoo MR. Resin-Ionomer and Hybrid-Ionomer Cements: Part II. Human Clinical and Histologic Wound Healing Responses in Specific Periodontal Lesions. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 1997;17(1).

Falconi M, Teti G, Zago M, Pelotti S, Breschi L, Mazzotti G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell biology and toxicology*. 2007;23(5): 313-322.

Ferracane JL. Current trends in dental composites. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1995;6(4): 302-318.

Ferracane JL. Resin composite—state of the art. *Dental materials*. 2011;27(1): 29-38.

Franz A, Konig F, Skolka A, Sperr W, Bauer P, Lucas T, Watts DC, Schedle A. Cytotoxicity of resin composites as a function of interface area. *Dent Mater*. 2007;23(11): 1438-1446.

Frauscher KE, Ilie N. Degree of conversion of nano-hybrid resin-based composites with novel and conventional matrix formulation. *Clinical oral investigations*. 2013;17(2): 635-642.

Garant PR. *Oral Cells and Tissues*: Quintessence Publishing Company;2003,

García AH, Lozano MAM, Vila JC, Escribano AB, Galve PF. Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(2): E215-220.

Gargiulo AW, Wentz FM, Orban B. Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans. *Journal of Periodontology*. 1961;32(3): 261-267.

Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(2 Pt 2): 687-695.

Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2000;11(3): 333-355.

Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of dental research*. 1996;75(3): 895-902.

Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clinical oral investigations*. 2008;12(1): 1-8.

Goldstein M, Nasatzky E, Goultshin J, Boyan B, Schwartz Z. Coverage of previously carious roots is as predictable a procedure as coverage of intact roots. *Journal of periodontology*. 2002;73(12): 1419-1426.

Gomes SC, Miranda LA, Soares I, Oppermann RV. Clinical and histologic evaluation of the periodontal response to restorative procedures in the dog. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2005;25(1).

Gottlieb B. Biology of the cementum. *Journal of Periodontology*. 1942;13(1): 13-17.

Gullo C, Powell R. The effect of placement of cervical margins of class II amalgam restorations on plaque accumulation and gingival health. *Journal of oral rehabilitation*. 1979;6(4): 317-322.

Gupta G, Gupta R, Gupta N, Gupta U. Crown lengthening procedures-A review article. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2015;4(14): 27-37.

Hakki S, Bozkurt S, Ozcopur B, Purali N, Belli S. Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials—a laboratory study. *International endodontic journal*. 2012;45(3): 240-248.

Häkkinen L, Heino J, Koivisto L, Larjava H. Altered interaction of human granulation-tissue fibroblasts with fibronectin is regulated by  $\alpha 5\beta 1$  integrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1994;1224(1): 33-42.

Hanks CT, Anderson M, Craig RG. Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1981;10(2): 101-112.

Hayacibara M, Rosa O, Koo H, Torres S, Costa B, Cury J. Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. *Journal of dental research*. 2003;82(4): 267-271.

Hickel R, Dasch W, Janda R, Tyas M, Anusavice K. New direct restorative materials. *International Dental Journal*. 1998;48(1): 3-16.

Hulsmann M. Dens invaginatus: aetiology, classification, prevalence, diagnosis, and treatment considerations. *Int Endod J*. 1997;30(2): 79-90.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1): 11-25.



ISO B. 10993-5: Biological evaluation of medical devices. Tests for in vitro cytotoxicity. 1999.

Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater.* 2004;20(1): 12-20.

Ivanovski S, Komaki M, Bartold P, Narayanan A. Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via  $\alpha 5\beta 1$  integrin. *Journal of periodontal research.* 1999;34(3): 154-159.

Jakhu H, Gill G, Singh A. Role of integrins in wound repair and its periodontal implications. *Journal of oral biology and craniofacial research.* 2018.

Jandt KD, Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dental materials.* 2009;25(8): 1001-1006.

Jerg A, Schulz S, Tomakidi P, Hellwig E, Polydorou O. Modulation of gingival cell response towards dental composites. *Dental Materials.* 2018;34(3): 412-426.

