



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**FARKLI MATERYALLERDEN ÜRETİLEN İMPLANT DAYANAKLARININ
FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Dt. Elif AYGÜN ÇİMENTEPE

Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**FARKLI MATERYALLERDEN ÜRETİLEN İMPLANT DAYANAKLARININ
FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dt. Elif AYGÜN ÇİMENTEPE

Danışman
Prof.Dr. Ebru KARABECE ÇAL

Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı
Doktora Programı

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Ebru KARABECE ÇAL

(Danışman)

Üye :Prof.Dr. T. Övül KÜMBÜLOĞLU

Üye :Prof.Dr. Mine DÜNDAR ÇÖMLEKOĞLU

Üye : Prof.Dr. Pelin GÜNERİ

Üye : Doç.Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Pınar MAVİGÖZLÜ

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Dişlerin tek, grup ya da tümüyle kaybedilmesi kişilerde estetik, fonasyon ve fonksiyon eksiklikleri ile sosyal ilişkilerinde de kayıplara ve ruhsal sıkıntılara neden olabilmektedir. Bu nedenle protetik tedavi uygulamaları fonksiyon ve fonasyonu sağlarken estetik olarak bir kusurun ortadan kalkması ile sosyal ve ruhsal sorunların çözümüne de hizmet etmektedir. Özellikle dental implant tedavilerindeki gelişmelerle birlikte diş kayıplarının oluşturacağı hasarlar minimuma indirilerek doku bütünlüğünün devamı sağlanır. Bu tedavilerde kullanılan malzemelerin çevre yumuşak ve sert dokularla uyumlu olması başarılı bir tedavi için ana kriterlerdendir.

Çalışmamızda implant destekli protetik restorasyonlarda dayanak materyali olarak kullanılan geçici ve daimi dayanak materyallerinin diş eti fibroblast hücreleri için sitotoksik olup olmadıklarını *in vitro* şartlarda fare fibroblast hücreleri üzerinde çeşitli sitotoksikite ve hücre canlılık testleri yaparak araştırdık. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle implant üstü protetik uygulamalarda dayanak materyali seçimi için yönlendirici olacağı inancındayız.

Bu doktora tez çalışması TDK-2021- 21669 kodlu proje ile Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

İzmir, 13.10.2022

Dt. Elif AYGÜN
ÇİMENTEPE

Özet

Farklı Materyallerden Üretilen İmplant Dayanaklarının Fibroblast Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Diş eksikliği durumlarında implant tedavisi yaygın olarak kullanılmaktadır. İmplant, cerrahi işlem ile alt veya üst çene kemiklerinde dişsiz alana uygulanır. Bu durumda implant materyali operasyon alanında yumuşak doku ve kemik ile temas etmektedir. İmplantın yerleştirilmesiyle birlikte implant dayanağının da operasyonu takiben hemen uygulandığı tedavi protokolleri bulunmaktadır. Bu protokol uygulandığında implant dayanak materyali de operasyon alanındaki yumuşak doku yara yüzeyi ile doğrudan temas etmektedir. Bu nedenle biyouyumlu bir materyal kullanımı esas olmalıdır. Başarılı bir implant tedavisi için implant-implant dayanağı-doku ara yüzünde biyouyumluluk çok önemlidir. Biyouyumluluk, bir materyalin uygulandığı bölgede uygun biyolojik cevabı oluşturabilmesidir. Teknolojik gelişmelerle birlikte farklı yapıda ve farklı yüzey özelliklerine sahip birçok implant dayanak materyali diş hekimliği uygulamalarında yerini almıştır. Diş eksikliklerinde uygulanmakta olan implant tedavilerinde implant dayanak materyalinin seçiminde, implant dayanağını çevreleyen biyolojik ortamla uyumlu bir etkileşim sergileyecek materyalin seçilmesi esas alınmalıdır. Bu çalışmada; CAD-CAM prensibi ile kullanılan lityumdisilikat ile güçlendirilmiş cam seramik (LiSiO₂), polietereeterketon (PEEK), polimetilmetakrilat (PMMA), titanyum alaşım (Ti-6Al-4V) ve zirkonya (ZrO₂) dayanak materyalleri kullanılmıştır. Dayanak materyallerinden hazırlanan örneklerle in vitro şartlarda fare fibroblast hücre hattı L929 kullanılmıştır. 24 saat ve 48 saat bekleme süreleriyle 1., 3. ve 7. gün alınan ortamlarla sitotoksisite analizi, apoptosis analizi, interlökin 6 (IL6), dönüştürücü büyüme faktörü- β (transforming growth factor- β / TGF- β) analizi ve reaktif oksijen türevleri (ROS) analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre kullanılan dayanak materyal gruplarında materyal ve gün açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. Sitotoksisite analiz sonuçlarında lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak materyali sonuçları tüm gün ve saat değerlendirmelerinde kontrol grubu değerleri ile istatistiksel olarak fark göstermemektedir. Daimi dayanak materyali olarak kullanımı güvenlidir. PEEK dayanak materyali sitotoksisite analiz sonuçları, sahip olduğu güven aralığının 3. gün 24 saat değeri dışında kontrol grubu değerlerini kapsamadığını göstermektedir.

PMMA' ın laboratuvar ya da klinik ortamda hazırlanması durumunda polimerizasyon sırasında açığa çıkan artık monomer canlı hücreler için sitotoksiktir. Dayanak materyalleri CAD-CAM prensibiyle fabrikasyon olarak üretilir. PMMA' nın fabrikasyon üretimi ve preslenmesi artık monomer oluşumunu ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle PMMA dayanak materyalinin, uzun dönem geçici materyal olarak kullanımı uygundur. Titanyum alaşım ve zirkonya dayanak materyalleri analiz sonuçlarına göre güvenli kabul edilmişlerdir.

Çalışmada kullanılan dayanak materyallerinin hiçbirisi fibroblast hücreleri için sitotoksik olarak değerlendirilmemekte; IL6, TGF- β salınımı, ROS aktivitesi ve apoptoz testlerinde kontrol grubu ile benzer değerler göstermektedir. Bu nedenle klinik pratiğinde güvenle kullanılabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler; dental implant; dayanak; sitotoksosite; dişeti fibroblastı; hücre canlılığı; apoptoz

Abstract

Investigation of Cytotoxic Effects of Implant Abutments Manufactured From Different Materials on Fibroblast Cells

Implant treatment is widely used in cases of missing teeth in dentistry. The implant is surgically applied to the edentulous areas of the lower or upper jaw bones. Thus the implant material comes into contact with the soft and hard tissue in the operation area. There are treatment protocols in which the implant abutment is applied immediately after the operation, along with the placement of the implant. When this protocol is applied, the implant abutment material is in direct contact with the soft tissue wound surface in the operation area. Therefore, the use of a biocompatible material should be essential. Biocompatibility at the implant- implant abutment – soft tissue interface is very important for a successful implant treatment. Biocompatibility is the ability of a material to produce an appropriate biological response in the area where it is applied. With the technological developments, many implant abutment materials with different structures and different surface properties have taken place in dentistry. The selection of the implant abutment material should be based on the selection of the material that will interact in harmony with the biological environment surrounding the implant abutment.

In this study; Lithium disilicate reinforced glass ceramic (LiSiO_2), polyetheretherketone (PEEK), polymethylmethacrylate (PMMA), titanium alloy (Ti-6Al-4V) and zirconia (ZrO_2) abutment materials used with the CAD-CAM principle were used. Mouse fibroblast cell line L929 was used in vitro with samples prepared from the substrate materials. Cytotoxicity analysis, apoptosis analysis, interleukin 6 (IL6) and transforming growth factor- β (TGF- β) analysis and reactive oxygen species (ROS) analysis with media taken on the 1st, 3rd and 7th days with 24 hours and 48 hours incubation times were performed. Obtained results were evaluated statistically. According to the results of the analysis, no significant difference was found in the abutment material groups in terms of material and day. In the cytotoxicity analysis results, the glass ceramic reinforced with lithium disilicate abutment material contains the values of the control group within the confidence interval in all day and hour evaluations. It is safe to use as a permanent abutment material. PEEK abutment material cytotoxicity analysis results show that its confidence interval does not include the control group values, except for the 3rd day 24 hour value. When PMMA is

V

prepared in a laboratory or clinical setting, the residual monomer released during polymerization is cytotoxic to living cells. The production of abutment materials with the CAD-CAM principle requires that they be produced in the factory. Fabrication and pressing of PMMA eliminates residual monomer formation. Therefore, PMMA abutment material is suitable for use as a long-term temporary material. Titanium and zirconia abutment materials were considered safe according to the analysis results. None of the abutment materials can be evaluated as cytotoxic to fibroblast cells; shows similar apoptotic-necrotic values with the control group; IL6 is considered safe in terms of TGF- β release and ROS activity.

Keywords; Dental implants; abutment; cytotoxicity; gingival fibroblasts; cell viability; apoptosis

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Grafikler Dizini	XII
Kısaltma Listesi	XIII
1.Giriş	1
2.Genel Bilgiler	3
2.1. İmplant sisteminin bölümleri.....	3
2.1.1. Gövde.....	3
2.1.2. Dayanak	3
2.1.2.1. Geçici Dayanaklar	4
2.1.2.2. Kalıcı Dayanaklar	4
2.2. Güncel Dayanak Materyalleri.....	5
2.2.1. Lityum Disilikat ile Güçlendirilmiş Cam Seramik	5
2.2.2. Polietereeterketon (PEEK).....	8
2.2.3. Polimetilmetakrilat (PMMA).....	8
2.2.4. Titanyum (Ti-6Al-4V).....	10
2.2.5. Zirkonya (ZrO ₂)	12
2.3. İmplant Çevresi Yumuşak Doku	13
2.3.1. Diş Çevresi Yumuşak Doku Biyolojisi.....	14
2.3.2. İmplant Çevresi Yumuşak Doku Biyolojisi	15
2.4. Yara İyileşmesi	17
2.5. Biyouyumluluk	19
2.6. Biyouyumluluk Testleri	20
2.6.1. Klinik Deneyler.....	20
2.6.2. Hayvan Deneyleri.....	20
2.6.3. <i>In Vitro</i> Deneyler	21
2.6.4. Sitotoksikite Testleri.....	21
2.6.5. Apoptoz (Annexin V- FITC) Testi.....	22

2.6.6. İnterlökin 6 (IL6) ve Transforming Growth Faktör (TGF-β) Analizi.....	23
2.6.7. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	24
3. Gereç ve Yöntem	25
3.1. Hücre Kültürü	27
3.2. Hücrelerin Üretilmesi ve Kültür Koşulları.....	27
3.3. Hücre Canlılığının Takibi.....	30
3.4. Hücre Hattının Pasajlanması.....	32
3.5. Hücre Hatlarının Dondurularak Saklanması.....	32
3.6. Dondurulan Hücre Hattının Çözünmesi.....	33
3.7. Örneklerin Hazırlanması.....	33
3.8. Sitotoksikite Testi.....	39
3.9. Apoptoz (Annexin V- FITC) Testi.....	42
3.10. İnterlökin 6 (IL6) ve Transforming Growth Faktör (TGF-β) Analizi.....	44
3.11. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	45
3.12. İstatistiksel Analiz	45
4. Bulgular.....	47
4.1. XTT Test Bulguları.....	47
4.2. Apoptoz Test Bulguları.....	54
4.3. IL6 ve TGF- β Test Bulguları	64
4.4. ROS Test Bulguları.....	69
Tartışma	72
Sonuç ve Öneriler	89
Kaynaklar	90
Teşekkür.....	102
Özgeçmiş	104

Tablolar Dizini

Tablo 1 Saf titanyum ve titanyum alaşım kimyasal kompozisyonları

Tablo 2 Diş ve implant destek doku karşılaştırma

Tablo 3 Biyouyumluluk tanımına göre dental materyallerin sınıflandırılması

Tablo 4 çalışmada kullanılan materyaller

Tablo 5 Sitotoksisite deney planı

Tablo 6 Apoptoz deney planı

Tablo 7 XTT materyal ve kontrol absorbans değerleri

Tablo 8 IL6 analizi zet istatistik tablosu

Tablo 9 TGF- β analizi zet istatistik tablosu

Tablo 10 ROS analizi zet istatistik tablosu

Şekiller Dizini

Şekil 1 Geçici ve kalıcı dayanaklar

Şekil 2 Dental seramikler ve seramik benzeri materyallerin sınıflandırması

Şekil 3 Zirkonyanın ısı değişimine bağlı kristalografik faz değişimi

Şekil 4 Abutment çevresinde kollagen fibriller ve etrafında bulunan fibroblastlar

Şekil 5 Tetrazolyum tuzunun formazona dönüşümü

Şekil 6 Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik (e.max CAD)

Şekil 7 Polietereterketon (PEEK) çubuk

Şekil 8 Polimetilmetakrilat Blok (PMMA) (Telio CAD)

Şekil 9 Titanyum çubuk (GradeV)

Şekil 10 Zirkonya Blok (e.max ZirCAD)

Şekil 11 Hücrelerin çoğaltılması aşamasında kullanılan Fetal Bovine Serum (FBS)

Şekil 12 Hücrelerin çoğaltılması aşamasında kullanılan MEM- Eagle Solusyonu

Şekil 13 Hücre ekilen 75'lik Hücre kültür kabı Buharlı Sterilizatör

Şekil 14 İnkübasyon için kullanılan 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatör

Şekil 15 Hücrelerin tutundukları kültür kabı yüzeyinden ayrılmaları için kullanılan Tripsin- EDTA Solusyonu

Şekil 16 L929 fare fibroblast hücrelerinin 40X büyütmede incelendiği ışık mikroskobu

Şekil 17 Işık mikroskonu 40X büyütmede 75'lik hücre kabındaki L929 fare fibroblast hücrelerinin görüntüsü

Şekil 18 Neubauer Hemositometresi

Şekil 19 Örneklerin hazırlanması

Şekil 20 Hazırlanan örnekler

Şekil 21 Buharlı Sterilizatör

Şekil 22 Hücre pasajlaması, yıkanması, üretilmesi için kullanılan laminar flow kabin

Şekil 23 Ortamların pipet ile toplanması

Şekil 24 Ortamların süzülmesi için kullanılan 0,22 µm Filtre

Şekil 25 96 kuyucuklu plaka (well plate)

Şekil 26 Örneklerin 96'lık plakaya alınması

Şekil 27 ELISA Okuyucu

Grafikler Dizini

Grafik 1 Ortalama XTT -gün/saat grafiği

Grafik 2 1. Gün 24 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 3 3. Gün 24 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 4 7. Gün 24 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 5 1. Gün 48 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 6 3. Gün 48 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 7 7. Gün 48 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 8 Annexin/PI ile boyanarak apoptotik etkinin ölçüldüğü ELISA test sonuçlarının akış sitometri cihazı ile analizi

Grafik 9 Kontrol grubu Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri

Grafik 10 Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri

Grafik 11 PEEK dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri

Grafik 12 PMMA dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri

Grafik 13 Titanyum dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri

Grafik 14 Zirkonya dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri

Grafik 15 Dayanak materyalleri apoptoz test 1. gün sonuçları grafiği

Grafik 16 Dayanak materyalleri apoptoz test 3. gün sonuçları grafiği

Grafik 17 Dayanak materyalleri apoptoz test 7. gün sonuçları grafiği

Grafik 18 IL6 analiz grafiği

Grafik 19 TGF- β analiz grafiği

Grafik 20 ROS analiz grafiği

Kısaltma Listesi

CAD- CAM	: Computer Aided Design- Computer Aided Manufacturing (Bilgisayar destekli tasarım- bilgisayar destekli üretim)
PEEK	: Polieter eter keton
PMMA	: Polimetilmetakrilat
IL6	: İnterlökin 6
IL8	: İnterlökin 8
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü alfa
TGF- β	: Transforming growth faktör beta
PDGF	: Platelet- derived growth faktör
XTT	: 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H- tetrazolyum-5- karboksanilid
PI	: Propidyum iyodür
ROS	: Reaktif oksijen türleri
FBS	: Fetal bovine serum
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

1.Giriş

Modern diş hekimliği uygulamalarının amacı, kısmi ya da total diş kaybına uğramış bireylerde çiğneme fonksiyonu, konuşma ve estetik görünümün öngörülebilir şekilde yeniden oluşturulmasının sağlanmasıdır. İmplant uygulamaları hastaya, yumuşak ve sert dokularda kayıp olmaksızın çiğneme sisteminde herhangi bir rahatsızlığa sebep olmadan estetik, fonksiyon, konuşma hedeflerine ulaşabilmeyi sağlamaktadır.

Hareketli protezler ile çiğneme fonksiyonu, doğal dişlere göre sadece altıda bir oranında sağlanır. Fakat bu fonksiyon, implant destekli protezlerde normal fonksiyon sınırlarına yakın gerçekleşebilmektedir. Tam dişsiz bireylerde devam eden kemik kaybı yüz estetiğinde geri dönüşümü mümkün olmayan değişimlere yol açarken, implantın varlığına bağlı olarak kemiğin uyarılmasıyla kemiğin devamlılığı, implant destekli protezlerle de kas fonksiyonu sağlanmakta; böylece estetik olarak büyük değişimlere yol açan kayıplar oluşmamaktadır (Misch 2008). İmplant tedavisinin başarısında uygulanan implantın ve dayanak materyalinin çevresindeki sert ve yumuşak dokularla uyumlu olması önemlidir. Geçici ya da kalıcı protezleri yapmak üzere dayanak materyali olarak çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. Bu malzemelerin biyouyumluluğu ve çevre yumuşak dokuda oluşturduğu biyolojik cevap incelenerek yumuşak doku için hangi dayanak materyalinin daha uyumlu olduğu günümüz diş hekimliğinin cevap aradığı sorular arasındadır. Canlı doku ile temasta olan bu maddelerin biyouyumlu olması, sitotoksik etkisi olmaması gerekir. Araştırmamızın (H₀) Hipotezi kullanılan materyallerin gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkili olmadığı, bu materyallerin biyouyumlu olduğudur.

Estetik beklentilerin artmasıyla birlikte özellikle ön bölge protetik uygulamalarda doğal, doku uyumlu, fonksiyonel materyal arayışı da artmıştır. Özellikle implant destekli protetik restorasyonlarda daha estetik sonuçlar elde etmek için titanyum alaşıma alternatif madde arayışları sonucu zirkonya, cam seramik gibi malzemelerin dayanak materyali olarak kullanımı söz konusudur. Ayrıca artan sosyal yaşam ve estetik gereksinimler gereği hastaların implant operasyonunu takiben geçici protetik restorasyon talebinin artışı, geçici dayanak materyali uygulamalarını da gündeme getirmiş; buna paralel olarak polimetilmetakrilat (PMMA), polietetereterketon (PEEK) türevi materyallerin kullanımı gündeme gelmiştir. Özellikle cerrahi uygulamanın

hemen ardından kullanılacak dayanak materyalinin çevre yumuşak ve sert dokular için biyoyumlu olması gerekliliği bu nedenle önemlidir. Bu gelişmeler ışığında kullanılacak geçici ve daimi dayanak materyallerinin çevre doku hücreleri için sitotoksik etkilerinin varlığının ölçülmesi günümüz diş hekimliği konuları arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Gelişen teknolojinin diş hekimliği alanında kullanılmasıyla CAD- CAM destekli uygulamaların geliştirilmesi dental sektörde CAD- CAM sistemleri için materyal gelişimine sebep olmuştur. Böylece dental laboratuvarlarda üretilip kullanıma sunulan materyallerin fabrikasyon üretimi de mümkün hale gelmiştir. Bu durumun en önemli avantajlarından biri özellikle PMMA materyali için artık monomer oluşumunun önüne geçilmiş olmasıdır. Konvansiyonel sistemle elde edilen PMMA, ağız içi dokular yönünden artık monomer salınımı sebebiyle sitotoksik etkilidir. CAD- CAM sisteme uygun dayanak materyali için blok/ disk üretiminde tüm polimerizasyon basamakları üretici firma talimatlarına uygun basınç ve sıcaklık altında kontrollü şartlarda fabrika ortamında gerçekleştirilmektedir. Böylece polimerizasyon sonucu elde edilen ürün içerisinde polimerize olmadan kalan monomer bulunmamaktadır. Bu durum sebebiyle CAD- CAM PMMA blok / disk materyallerin sitotoksik olmadığı; geçici dayanak materyali olarak güvenle kullanımlarının mümkün olacağı düşünülmektedir.

Literatürde implant dayanağı olarak kullanılan geçici ve daimi dayanak materyallerinin gingival fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin karşılaştırmalı varlığını araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Bu projenin özgün değeri, bu alanda karşılaştırmalı bir araştırma sunmasıdır. Planlanan bu projeyle birlikte test edilecek implant dayanak materyallerinin sitotoksiteleri belirlenerek bundan sonra uygulanacak olan tedavilerde biyoyumluluğu en yüksek olan materyal diş hekimlerince tercih edilebilecektir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre tedavi materyalleri arasında daha kısa zamanda seçim yapılabilmesi, kullanılacak iş gücünün ve yapılacak masrafların minimuma indirilmesi, böylece ülke ekonomisine katkıda bulunulması mümkün olacaktır.

2.Genel Bilgiler

İmplant sözcüğü, biyolojik olarak uyumlu, alloplastik materyalden oluşan, fonksiyon, fonasyon ve estetik açıdan uygun protetik restorasyonun yapımına olanak sağlamak amacıyla kemik içerisine yerleştirilen araç olarak tanımlanmıştır (Misch 2015). Burada konu edilen implantlar, endosteal implantlardır. “endo” ön eki içine, “osteal” ise kemik anlamındadır- “kemik içine”. İmplant gövdesinin konik, pin, plak, silindir şeklinde üretildiği, protetik dayanak bağlantısının vidalı, soğuk kilitlenme ya da iki sistemin birlikte uygulanmasıyla sağlandığı, yüzey özelliklerinin değiştiği birçok implant sistemi bulunmaktadır.

Kök şeklindeki implantlar endosteal implantlar grubuna girer. Doğal diş dokusunun benzeri olarak kök formundadırlar. Kök formu implant sistemleri genellikle birbirinden ayrı iki bölüm olan gövde ve dayanaktan oluşur. İlk aşamada kemik içine implant gövdesi yerleştirilir; iyileşmenin ardından dayanak uygulanarak protetik aşamaya geçilir (Misch 2015).

2.1. İmplant sisteminin bölümleri

Dental implant sistemleri iki bölümden oluşur:

2.1.1. Gövde

Kemik içine cerrahi işlem ile yerleştirilen, protetik bileşenler için destek görevi gören kısımdır. İmplant gövdesi üç bölüm içerir. Bunlar servikal geometrinin bulunduğu bölüm, gövde bölümü ve kök bölümüdür. Her bölüm cerrahi işlem ve protez uygulaması için yarar sağlayacak özelliklere sahiptir.

2.1.2. Dayanak

İmplantın proteze ya da üst yapıya desteklik ve tutuculuk sağlayan kısmıdır. Üst yapı, implant destekli ya da implant tutuculu hareketli protezler için retansiyon sağlayan metal bir alt yapı (döküm ya da CAD-CAM bar destekli hareketli protezler) olabileceği gibi sabit protezler için kullanılacak metal bir alt yapı da olabilir. Dayanaklar, kullanım amacı, üretim şekli, protetik restorasyonun tipi ve implant- dayanak bağlantı tipine göre gruplara ayrılırlar.

İmplant dayanakları kullanım amacına göre iki ana başlık altında toplanır (Prosthodontics n.d.; ŞEN ve ÖLÇER US 2019)

2.1.2.1. Geçici Dayanaklar

Geçici restorasyonların yapılmasına olanak sağlayan, titanyum ya da plastik esaslı malzemelerden üretilen, implant çevresi yumuşak doku şekillenmesine olanak sağlayan parçalardır.

2.1.2.2. Kalıcı Dayanaklar

Yapılacak protetik restorasyon ile implant gövdesi arasında bağlantıyı sağlayan parçalardır.