Jokinen J, Dadu E, Nykvist P, Käpylä J, White DJ, Ivaska J, Vehviläinen P, Reunanen H, Larjava H, Häkkinen L. Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(30): 31956-31963.

Jung S, Mielert J, Kleinheinz J, Dammaschke T. Human oral cells' response to different endodontic restorative materials: an in vitro study. *Head & face medicine.* 2014;10(1): 55.

Kim J, Kim L, Kim C, Cho B, Kim O. Characteristics of novel dental composites containing 2, 2-bis [4-(2-methoxy-3-methacryloyloxy propoxy) phenyl] propane as a base resin. *Biomacromolecules.* 2006;7(1): 154-160.

Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl F-X. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Journal of Dentistry.* 2004;32(3): 229-234.

Ko JS, Bernard GW. Osteoclast formation in vitro from bone marrow mononuclear cells in osteoclast-free bone. *American Journal of Anatomy.* 1981;161(4): 415-425.

Koohpeima F, Mokhtari MJ, Doozandeh M, Jowkar Z, Yazdanshenas F. Comparison of Cytotoxicity of New Nanohybrid Composite, Giomer, Glass Ionomer and Silver Reinforced Glass Ionomer using Human Gingival Fibroblast Cell Line. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry.* 2017;41(5): 368-373.

Kostoryz EL, Zhu Q, Zhao H, Glaros AG, Eick JD. Assessment of cytotoxicity and DNA damage exhibited by siloranes and oxiranes in cultured mammalian cells. *Mutat Res.* 2007;634(1-2): 156-162.

Kramer PR, JanikKeith A, Cai Z, Ma S, Watanabe I. Integrin mediated attachment of periodontal ligament to titanium surfaces. *dental materials*. 2009;25(7): 877-883.

Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006;38(4): 283-293.

Kuru L, Parkar M, Griffiths G, Newman H, Olsen I. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. *Journal of dental research*. 1998;77(4): 555-564.

Larjava H, Haapasalmi K, Salo T, Wiebe C, Uitto VJ. Keratinocyte integrins in wound healing and chronic inflammation of the human periodontium. *Oral diseases*. 1996;2(1): 77-86.

Larjava H, Koivisto L, Häkkinen L, Heino J. Epithelial integrins with special reference to oral epithelia. *Journal of dental research*. 2011;90(12): 1367-1376.

Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater*. 2006;22(12): 1086-1092.

Lee SY, Huang HM, Lin CY, Shih YH. Leached components from dental composites in oral simulating fluids and the resultant composite strengths. *J Oral Rehabil*. 1998;25(8): 575-588.

Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*. 2015;3(5): 617-620.

Liu Z, Zhou W, Tangl S, Liu S, Xu X, Rausch-Fan X. Potential mechanism for osseointegration of dental implants in Zucker diabetic fatty rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015;53(8): 748-753.

Lohbauer U. Dental glass ionomer cements as permanent filling materials?—Properties, limitations and future trends. *Materials*. 2009;3(1): 76-96.

Löe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *The Journal of Periodontology*. 1967;38(6P2): 610-616.

Löe H, Karring T. A quantitative analysis of the epithelium-connective tissue interface in relation to assessments of the mitotic index. *Journal of dental research*. 1969;48(5): 634-640.

Lucchesi JA, Santos VR, Amaral CM, Peruzzo DC, Duarte PM. Coronally positioned flap for treatment of restored root surfaces: a 6-month clinical evaluation. *J Periodontol*. 2007;78(4): 615-623.

Lüleyap HÜ. Moleküler genetiğin esasları: Nobel Kitabevi;2008,

Madhyastha PS, Naik DG, Kotian R, Padma D, Srikant N, Bhat KM. Evaluation of cytotoxicity of silorane and methacrylate based dental composites using human gingival fibroblasts. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2015;9(1): ZC05.

Manojlovic D, Radisic M, Vasiljevic T, Zivkovic S, Lausevic M, Miletic V. Monomer elution from nanohybrid and ormocer-based composites cured with different light sources. *dental materials*. 2011;27(4): 371-378.

Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontology 2000*. 1993;3(1): 39-63.

Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *Journal of periodontology*. 1990;61(2): 103-111.

Martins TM, Bosco AF, Nóbrega FJ, Nagata MJ, Garcia VG, Fucini SE. Periodontal tissue response to coverage of root cavities restored with resin materials: a histomorphometric study in dogs. *Journal of periodontology*. 2007;78(6): 1075-1082.

Matthews DC, Tabesh M. Detection of localized tooth-related factors that predispose to periodontal infections. *Periodontology 2000*. 2004;34(1): 136-150.

McCulloch C, Melcher A. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *American Journal of Anatomy*. 1983;167(1): 43-58.

McCulloch CA, Lekic P, Mckee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontology 2000*. 2000;24(1): 56-72.

McGuire MK. Soft tissue augmentation on previously restored root surfaces. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 1996;16(6).

McKee M, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 1996;245(2): 293-312.

Miller CC, Septier D, Bonnefoix M, Lecolle S, Lebreton-Decoster C, Coulomb B, Pellat B, Godeau G. Human dermal and gingival fibroblasts in a three-dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling. *Clinical oral investigations*. 2002;6(1): 39-50.

Narayanan AS. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. Collagen and related research. 1983;3(1): 25-31.

Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*. 11 th ed. ed: Elsevier health sciences;2012,

Nicholson JW, Connor J. *Glossary2002*, p:P011-P012

Oates TW, Maller SC, West J, Steffensen B. Human gingival fibroblast integrin subunit expression on titanium implant surfaces. *Journal of periodontology*. 2005;76(10): 1743-1750.

Oppermann RV, Carvalho Gomes S, Cavagni J, Gomes Cayana E, Nocchi Conceição E. Response to Proximal Restorations Placed Either Subgingivally or Following Crown Lengthening in Patients with No History of Periodontal Disease. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2016;36(1).

Pae A, Lee H, Kim H-S, Kwon Y-D, Woo Y-H. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomedical materials*. 2009;4(2): 025005.

Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *Journal of periodontology*. 2001;72(6): 798-807.

Paolantonio M, D'ercole S, Perinetti G, Tripodi D, Catamo G, Serra E, Bruè C, Piccolomini R. Clinical and microbiological effects of different restorative materials on the periodontal tissues adjacent to subgingival class V restorations: 1-year results. *Journal of clinical periodontology*. 2004;31(3): 200-207.

Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *European journal of oral sciences*. 1997;105(2): 97-116.

Pini Prato GP, Baldi C, Nieri M, Franseschi D, Cortellini P, Clauser C, Rotundo R, Muzzi L. Coronally advanced flap: The post-surgical position of the gingival margin is an important factor for achieving complete root coverage. *Journal of periodontology*. 2005;76(5): 713-722.

Putzeys E, De Nys S, Cokic SM, Duca RC, Vanoirbeek J, Godderis L, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Long-term elution of monomers from resin-based dental composites. *Dental Materials*. 2019.

Rao L, Wang H, Kalliecharan R, Heersche J, Sodek J. Specific immunohistochemical localization of type I collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-labelled antibody technique. *The Histochemical Journal*. 1979;11(1): 73-82.

Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*. 2006;80(6): 370-377.

Roberson T, Heymann HO, Swift Jr EJ. *Sturdevant's art and science of operative dentistry*: Elsevier Health Sciences;2006,

Santamaria MP, da Silva Feitosa D, Nociti FH, Jr., Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA. Cervical restoration and the amount of soft tissue coverage achieved by coronally

advanced flap: a 2-year follow-up randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36(5): 434-441.

Santos VR, Lucchesi JA, Cortelli SC, Amaral CM, Feres M, Duarte PM. Effects of glass ionomer and microfilled composite subgingival restorations on periodontal tissue and subgingival biofilm: A 6-month evaluation. *Journal of periodontology.* 2007;78(8): 1522-1528.

Schätzle M, Lang NP, Ånerud Å, Boysen H, Bürgin W, Løe H. The influence of margins of restorations on the periodontal tissues over 26 years. *Journal of clinical periodontology.* 2001;28(1): 57-64.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *Journal of Dentistry.* 1994;22: S6-S11.

Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Current opinion in cell biology.* 1999;11(2): 274-286.

Schor S, Ellis I, Irwin C, Banyard J, Seneviratne K, Dolman C, Gilbert A, Chisholm D. Subpopulations of fetal-like gingival fibroblasts: characterisation and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease. *Oral diseases.* 1996;2(2): 155-166.

Schroeder HE. *Oral Structural Biology: Embryology, Structure and Function of Normal, Hard and Soft Tissues of the Oral Cavity and Temporomandibular Joints:* Thieme Publishing Group;1991,

Schroeder HE, Theiiade J. Electron microscopy of normal auman gingival epithelium. *Journal of periodontal research.* 1966;1(2): 95-119.

Schubert A, Ziegler C, Bernhard A, Bürgers R, Miosge N. Cytotoxic effects to mouse and human gingival fibroblasts of a nanohybrid ormocer versus dimethacrylate-based composites. *Clinical oral investigations.* 2019;23(1): 133-139.

Schulz SD, Ruppell C, Tomakidi P, Steinberg T, Reichl FX, Hellwig E, Polydorou O. Gene expression analysis of conventional and interactive human gingival cell systems exposed to dental composites. *Dent Mater.* 2015;31(11): 1321-1334.

Selvig KA. The fine structure of human cementum. *Acta Odontologica Scandinavica.* 1965;23(4): 423-441.

Seppa L, Forss H, Øgaard B. The effect of fluoride application on fluoride release and the antibacterial action of glass lonomers. *Journal of dental research.* 1993;72(9): 1310-1314.

Silness J, Røynstkand T. Effects on dental health of spacing of teeth in anterior segments. *Journal of clinical periodontology.* 1984;11(6): 387-398.

Sunnegårdh-Grönberg K, van Dijken JW, Funegård U, Lindberg A, Nilsson M. Selection of dental materials and longevity of replaced restorations in Public Dental Health clinics in northern Sweden. *Journal of dentistry*. 2009;37(9): 673-678.

Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*. 1986;46(2): 271-282.

Terry DA, McGuire MK, McLaren E, Fulton R, Swift EJ, Jr. Perioesthetic approach to the diagnosis and treatment of carious and noncarious cervical lesions: Part II. *J Esthet Restor Dent*. 2003;15(5): 284-296.

Teti G, Mazzotti G, Zago M, Ortolani M, Breschi L, Pelotti S, Ruggeri A, Falconi M. HEMA down-regulates procollagen  $\alpha 1$  type I in human gingival fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2009;90(1): 256-262.

Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater*. 2002;18(4): 318-323.

Uitto J, Murray LW, Blumberg B, Shamban A. Biochemistry of collagen in diseases. *Annals of internal medicine*. 1986;105(5): 740-756.

Uno S, Finger WJ, Fritz U. Long-term mechanical characteristics of resin-modified glass ionomer restorative materials. *Dental Materials*. 1996;12(1): 64-69.

Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater*. 2010;26(1): 51-58.

Üstüner D. Tümör Hücrelerinde Western Blotlama Uygulamaları. *TÜBAV Bilim Dergisi*. 2010;3(4): 330-334.

Van Der Pauw M, Everts V, Beertsen W. Expression of integrins by human periodontal ligament and gingival fibroblasts and their involvement in fibroblast adhesion to enamel matrix-derived proteins. *Journal of periodontal research*. 2002;37(5): 317-323.

Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *The FASEB journal*. 1991;5(13): 2814-2823.

van Dijken JW, Sjöström S, Wing K. Development of gingivitis around different types of composite resin. *Journal of clinical periodontology*. 1987;14(5): 257-260.

Van Landuyt K, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental Materials*. 2011;27(8): 723-747.

Waerhaug J. Effect of rough surfaces upon gingival tissue. *J Dent Res*. 1956;35(2): 323-325.