Şekil 1 Geçici ve kalıcı dayanaklar

Protetik restorasyonun dayanak ile olan tutuculuk ilişkisine göre üç ana tip dayanak tanımlanmıştır (Misch 2008):

1. Protezin ya da üst yapının vida ile tutuculuğunun sağlandığı vidalı dayanaklar
2. Protezin ya da üst yapının siman ile tutuculuğunun sağlandığı simante dayanaklar
3. Hareketli protezler için tutuculuk sağlayan bağlantı dayanakları (*O-ring, ball, locator vb.*)

Yıllar içerisinde yapılan araştırmalar sonucunda implant sisteminin çene kemiklerine uygulanmasının ardından üzerine dayanak sisteminin yerleştirilip protetik restorasyonun yapılması işlemleri için dört prosedür bildirilmiştir (Morton et al. 2018):

- Hemen yükleme: İmplant ve dayanağın aynı cerrahi işlem sırasında yerleştirilmesi şeklindedir. Karşıt ark ile okluzal ilişki implantın yerleştirilmesini takip eden bir hafta içinde sağlanacak şekilde protetik restorasyon yapılır.
- Hemen restorasyon: İmplant gövdesinin kemiğin içine yerleştirildiği cerrahi işlemi takip eden bir hafta içinde dayanak üzerine protetik restorasyon karşıt ark ile okluzal temasa gelmeden uygulanır.
- Erken yükleme: Kemik içine implant gövdesinin yerleştirilmesini takiben protetik restorasyon bir hafta- iki ay aralığında implant üzerine dayanak ile uygulanır.
- Konvansiyonel yükleme: Dental implant kemik içine yerleştirilmesinin ardından iki ay sonra protetik restorasyon uygulanır.

2.2. Güncel Dayanak Materyalleri

2.2.1. Lityum Disilikat ile Güçlendirilmiş Cam Seramik

1774 yılında Alexis Duchateau tarafından seramik tam protez üretilmesinin ardından günümüze kadar birçok dental seramik bileşimi geliştirilmiştir. Seramik bileşimleri 1962 yılında metal- seramik restorasyonlar için tanıtılmışlar; 1965 yılında ilk kaplama seramiği ve alüminöz seramik kullanılmıştır (Denry 1996). Gelişen teknoloji ile birlikte diş hekimliğinde kullanılan malzemeler de çeşitlenmiştir. Özellikle hastaların estetik beklentilerindeki artış malzeme arayışına neden olmuştur. Bu amaçla diş rengine yakın materyallerin kullanımı son yıllarda artmıştır.

Lityum disilikat içerikli dental seramikler 1988 yılında IPS Empress 2 adı altında ısı ile preslenmiş çekirdek materyali olarak tanıtılmıştır. Empress 2, %70 kristal halde lityum disilikat dolgu maddesi içerir. 2005 yılında yenilenen formül ile IPS e.max Press üretilmiştir. Dijital diş hekimliğinin gelişimi ile bilgisayar destekli tasarım ve üretimdeki gelişmelerle IPS e.max CAD 2006 yılında kullanıma sunulmuştur. Bloklar frezlemenin daha kolay ve frez aşınmasının daha az olduğu lityum metasilikat formda, “mavi faz”da piyasaya sunulmuştur. Tek basamakta ısıl işlem uygulanarak kürlenmesi ve glazürün ardından lityum disilikat olan son halini almaktadır (Willard and Gabriel Chu 2018).

Günümüzde geliştirilmiş dental seramikler hem yüksek dayanıklılık gösterdikleri için alt yapı materyali olarak hem de yüksek estetik özellikleri sebebiyle üst yapı materyali olarak kullanılır.

En son geliştirilen seramik sınıflandırmasında dental seramikler, diş hekimleri ve diş teknisyenleri arasındaki iletişimin kolaylaşması ve eğitim alanında aynı dilin kullanılması amacıyla üç sınıfta toplanmıştır (Gracis et al. 2016).

I.Cam matriks seramikler: Cam faz içeren, metal olmayan inorganik seramiklerdir. Üç alt gruba ayrılır.

a. Feldspatik seramikler: Kaolin (aluminosilikat), silika (quartz) ve feldspattan (potasyum ve sodyum aluminosilikat karışımı) oluşurlar. Platin folyo, presleme, refraktör day yöntemi ve CAD-CAM teknolojisi ile üretilmektedir. Feldspatik seramikler özellikle yüksek estetik beklentinin olduğu lamina, inlay, onlay yapımında ya da metal alaşım, zirkonyum gibi malzemelerden yapılan alt yapı üzerine tabakalama materyali olarak kullanılmaktadır. (IPS Empress Esthetic, IPS Empress CAD (Ivoclar Vivadent), Vita Blocks (Vita Zahnfabrik))

b. Sentetik Seramikler: Silisyumdioksit, potasyum oksit, sodyum oksit ve alüminyum oksit içerirler. Mekanik özellikleri geliştirilmiştir. Üç alt gruba ayrılırlar.

b.1. Lössit ile güçlendirilmiş seramikler (IPS d. SIGN (Ivoclar Vivadent), Vita VM 7, VM 9, VM 13 (Vita Zahnfabrik))

b.2. Lityumdisilikat ile güçlendirilmiş seramikler (IPS e.max CAD, IPS e.max Press (Ivoclar Vivadent))

b.3. Florapatit ile güçlendirilmiş seramikler (IPS e.max Ceram (Ivoclar Vivaden), Dicor, (Dentsply))

c. Cam İnfiltrat Seramikler: Üç alt gruba ayrılırlar.

c.1. Alumina içeren cam seramikler (In-Ceram Alumina (Vita Zahnfabrik))

c.2. Alumina ve magnezyum içeren cam seramikler (In-Ceram Spinell (Vita Zahnfabrik))

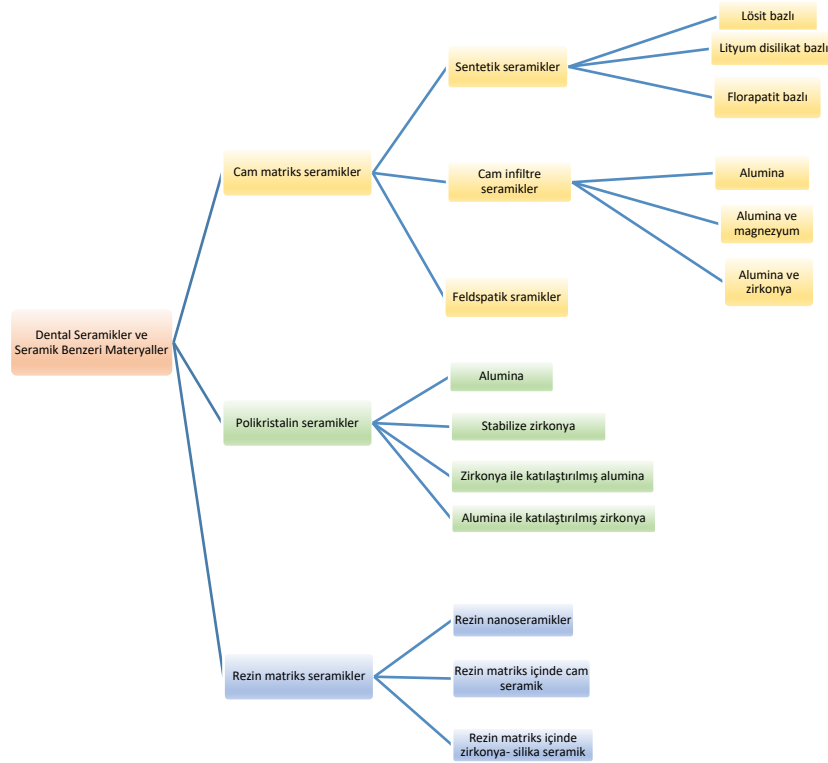
c.3. Alumina ve zirkonya içeren cam seramikler (In-Ceram Zirconia (Vita Zahnfabrik))

II.Polikristalin Seramikler: Kristal yapıları sebebiyle dayanıklılıkları ve kırılma dayanımları yüksek, ışık geçirgenlikleri düşüktür. Yapılarında cam faz olmaması nedeniyle hidroflorik asit ile asitlenebilmeleri için daha uzun süre veya yüksek ısı gerekir. Dört alt gruba ayrılırlar.

- a. Alumina (Procera AllCeram (Nobel Biocare))
- b. Stabilize zirkonya (IPS e.max ZirCAD (Ivoclar Vivadent), Nobel Procera Zirconia (Nobel Biocare), Lava/Lava Plus (3M Espe))
- c. Zirkonya ile güçlendirilmiş alümina ve
- d. Alumina ile güçlendirilmiş zirkonya (NanoZr (Panasonic Electric Works))

III.Rezin matriks seramikler: Bu grupta organik matriks içinde seramik partiküllerin bulunduğu seramikler yer alır. Yapılarındaki inorganik bileşene göre üç alt gruba ayrılırlar.

- a. Rezin nanoseramikler (Lava Ultimate (3M ESPE))
- b. Rezin matriks içinde cam seramik yapı (Enamic (Vita Zahnfabrik))
- c. Rezin matriks içinde zirkonya- silika seramik yapı (MZ100 Blok, Paradigm MZ100 blok (3M ESPE))



Şekil 2 Dental seramikler ve seramik benzeri materyallerin sınıflandırması (Gracis et al. 2016)

Bu sınıflandırma sisteminin bilinmesi materyalin nerede kullanılacağı (ön bölge veya arka bölge), restorasyonun şekli (bölümlü veya tam kaplama), nasıl yapıştırılacağı

(adeziv veya geleneksel) konularında yardımcı olmaktadır. Ayrıca seramikler için pişirme ısısı, kırılma direnci, ışık geçirgenliği, içerikleri, asitlenebilirlikleri, klinik uygulamaları gibi özellikleri ön plana çıkarılarak yapılan sınıflandırmalar da bulunmaktadır. Bunların içinde seramiklerin içerikleri esas alınarak yapılan sınıflandırma, hem hekim hem de teknisyen için materyalin doğru seçimi konusunda önemli rol oynar.

2.2.2. Polietereeterketon (PEEK)

1978 yılında geliştirilen poliakrileterketon grubuna ait yüksek performanslı organik, sentetik bir polimer olan PEEK, kimyasal olarak inert bir biyomateryal olarak dental pazara sunulmuştur (Wang ve ark. 2021). Düşük özgül ağırlığı, düşük bükülme dayanımı, uygun elastikiyet ve sertlik derecesine sahip oluşu özelliklerinin yanı sıra biyouyumlu yapısı nedeniyle öncelikle ortopedi alanında uzun yıllar kullanılmıştır (Jing Wang ve ark. 2021). Oral rehabilitasyonlarda kullanılan polietereeterketon (PEEK) bazlı materyaller, PMMA gibi polimerlere ve kompozit rezinlere alternatif olarak uygulanmaktadır (Heimer, Schmidlin ve Stawarczyk 2017). Dental tedavilerde daimi ya da geçici sabit restorasyon materyali, hareketli protez kaide materyali, endodontik pin materyali, implant dayanak materyali, implant üstü protez alt yapı materyali ve implant gövde materyali olarak kullanılmaktadır (Mishra and Chowdhary 2019; Najeeb et al. 2016). Diş dokusu renginde olması kullanım avantajları arasında yer alır. Düşük renk değişimleri ve iyileştirilmiş mekanik özellikleri ile geleneksel protez materyallerine alternatif oluşturmaktadır. İyi cilalanabilmesi, düşük su emme kabiliyeti, minimum polimerizasyon büzülmesi, düşük artık monomer içeriği ve renk stabilitesi gibi fonksiyonel özellikler avantajları arasındadır (Heimer et al. 2017). En önemli özelliği, elastik modülünün metalik malzemelerinkinden daha düşük ve kemiğe benzer olmasıdır. Böylece çevresindeki kemik üzerindeki stresin azalmasına yardımcı olur. Beyaz rengi ve mekanik özellikleri sayesinde PEEK, özellikle implant destekli sabit ve hareketli protezlerde CAD-CAM alt yapı materyali olarak daha fazla kullanılmaktadır. PEEK'in kemik-implant ara yüzüne iletilen kuvvetleri en aza indirmek için bir stres kırıcı olarak işlev görebileceği gösterilmiştir (Jing Wang et al. 2021).

2.2.3. Polimetilmetakrilat (PMMA)

Akrilik polimerler; diş hekimliğinde hareketli protez kaide materyali, bireysel kaşık materyali, geçici restorasyon uygulamaları ve yapay diş üretimi olmak üzere geniş bir

alandan kullanılırlar. Polimetilmetakrilat (akrilik rezinler) 1936 yılında Walter Wright tarafından tanıtılmıştır. Uygulama ve tamir kolaylığı, kabul edilebilir estetik, ağız ortamında kararlı yapısı, düşük maliyet özellikleri sebebiyle diş hekimliği uygulamalarında tercih edilen bir materyaldir. Toz-likit olarak hazırlanan hamurun sıcak ya da soğuk polimerizasyonu ve CAD-CAM üretim şeklinde kullanılan formları bulunmaktadır. Toz-likit formunda hazırlanan PMMA dezavantajları arasında kırılmaya yatkınlık, artık monomer varlığı, estetik ve hijyenik sorunlara yol açabilen porözite oluşma ihtimali sayılabilir (Al-Dwairi et al. 2019).

Günümüzde polimerlerden üretilen sabit dental protezler, geçici protezler olarak kullanılmaktadır. Toz-likit olarak üretilenlere kıyasla CAD-CAM teknolojisiyle hazırlananlarda artık monomer oluşmamaktadır. Kontrollü ve standardize edilmiş üretim basamağının olması, yüksek ısıda ve basınç altında polimerize edilmeleri mekanik özelliklerinin daha iyi olması ile sonuçlanır. Renk stabilitesi ve kenar uyumunun daha iyi oluşu uzun dönem geçici protez yapımında tercih edilme nedenleri arasındadır (Pitta et al. 2020). Geçici protetik restorasyon kullanımı kısa ve orta vade için birkaç haftadan altı aya kadar değişen süreleri kapsar. Sabit protetik restorasyonlar için bu süre 1- 2 hafta kadarken; iki aşamalı cerrahi tedavi yaklaşımıyla uygulanan implant diş hekimliğinde 6 aya kadar uzayabilir. Altı aydan daha uzun süre ile geçici protetik restorasyon kullanımı uzun dönem geçici tedavi olarak değerlendirilir. Dikey boyutun yükseltildiği vakalar, palyatif protetik tedavi uygulanan kanser hastaları ve destek dişlere farklı tedavilerin uygulandığı sabit protetik restorasyon vakalarında uzun dönem geçici restorasyonların kullanımı gerekir. Değerli olmayan metal alaşımların rezin kompozit materyaller ile tabakalandırılması ile yapılan geçici sabit restorasyonların uygulanması standart tedavi protokolü olarak kabul edilse de ekonomik değildirler. Bu nedenle uzun dönem geçici restorasyonlarda rezin bazlı materyaller tercih edilmektedir (Huettig et al. 2016).

Geleneksel akrilik malzemeler, toz ve monomer karışımının hamur oluşturmak üzere bir araya getirilerek karıştırılmasıyla oluşurlar. Isı ile polimerize olan malzemeler kullanıldığında reaksiyonun başlaması için ısı enerjisine ihtiyaç duyulur. Kendi kendine polimerize olan malzemeler ise oda sıcaklığında ya da 65 °C nin altında ılık suda polimerize olurlar. İşlemin bu şekilde gerçekleşmesi büzülmeye ve bazen polimerizasyonu takiben malzemenin iç yapısında poröziteye neden olur. CAD-CAM teknolojisi ile akrilik blok ya da disklerin kullanıldığı durumlarda ise polimerizasyon

basamağı üretim aşaması fabrikada gerçekleştirilir. Böylece uygun oranlarda toz ve likidin karıştırılarak hamurun elde edilmesi, düşük sıcaklıkta bekletilmesi (24 saat, -18°C), kalıplanması, ısının kademeli olarak yükseltilmesi ile kontrollü olarak polimerizasyonu gerçekleştirilir. Tüm bu süreçler sonunda yapısında poröz bulunmayan, uzun polimer zincirlerine sahip, artık monomer içermeyen, yüksek sertlikte bir yapı elde edilir.

2.2.4. Titanyum Alaşım(Ti-6Al-4V)

İlk olarak 1950’li yıllarda havacılık alanında kullanılmaya başlanmış, sonraki yıllarda medikal alanda da yer edinmiştir. Titanyum ve alaşımları cerrahi alanında organ implantları, diş hekimliğinde dental implant, dayanak, ortodontik tel üretiminde kullanılmaktadır. Doğada reaktif halde bulunur; saf olarak elde edilmesi mümkün değildir. Genellikle birçok elementle alaşım halindedir. İçeriğindeki oksijen miktarına bağlı olarak saf titanyum dört sınıfa ayrılır. Bunlar Tip 1, 2, 3 ve 4’tür. Tip 1 titanyum %0,18 oranında oksijen içerirken; Tip 4 titanyum %0,4 oksijen içeriğine sahiptir. İçeriklerindeki oksijen miktarı ile direnç yeteneği, esneklik ve dayanıklılık özellikleri değişmektedir.

Amerikan Test ve Malzemeler Derneği (ASTM)’ne ait sınıflandırmada ise titanyum içeriğindeki oksijen ve demir miktarına göre beş farklı sınıfa ayrılır. Bunlar Tip 1, 2, 3, 4 ve 5’tir. Tip 5 titanyum, %6 alüminyum ve %4 vanadyum eklenerek elde edilen Ti-6Al-4V alaşımıdır. Saf titanyuma azot, karbon, hidrojen ve demir gibi elementlerin eklenmesi ile mekanik ve fizikokimyasal özelliklerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Demirin eklenmesi korozyona direnç sağlar; alüminyumun eklenmesi dayanıklılığı artırır, yoğunluğunu azaltır; vanadyumun eklenmesi ile alüminyum kalıntılarını ortadan kaldırılır (Liu et al. 2017; Mercan 2016; Zhang and Chen 2019).

Element	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	Ti-6V-4Al
Azot	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05
Karbon	0,1	0,1	0,1	0,1	0,08
Hidrojen	0,015	0,015	0,015	0,015	0,0125
Demir	0,2	0,3	0,3	0,5	0,25
Oksijen	0,18	0,25	0,35	0,40	0,13

Tablo 1 Saf titanyum ve titanyum alaşımlarının kimyasal kompozisyonları (Raton et al. 2000)

Titanyum sıcaklığa bağlı olarak değişen iki fazı olan dimorfik (iki şekilli) bir metaldir. Bunlar α ve β fazlarıdır. α -Ti, güçlü, iyi kaynak yapılabilme özelliğine sahip; fakat çalışması ve işlenmesi zor bir yapıdadır. β -Ti, su ile tavlansak ya da hava soğutması ile soğutulmasından sonra oda sıcaklığında gözlenebilen yapıdır. Bu haliyle soğuk işlenebilirlik, düşük duktilite, solüsyona bırakılabilme ve dayanıklılık için yaşlandırılabilme özelliklerine sahip hale gelir. Alüminyum α stabilizatörü, vanadyum β stabilizatörü olarak titanyuma eklendiğinde oda sıcaklığında dönüşüm baskılanır; bu katkılarla hem α hem de β fazında bulunabilen, daha dirençli alaşım elde edilmiş olur. Düşük sıcaklıkta yüksek mekanik özelliklere sahip olması sebebiyle günümüzde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Uzun and Bayındır 2010; Zhang and Chen 2019). Düşük sıcaklıklarda α fazında bulunur; 885°C'nin üzerinde faz değiştirerek body-centered cubic (BCC) yapısına (β fazına) geçer. Yüksek sıcaklıkta gerçekleşen bu geçiş titanyumun dört faz oluşumuna neden olur. Bunlar; α , α' 'ya yakın, α/β ve β fazlarıdır. α fazı daha yumuşak ve esnek bir form iken β fazı daha sert ve güçlü bir formdur. İmplant dış hekimliğinde güvenle kullanılan titanyum alaşımları bunlardan α fazında bulunan saf titanyum (CpTi) ve α/β fazındaki Ti-6Al-4V'dur.

Biyolojik olarak uyumlu olmasının en önemli nedenlerinden biri yüzeyinde kendiliğinden kararlı bir titanyum dioksit (TiO₂) tabakasının oluşmasıdır. Bu tabaka bozulsa bile hızlıca tekrar meydana gelir. Oluşan oksit tabakası, materyali korozyona karşı dayanıklı hale getirir. Korozyona karşı dayanıklılık özelliği beraberinde biyouyumluluğu getirmektedir (Uzun and Bayındır 2010; Zhang and Chen 2019).

Kemiğe yakın elastiklik modülünün olması, korozyona karşı yüksek direnç göstermesi, üst düzeyde biyouyumluluğa sahip olması, vücut ortamında herhangi bir

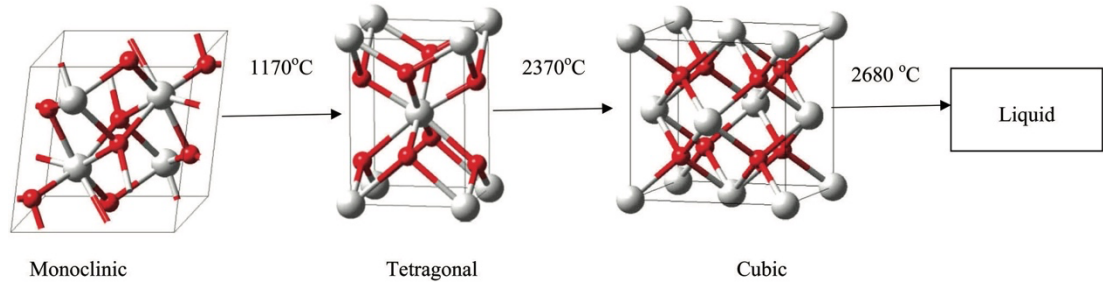
reaksiyona girmeden stabil kalması gibi üstün özellikleri sebebiyle tercih edilen materyallerdendir (Liu et al. 2017; Zhang and Chen 2019).

2.2.5. Zirkonya (ZrO_2)

Diş hekimliğinde özellikle ön bölge restorasyonları için estetik beklentinin yüksek olması materyal gelişiminin önemini artırmıştır. Estetik malzemeler arasında zirkonya biyouyumluluk, optik ve mekanik özelliklerinin yüksek oluşu nedeniyle önde gelen materyaller arasındadır. Gri- beyaz renkte, güçlü bir geçiş metalidir. Zirkonya, zirkonyumun oksit formudur. Öncelikle ortopedik cerrahi alanda kalça, parmak, akustik implant olarak kullanılmıştır. Diş hekimliğinde kullanımı endodonti alanında post uygulaması, kron/ köprü restorasyonları, ortodontik braket yapımı ve implant materyali şeklindedir (Gomes and Montero 2011).

Zirkonya moleküler olarak üç formu olan bir polimorftur. Bunlar monoklinik (M), kübik (C) ve tetragonal (T) fazlardır. Saf zirkonya oda ısısında monoklinik fazda bulunur. 1170°C ye kadar karardır. 1170- 2370 °C arasında tetragonal fazda, 2370°C üzerinde kübik fazda bulunur. (Şekil 2) Uygulanan ısı işlemler sonrası soğuma sırasında 100- 1170 °C arasında tetragonal fazdan monoklinik faza geçiş gözlenir. Bu geçiş sırasında %3-4 oranında hacim artışı olur. Kübik fazdan tetragonal faza geçiş sırasında izlenen hacim artışı ise %2-3 oranındadır. Faz dönüşümleri materyalin yapısında büyük strese neden olarak çatlak oluşumuna neden olur. Oluşan çatlaklar oda sıcaklığında zirkonyada kırıklara yol açar. Bu nedenle faz dönüşümlerinin önüne geçmek amacıyla zirkonya yapısına kalsiyum oksit (CaO), magnezyum oksit (MgO), yttriumoksit (Y_2O_3) gibi oksitler katılarak alaşımlar elde edilir. Böylece zirkonyanın oda sıcaklığında tetragonal fazda kararlı halde kalması sağlanır. Bu alaşımlar şeklinde oluşan zirkonya, “kısmi kararlı zirkonya” (partially stabilized zirconia- PSZ) olarak tanımlanır. Zirkonyanın içine %2-3 oranında Y_2O_3 eklenmesiyle diş hekimliğinde kullanılan tetragonal zirkonya polikristalin maddesi (3Y- TZP) elde edilir. 3Y- TZP’nin mekanik özellikleri içeriğindeki partikül boyutundan etkilenir. Kritik partikül boyutu 1 μm ’ dir. Partikül boyutunun büyütülmesi ile yapının stabilitesi bozulur, tetragonal- monoklinik spontan faz değişimi hızlanır. Partikül boyutunun küçültülmesi ile faz değişimi engellenir; mekanik özellikler zayıflar. Saf zirkonyanın içine eklenen stabilizatör maddelerin miktarının artırılmasıyla “tam kararlı zirkonya” (fully stabilized zirconia) elde edilir. Tam stabil zirkonya yapısında yalnız kübik faz bulunur.

Oda sıcaklığından 2500°C ye kadar faz değişimi izlenmez. Daha çok endüstri ve mühendislik alanlarında kullanılmaktadır. Diş hekimliği alanında kullanılmamaktadır (Bultan, Öngül, and Türkoğlu 2010; Gautam et al. 2016; Piconi and Maccauro 1999)



Şekil 3 Zirkonyanın ısı değişimine bağlı kristalografik faz değişimi (Gautam et al. 2016)

Zirkonya bazlı seramikler kimyasal olarak inert yapıda olan biyomateryallerdir. Uygulandıkları biyolojik çevrede uygun doku yanıtı oluştururlar. Hücre tutunması açısından başarılı materyallerdir. Çevre kemik ve diş eti fibroblast hücreleri için onkojenik, sitotoksik ve mutajenik etki göstermezler (Hisbergues, Vendeville, and Vendeville 2009; Paul, Hanisch, and Nesic 2021).

2.3. İmplant Çevresi Yumuşak Doku

İmplant başarısının en önemli belirleyicilerinden biri kemik ve implant arasındaki bağlantıdır. Bu bağlantı “osseointegrasyon” terimi ile ifade edilmektedir. Osseointegrasyon, Brånemark tarafından canlı kemik dokusu ile implant yüzeyi arasındaki mikroskobik olarak da gözlenen direk temas olarak tanımlanmıştır (Misch 2008). Günümüzde implant uygulamaları için osseointegrasyon sadece mikroskobik olarak izlenen direk yüzey temasını değil, sıkı bir fiksasyonun da bulunduğu klinik durumu ifade etmektedir (Branemark n.d.; Misch 2008). Osseointegrasyon süreci, homeostaz oluşumu, granülasyon dokusunun formasyonu, kemik formasyonu ve remodelingi içerir (Bielemann et al. 2018; Bosshardt, Chappuis and Buser 2017).

İmplant başarısının diğ er bir belirleyicisi implant çevresi yumuşak dokudur. Yapılan çalışmalarda, implant çevresi yumuşak doku ile diş çevresi yumuşak doku arasında özellikle kalın karakterde doku varlığında kayda değer benzerlikler bulunmuştur. İmplant çevresinde keratinize oral epitel doku bulunması mekanik koruma oluşturur. Dayanak ve implanta komşu cep epiteli ise hücresel immünolojik koruma sağlar. Bağlantı epiteli, hemidesmozomlarla implanta ve dayanağa bağlanır; böylece enfeksiyona karşı koruyucu örtüleme oluşur. Sonuç olarak implant ve dayanak çevresinde keratinize oral epitel olması, cep epiteli ve bağlantı epitelinin varlığı uzun dönem implant başarısı için gereklidir (Schupbach and Glauser n.d.; Talwar 2012). Yumuşak dokuda bu basamakların elde edilebilmesinin başta gelen şartı enfeksiyonun olmamasıdır. Altta yer alan kemik dokuyu mikroorganizma ve patojenik hasarlardan korumak için dayanak yüzeyinde sıkı bir bariyer oluşturan epitelial bağlanma gereklidir. Ağız boşluğu ve implant arasında etkin bir biyolojik örtüleme sağlayan yumuşak doku entegrasyonu implantın başarısı konusunda kritik noktalardan biridir. İmplant dayanağı çevresinde oluşan yumuşak doku entegrasyonu, implant ve kemiği bakteri penetrasyonundan korur; enflamasyona dayalı kemik erimesini önler ve diş eti çekilmesini engeller. Bu oluşan yumuşak doku bariyerinde en çok bulunan hücre tipi gingival fibroblastlardır. Fibroblastlar birçok hücre dışı matris bileşenini sentezler; yara iyileşmesi ve rejenerasyonundan sorumludur. *In_vivo* kültür için en kolay erişilebilir memeli hücreleri arasındadır (G mez-Florit et al. 2014). Patolojik mikrobiyal kolonizasyon; diş eti çekilmesi, enflamasyon ve kemik erimesi ile karakterize peri-implantitise yol açarak implant kaybına neden olabilir. Epitelin implant ve dayanak yüzeyine bağlanması, enfeksiyon oluşumunu takiben kemik yıkımına neden olabilen patojenlerin ve tahriş edici maddelerin organizmaya girişini ve alttaki yumuşak dokulara, kemiğe ulaşmasını önleyen biyolojik örtüleme oluşturmak için gereklidir (Gibbs et al. 2019).

2.3.1. Diş  evresi Yumuşak Doku Biyolojisi

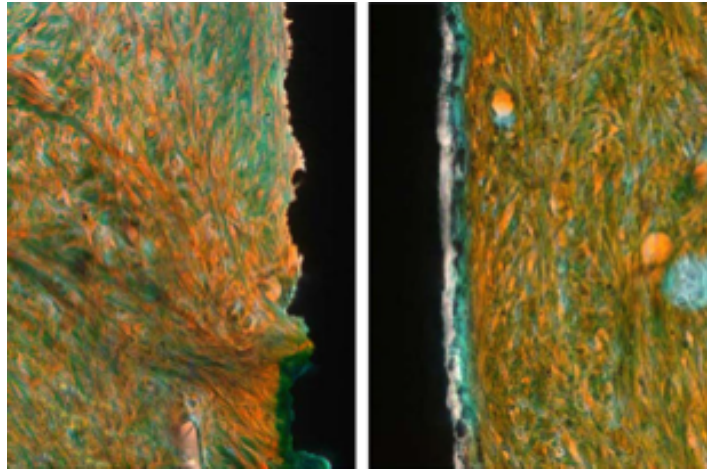
Dişeti; altında bulunan lamina propria denilen kan damarları, sinirleri, yapısal fibrilleri, fibroblastları ve diğ er hücre tiplerini barındıran yoğun bağ dokusu tabakası ile doğrudan temasta olan, diş tarafta yer alan, tabakalı, skuamoz hücreli epitel dokudur. Serbest dişeti dokusu, sement- mine birleşiminin koronalinde bulunan bölümdür. Oral epitel (ağız boşluğuna komşu dişeti dokusu), oral sulk ler epitel (dişe bakan fakat temasta olmayan cep epiteli) ve bağlantı epiteli (sement tabakası ile

temasta olan dişeti dokusu) olmak üzere farklı bölümlerden oluşur. Histolojik olarak da gözlenen bu farklılaşma bu bölümlerin fonksiyonları ile ilişkilidir. Serbest dişeti dokusu keratinizedir. Bu keratinizasyon çiğneme fonksiyonu ve mekanik travma sırasında yaralanmaya karşı direnç oluşturur. Sulkuler epitel ve bağlantı epiteli ise keratinize karakterde olmayan dokulardır. Bağlantı epiteli sadece diş eti dokusunun dişin mine tabakasına bağlanmasından sorumlu değildir. Ayrıca mikrobiyal kolonizasyon karşısında sıkı bir bariyer görevi üstlenmiştir. Dişeti oluşu sıvısı, yara iyileşmesine katkıda bulunan anti mikrobiyal moleküller içerir; bağlantı epiteli ve sulkuler epitel hücreleri tarafından sürekli salgılanır (Gibbs et al. 2019).

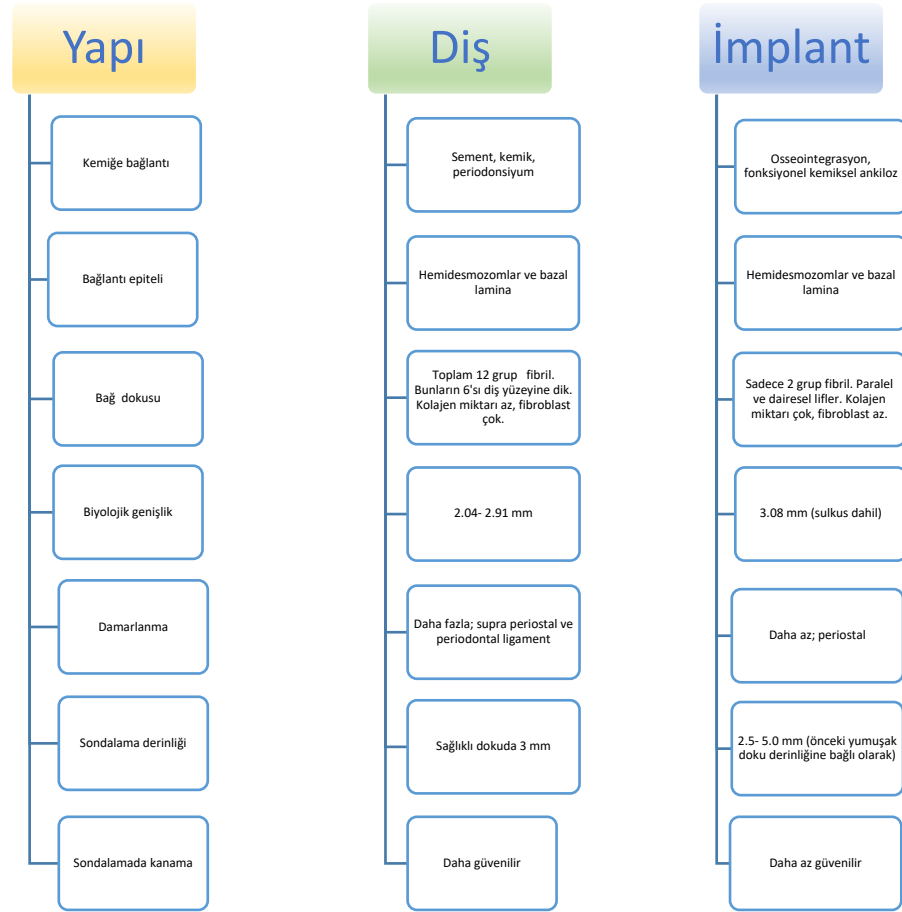
2.3.2. İmplant Çevresi Yumuşak Doku Biyolojisi

Dental implant çevresinde bulunan sert ve yumuşak dokular, diş çevresinde yer alan destek dokulara benzer histolojik ve klinik özellikler gösterebilir de diş ve implanta tutunma yönünden ana farklılıklar vardır. Bu farklılıkların başında dental implantların çevresinde periodontal ligament ve sement bulunmayışı, alveolar kemiğin implant yüzeyi ile direk temasta olması gelir. Hem implantta hem de diş yapısında sağlıklı durumda var olan diş eti sulkusu hastalık durumunda cep halini alır. Epitel dokunun altında bulunan bağ dokusu ise diş çevresi bağ dokusu ile karşılaştırıldığında farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar nedeniyle implant çevresi yumuşak doku hastalıklarının tanısı ve tedavi yönetimi de farklı yaklaşımlar gerektirir (Ivanovski and Lee 2017). İmplantın cerrahi olarak yerleştirilmesini takip eden süreçte yapılan insizyon kenarlarının birleştirilmesiyle epitel hücreleri tarafından implant çevresi yumuşak doku oluşturulmaya başlar. Bu hücreler implant yüzeyine doğru ilerleyip basal lamina ve hemidesmozomlar oluşturarak bağlantı epitelinin temelini meydana getirirler (Lindhe and Berglundh 2000). İmplant çevresi mukoza dokusu, ağız ortamına komşu yüzeyi iyi seviyede keratinize olmuş, diş eti oluşu bölgesinde sulkus epiteli ile devam eden yapıdadır. İmplant dayanağı ağza ilk yerleştirildiğinde hızlıca etrafında fibrin ağı oluşturulur ve dayanak yüzeyine temas eder. Bu doku, dayanak yüzeyine paralel olarak aşağı doğru hareket ederken ileride implant çevresi bağlantı epitelini oluşturmak üzere farklılaşmaya da başlar. Dayanak materyalinin özelliklerine bağlı olarak epitel dokusu dayanağa tutunur. Epitel dokunun aşağı doğru hareketi bağ dokusuna ulaştıkça durur. İmplant çevresi yumuşak doku ile diş çevresi yumuşak doku arasındaki ana farklılık; dokulardaki hücreler ve fibrillerdeki dağılımdır. Diş dokusunda bulunan sement ve bağ dokusu arasında dişin uzun aksına dik uzanan

Sharpey liflerinin aksine dayanak etrafındaki kolajen fibriller, dayanak yüzeyine paralel uzanır. Bu da diş dokusuna göre dayanak etrafında daha az sayıda fibroblast hücresi bulunmasına ve daha az vaskülarize olmasına neden olur. Bu önemli farklılıklar, dayanak çevresinde daha zayıf bir bağlantı olmasını açıklar (Gibbs et al. 2019; Ivanovski et al. 2017). Dayanak materyali ve çevre yumuşak doku arasında direk bir adeziv bağlantı bulunmamaktadır. İmplant çevresi bağ dokusu iyileşmeyi takiben 4 - 6 hafta sonra organize olmaya başlar. Dokunun olgunlaşması, iyileşmenin arkasından 6 - 12 hafta kadar sürer. Histolojik olarak incelendiğinde; fibroblastlar, implanta uzak alandaki damar ve kolajenden zengin dokuya kıyasla implant yüzeyine komşu kısımda yüzeye paralel olarak bulunan kolajen fibrillerin yakınında sayıca daha fazladır. (Şekil 3) İmplant yüzeyinin hemen yakınında bulunan fibroblasttan zengin bu bariyer doku, dış ortama karşı yeterli sızdırmazlık sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (Ivanovski and Lee 2017).



Şekil 4 Abutment çevresinde kollagen fibriller ve etrafında bulunan fibroblastlar (Ivanovski and Lee 2018)



Tablo 2 Diş ve implant destek doku karşılaştırma (Misch 2015)

2.4. Yara İyileşmesi

Diş çekimini takiben oluşan yara iyileşmesi deri yara iyileşmesine benzer basamaklardan oluşur. Bunlar; hemostaz, enflamasyon, hücre çoğalması, ekstraselüler matriks depolanması ve matriksin düzenlenmesidir. Ağız mukozasında yara bölgesine besin ve enflamatuar hücre akışını sağlayan artmış kan mikrosirkülasyonu yara iyileşmesi için gereklidir. Dişeti oluğu, dişeti oluğu sıvısı tarafından yıkanır. Dişeti oluğu sıvısının içinde mikroorganizmaların doku istilasına karşı üretilen bütün moleküler (sitokinler, antikorlar, kompleman sistem proteinleri) ve hücre (plazma hücreleri, lökositler) bileşenler yer almaktadır. Ayrıca büyüme faktörü, sitokinler, doku düzenleyici faktörler (matriks metalloproteinazlar vs.) gibi yara iyileşmesinde rol alan medyatörleri de yapısında barındırmaktadır (Gibbs et al. 2019).

İmplant çevresi sert ve yumuşak dokular, operasyonu takiben 6-8 hafta sonra yumuşak dokunun bağlanması ve olgunlaşması ile sonuçlanan yara iyileşmesiyle şekillenir (Salvi et al. 2015). İmplant çevresi yara iyileşmesinin, diş çekimini takiben oluşan yara iyileşmesine göre temel farklılıkları vardır. Yaranın kapanmasının yanında dayanak çevresinde biyolojik kapanmanın ve implantın osseointegrasyonunun sağlanması gerekir (Sculean, Gruber and Bosshardt 2014). Yara iyileşme basamaklarından enflamasyonun başlaması ve çözünmesi, yumuşak doku bağlantısının sağlanması yanında peri-implantitisin önlenmesi ve uzun vadede implantın başarısı için gereklidir (Toması et al. 2016). Yapılan araştırmalarda, implatın yerleştirilmesinden sonra 16 haftaya kadar implant çevresi oluk sıvısında enflamasyon ve yara iyileşmesinde yer alan birçok biyolojik marker saptanmıştır. Bunlar arasında interlökin-6 (IL-6), IL-8, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) yer almaktadır (Bielemann et al. 2018). Dişeti oluğu sıvısının toplanması ve ölçülmesi, periodontal hastalıklar açısından bu biyolojik belirteçlerin (*marker*) değerlendirilmesini sağlar. Biyolojik belirteçler, bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan maddelerdir ve bakteriyel patojenler ve tehlikeli ajanlara karşı kalıtsal bağışıklık yanıtı oluştururlar. Bu değerlendirmeler, implant çevresi doku için de enflamasyon ve periodontal hastalık durumunu belirlemek üzere sitokinler, proteinler, hücreler arası düzenleyici olarak çalışan peptid yapıdaki maddelerde yapılabilmektedir. Enflamasyon derecesi, yabancı cisim reaksiyonu derecesi, iyileşme ve hastalık patogenezi biyolojik belirteçler tarafından düzenlenir (Bielemann et al. 2018; Bostanci and Belibasakis 2018). Yapılan sistematik derleme modelindeki araştırmalarda patolojik süreçlere dahil olan biyolojik belirteçler belirlenmiştir (Bielemann et al. 2018; Duarte et al. 2016). Yapılan bir başka sistematik derlemeye, peri-implantitisli implantların bulunduğu hastalardan alınan diş eti oluğu sıvısında enflamasyon öncüsü sitokin seviyelerinin sağlıklı implantları olan hastalardan alınan diş eti oluğu sıvısındaki seviyelere göre yüksek olduğu belirlenmiştir (Duarte et al. 2016; Emecen-Huja et al. 2013).

Kemik büyüme faktörleri; kemiğin oluşumu ve mineralizasyonunu arttıran, değişime uğramamış mezenşim hücrelerinin kemik hücresine dönüşümünde öncülük eden moleküllerdir. Hedef hücre yüzeyindeki kendine has reseptörlere bağlanırlar. Tanımlanan 50'den fazla büyüme faktörü bulunmaktadır. TGF- β (transforming growth faktör- β), 47'den fazla alt çeşidi olan büyüme faktörleri ailesi üyesidir. Kemik yenilenmesi ve bağ dokusu tamirine katkı sağlayan sitokinlerden oluşur. Kemotaksisi

başlatıp osteoblastlar tarafından hücre dışı matriks oluşumunu uyarır. Osteoblast oluşumunu kısıtlar. TGF- β , prokolajen oluşturmak üzere fibroblast hücrelerini uyarır, yara alanında tip 1 kolajen depolanmasına katkıda bulunur. Bu özellikleriyle yumuşak ve sert doku onarımının geliştirmesiyle bilinir. Platelet türevli büyüme faktörü (PDGF -Platelet-derived growth factor) ile birlikte yumuşak doku iyileşmesi ve kemik mineralizasyonuna yardımcı olur (Misch 2008).

2.5. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk için literatürde pek çok tanım bulunmaktadır. Genel olarak bir materyalin uygulandığı biyolojik ortamda uygun doku ya da sistem cevabı oluşturması; zararlı ve immünolojik olarak reddedilmiş olmaması olarak ifade edilmektedir. Tanımlama yapılırken daha çok iki temel ilke dikkate alınmıştır. Bunlardan birincisi, biyomateryalin organizma için zararlı etkilerinin olmadığı “biyogüvenlik” ilkesidir. Bu ilke, sitotoksikite kavramını içerir. İkinci ilke ise, biyomateryalin uygulandığı organizmada uygun cevabı oluşturarak fonksiyon görme kabiliyeti olarak tanımlanan “biyofonksiyonellik” ilkesidir (Black n.d.; Kirkpatrick et al. 1998; Shahi et al. 2019). Biyouyumluluk kavramına göre dental materyaller biyotolerant, bioinert ve bioaktif olmak üzere gruplanırlar. Bu gruplara ait tanımlar ve örnekler Tablo 3 de açıklanmıştır.

Dayanak materyallerinin çevre yumuşak doku ile biyouyumluluğu yumuşak doku kararlılığını etkileyen önemli faktörler arasındadır. İmplant tedavisinin rutin tedavi seçenekleri arasında yer alışıyla birlikte ticari olarak birçok marka dental markete sunulmuştur. Standart implant dayanakları, doğal dişlenmedeki yumuşak doku çıkış profilini oluşturma konusunda kişiselleştirilmiş dayanaklar kadar başarılı olamayıp artık simanın temizliği konusunda da yetersiz kalmaktadır. Dijital teknolojinin yaşamın her alanında etkin kullanımı, kişiselleştirilmiş dayanakların CAD- CAM teknolojisi ile uygun bütçe ve yüksek estetik sonuçlarla elde edilmesini mümkün kılmaktadır (Serichetaphongse et al. 2020).

Biyouyumluluk grubu	Diş hekimliği tanımı	Diş hekimliğinde kullanılan örnek malzeme	Komşulukta olduğu kemik ile ilişki
<u>Biotolerant</u>	Yerleştirildiği kemik dokudan fibröz doku tabakası ile ayrılır.	Paslanmaz çelik, kobalt alaşımları, polimetilmetakrilat	Uzak osteogenezis
<u>Bioinert</u>	Kemik doku ile kimyasal bağ kurarlar.	Titanyum, zirkonya, alümina, karbon	Kemik dokuya direkt temas
<u>Bioaktif</u>	Kemik doku ile kimyasal bağ kurmadan komşu kemik ile direkt temastadır.	Hidroksi apatit, kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat, cam seramikler	Kemik dokuya yapışma

Tablo 3 Biyouyumluluk tanımına göre dental materyallerin sınıflandırılması (Williams 1981)

2.6. Biyouyumluluk Testleri

Biyouyumluluk için klinik deneyler, hayvan deneyleri ve *in vitro* deneyler yapılmaktadır (Hanks', Watahaz, and Suni 1996; Saw et al. 2005).

2.6.1. Klinik Deneyler

Deney materyaline karşı oluşan cevabın en doğru olduğu deney türüdür. Gönüllü insan grupları üzerine deney materyali uygulanır. Dezavantajları, çok pahalı olması, uzun süreli olması, değerlendirmenin zor olmasıdır. Etik açıdan tartışmalıdır (Saw et al. 2005).

2.6.2. Hayvan Deneyleri

Kedi, köpek, fare, maymun, koyun ve keçi gibi memeli hayvanların organizmalarına deney materyalinin uygulanması ile gerçekleştirilen deneylerdir. Memeli organizmasının kompleks yapısı nedeniyle daha anlamlı ve karmaşık cevaplara

ulaşılır. Ancak, değişkenlerin kontrol edilmesi zordur. Pahalı deneyler oldukları gibi etik açıdan da tartışmalıdır (Schmalz 1997).

2.6.3. *In Vitro* Deneyler

Biyouyumluluğu test edilecek materyalin *in vitro* şartlarda biyolojik dokularda oluşturduğu cevabın ve toksik etkilerin değerlendirilmesi için *in vitro* biyouyumluluk testleri kullanılmaktadır. Bu testlerle hücre ve dokularda materyale karşı gelişecek enflamasyonun dejeneratif (geri dönüşebilir) ve nekrotik (geri dönüşümsüz) basamaklarında oluşan cevaplar değerlendirilebilmektedir (Hanks' et al. 1996).

Diş hekimliğinde kullanılan malzemelerin biyouyumluluk deneyleri beş grup altında toplanmaktadır. Bunlar; pulpa ile temasta olan malzemeler, kanal dolgu malzemeleri, dişin sert doku sağlığını etkileyen malzemeler, ağız içi yumuşak doku ile temasta olan malzemeler ve ağız dışı dokularla yutma, solunum ve dokunma yoluyla temasta olan malzemelerdir. Bu gruplara dayanarak uygulanacak testler, materyalin kullanılacağı bölgeye ve beklenen zararlı etkiye göre farklılık gösterir. Burada en önemli konu uygulanacak materyal için doğru testin seçilmesidir. *In vitro* testlerin tekrarlanabilir olması en büyük avantajlarıdır. Biyolojik ortamlardaki kompleks yapının sağlanamaması, sadece deney değişkenlere bağlı kalınması dezavantajlarından (Hanks' et al. 1996; Saw et al. 2005; Schmalz 1997; Williams 1981).

Biyouyumluluk testleri öncül testler, ikincil testler ve kullanım testleri olarak üç gruba ayrılırlar. Diş hekimliğinde kullanılan materyaller için uygulanan biyouyumluluk testleri öncül testler grubu içinde yer alan sitotoksite testleridir (Hanks' et al. 1996; Murray, Godoy, and Godoy n.d.; Schmalz 1997).