Willershausen B, Köttgen C, Ernst C. The influence of restorative materials on marginal gingiva. *European journal of medical research*. 2001;6(10): 433-439.

Wilson AD. A new translucent cement for dentistry: the glass-ionomer cement. *Br Dent J*. 1972;132: 133-135.

Yang Y, Reichl F-X, Shi J, He X, Hickel R, Högg C. Cytotoxicity and DNA double-strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to eluates of dental composites. *Dental Materials*. 2018;34(2): 201-208.

Yoshimoto T, Fujita T, Kajiyama M, Ouhara K, Matsuda S, Komatsuzawa H, Shiba H, Kurihara H. Aggregatibacter actinomycetemcomitans outer membrane protein 29 (Omp29) induces TGF- $\beta$ -regulated apoptosis signal in human gingival epithelial cells via fibronectin/integrin $\beta$ 1/FAK cascade. *Cellular microbiology*. 2016;18(12): 1723-1738.

Zimmerli B, Strub M, Jeger F, Stadler O, Lussi A. Composite materials: composition, properties and clinical applications. A literature review. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin= Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie= Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia*. 2010;120(11): 972-986.

Zucchelli G, Testori T, De Sanctis M. Clinical and anatomical factors limiting treatment outcomes of gingival recession: a new method to predetermine the line of root coverage. *J Periodontol*. 2006;77(4): 714-721.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	Gamze	<b>Soyadı</b>	KAVUNCU
<b>Doğum Yeri</b>	Bakırköy – İSTANBUL	<b>Doğum Tarihi</b>	24.10.1990
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>Tel</b>	05344872276
<b>E-mail</b>	gamzekavuncu1990@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji	-
<b>Lisans</b>	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2013
<b>Lise</b>	Sakıp Sabancı Anadolu Lisesi	2008

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Araştırma Görevlisi Dt.	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2016-
Diş Tabibi	Naturadent Diş Polikliniği Gaziosmanpaşa	2014-2015
Diş Tabibi	Dentistanbul Diş Polikliniği Levent	2013-2014

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

Yabancı Dil Sınav Notu #							
YÖKDİL	ÜDS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
82,5							

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok iyi
SPSS İstatistik Programı	İyi
Endnote Referans Programı	Çok iyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.



## ÖZET BİLDİRİLER

### ULUSLARARASI

1. ÖMER BİRKAN AĞRALI, BERKANT SEZER, **GAMZE KAVUNCU**, LEYLA KURU, ALİ MENTEŞ, Multidisciplinary Treatment Approach of Dens Invaginatus with Endo-Perio Lesion, TDA 23<sup>nd</sup> International Dental Congress, 21- 24 September 2017, Istanbul, Turkey.
2. ÖMER BİRKAN AĞRALI, **GAMZE KAVUNCU**, LEYLA KURU, Periferal Ossifiye Fibrom Piezo Cerrahi Destekli Tedavisi: Bir Vaka Raporu, Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Sempozyumu, 4-5 Mayıs 2018, İstanbul, Türkiye.
3. **GAMZE KAVUNCU**, SUHEYLA UYAR BOZKURT, KEMAL NACI KOSE, Periodontal Augmentation In The Treatment Of Oral Pyogenic Granuloma 23<sup>rd</sup> BaSS Congress 10-12 May 2018, İasi, Romania.
4. **GAMZE KAVUNCU**, KEMAL NACİ KÖSE, NİKOS KARPİTSARİS, OKAN UYSAL, TUĞÇE ÇETİN, LEYLA KURU, Muldisciplinary Treatment Approach of Cervical Crown Fracture, 9<sup>th</sup> Conference of the European Federation of Periodontology, 20-23 June 2018, Amsterdam, Holland.
5. KEMAL NACİ KÖSE, **GAMZE KAVUNCU**, LEYLA KURU, Piezo-Assisted *Sinus Lifting* and Simultaneous Implant Placement: Case Report, TDA 24<sup>th</sup> International Dental Congress, 27-30 September 2018, Ankara, Turkey.