2.6.4. Sitotoksite Testleri

Hücre canlılığı /sitotoksitenin belirlenmesinde *in vitro* şartlarda kullanılan yöntemler beş grupta incelenirler. Bunlar aşağıdaki gibidir:

1. Boyama yöntemleri: Tripan mavisi, eozin, kongo kırmızısı ve eritrosin B kullanılarak uygulanır.

2. Kolorimetrik yöntemler: Metabolik aktivitenin ölçüldüğü hücre çoğalması/ölümünün sistemine dayalı testlerdir. Nötral kırmızısı alımı (NRU) testi, MTS testi, XTT testi, kristal viyole testi, 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi, suda çözünen formazan 1 (WST-1) testi, suda çözünen formazan

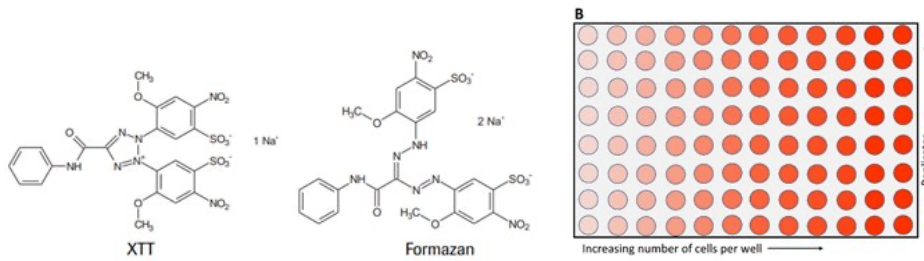
8 (WST-8) ve sulforhodamin B (SRB) testi, testleri farklı boyalar kullanılarak spektrofotometrik okumalarla uygulanan testlerdir.

3. Florometrik yöntemler: Alamarblue testi ve CFDA-AM testleri florometrik testler arasındadır.

4. Apoptozun belirlenmesi: Akış sitometrisi kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücre oranları değerlendirilir.

5. Otofajinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler: Otofajide rol oynayan protein düzeylerinin belirlendiği testlerdir (Erkekoglu and Baydar 2021).

XTT (2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-5-[(fenilamino) karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit), hücrelerin metabolik aktivitesi ile hücre canlılığı, çoğalması ve uygulanan etken maddenin sitotoksitesini ölçmeyi sağlayan renk değişimine dayalı, radyoaktif olmayan bir yöntemdir. Sarı renkteki tetrazolium tuzunun metabolik aktivite ile indirgenerek turuncu renkteki formazan molekülüne dönüşümü esasına dayanır. (Şekil 4)



Şekil 5 Tetrazolyum tuzunun formazona dönüşümü

2.6.5. Apoptoz (Annexin V- FITC) Testi

Hücre ölümü fizyolojik koşullarda ve yaralanma veya hastalık sonucu meydana gelir. Programlanmış hücre ölümü, insan dokusunun gelişiminde ve homeostazında önemli bir role sahiptir. Apoptoz, programlanmış hücre ölümünün ana tipidir. Bu sürecin anormal düzenlenmesinin, gelişimsel bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar ve

kanser dahil olmak üzere çok sayıda hastalığa neden olduğu düşünülmektedir. Programlanmış hücre ölümü ile periodontal hastalık arasındaki bağlantı olduğu bilinmektedir. (Tsuda H et al. 2012)

Apoptoz, hücre küçülmesi, zar kabarması, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması ve hücre yüzeyi değişiklikleri dahil olmak üzere karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle ilişkilidir. Apoptozun erken tespiti, apoptoza yol açan merkezi yolun incelenmesi için kritik öneme sahiptir. Tahlil, normalde plazma zarının sitoplazmik yüzüyle sınırlı bir fosfolipid olan fosfatidilserinin (PS), çoğu hücre tipinde ve birçok apoptotik uyaran tarafından apoptoz sırasında hücre yüzeyine yer değiştirdiği gözlemine dayanır. PS'nin hücre yüzeyine eksternalizasyonu, apoptotik hücrelerin komşu hücreler veya makrofajlar tarafından tanınmasını işaretleyerek, fagositoz ile ölmekte olan hücrelerin enflamatuvar olmayan şekilde uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Hücre yüzeyinde PS, floresan izotiyosiyanat (FITC) etiketli anneksin V'nin bağlanmasıyla saptanabilir. Anneksin V proteini, kalsiyum varlığında, negatif yüklü fosfolipidlere spesifik olarak bağlanan bir fosfolipid bağlayıcı protein ailesine aittir. 4 FITC etiketli anneksin V-pozitif hücreler, akış sitometrisi veya floresan mikroskobu ile tespit edilebilir. Çoğu durumda, hücre yüzeyine PS translokasyonu, DNA yoğunlaşması, plazma zarı geçirgenliği ve zar kabarmasından önce meydana gelir, bu nedenle erken apoptozun hızlı ve uygun bir ölçüsü olarak hizmet eder(Bossy-Wetzel and Green 2000).

2.6.6. İnterlökin 6 (IL6) ve Transforming Growth Faktör (TGF- β) Analizi

ELISA, antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini, karışımdaki belirli bir proteini tespit etmek temeline dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir. Renk değişimi esasına dayanır. Spesifik antikorlar kullanılarak mikropılaka kuyularında immobilize edilmiş protein örneklerinin analizini sağlar. Antikor ve proteinleri pasif olarak bağlayan 96 veya 384 kuyucuklu polistiren plakalarda gerçekleştirilir. Araştırma amaçlı, serum antikor konsantrasyonu belirlenmesi, gıda alerjilerinin saptanması, antijen tayini, salgın hastalıklar ve yayılımın belirlenmesi, geçirilmiş hastalıkların antijenlerinin kandan tespiti amacıyla uygulanır. Vücut sıvıları, hücre ve doku kültürlerinde çalışılır. ELISA testinin direkt, indirekt ve sandviç olmak üzere üç uygulama yöntemi vardır. Bunlardan en çok kullanılan sandviç yöntemidir (Crowther 2009).

2.6.7. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), moleküler oksijenden türetilen bir dizi reaktif molekülü ve serbest radikali tanımlamak için kullanılır. Aerobik solunumda oksijenin indirgenmesi ve hücre içindeki çeşitli enzimatik sistemler tarafından yan ürün olarak ortaya çıkarlar. Fizyolojik seviyelerde ROS, hem hücre içi hem de hücrelerarası haberleşmede ve hücre savunmasında rol oynar. Biyolojik sistemin detoksifikasyon mekanizmasının üzerinde artan ROS üretimi, oksidatif stres ve hücre hasarı ile sonuçlanır (Held 2015).

Florometrik Hücre İçi ROS kiti, bir saatlik inkübasyonu takiben hücre içi ROS'u (özellikle süperoksit ve hidroksil radikalleri) tespit etmek için hassas, tek adımlı florometrik ölçüm sağlar. ROS, sitoplazmada lokalize bir floresan sensör ile reaksiyona girerek, mevcut ROS miktarıyla orantılı bir florometrik ürün ortaya çıkar.

Bu araştırmada beş farklı implant dayanak materyalinin (lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik, PEEK, PMMA, titanyum alaşım ve zirkonya) gingival fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin varlığı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Çalışmanın H_0 hipotezi:

Kullanılan materyallerin gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin olmadığıdır.

3. Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, diş hekimliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan implant dayanak materyallerinin, fare fibroblast hücreleri (L929 hücre hattı) üzerine sitotoksik etkileri *in vitro* şartlarda araştırıldı.

Çalışma için uygulanan testler, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan materyallerin adları, türleri ve üretici bilgileri Tablo 4'te gösterilmiştir. Kullanılan materyaller Şekil 5-9'da gösterilmiştir.

Materyal	Üretici Firma Adı	Seri No	Materyal İçeriği	Örnek sayısı
IPS e.max® CAD	Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein	S23926	Lityum dislikat ile güçlendirilmiş cam seramik (LiSiO ₂) (%57-80 SiO ₂ , %11-19 Li ₂ O, %0-13 K ₂ O, %0-11 P ₂ O ₅ , %0-8 ZrO ₂ , %0-8 ZnO, %0-5 Al ₂ O ₃ , %0-5 MgO, %0-8 renklendirici oksitler)	n=30
PEEK	NucleOss, İzmir, Türkiye	-	Polietereterketon	n=30
Telio® CAD	Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein	T49621	%99.5 Polimetilmetakrilat (PMMA), pigment<1.0%	n=30
Titanyum	NucleOss, İzmir, Türkiye	-	Grade V titanyum (Ti-6Al-4V)	n=30
IPS e.max®ZirCAD	Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein	Y22252	Yarı sinterize yttrium oksit stabilize zirkonyum (ZrO ₂)	n=30

Tablo 4 Çalışmada kullanılan materyaller ve kimyasal içerikleri



Şekil 6 Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik (e.max CAD)



Şekil 7 Polietetereterketon (PEEK) çubuk



Şekil 8 Polimetilmetakrilat Blok (PMMA) (Telio CAD)



Şekil 9 Titanyum alaşım çubuk (GradeV- Ti-6Al-4V)



Şekil 10 Zirkonya (ZrO_2) Blok (e.max ZirCAD)

3.1. Hücre Kültürü

İmplant tedavisinde kullanılan dayanak materyalleri ağız ortamında bağ dokusu ile temas halindedir. Bu nedenle hücre kültürü olarak ATCC® firmasından temin edilmiş olan L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır.

3.2. Hücrelerin Üretilmesi ve Kültür Koşulları

Hücreler; yaşamsal faaliyetlerini sağlıklı şekilde sürdürebilmeleri için %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin ile desteklenen MEM- EAGLE Earle's Salts Base kullanılarak 75 cm^2 'lik hücre kültür kabında; 37°C , %5 CO_2 'li inkübatörde çoğaltıldı. (Şekil 10-11-12-13) Düzenli hücre kontrolleri inverted ışık mikroskobu kullanılarak yapıldı.





Şekil 13 Hücre ekilen 75'lik Hücre kültür kabı



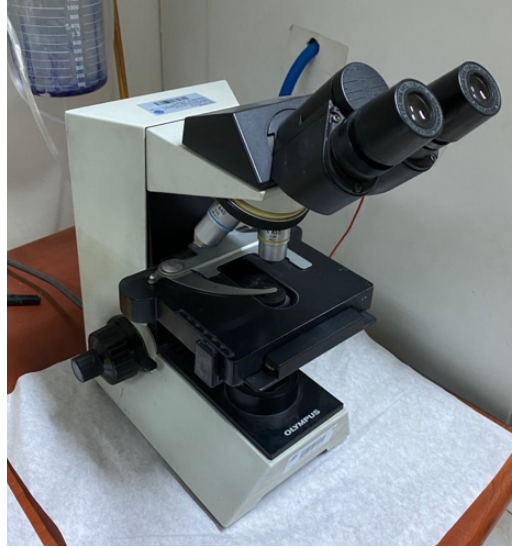
Şekil 14 İnkübasyon için kullanılan 37 °C, %5 CO2 içeren inkübatör

3.3. Hücre Canlılığının Takibi

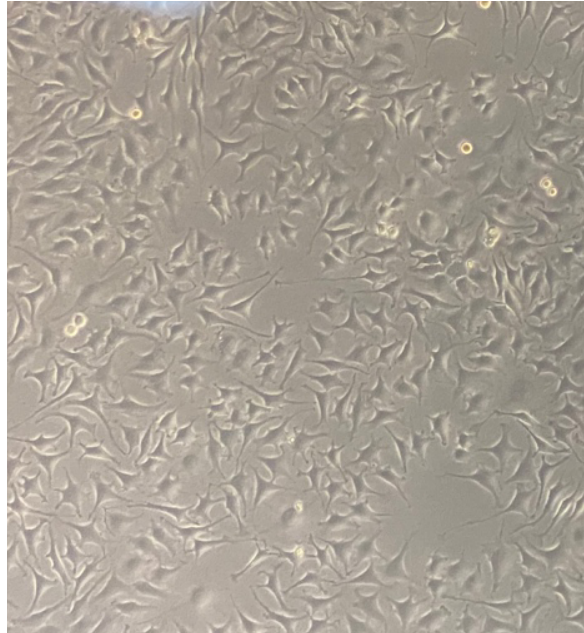
Tripan mavisi membran geçirimsiz bir boyadır. Bu nedenle canlı hücreleri boyayamaz. Ölü hücreler membranlarında meydana gelen bozulmalardan dolayı maviye boyanır. Çalışmanın bu bölümünde hücre canlılığı takibi için tripan mavisi kullanıldı. 75'lik hücre kültür kaplarında bulunan L929 hücre hattı önce 5 ml serumsuz ortam ile yıkandı. Hücre kültür kabı içerisine 1 ml Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de 5 dk inkübe edildi. Böylece kap yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı (Şekil 14). Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı inverted ışık mikroskopunda görüldü. Eklenilen tripsin-EDTA miktarının hacimce iki katı serumlu ortam eklenerek tripsin inaktivasyonu sağlandı. Kültür kabı içindeki hücreler serolojik pipet ile 15 ml'lik falkon tüpüne alındı, 1200 rpm'de 5 dk santrifüje edildi. Hücrelerin dibe çöktüğü görüldükten sonra üstte kalan ortam atıldı. 1 ml serumlu ortam eklenerek hücreler resüspanse edildi. Bu karışımdan 50 µl alındı; 50 µl %0,4- 0,5 konsantrasyonda tripan mavisi ile karıştırıldıktan sonra ışık mikroskobu (Olympus CH30, Japan) ve Neubauer hemositometresi (Marienfeld, Germany) kullanılarak hücrelerin canlılık durumuna göre sayımı yapıldı; 0,1 µl deki canlı hücre sayısı bulunduktan sonra 2 olan dilüsyon katsayısı ve 10^4 ile çarpılarak ml'deki hücre sayısı hesaplandı. (Şekil 15-16-17)



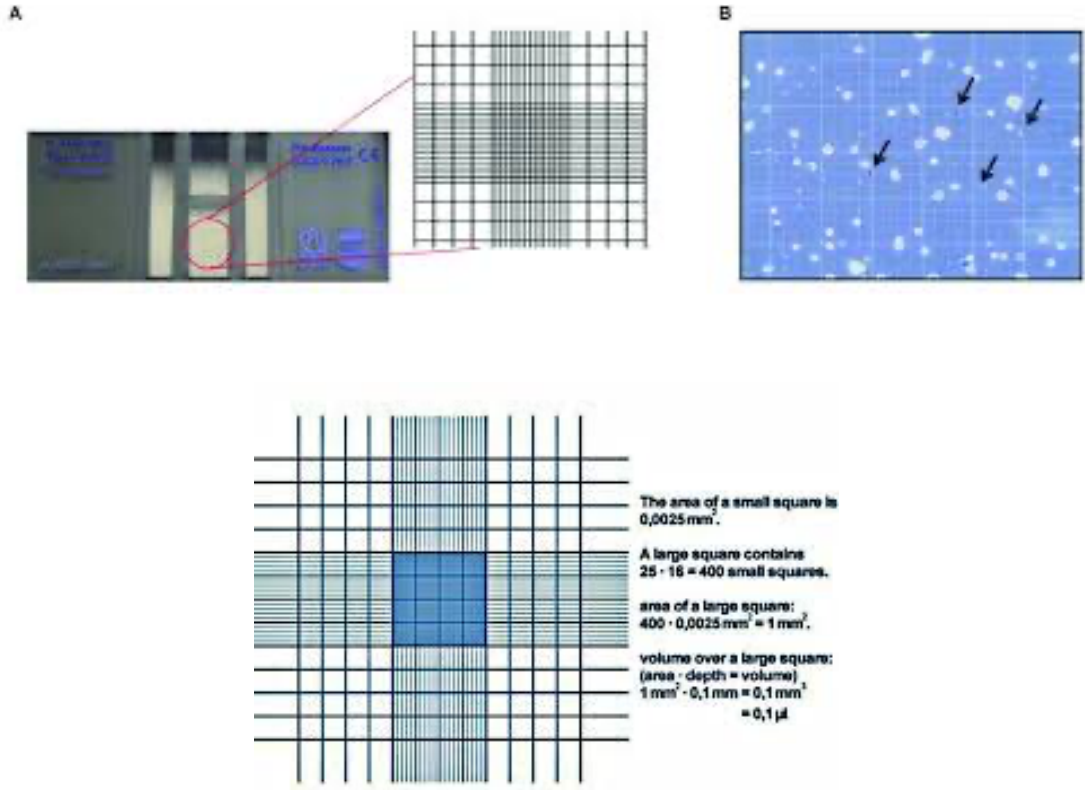
Şekil 15 Hücrelerin tutundukları kültür kabı yüzeyinden ayrılmaları için kullanılan Tripsin- EDTA Solusyonu



Şekil 16 L929 fare fibroblast hücrelerinin 40X büyütmede incelendiği ışık mikroskobu



Şekil 17 Işık mikroskonu 40X büyütmede 75'lik hücre kabındaki L929 fare fibroblast hücrelerinin görüntüsü



Şekil 18 Neubauer Hemositometresi

3.4. Hücre Hattının Pasajlanması

Hücreler 75'lik kültür kabının %70-80'ini kapladığında pasaj uygulandı. Bunun için hücreler tripsin ile yüzeyden kaldırıldı, 15 ml'lik falkon tüpe alındı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüje edilerek hücreler çöktürüldü. Üstte kalan ortam atıldı. Hücreler 1 ml besiyeri bulunan ortam ile resüspanse edildi. 9 ml daha besiyeri eklenerek karışım 10 ml'ye tamamlandı. 75 cm²'lik iki kültür kabına bölündü. Her bir kültür kabına 15 ml besiyeri eklendikten sonra inkübatöre alındı.

3.5. Hücre Hatlarının Dondurularak Saklanması

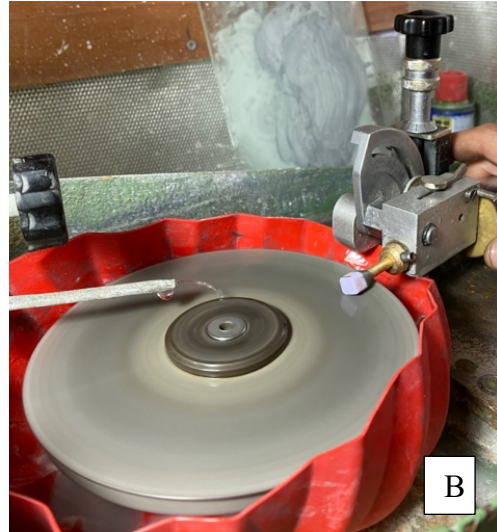
İlerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere ihtiyaç fazlası hücreler -80 °C'de dondurularak saklandı. Bunun için buz üzerinde 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) ile 900 µl FBS karıştırılarak dondurma çözeltisi hazırlandı. 1ml dondurma çözeltisi ile 1×10^6 hücre karıştırılarak kriyo tüplere alınarak -80 °C'de donduruldu.

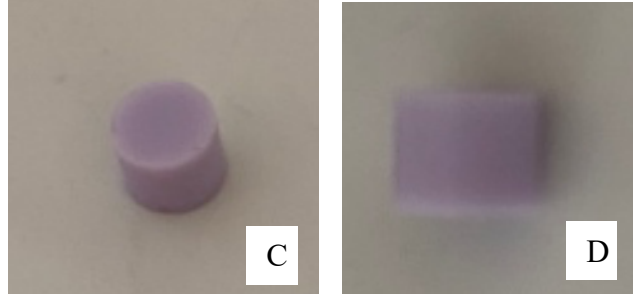
3.6. Dondurulan Hücre Hattının Çözünmesi

15 ml'lik falkon tüpüne 5-10 ml arası besiyeri eklendi. -80°C'de kriyo tüplerde donuk halde bulunan hücrelerin üzerine bir miktar hazırlanan besiyeri pipetaj işlemi ile uygulanarak hücrelerin hızlıca çözünmesi sağlandı. Kriyo tüpte çözünmüş halde bulunan hücre – besiyeri karışımı falkon tüpe aktarıldı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüje edilerek hücrelerin çöktürülmesi sağlandı. Üstte bulunan ortam uzaklaştırıldı, hücre peleti taze besiyeri ile resüspanse edilerek fazla DMSO'nun uzaklaştırılması için tekrar santrifüj yapıldı. Üst kalan ortam atıldı. Hücreler %10 FBS içeren besiyerine pipetlenerek resüspansiyon sağlandı; tripan mavisi ile hücre canlılığı kontrol edilip uygun sayıda hücre 75 cm²'lik kültür kabına ekilip inkübatöre yerleştirildi.

3.7. Örneklerin Hazırlanması

Uygulanacak testlerde kullanılmak üzere örnekler hazırlanırken ISO-10993-12:2012-8 no'lu "Test Örnek ve Referans Materyal Hazırlama" talimatı referans alındı. Deneylerde kullanılacak örnekler ISO-10993-12:2012'de yer alan "Tablo 1- Standart Yüzey alanları ve Likit Ortam Hacimleri" örnek materyal tipleri dikkate alınarak kalınlığı 1mm'den fazla olacak şekilde oluşturuldu. Örnekler 5mm yükseklik ve 6mm çapta silindir şeklinde her materyal grubundan 30 adet (n=30/grup), toplam 150 adet (N=150) hazırlandı (Standards Authority of Ireland 2012). (Şekil 18-19)





Şekil 19 Örneklerin hazırlanması (A. CAD/CAM bloktan hazırlanacak örnek için bloğun endüstriyel olarak tasarlanmış kesme cihazında dilimlenmesi, B. Dilimlenmiş örneklerin yüzeyinin gren büyüklüklerine göre aşındırılarak son halinin elde edilmesi, C. Hazırlanmış e.max CAD örnek -üst yüzeyi, D. Hazırlanmış e.max CAD örnek -yan yüzeyi)



e.max[®] CAD (n=30)
(LiSiO₂)



PEEK (n=30)



Telio[®] CAD (n=30)
(PMMA)



Titanyum (Ti-6Al-4V) (n=30)



e.max[®] ZirCAD (n=30)

Zirkonya (ZrO₂)

Şekil 20 Hazırlanan örnekler (A. LiSiO₂, B. PEEK, C. PMMA, D.Ti-6Al-4V, E. ZrO₂)

Hazırlanan örnekler (Şekil 18) buharlı sterilizatörde, 121°C de, 3 atm basınç altında 20 dk hassas programda paketli olarak sterilize edildi. (Şekil 20) Sterilize edilmiş her

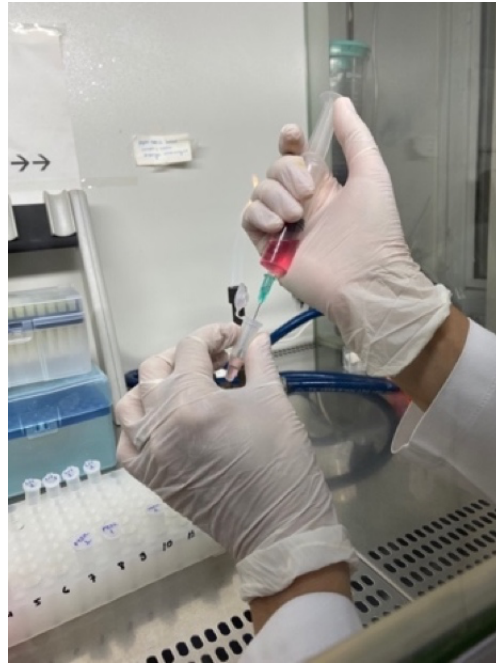
örnek laminar flow kabinde (Şekil 20) bir ependorf tüpüne yerleştirilerek üzerine ISO 10993-12:2012 standartlarına göre 502 µl %10 FBS, %1 penisilin- streptomisin ve %1 L-glutamin ile desteklenmiş MEM-Eagle ortam konuldu (Standards Authority of Ireland 2012). 1 gün (24 saat), 3 gün (72 saat) ve 7 gün (168 saat) 37 °C, %5 CO₂ li inkübatörde bekletildi. Bu süreler sonunda dayanak materyallerine maruz kalan ortamlar toplandı. 0,22 µm filtreden geçirilerek -20 °C’de saklandı (Şekil 20-21-22-23).



Şekil 21 Buharlı Sterilizatör



Şekil 22 Hücre pasajlaması, yıkanması,üretilmesi için kullanılan laminar flow kabin



Şekil 23 Ortamların pipet ile toplanması



Şekil 24 Ortamların süzülmesi için kullanılan 0,22 μ m Filtre

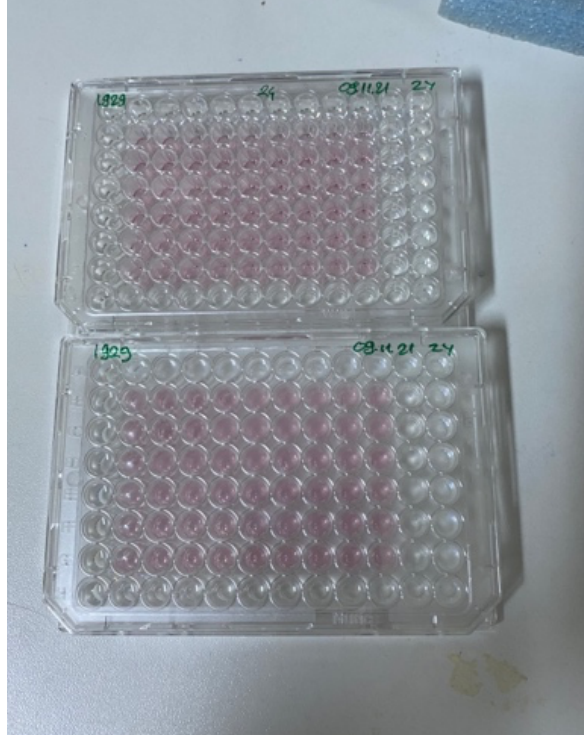
3.8. Sitotoksosite Testi

Çalışmada kullanılan dayanak materyallerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için tablo 5'teki deney planı kurgulandı. Dayanak materyallerine maruz kalan ortamlardan toplanan ekstratlarla oluşturulan deney planı lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik n=9, PEEK n=9, PMMA n=9, titanyum n=9 ve zirkonya n=9 örnek, toplam N=45 örnek olarak kurgulanmıştır. Örnekler 1. gün, 3. gün ve 7. gün olarak zaman gruplarına ayrıldı. Her grup için kontrol grubu oluşturuldu. Buharlaşmaya bağlı sıvı kaybını minimuma indirmek için kenar kuyulara su yüklendi.

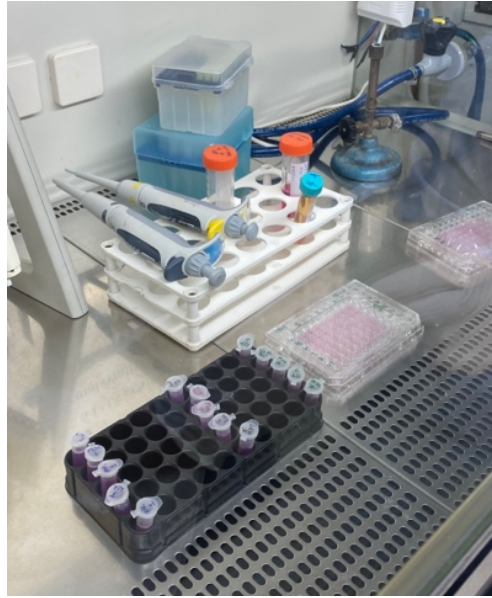
	1. gün			3. gün			7. gün				
dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O
dH ₂ O	Li ₂ Si	Li ₂ Si	Li ₂ Si	Li ₂ Si	Li ₂ Si	Li ₂ Si	Li ₂ Si	Li ₂ Si	Li ₂ Si	blank	dH ₂ O
dH ₂ O	peek	peek	peek	peek	peek	peek	peek	peek	peek	blank	dH ₂ O
dH ₂ O	pmma	pmma	pmma	pmma	pmma	pmma	pmma	pmma	pmma	blank	dH ₂ O
dH ₂ O	ti	ti	ti	ti	ti	ti	ti	ti	ti	blank	dH ₂ O
dH ₂ O	zr	zr	zr	zr	zr	zr	zr	zr	zr	blank	dH ₂ O
dH ₂ O	kontrol	kontrol	kontrol	kontrol	kontrol	kontrol	kontrol	kontrol	kontrol	blank	dH ₂ O
dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O

Tablo 5 Sitotoksosite deney planına göre alınan süpernatantların 96 kuyucuklu plakaya yerleşim planı (çalışmada kullanılan materyallerin zamana göre dağılımları) (dH₂O:su, Li₂Si: lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak materyaline maruz bırakılan ortam, peek: PEEK dayanak materyaline maruz bırakılan ortam, pmma: PMMA dayanak materyaline maruz bırakılan ortam, ti: Ti-6Al-4V alaşım dayanak materyaline maruz bırakılan ortam, zr: zirkonya dayanak materyaline maruz bırakılan ortam, kontrol: dayanak materyaline maruz bırakılmayan ortam, blank: sadece besiyeri olan ortam)

Hücre sayımı yapıldıktan sonra %10 FBS besiyeri içeren ortamdaki hücre konsantrasyonu ml’de 1×10^5 olacak şekilde ayarlandı ve yeterli miktarda hücre küvete alındı. Çoklu pipet yardımıyla kuyucuk başına 100 µl hacimde ve her materyal grubu için 3’lü tekrar olacak şekilde iki ayrı 96 kuyucuklu plakaya pipetlendi (Şekil 24-25). Kontrol grupları her bir materyal için sadece L-929 hücre kültürü ve besiyeri olan; materyal içermeyen kuyucuklardan oluşturuldu.



Şekil 25 96 kuyucuklu plaka (well plate)



Şekil 26 Örneklerin 96'lık plakaya alınması

Hücrelerin plaka kuyucuklarına tutunmaları için 24 saat süreyle %5 CO₂, 37 °C inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda her iki plakalardaki ortamların tamamı çekilerek 1, 3 ve 7 gün örneklerle maruz bırakılan ortamlardan alınan 100 µl ortam ile değiştirildi. Plakalar 24 ve 48 saat boyunca 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

24 ve 48 saatin ardından kuyucuklardaki tüm ortam uzaklaştırıldı ve yerine kuyucuk başına 100 µl fenol red içermeyen besi ortamı, 50 µl XTT reagent ve 1 µl aktivatör karışımı çoklu pipet yardımıyla ışısız ortamda hızlıca eklendi. İnkübatöre konularak dört saat süreyle saat başı Multiskan Spectrofotometer Elisa Reader cihazında 450 nm ve 620 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü (Şekil 26). 450 nm deki absorbans değerinden 620 nm değerindeki absorbans değerleri çıkarılarak deney grupları ile kontrol grupları arasındaki canlılık değerleri karşılaştırıldı. Sonuçlar IBM SPSS Statistic for Windows, Version 25.0.(IBM Corp. Released 2017, Armonk, NY) paket programı ile analiz edildi.



Şekil 27 ELISA Okuyucu

3.9. Apoptoz (Annexin V- FITC) Testi

Hücre canlılığı ve apoptoz testi FITC Annexin V Apoptozis Belirleme kiti ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan dayanak materyallerinin hücreler üzerindeki

apoptotik etkilerini belirlenmesi için iki ayrı plakaya dayanak materyallerine 1, 3 ve 7 gün süreyle maruz bırakılan ortamlar birer kuyucuk olacak şekilde pipetlenerek aşağıdaki deney planı kurgulanmıştır.

1.Gün	3.Gün	7.Gün
Lityumdisilikat	Lityumdisilikat	Lityumdisilikat
Peek	Peek	Peek
Pmma	Pmma	Pmma
Titanyum	Titanyum	Titanyum
Zirkonya	Zirkonya	Zirkonya
Kontrol	Kontrol	Kontrol

Tablo 6 Apoptoz deney planı

Kuyucuk başına 75×10^3 hücre 1ml %10 FBS içeren MEM-Eagle ile ekildi ve 24 saat boyunca 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat beklendikten sonra ortamlar, dayanak materyaline belirli sürelerle (1,3,7 gün) maruz bırakılan 1ml ortamla deney planına uygun olarak değiştirildi. 48 saat boyunca 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda ELISA testlerinde kullanılmak üzere 1000 g'de (gravite) 15 dk santrifüjlenerek -20 °C'de saklandı.

ELISA testi için tüm kuyulardaki hücreler 500'er µl serumsuz ortam ile yıkanıp 200 µl tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra 400 µl serumlu ortam ile tripsin inaktivasyonu sağlandı, ardından hücreler 2 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak, 100 g'de 7dk santrifüj edildi; santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak hücreler soğuk PBS ile resüspanse edildi, tekrar santrifüje edildi. Yıkama işlemi 2 defa tekrarlandı. İşlem sonunda kontrol hücreleri, bağlama tamponu ile resüspanse edilerek kontrol grubu 100'er µl olacak şekilde dört tüpe bölündü; tüplerden birine 1/100 oranında PI boyası, diğerine 1/100 oranında Annexin V- FITC boyası, diğerine aynı oranlarda PI+Annexin V- FITC eklenip 20 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

Deney gruplarında ise her grup için 100 µl bağlama tamponu ile 1 µl PI ve 1 µl Annexin V- FITC bir tüpte karıştırıldıktan sonra hücreler 100'er µl boya karışımı ile resüspanse edilerek 20 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından bağlama tamponu ile süspanse edilen hücreler akış sitometre cihazı ile analiz edildi.

İlk olarak FSC-A ve SSC-A alanında hücrelerin bulunduğu P1 alanında 30×10^3 hücre sayıldı ve FL1-A ve FL2-A filtrelerinde P1 alanını içerecek şekilde canlı hücre bölümü, erken apoptoz bölümü, geç apoptoz bölümü ve nekroz bölümü belirlendi. Anx içeren kontrol grubu ve PI içeren kontrol grubu da analiz edildi. Son olarak Anx+PI içeren kontrol grubu da analiz edildikten sonra deney grupları sırası ile analiz edildi.

3.10. İnterlökin 6 (IL6) ve Transforming Growth Faktör (TGF- β) Analizi

İnterlökin 6 (IL6) ve Transforming Growth Faktör- β (TGF- β) düzeylerinin belirlenmesi için ELISA yöntemi kullanıldı.

IL6 analizini gerçekleştirmek üzere hazırlanan standartlar ve örnekler 100'er μ l olarak kuyucuklara pipetlendi, üzeri jelatinle kapatıldı. 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Kuyulardaki sıvılar uzaklaştırıldı, her kuyuya 100 μ l biotin antikoru eklendi. Üzeri jelatinle kapatıldı. 1 saat boyunca 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Ortamlardaki sıvılar uzaklaştırılarak her kuyu 200 μ l yıkama solüsyonu ile 2 dk boyunca yıkandı. Bu işlem üç kere tekrar edildi. Her kuyuya 100 μ l HRP- avidin eklendi. Üzeri kapatıldı, 37 °C, %5 CO₂'li etüvde tekrar inkübasyona bırakıldı. Ortamlardaki sıvı uzaklaştırıldı, her kuyu 200 μ l yıkama solüsyonu ile 2 dk boyunca yıkandı. Bu işlem beş kere tekrar edildi. Her kuyuya 90 μ l TMB substrat eklendi, 37 °C, %5 CO₂'li etüvde ve karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakıldı. Her kuyuya 50 μ l durdurma solüsyonu eklendi, nazikçe çalkalanarak karıştırıldı. Ardından Multiskan ELISA okuyucuda 450 nm absorbansı ölçüldü. Standartlara göre standart eğri grafiği oluşturuldu ve deney gruplarının konsantrasyonları hesaplandı (CUSABIO TECHNOLOGY LLC n.d.-a).

Fare fibroblast hücreleri tarafından salgılanan TGF- β seviyelerini ölçmek üzere sandwich ELISA yöntemine dayanan deney düzeneği kullanıldı. Deney protokolüne uygun olarak standartlar ve ortamlar hazırlandı. Örneklerin ve ortamların hazırlanması basamağında IL6 ELISA deney hazırlığından farklı olarak TGF- β 'ya özgü antikorların sabitlendiği mikro plakalara asit aktivasyonu ve nötralizasyonu işlemlerinin uygulanması gerekmektedir. 100 μ l hücre kültürü ortamına 20 μ l hidroklorik asit (HCl) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Ardından 13 μ l 1.2 N

NaOH/0.5 M HEPES eklenerek nötralizasyon sağlandı. İyice karıştırıldı. IL6 için uygulandığı şekilde deney protokolü uygulandı (CUSABIO TECHNOLOGY LLC n.d.-b)

3.11. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Deney için 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 1×10^4 hücre ekildi. Hücrelerin tutulması için inkübatörde 24 saat bırakıldı. Hücrelerin ortamı belirli sürelerle dayanak materyallerine maruz bırakılan ortamlarla değiştirildi. 48 saat inkübasyonun ardından kuyucuk başına 100 μ l analiz tamponu ve 0,2 μ l ROS belirleme reaktifi koyu kırmızı eklendi. Bir saat 37 derecede inkübasyona bırakıldı. 640 nm dalga boyunda uyarılarak 675 nm deki ışıma ölçüldü.

3.12. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistik analizleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda IBM SPSS Statistic for Windows, Version 25.0.(IBM Corp. Released 2017, Armonk, NY) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Hipotez kontrol seviyesi $\alpha=0,05$ olarak belirlendi.

Sitotoksiste analizi olan XTT için materyal (lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik, PEEK, PMMA, titanyumve zirkonya; 5 grup), gün (1-3-7 gün; 3 grup) ve saat (24-48 saat, 2 grup) faktörlerinin hücresel canlılık üzerine etkileri ilk olarak 5x3x2 Faktöriyel Varyans Analizi yöntemiyle incelendi. Bu analizde elde edilen artık (residual) tahminleri üzerinden Kolmogorov-Smirnov yöntemi kullanılarak hücresel canlılık değişkeninin normal dağılıma uyumu kontrol edildi. Analiz sonucuna göre normal dağılım varsayımıyla ilgili sorun olmadığı saptandı ($p=0,200$). 5x3x2 Faktöriyel Varyans analizinde gün ile saat faktörleri arasında 2'li etkileşimin önemli olduğu ($p=0,010$) belirlendi. Çözüm olarak 2 saat grubunda ayrı ayrı 5x3 Faktöriyel Varyans Analizi ile materyal ve gün etkileri incelenirken, 3 gün grubunda ayrı ayrı 5x2 Faktöriyel Varyans analizi uygulanarak materyal ve saat etkileri incelendi. Günler arası ikili karşılaştırmalarda Post HOC yöntem olarak Tukey HSD yöntemi kullanıldı.

Verilerin analizinde ikiden fazla grup olması nedeniyle grupların birbirinden farklı olup olmadığının anlaşılması amacı ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu bulmak için ve grupları ikiyeşerli karşılaştırmak amacıyla Post- Hoc testleri yapıldı. Hangi Post- Hoc testinin

kullanılacağına karar vermek için ise varyansların homojenliğine bakıldı. Araştırmamızda gruplar arası farklılıklar Tukey testi ve Dunnet T3 testi ile analiz edildi.

4. Bulgular

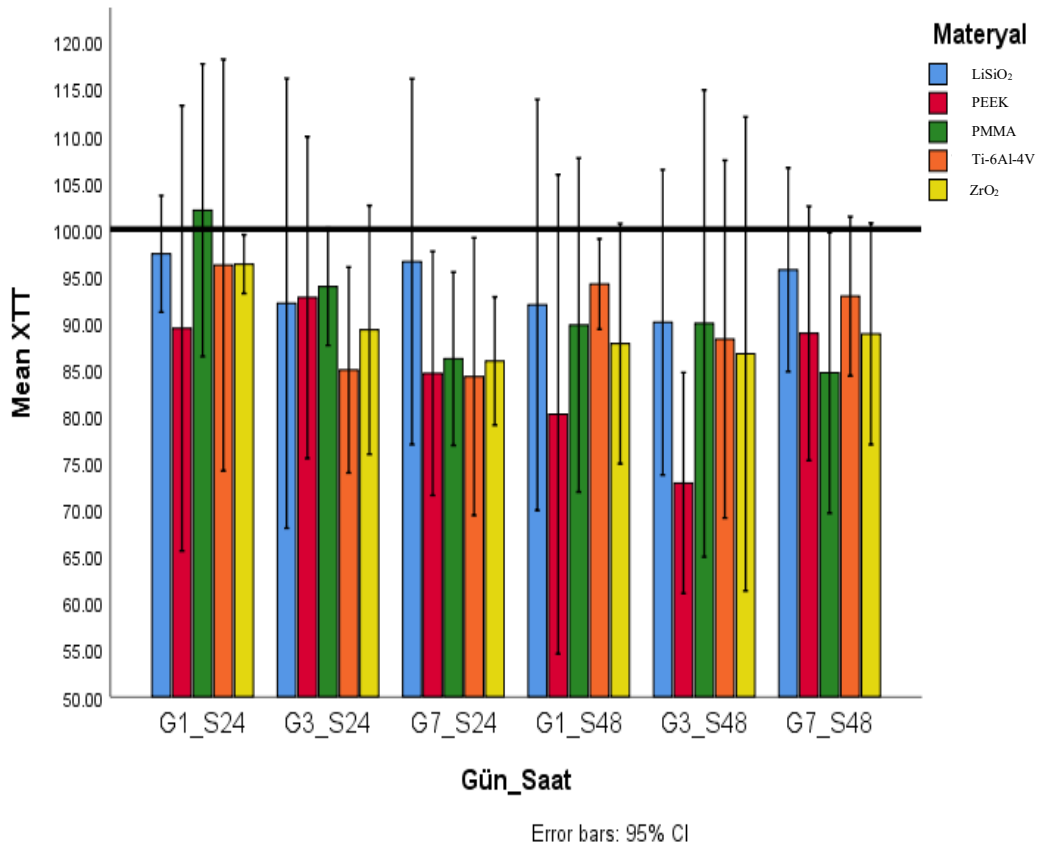
4.1. XTT Test Bulguları

XTT analiz kitindeki talimatlara uygun olarak 24 saat ve 48 saat süre ile dayanak materyallerine maruz bırakılan ortamlardan elde edilen absorbans ve standart sapma değerleri Tablo 7’de gösterilmiştir.

Materyal	Zaman	Absorbans Değeri $\pm$ standart sapma			
		1.Gün	3.Gün	7.Gün	
Lityum Disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik (LiSiO ₂)	24 saat/ kontrol	1,682 $\pm$ 0,095	1,667 $\pm$ 0,084	1,467 $\pm$ 0,044	
	24 saat/ materyal	1,563 $\pm$ 0,040	1,478 $\pm$ 0,155	1,550 $\pm$ 0,126	
	48 saat/ kontrol	2,130 $\pm$ 0,137	2,245 $\pm$ 0,207	2,519 $\pm$ 0,152	
	48 saat/ materyal	2,121 $\pm$ 0,187	2,081 $\pm$ 0,139	2,200 $\pm$ 0,093	
Polietereterketon (PEEK)	24 saat/ kontrol	1,682 $\pm$ 0,095	1,667 $\pm$ 0,084	1,467 $\pm$ 0,044	
	24 saat/ materyal	1,435 $\pm$ 0,154	1,488 $\pm$ 0,111	1,358 $\pm$ 0,084	
	48 saat/ kontrol	2,130 $\pm$ 0,137	2,245 $\pm$ 0,207	2,519 $\pm$ 0,152	
	48 saat/ materyal	1,874 $\pm$ 0,218	1,718 $\pm$ 0,101	2,056 $\pm$ 0,116	

Polimetilmetakrilat (PMMA)	24 saat/ kontrol	1,682 ± 0,095	1,667 ± 0,084	1,467 ± 0,044
	24 saat/ materyal	1,638 ± 0,101	1,253 ± 0,441	1,383 ± 0,060
	48 saat/ kontrol	2,130 ± 0,137	2,245 ± 0,207	2,519 ± 0,152
	48 saat/ materyal	2,075 ± 0,152	2,079 ± 0,212	1,967 ± 0,128
Titanyum (Ti)	24 saat/ kontrol	1,682 ± 0,095	1,667 ± 0,084	1,467 ± 0,044
	24 saat/ materyal	1,544 ± 0,142	1,364 ± 0,071	1,352 ± 0,096
	48 saat/ kontrol	2,130 ± 0,137	2,245 ± 0,207	2,519 ± 0,152
	48 saat/ materyal	2,168 ± 0,041	2,043 ± 0,163	2,140 ± 0,072
Zirkonya (ZrO₂)	24 saat/ kontrol	1,682 ± 0,095	1,667 ± 0,084	1,467 ± 0,044
	24 saat/ materyal	1,545 ± 0,020	1,433 ± 0,086	1,379 ± 0,044
	48 saat/ kontrol	2,130 ± 0,137	2,245 ± 0,207	2,519 ± 0,152
	48 saat/ materyal	2,033 ± 0,109	2,010 ± 0,216	2,055 ± 0,101

Tablo 7 XTT okunan materyal ve kontrol grubu absorbans değerleri ± standart sapma değerleri

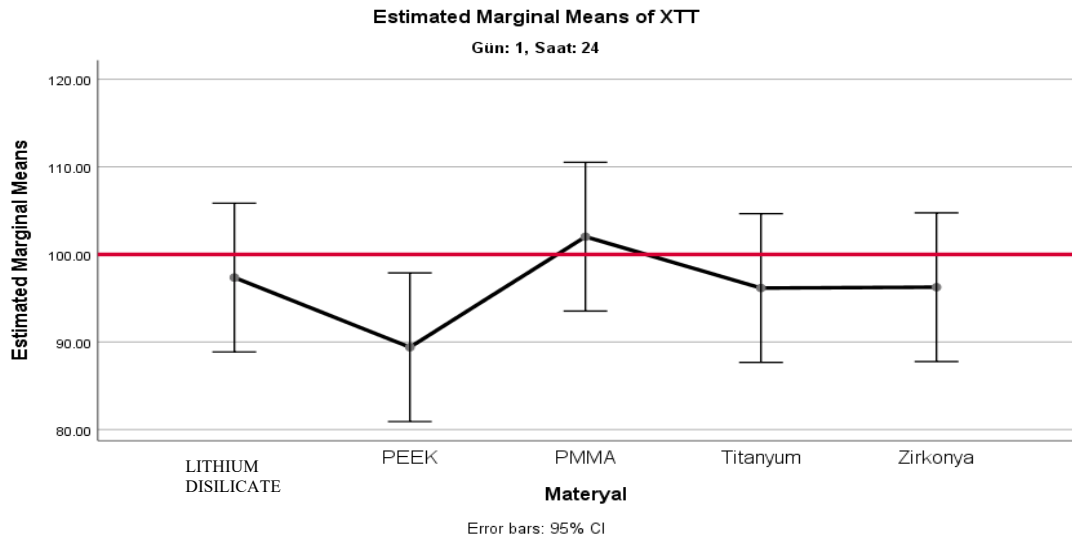


Grafik 1 Ortalama XTT -gün/saat grafiği (G1_S24: 1.Gün 24 saat, G3_S24; 3. Gün 24 saat; G7_S24: 7. Gün 24 saat; G1_S48: 1. Gün 48 saat; G3_S48: 3. Gün 48 saat; G7_S48: 7.gün 48 saat)

Materyal (lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik, PEEK, PMMA, titanyum ve zirkonya; 5 grup), gün (1-3-7 gün; 3 grup) ve saat (24-48 saat, 2 grup) faktörlerinin hücrel canlılık üzerine etkileri ilk olarak 5x3x2 Faktöriyel Varyans Analizi yöntemiyle incelendi. Bu analizde elde edilen artık (residual) tahminleri üzerinden Kolmogorov-Smirnov yöntemi kullanılarak hücrel canlılık değişkeninin normal dağılıma uyumu kontrol edildi. Analiz sonucuna göre normal dağılım varsayımıyla ilgili sorun olmadığı belirlendi ($p=0,200$). 5x3x2 Faktöriyel Varyans analizinde gün ile saat faktörleri arasında 2'li etkileşimin önemli olduğu ($p=0,010$) belirlendi. Faktöriyel Varyans analizi sonuçlarına dayanarak etkileşimin, farklı günlerde iki saat grubu arasında hücrel canlılıkta oluşan değişikliğin benzer yönde ve/veya benzer büyüklükte olmadığı anlaşılmaktadır. Buna dayanarak saat gruplarında yapılan

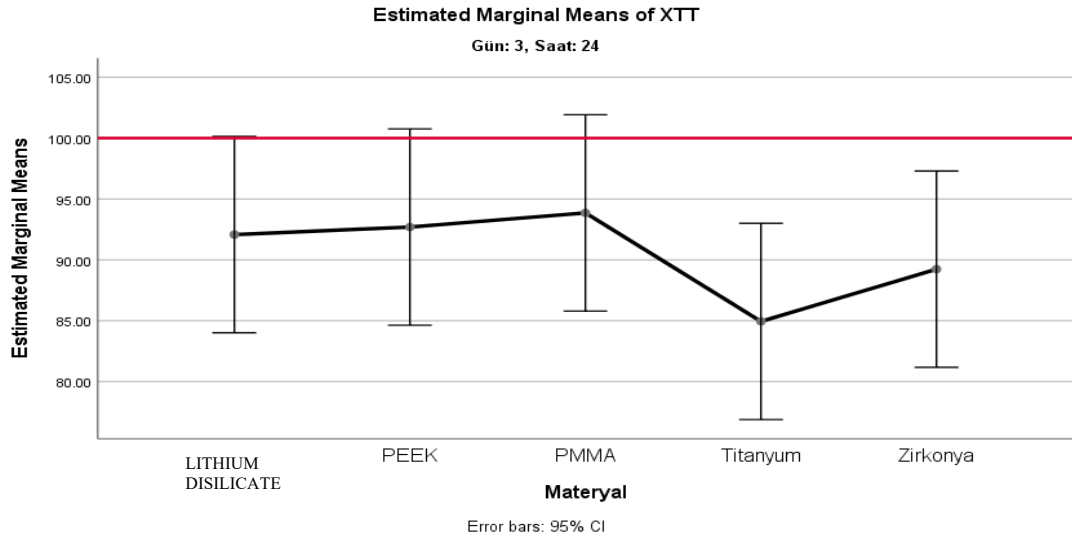
Faktöriyel Varyans analizi ile materyal- gün etkileşimi; gün gruplarında yine Faktöriyel Varyans analizi uygulanarak materyal- saat etkileşimi incelenmiştir.

- 24 saat grubunda yapılan analizde materyal x gün etkileşimi ($p=0,312$) ve materyaller arası farklılık ($p=0,083$) anlamlı bulunmazken, günler arası farklılık ($p=0,002$) anlamlı bulundu. Günler arası ikili karşılaştırmada Grafik 1 incelendiğinde gün arttıkça canlılık düzeyinin azaldığı görülmektedir. İkili analiz sonucunda 1. Gün ile 3. Gün ($p=0,042$) ve 7.Gün ($p=0,001$) arasında anlamlı fark gözlenirken, 3. ile 7. Gün arasında ($p=0,3633$) anlamlı farklılık gözlenmedi.
- 48 saat grubunda yapılan analizde materyal x gün etkileşimi ($p=0,453$) ve günler arası farklılık ($p=0,190$) anlamlı bulunmazken, materyaller arası farklılık ($p=0,008$) anlamlı bulundu. Grafik 1 incelendiğinde en yüksek canlılık düzeyinin sırasıyla lityum disilikat ve titanyum alaşım, en düşük değer ise PEEK materyalinde olduğu görülmektedir. İkili analiz sonucunda PEEK ile Lityum disilikat ($p=0,008$) ve titanyum alaşım($p=0,015$) farklılıkları anlamlı bulunurken, diğer ikili gruplar arası farklar anlamlı bulunmadı.



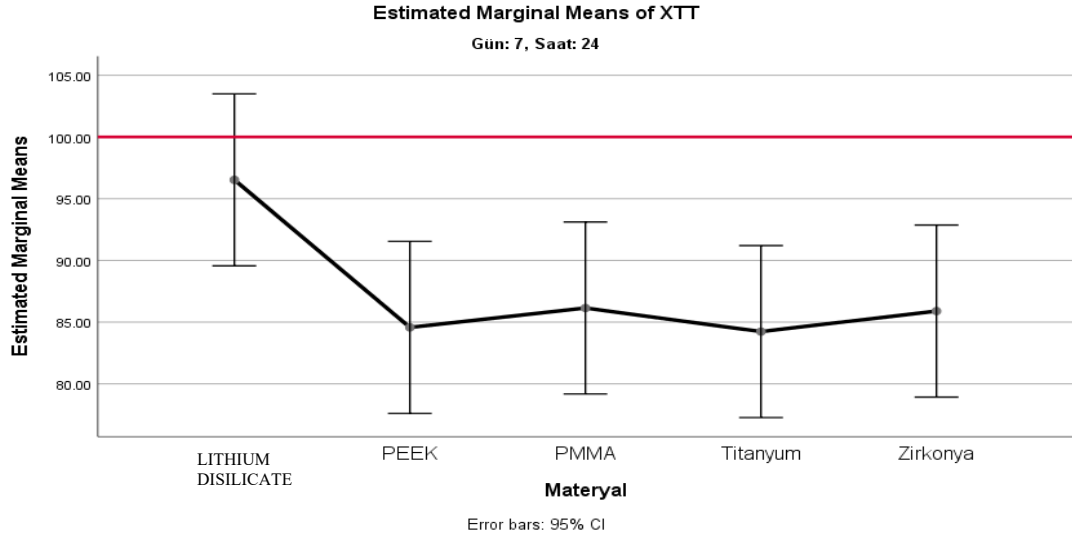
Grafik 2 1. Gün 24 saat XTT- Materyal grafiği

Grafik 2' de 24 saat 1. gün XTT analiz değerlerine göre materyaller arasında sadece PEEK dayanak materyali absorbans değeri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0,05$). Diğer dayanak materyalleri güven aralıkları kontrol grubu değerlerini barındırmaktadır. Anlamlı farklılık bulunmamaktadır.



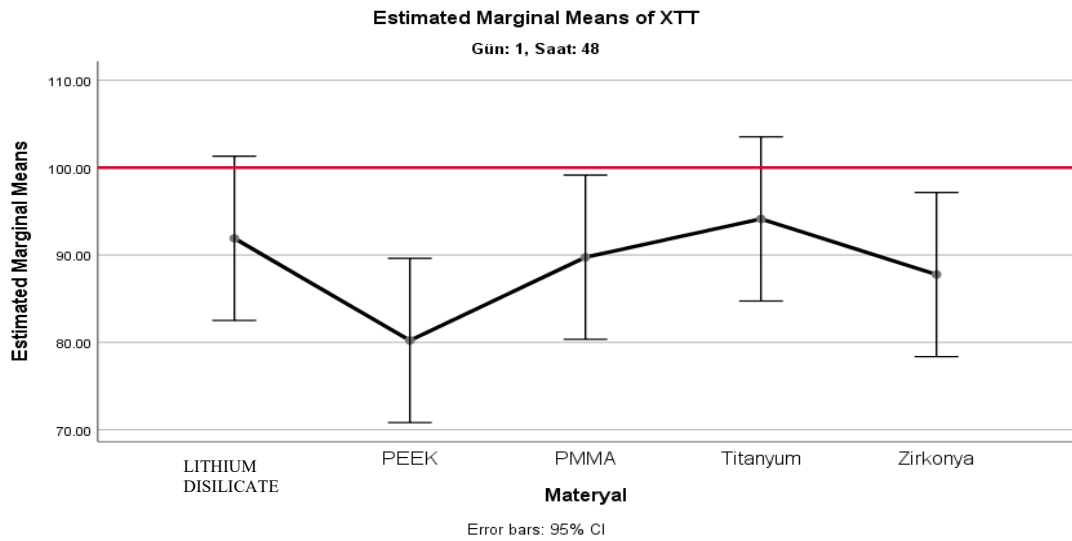
Grafik 3 3. Gün 24 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 3' te 24 saat 3. gün XTT analiz değerlerine göre titanyum alaşım ve zirkonya grupları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0,05$). Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik, PEEK ve PMMA dayanak grupları güven aralıkları kontrol grubu değerlerini içermektedir, anlamlı fark bulunmamıştır.



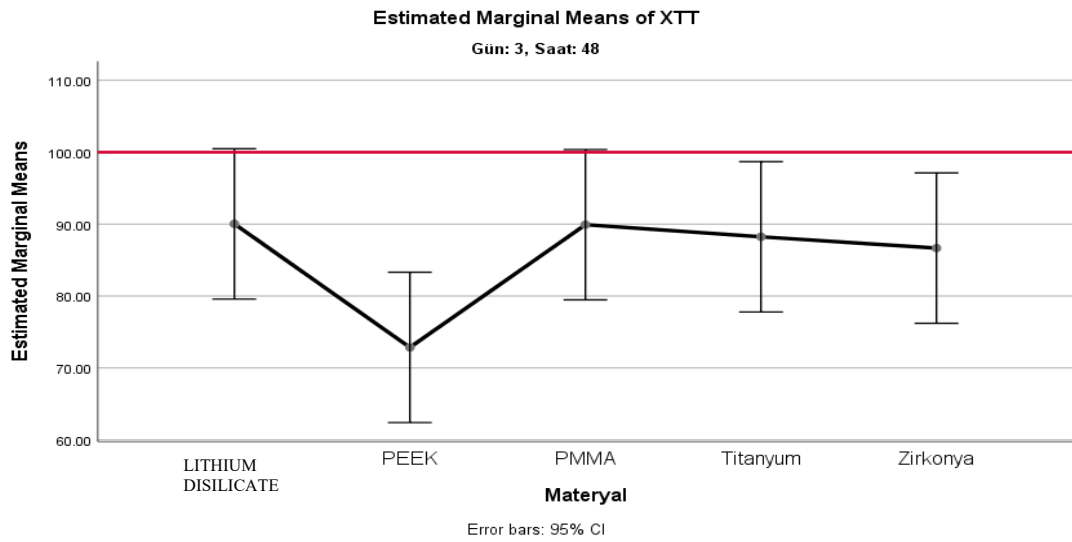
Grafik 4 7. Gün 24 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 4' te 24 saat 7. Gün XTT analiz değerleri incelendiğinde PEEK, PMMA, titanyum ve zirkonya dayanak gruplarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği izlenmektedir ($p < 0,05$). Sadece lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak grubu güven aralığı kontrol grubu değerlerini kapsamaktadır, anlamlı fark bulunmamıştır.



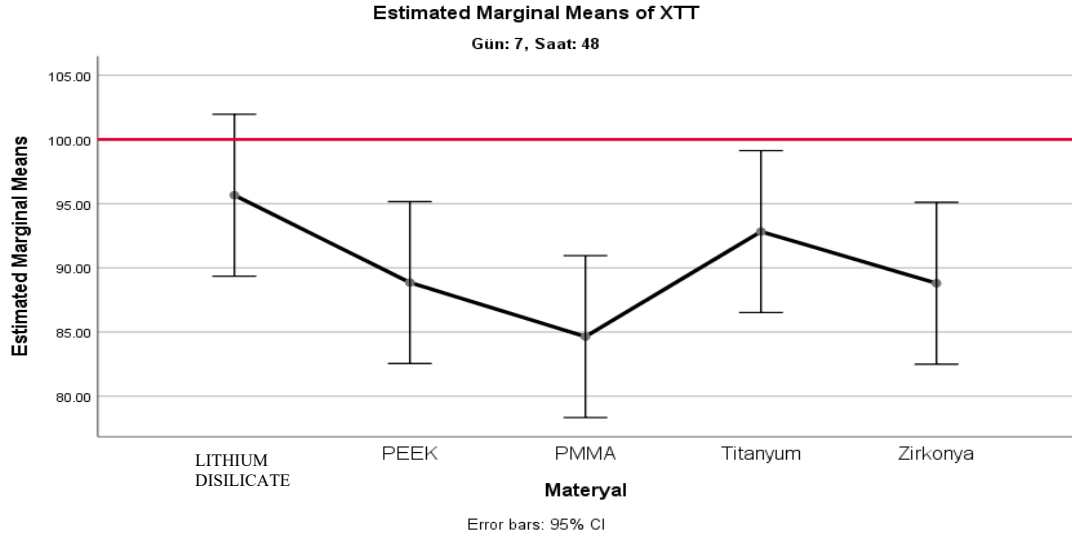
Grafik 5 1. Gün 48 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 5’ te 48 saat 1. gün XTT analiz değerleri incelendiğinde PEEK, PMMA ve zirkonya değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0,05$). Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik ve titanyum dayanak gruplarında güven aralığı kontrol değerlerini kapsamaktadır. Anlamlı fark bulunmamıştır.



Grafik 6 3. Gün 48 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 6’ da 48 saat 3. gün XTT analiz değerlerine göre PEEK, titanyum ve zirkonya dayanak grupları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0,05$). Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik ve PMMA dayanak grupları analiz değerlerinin güven aralığı kontrol grubu değerlerini kapsamaktadır. Anlamlı fark bulunmamıştır.



Grafik 7 7. Gün 48 saat XTT- materyal grafiği

Grafik 7’ de 48 saat 7. Gün XTT analiz değerleri incelendiğinde PEEK, PMMA, titanyum ve zirkonya dayanak gruplarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği izlenmektedir ($p<0,05$). 24 saat değerlerinde olduğu gibi sadece lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak grubu güven aralığı, kontrol grubu değerlerini kapsamaktadır. Anlamlı fark bulunmamıştır.

4.2. Apoptoz Test Bulguları

Kontrol grubunda 1. gün hücre canlılık değeri %93.3, erken apoptoz %0.2, geç apoptoz %2.1 ve nekroz değeri %4.4 olarak ölçülmüştür. 3. gün canlılık değeri %95.3, erken apoptoz %1.6, geç apoptoz %1.6 ve nekroz değeri %1.6’ dır. 7. gün canlılık seviyesi %96.9, erken apoptoz % 0.0, geç apoptoz %0.5, nekroz %2.6 olarak izlenmektedir. En yüksek canlılık değeri 7. günde, en düşük canlılık 1. günde görülmektedir.

Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak grubunda 1. gün canlı hücre düzeyi % 98.3, erken apoptoz değeri % 0.0, geç apoptoz değeri %0.1 ve nekroz değeri %1.6’ dır. 3. gün canlılık %98.9 olarak ölçülmüştür. Erken apoptoz değeri %0.0, geç apoptoz %0.0 ve nekroz değeri %1.1’ dir. 7. gün değerleri ise şu şekildedir: canlılık %98.5, erken apoptoz %0.0, geç apoptoz %0.0 ve nekroz %1.5. en yüksek canlılık değeri 3. günde, en düşük canlılık değeri ise 1. günde görülmüştür.

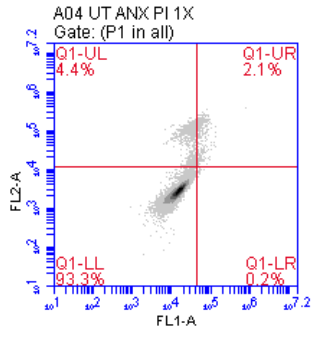
PEEK dayanak grubu apoptotik değerleri 1. gün için %94.1 canlılık, %1.9 erken apoptoz, %1.6 geç apoptoz ve %2.4 nekroz şeklindedir. 3. gün hücre canlılığı %96.4, erken apoptoz %0.7, geç apoptoz %0.9 ve nekroz %2.0 olarak llmştır. 7. Günde ise hücre canlılığı %99.1, erken apoptoz %0.2, geç apoptoz % 0.4 ve nekroz %0.4 olarak kaydedilmiştir. En yüksek canlılık değeri 7. günde, en düşük canlılık değeri 1. günde izlenmektedir.

PMMA dayanak grubu için analiz değerleri 1. gün için hücre canlılığı %95.1, erken apoptoz %1.2, geç apoptoz %1, nekroz %2.7’ dir. 3. günde hücre canlılığı %99.4, erken apoptoz %0.1, geç apoptoz %0.1 ve nekroz %0.3 değerlerindedir. 7. günde ise hücre canlılığı değeri %99.7, erken apoptoz %0.1, geç apoptoz %0.1 ve nekroz %0.1 olarak llmştır. En yüksek canlılık düzeyi 7. günde, en düşük canlılık düzeyi 1. günde kaydedilmiştir.

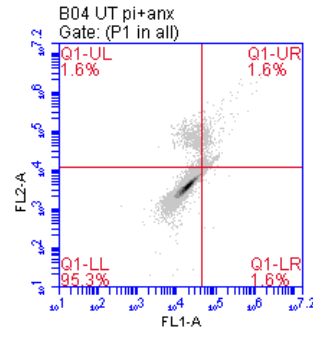
Titanyum dayanak grubunda 1. günde canlılığı %97.8 olarak gözlenmektedir. Erken apoptoz değeri %0.3, geç apoptoz %1 ve nekroz %0.8’ dir. 3. gün hücre canlılığı % 98.8, erken apoptoz %0.0, geç apoptoz %0.1 ve nekroz %1.1 geğerindedir. 7. gün için hücre canlılık değeri %97.5, erken apoptoz %0.4, geç apoptoz %1.6 ve nekroz %0.5’ tir. En yüksek canlılık düzeyi 3. günde, en düşük canlılık düzeyi 7. günde grlmştır.

Zirkonya dayanak grubu için 1. gün hücre canlılık değeri %96.2, erken apoptoz %0.4, geç apoptoz %1.6 ve nekroz değeri %1.8’ dir. Bu değerleri 3. günde hücre canlılığı için %93.5, erken apoptoz için %0.5, geç apoptoz için %4.7 ve nekroz için %1.3 değerleri takip etmektedir. 7. günde ise hücre canlılık değeri %94.6, erken apoptoz değeri %0.7,geç apoptoz değeri %3.6 ve nekroz değeri %1.1 olarak izlenmektedir. En yüksek canlılık düzeyi 1. günde, en düşük canlılık 3. günde izlenmektedir.

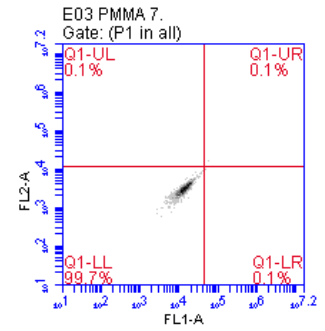
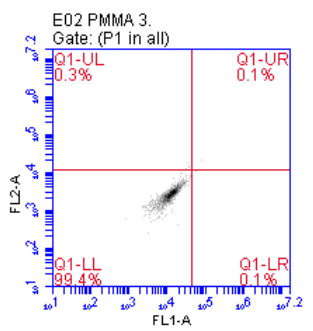
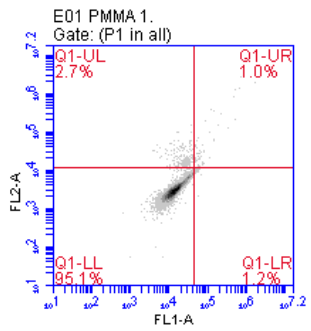
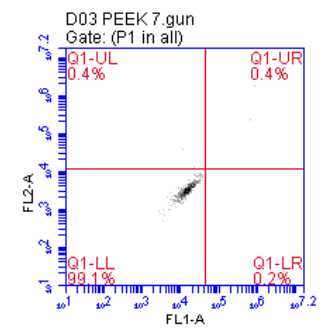
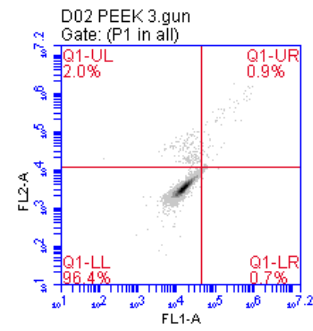
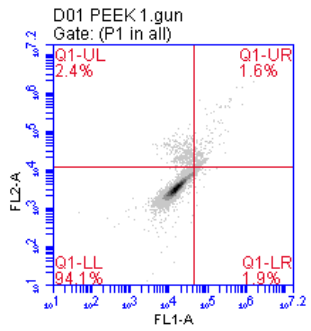
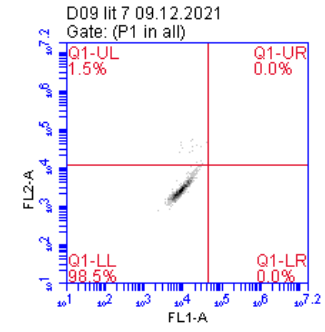
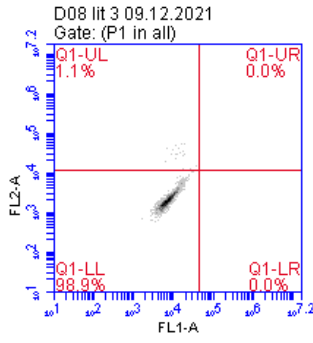
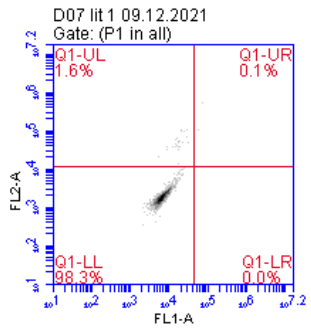
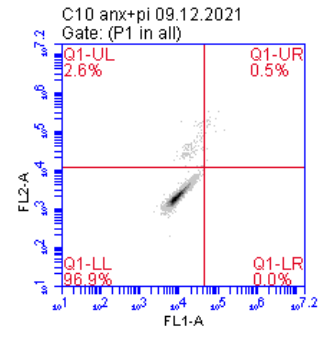
1. Gün

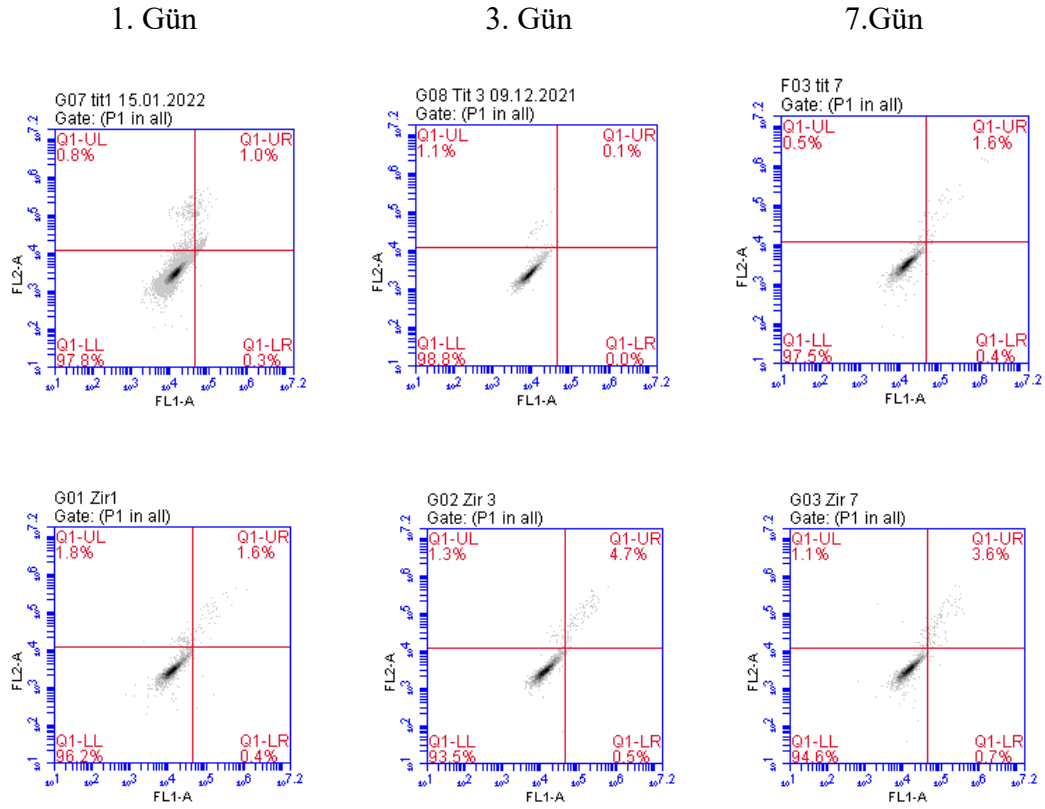


3. Gün



7. Gün





Grafik 8 Annexin/PI ile boyanarak apoptotik etkinin ölçüldüğü ELISA test sonuçlarının akış sitometri cihazı ile analizi. (LL: Vital hücreler, LR: Erken apoptoz, UR: Geç apoptoz, UL: Nekroz bölgelerini göstermektedir.)

Apoptoz değerlerinin bir arada değerlendirilmesiyle oluşturulan grafiklere (Grafik 9-14) göre analiz değerleri şu şekildedir: Kontrol grubunda 1. gün canlılık değerleri %93.3, apoptoz değeri %2.3 ve nekroz değeri %4.4' tür. 3. gün canlılık değeri %95.3, apoptoz değeri %3.2 ve nekroz değeri %1.6 olarak ölçülmüştür. 7. günde hücre canlılığı %96, apoptoz %0.5 ve nekroz %2.6' dır. (Grafik 9)

Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik grubunda 1. gün hücre canlılığı değeri %98.3, apoptoz değeri %0.1 ve nekroz değeri %1.6' dır. 3. gün hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz değerleri sırasıyla %98.9, %0.0 ve %1.1' dir. 7. gün hücre canlılığı değeri %98.5, apoptoz değeri %0.0 ve nekroz değeri %1.5 olarak ölçülmüştür. (Grafik 10)

PEEK dayanak grubunda ise 1. gün hücre canlılığı %94.1 iken apoptoz %3.5, nekroz değeri %2.4 olarak izlenmektedir. 3. Gün değerleri canlılık, apoptoz ve nekroz için

sırasıyla %96.4, %1.6 ve %2 şeklindedir. 7. günde ise hücre canlılığı %99.1, apoptoz %0.6 ve nekroz %0.4 olarak değerlendirilmiştir. (Grafik 11)

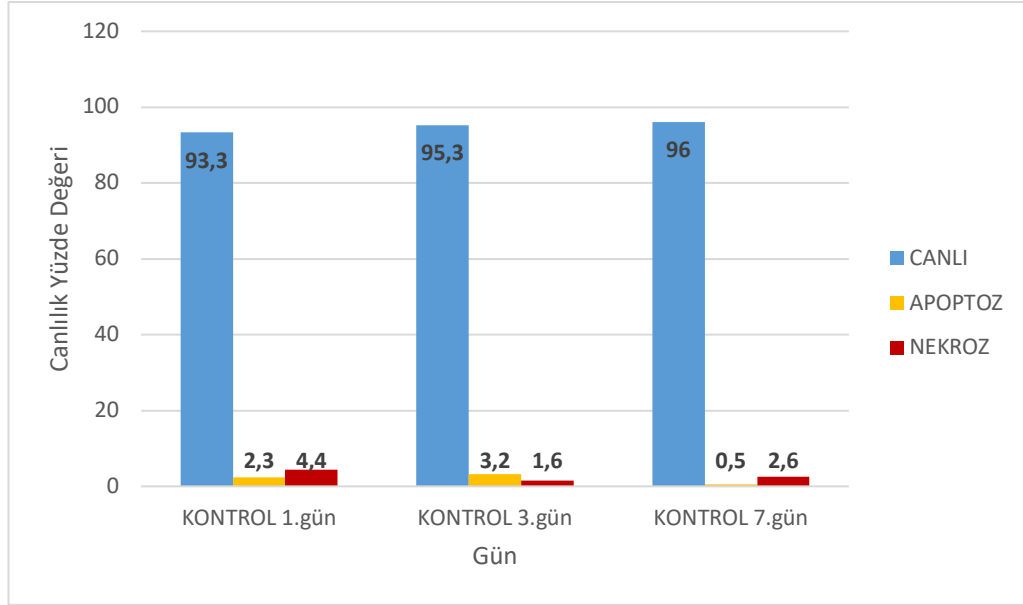
PMMA dayanak grubu için 1. gün hücre canlılık seviyesi % 95.1'dir. Apoptoz değeri % 2.2 ve nekroz değeri %2.7 olarak ölçülmüştür. 3. gün hücre canlılığı değeri %99.4, apoptoz değeri %0.2 ve nekroz değeri %0.3 olarak görülmektedir. 7. günde ölçülen analiz değerleri hücre canlılığı için % 99.7, apoptoz için %0.1 ve nekroz için %0.1'dir. (Grafik 12)

Titanyum dayanak grubu için sonuçlar incelendiğinde 1. günde hücre canlılık değerinin %96, apoptoz değerinin %0.3 ve nekrozun %3.7 olduğu izlenir. 3. günde hücre canlılığı için değer %98.8, apoptoz için %0.1 ve nekroz için %1.1 olarak kaydedilmiştir. 7. günde hücre canlılık değeri %97.5, apoptoz değeri %2 ve nekroz değeri %0.5'tir. (Grafik 13)

Zirkonya dayanak grubu için 1. gün hücre canlılık değeri %96.2, apoptoz değeri %2.4 ve nekroz değeri %2 olarak izlenmektedir. 3. gün hücre canlılığı %93.5, apoptoz %5.2 ve nekroz %1.3'tür. 7. günde ise hücre canlılık değeri, apoptoz değeri ve nekroz değeri sırasıyla %94.6, %4.3 ve %1.1'dir. (Grafik 14)

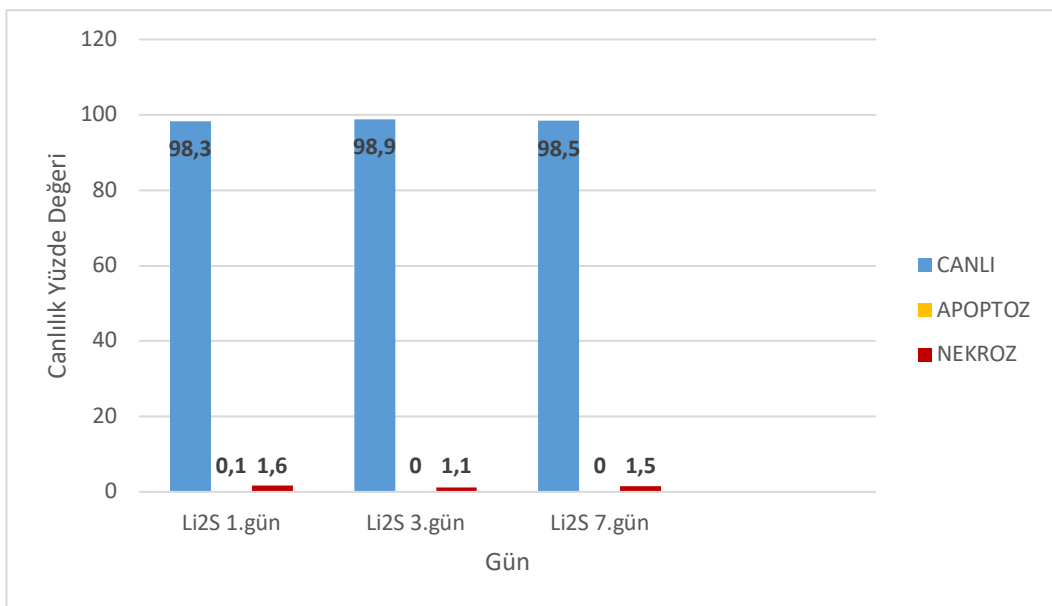
Bu verilere dayanarak zirkonya dayanak materyali dışında diğer dayanak materyallerine ait analiz verilerinin kontrol grubu değerlerinin altında olduğu görülmüştür. Takibi yapılan üç gün (1.,3. ve 7. gün) için zirkonya dayanak materyali apoptoz değerleri kontrol grubu değerleri üzerindedir. Bu nedenle zirkonya dayanak materyalinin hücre apoptozunu artırıcı etkisi olduğu düşünülmektedir.

KONTROL



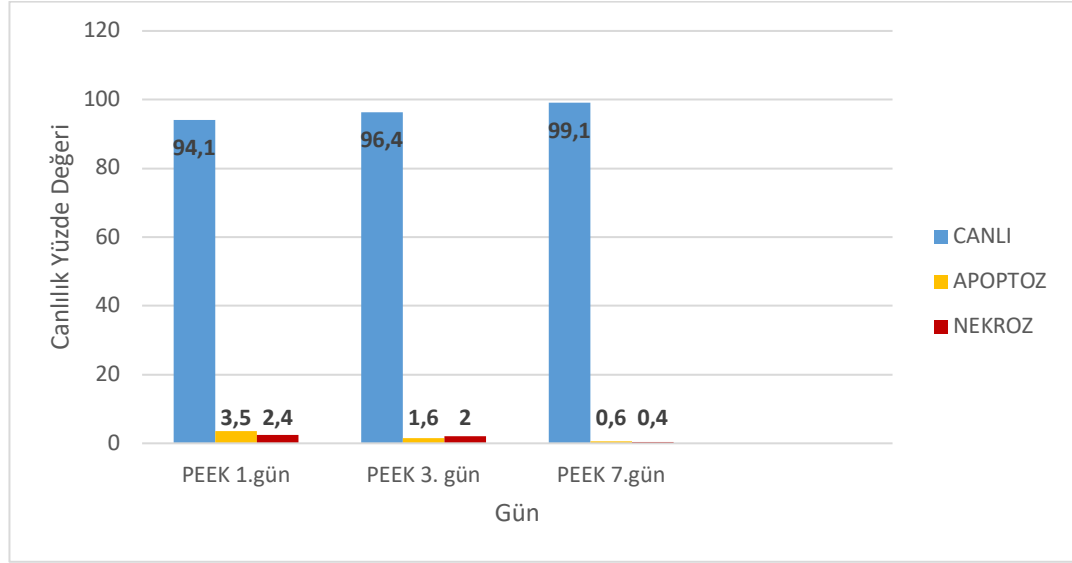
Grafik 9 Kontrol grubu Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri (canlı: hücre canlılık değeri, apoptoz:erken apoptoz + geç apoptoz, nekroz: nekrotik hücre değeri)

LİTYUM DİSİLİKAT İLE GÜÇLENDİRİLMİŞ CAM SERAMİK



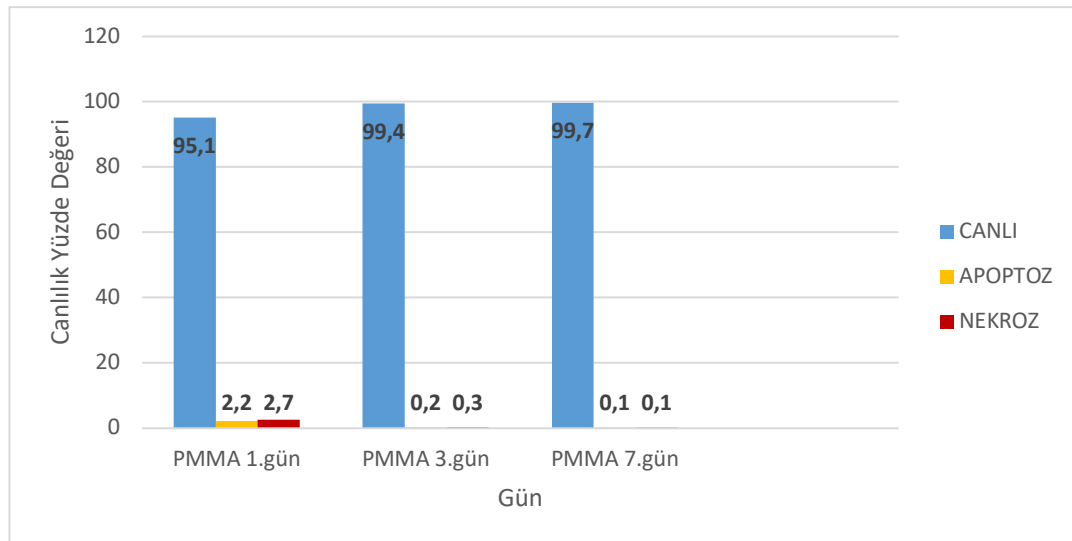
Grafik 10 Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri (canlı: hücre canlılık değeri, apoptoz: erken apoptoz + geç apoptoz, nekroz: nekrotik hücre değeri)

POLİETERETERKETON (PEEK)



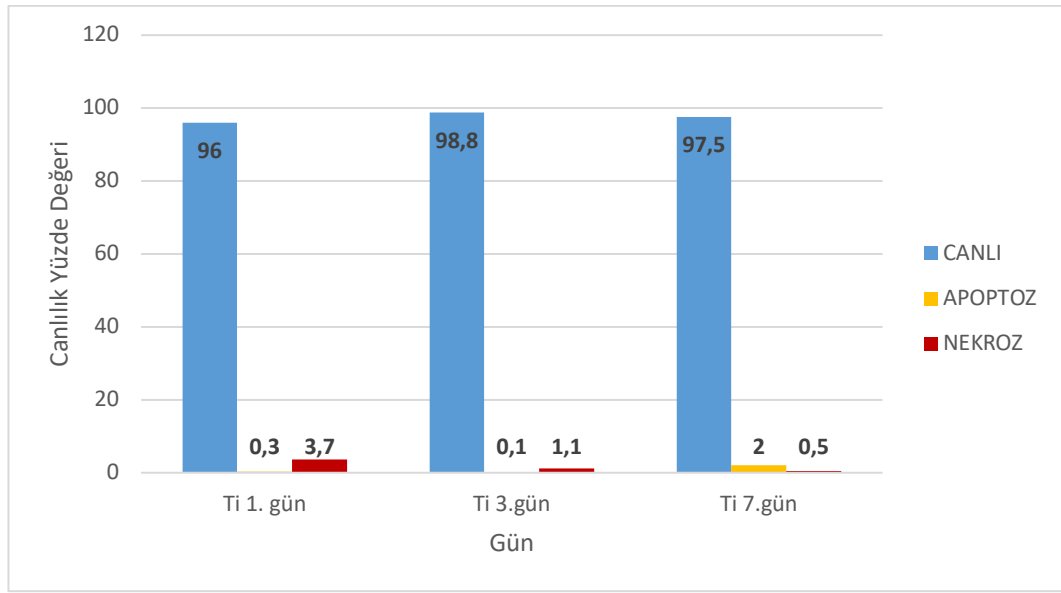
Grafik 11 PEEK dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri (canlı: hücre canlılık değeri, apoptoz: erken apoptoz + geç apoptoz, nekroz: nekrotik hücre değeri)

POLİMETİLMETAKRİLAT (PMMA)



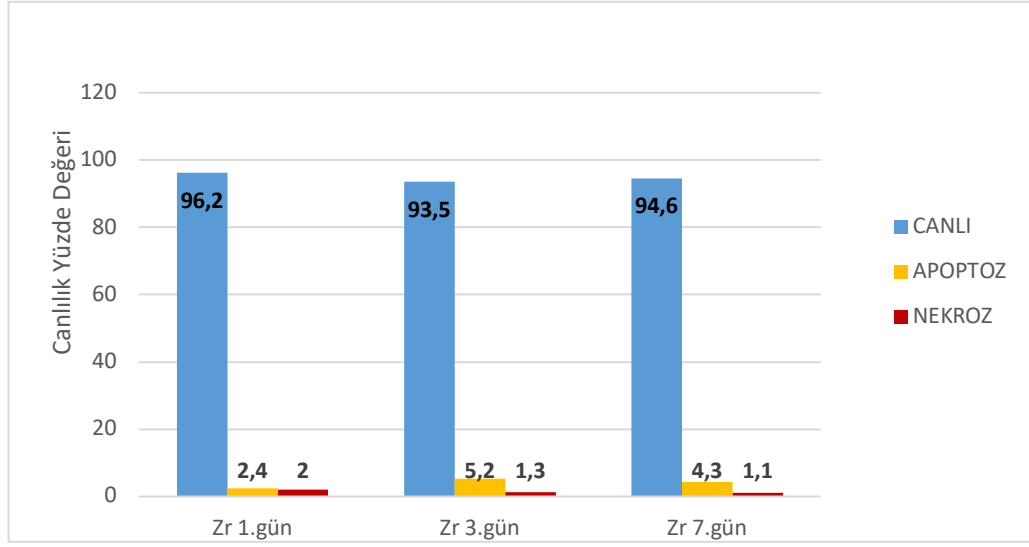
Grafik 12 PMMA dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri (canlı: hücre canlılık değeri, apoptoz: erken apoptoz + geç apoptoz, nekroz: nekrotik hücre değeri)

TİTANYUM

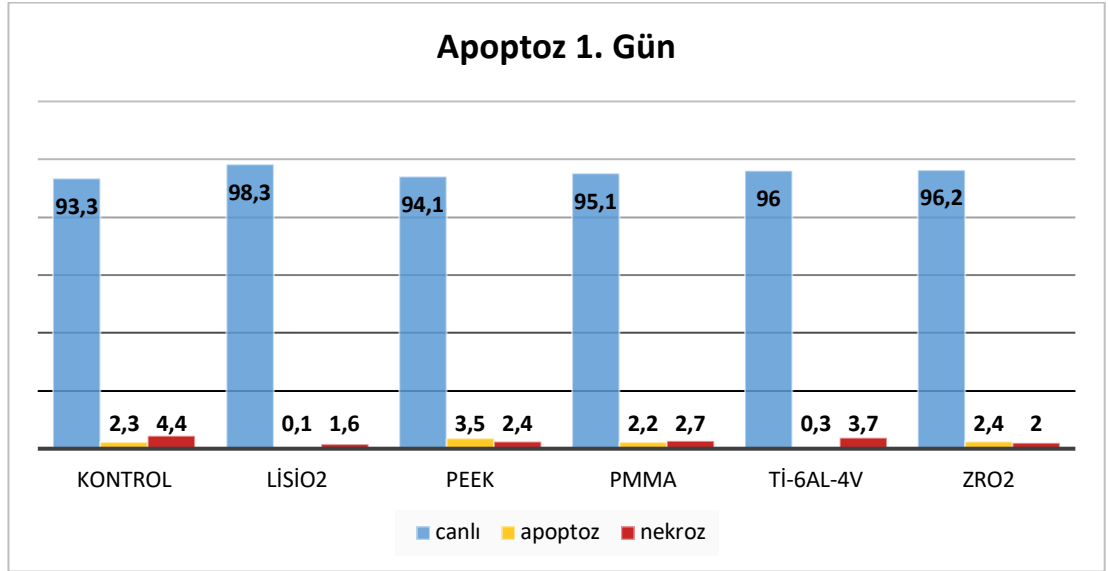


Grafik 13 Titanyum dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri (canlı: hücre canlılık değeri, apoptoz: erken apoptoz + geç apoptoz, nekroz: nekrotik hücre değeri)

ZİRKONYA



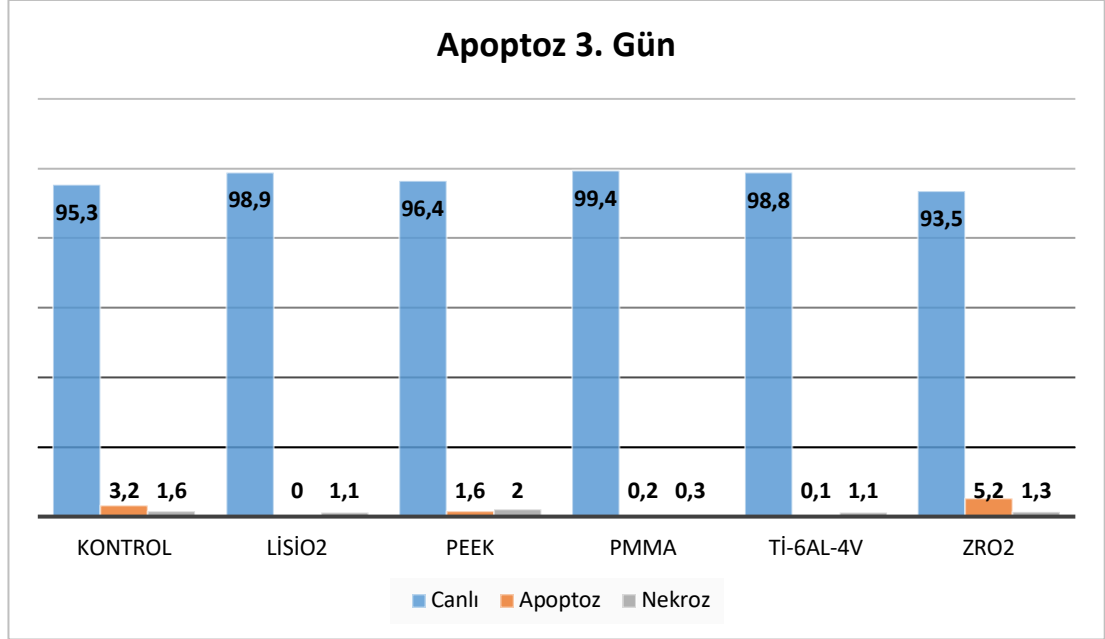
Grafik 14 Zirkonya dayanak materyali Annexin/PI apoptoz testi sonuç grafikleri (canlı: hücre canlılık değeri, apoptoz: erken apoptoz + geç apoptoz, nekroz: nekrotik hücre değeri)



Grafik 15 Dayanak materyalleri apoptoz test 1. gün sonuçları grafiği

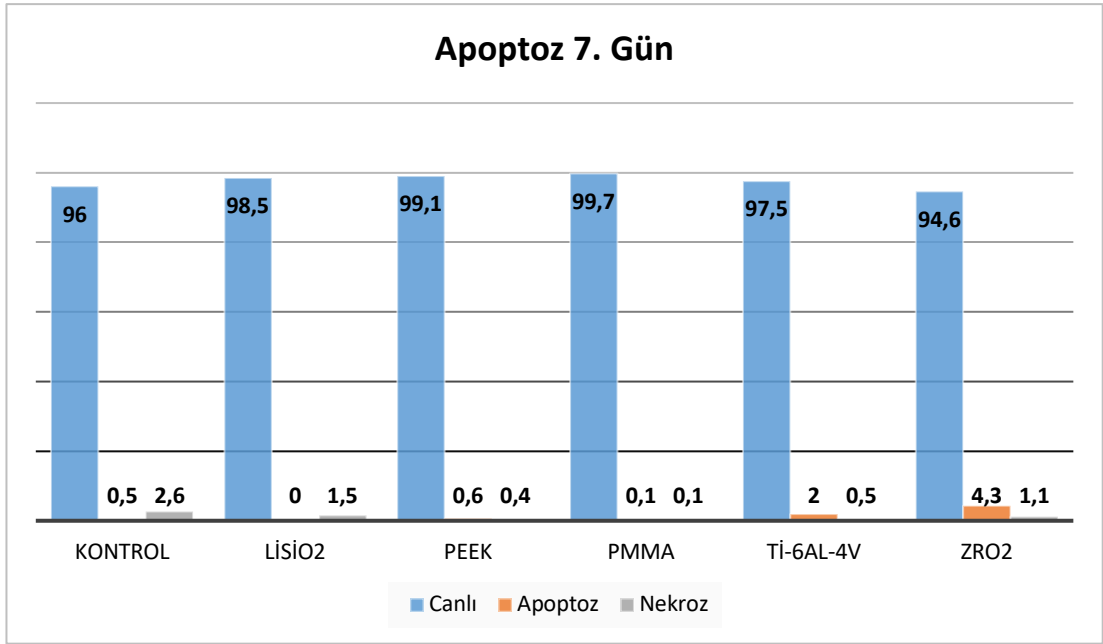
Apoptoz test sonuçlarının 1. gün değerlerine göre en yüksek canlılık lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak materyalinde izlenirken en yüksek nekroz değeri kontrol grubunda görülmektedir. En düşük canlılık değeri kontrol grubunda, en

düşük nekroz değeri lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak materyali grubunda bulunmuştur.



Grafik 16 Dayanak materyalleri apoptoz test 3. gün sonuçları grafiği

Apoptoz testi 3. gün değerleri incelendiğinde en yüksek canlılık değeri PMMA dayanak materyal grubunda, en düşük canlılık değeri ise zirkonya dayanak materyal grubunda izlenmektedir. En yüksek nekroz değeri PEEK materyal grubu, en düşük nekroz değeri ise PMMA dayanak materyal grubunda ölçülmüştür.



Grafik 17 Dayanak materyalleri apoptoz test 7. gün sonuçları grafiği

7. gün apoptoz test sonuçlarına göre en yüksek canlılık değeri PMMA dayanak materyal grubunda, en düşük canlılık değeri ise zirkonya dayanak materyal grubunda izlenmektedir. En yüksek nekroz değeri kontrol grubunda, en düşük nekroz değeri PMMA dayanak materyal grubunda görülmektedir.

4.3. IL6 ve TGF- β Test Bulguları

IL6, TGF- β Test ve ROS bağımlı değişkenleri için beş grup (Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik, PEEK, PMMA, titanyum, zirkonya) materyal ve üç (1, 3, 7) gün olmak üzere iki bağımsız değişken (faktör) ve ek olarak kontrol grubu ile birlikte iki tekrarlı 16 farklı analiz gerçekleştirildi. Kontrol grubunda gün bulunmadığı için faktöriyel yapıyı bozması sebebiyle ilk aşamada kontrol grubu dışarıda bırakılarak 5x3 faktöriyel varyans analizi yapıldı; materyal ve gün faktörlerinin bağımlı değişkenler üzerine etkileri incelendi.

TGF- β için yapılan analizde materyal x gün ikili etkileşimi anlamlı ($p=0,013$) bulundu. Etkileşimin anlamlı çıkması, farklı materyallerde günler arası değişimin benzer yönde ve/veya benzer büyüklükte olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç olarak hem materyal ve gün kombinasyonları arasındaki hem de kontrol grubuna göre farkları birlikte incelemek amacıyla ($5 \times 3 + 1 = 16$) 16 grup karşılaştırması

için Tek Yönlü Varyans Analizi uygulandı. Bu analizden elde edilen artık değerleri (residuals) kullanılarak normal dağılım kontrolü Shapiro-Wilk testiyle incelendi. Test sonucunda üç değişken için normal dağılımla ilgili sorun olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Varyansların homojen olmadığı görüldü ($p<0,001$); gruplar arası çoklu karşılaştırma için F yerine Welch istatistiği kullanıldı. Bu test sonucunda $p<0,05$ ise, yani genel olarak grup arasında fark anlamlı bulunduğundan, ikili karşılaştırmalarda Post-Hoc test olarak Dunnett T3 yöntemi kullanıldı.

Özet istatistiklerin yer aldığı (ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler) tablo ve tek yönlü varyans analizinden elde edilen ortak standart sapma kullanılarak hesaplanan güven aralıklarına ait grafik aşağıda sunulmuştur.

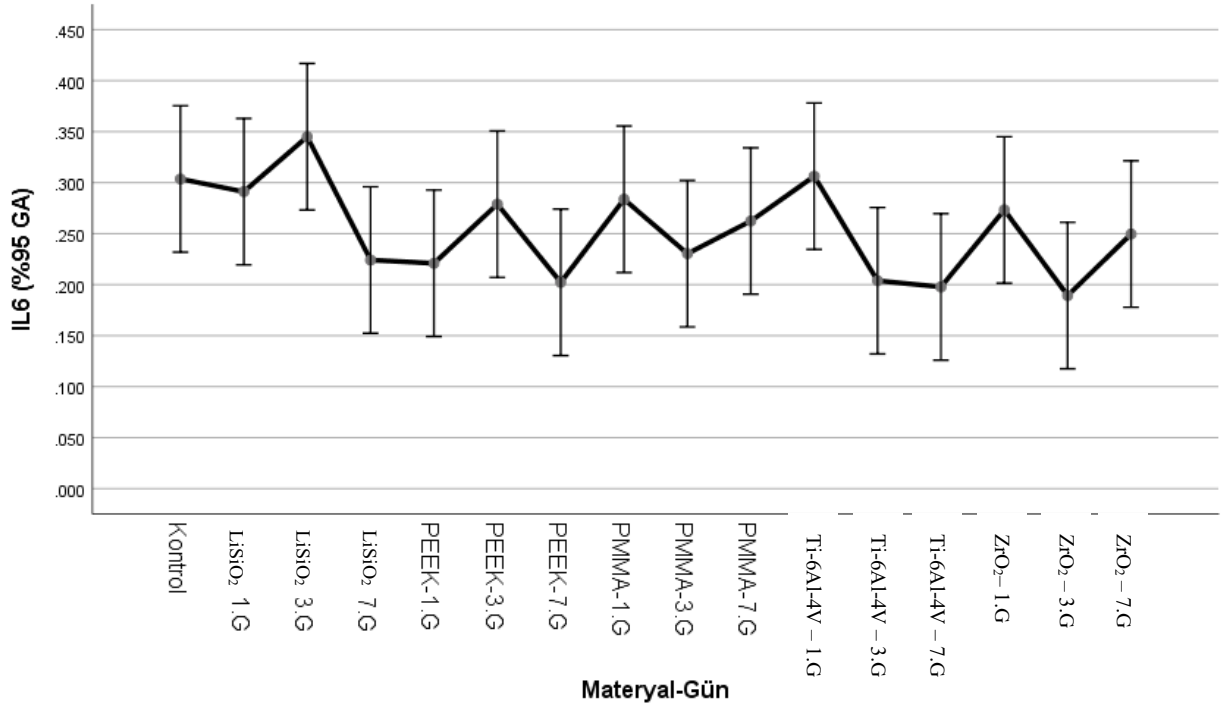
IL6 için 16 grup arasındaki karşılaştırma sonucunda, Welch istatistiğine göre farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p=0,095$). Buna dayanarak “günler arası farklılık tüm materyal gruplarında benzer yönde ve büyüklükte olmuştur” sonucuna ulaşılır. Çoklu karşılaştırmada farklılık anlamlı olmadığı için ikili karşılaştırmaya gidilmemiştir.

Kontrol grubu ortalama değeri 0.304, standart sapması 0.0327’ dir. Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik 1. gün ortalama değeri 0.291, standart sapması 0.0136; 3. gün ortalama değeri 0.345, standart sapması 0.0424; 7. gün ortalama değeri 0.224, standart sapma değeri 0.0151’ dir. PEEK dayanak grubunda 1. gün ortalama değeri 0.221, standart sapma değeri 0.0345; 3. gün ortalama değeri 0.279, standart sapması 0.0699; 7. gün ortalama değeri 0.202, standart sapma değeri ise 0.0310’ dur. PMMA dayanak grubu için 1. gün ortalama değeri 0.284, standart sapma değeri 0.0372; 3. gün ortalama değeri 0.230, standart sapma değeri 0.0050; 7. gün ortalama değeri 0.262, standart sapma değeri 0.05278’ dir. Titanyum dayanak grubunda 1. gün ortalama değeri 0.306, standart sapma değeri 0.0836; 3. gün ortalama değeri 0.204, standart sapma değeri 0.0318; 7. gün ortalama değeri 0.198, standart sapma değeri ise 0.0284’ tür. Son olarak zirkonya dayanak grubunda 1. gün ortalama değeri 0.273, standart sapma değeri 0.1141; 3. gün ortalama değeri 0.189, standart sapma değeri 0.0100; 7. gün ortalama değeri 0.250, standart sapma değeri 0.0167’ dir ($p<0,05$). Lityum 3.gün (0,345), kontrol grubunda (0,304), Titanyum 1.gün (0,306) gruplarında IL6 ölçümü en yüksek iken Zirkonya 3.gün (0,189), Titanyum 7.gün (0,198), Titanyum 3.gün (0,204) gruplarında IL6 ölçümü en düşüktür.

Özet istatistiklerin yer aldığı (ortama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler) tablo ve tek yönlü varyans analizinden elde edilen ortak standart sapma kullanılarak hesaplanan güven aralıklarına ait tablo ve grafik Tablo 8 ve Grafik 18’de sunulmuştur.

IL6 (n=2)				
Uygulama Grubu	Ortalama	Std, Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	0,304	0,0327	0,281	0,327
LiSiO₂-1.Gün	0,291	0,0136	0,282	0,301
LiSiO₂-3.Gün	0,345	0,0424	0,315	0,375
LiSiO₂-7.Gün	0,224	0,0151	0,214	0,235
PEEK-1.Gün	0,221	0,0345	0,197	0,245
PEEK-3.Gün	0,279	0,0699	0,230	0,328
PEEK-7.Gün	0,202	0,0310	0,180	0,224
PMMA-1.Gün	0,284	0,0372	0,257	0,310
PMMA-3.Gün	0,230	0,0050	0,227	0,234
PMMA-7.Gün	0,262	0,0528	0,225	0,300
Ti-6Al-4V-1.Gün	0,306	0,0836	0,247	0,365
Ti-6Al-4V-3.Gün	0,204	0,0318	0,181	0,226
Ti-6Al-4V-7.Gün	0,198	0,0284	0,178	0,218
ZrO₂ -1.Gün	0,273	0,1141	0,193	0,354
ZrO₂ -3.Gün	0,189	0,0100	0,182	0,196
ZrO₂ -7.Gün	0,250	0,0167	0,238	0,261

Tablo 8 IL6 analizi özet istatistik tablosu



Grafik 18 IL6 analiz grafiği

TGF- β için 16 grup arasındaki karşılaştırma sonucunda, Welch istatistiğine göre farklılık anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$). Çoklu karşılaştırmada farklılık anlamlı olduğu için ikili Dunnet T3 yöntemiyle ikili karşılaştırmaya gidilmiştir. Analiz sonucuna göre sadece kontrol grubu ile en yüksek TGF- β düzeyinin gözlemlendiği PMMA 1.gün kombinasyonu arasındaki farklılık ($p=0,041$) anlamlı bulundu. Diğer ikili karşılaştırmaların tümünde fark anlamlı bulunmadı ($p>0,05$)

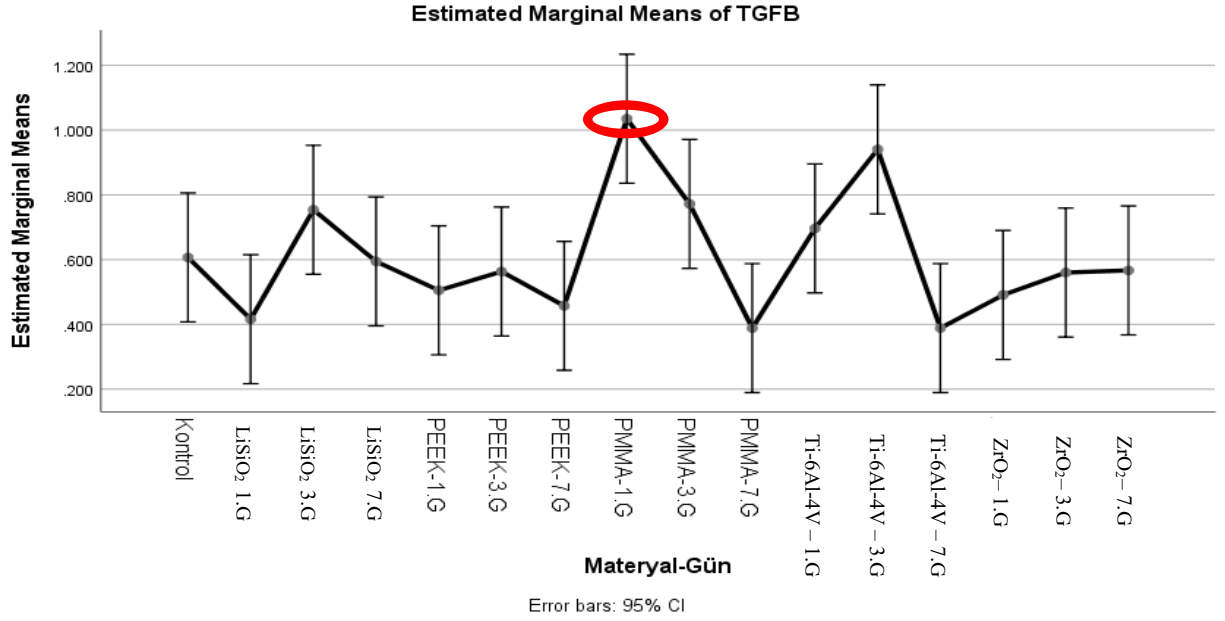
Kontrol grubu ortalama değeri 0.607, standart sapması 0.0311' dir. Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik 1. gün ortalama değeri 0.416, standart sapması 0.0705; 3. gün ortalama değeri 0.754, standart sapması 0.1573; 7. gün ortalama değeri 0.594, standart sapma değeri 0.1502' dir. PEEK dayanak grubunda 1. gün ortalama değeri 0.505, standart sapma değeri 0.0863; 3. gün ortalama değeri 0.563, standart sapması 0.1748; 7. gün ortalama değeri 0.457, standart sapma değeri ise 0.0044' tür. PMMA dayanak grubu için 1. gün ortalama değeri 1.035, standart sapma değeri 0.0306; 3. gün ortalama değeri 0.772, standart sapma değeri 0.3599; 7. gün ortalama değeri 0.389, standart sapma değeri 0.0939' dur. Titanyum dayanak grubunda 1. gün ortalama değeri 0.696, standart sapma değeri 0.1109; 3. gün ortalama değeri 0.940, standart sapma değeri 0.1557; 7. gün ortalama değeri 0.389, standart sapma değeri ise 0.0535' tir. Son

grup olan zirkonya dayanak grubunda ise 1. gün ortalama değeri 0.491, standart sapma değeri 0.0650; 3. gün ortalama değeri 0.560, standart sapma değeri 0.0579; 7. gün ortalama değeri 0.567, standart sapma değeri 0.0694' tür ($p<0,05$). PMMA 1.gün (1,035), Titanyum 3.gün (0,940), Lityum 3.gün grubunda (0,754) gruplarında TGF- β ölçümü en yüksek iken Titanyum 7.gün (0,389), PMMA 7.gün (0,389), Lityum 1.gün (0,416) gruplarında TGF- β ölçümü en düşüktür.

Özet istatistiklerin yer aldığı (ortama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler) tablo ve tek yönlü varyans analizinden elde edilen ortak standart sapma kullanılarak hesaplanan güven aralıklarına ait tablo ve grafik Tablo 9 ve Grafik 19'da sunulmuştur.

TGF- β (n=2)				
Uygulama Grubu	Ortalama	Std, Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	0,607	0,0311	0,585	0,629
LiSiO₂-1.Gün	0,416	0,0705	0,366	0,466
LiSiO₂-3.Gün	0,754	0,1573	0,643	0,865
LiSiO₂-7.Gün	0,594	0,1502	0,488	0,701
PEEK-1.Gün	0,505	0,0863	0,444	0,566
PEEK-3.Gün	0,563	0,1748	0,440	0,687
PEEK-7.Gün	0,457	0,0044	0,454	0,460
PMMA-1.Gün	1,035	0,0306	1,013	1,057
PMMA-3.Gün	0,772	0,3599	0,518	1,027
PMMA-7.Gün	0,389	0,0939	0,322	0,455
Ti-6Al-4V-1.Gün	0,696	0,1109	0,618	0,775
Ti-6Al-4V-3.Gün	0,940	0,1557	0,830	1,051
Ti-6Al-4V-7.Gün	0,389	0,0535	0,351	0,426
ZrO₂-1.Gün	0,491	0,0650	0,445	0,537
ZrO₂-3.Gün	0,560	0,0579	0,519	0,601
ZrO₂-7.Gün	0,567	0,0694	0,518	0,616

Tablo 9 TGF- β analizi özet istatistik tablosu



Grafik 19 TGF- β analiz grafiği

4.4. ROS Test Bulguları

ROS için 16 grup arasındaki karşılaştırma sonucunda, Welch istatistiğine göre farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p=0,114$). Buna dayanarak “günler ve materyaller arası farklılık anlamlı değildir” sonucuna ulaşılır. Çoklu karşılaştırmada farklılık anlamlı olmadığı için ikili karşılaştırmaya gidilmemiştir.

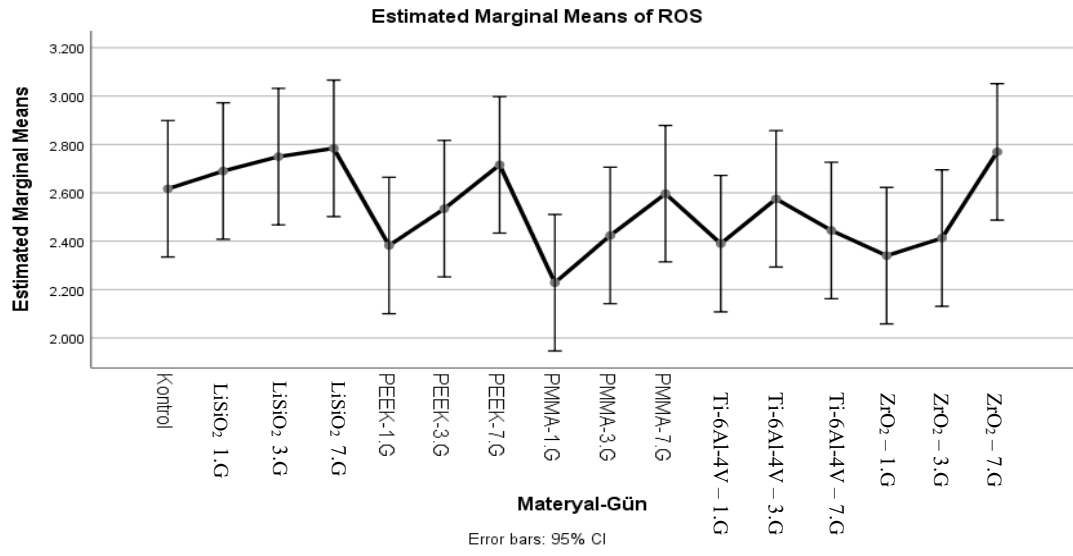
Kontrol grubu ortalama değeri 2.617, standart sapması 0.01931’ dir. Lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik 1. gün ortalama değeri 2.690, standart sapması 0.0667; 3. gün ortalama değeri 2.750, standart sapması 0.3967; 7. gün ortalama değeri 2.784, standart sapma değeri 0.1746’ dır. PEEK dayanak grubunda 1. gün ortalama değeri 2.382, standart sapma değeri 0.0748; 3. gün ortalama değeri 2.535, standart sapması 0.0331; 7. gün ortalama değeri 2.716, standart sapma değeri ise 0.2432’ dir. PMMA dayanak grubu için 1. gün ortalama değeri 2.228, standart sapma değeri 0.1232; 3. gün ortalama değeri 2.424, standart sapma değeri 0.2050; 7. gün ortalama değeri 2.596, standart sapma değeri 0.0390’ dır. Titanyum dayanak grubunda 1. gün ortalama değeri 2.390, standart sapma değeri 0.0221; 3. gün ortalama değeri 2.575, standart sapma değeri 0.2579; 7. gün ortalama değeri 2.444, standart sapma değeri ise 0.0287’ dir. Son

olarak zirkonya dayanak grubunda 1. gün ortalama değeri 2.340, standart sapma değeri 0.1494; 3. gün ortalama değeri 2.413, standart sapma değeri 0.2096; 7. gün ortalama değeri 2.769, standart sapma değeri 0.2800' dir ($p<0.05$). Lityum 7.gün (2,784), Lityum 3.gün (2,750), PEEK 7.gün grubunda (2,716), Zirkonya 7.gün (2,769) gruplarında ROS ölçümü en yüksek iken PMMA 1.gün (2,228), Zirkonya 1.gün (2,340), PEEK 1.gün (2,382) gruplarında ROS ölçümü en düşüktür.

Özet istatistiklerin yer aldığı (ortama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler) tablo ve tek yönlü varyans analizinden elde edilen ortak standart sapma kullanılarak hesaplanan güven aralıklarına ait tablo ve grafik Tablo10 ve Grafik 20'de sunulmuştur.

ROS (n=2)				
Uygulama Grubu	Ortalama	Std. Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	2.617	0.1931	2.480	2.753
LiSiO₂-1.Gün	2.690	0.0667	2.643	2.737
LiSiO₂-3.Gün	2.750	0.3967	2.469	3.030
LiSiO₂-7.Gün	2.784	0.1746	2.660	2.907
PEEK-1.Gün	2.382	0.0748	2.329	2.435
PEEK-3.Gün	2.535	0.0331	2.511	2.558
PEEK-7.Gün	2.716	0.2432	2.544	2.888
PMMA-1.Gün	2.228	0.1232	2.141	2.316
PMMA-3.Gün	2.424	0.2050	2.279	2.569
PMMA-7.Gün	2.596	0.0390	2.569	2.624
Ti-6Al-4V-1.Gün	2.390	0.0221	2.374	2.405
Ti-6Al-4V-3.Gün	2.575	0.2579	2.393	2.758
Ti-6Al-4V-7.Gün	2.444	0.0287	2.424	2.465
ZrO₂-1.Gün	2.340	0.1494	2.235	2.446
ZrO₂-3.Gün	2.413	0.2096	2.265	2.561
ZrO₂-7.Gün	2.769	0.2800	2.571	2.967

Tablo 10 ROS analizi özet istatistik tablosu



Grafik 20 ROS analiz grafiği

Tartışma

Günümüzde kısmi ve total dişsizlik olgularında implant tedavisi tercih edilen tedavi seçeneklerindendir. Tek diş eksikliklerinde dayanak- diş eti ilişkisinin doğal dokuya benzer hazırlanabilmesi; tek, çoklu ya da total diş eksikliklerinde implantlar ve dayanaklardan destek alan sabit protetik tedavi seçeneklerinin uygulanabilmesi hastalar için daha estetik ve fonksiyonel protezlerin uygulanmasını mümkün kılar. Kullanılan implant ve dayanak materyallerinin biyouyumluluğu sağlıklı doku devamlılığı açısından ön koşuldur. Kullanılan materyalin biyouyumluluğunun *in vivo* ve *in vitro* yöntemler kullanılarak test edilmesi gerekir. Yapılan çalışmalarda standardizasyonun oluşturulması; tekrarlanabilirlik ve karşılaştırılabilirliğin sağlanması için önemlidir. Sitotoksisite, biyouyumluluğun önemli bir bölümüdür. Sitotoksik terimi, hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksisite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Bu çalışmaların tipi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarı oranlarının belirlenmesidir (Riss and Moravec 2006). Sitotoksisitenin belirlenmesinde iki yöntem kullanılır. *In vivo* yöntemlerde kullanılacak materyaller klinik deneylerle insan ya da hayvan bedenine yerleştirilerek araştırılır. Bu yöntem; uygulamanın ve değerlendirmenin güçlüğü, karmaşık insan organizmasının gösterdiği cevabın yorumlanmasının zorluğu, aynı şartlarla tekrar edilemeyişi sebepleriyle daha az tercih edilmektedir. *In vivo* yöntemde insan/ hayvan deneyleri ve klinik çalışmalarda karmaşık bir biyolojik yapının içinde bir olay incelenirken farklı sistemlerin etkilerinin ayırt edilmesi mümkün olamaz. Bu etkilerin ayrı ayrı incelenmesi *in vitro* ortamda mümkün olmaktadır (Schmalz 1994). Malzeme – doku ara yüzünde meydana gelen değişikliklerin *in vivo* ya da *in vitro* çalışmalarla incelenmesi doku ile uyumlu materyal kullanımını mümkün kılar. Bu amaca ulaşmak için kullanılan malzemelere karşı oluşan doku cevabının değerlendirildiği hücre kültürü ve mikrobiyoloji çalışmaları yapılmaktadır (Edgerton and Levine 1993). *In vitro* şartlarda deneyin tekrarlanabilirliğinin gelişmiş olması bilimsel standardizasyonu sağlar. Bu amaçla dental materyaller ISO- EN 10993- 5 kapsamında deney grubuna dahil edilmiştir (ISO_10993_5_2009 2009). ISO- EN 10993-5 Standardına göre, sitotoksik etkinin derecesi, hücre proliferasyonu %75'ten fazla olduğunda sitotoksik olmayan, %50 ile %75 olduğunda hafif sitotoksik, %25 ile %50 olduğunda orta derecede sitotoksik ve %25'ten az olduğunda yüksek derecede sitotoksik olarak

sınıflandırılır. Dental materyallerin *in vitro* toksisitesi için en yaygın olarak kullanılan biyolojik sistemler hücre kültürü sistemleridir. Hücre temelli sitotoksikite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Kroemer et al. 2009). Bu metodoloji, hücre fonksiyonu ve canlılığının, gen ekspresyonunun, proteinlerin ve inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunun, reaktif oksijen türlerinin, hücre ölüm tipinin (apoptoz/nekroz), hücre morfolojisinin değerlendirilmesine izin verir(de Souza Costa et al. 2014). Bu tür deneylerden elde edilen veriler, seçilen hücre kültürü koşullarına (örneğin hücre sistemi ve hücre kültürü ortamı) bağlıdır. İki tip hücre kültürü sistemi kullanılmaktadır; birinci tip, kültür koleksiyonlarından (ticari kaynaklardan) türetilen kalıcı hücre hatları ve ikinci tip canlı dokudan türetilen birincil hücrelerdir. Kalıcı hücre hatlarına ulaşmak kolaydır. *In vitro* testler için, kalıcı hücre dizileri (örn. L-929 veya Balb/c 3T3 fibroblastları) veya birincil hücreler (örn. gingiva ve mukoza fibroblastları) yaygın olarak kullanılır (Elshahawy, Watanabe, and Kramer 2009). Çalışmamızda bu araştırma verilerine dayanarak *in vitro* şartlarda L-929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır.

İmplant çevresi yumuşak dokunun dayanak materyaline yapışması, bu bölgede bakteri geçişini önleyerek enflamasyon oluşumunu engeller. Koruyucu sızdırmazlık sağlayan bu bariyer, implant tedavisinin başarısında önemli rol oynamaktadır. Dişeti bağ dokusu içinde birkaç hücre tipi tanımlanmıştır. Diş eti fibroblast hücreleri, mukozal bariyerin bağ dokusunda yer alan hücrelerdir ve implant dayanakları etrafındaki kollajen liflerinin homeostazında yer alır. Fibroblastlar mezenşim doku kaynaklı hücrelerdir ve prokollagen, fibronektin, glikozamin glukanlar, enzimler ve büyüme faktörlerini salgılayan, bağ dokusunu oluşturan ana hücre grubudur. Birçok hücre dışı matris (extra cellular matrix- ECM) bileşenini sentezlerler. Fibroblastlar lokal homeostatik süreçlerin ve hücre-hücre etkileşimlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan enzimleri ve proteinleri de üretirler. Periodontal dokunun rejenerasyonu; transforme edici büyüme faktörü- α (anjiyogenezi düzenleyen), transforme edici büyüme faktörü- β (tip 1 kollajen, fibronektin ve osteonektin sentezini, kemik matriksi oluşumunu uyaran), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) tarafından düzenlenir.

İmplantının yerleştirilmesinden sonra, bağ dokudan gelen fibroblastlar, kolajen açısından zengin bir doku oluşturmak üzere yara alanını doldururlar (Gehrke et al. 2019; Gómez-Florit et al. 2014; Stepanova 2007). Sitokinler, immün ve enflamatuvar reaksiyonların temel düzenleyicileridir. Biyolojik süreçleri hem aktive hem de inhibe edebilirler. Ayrıca implante edilmiş bir materyale karşı konak tepkisini kontrol etmede merkezi öneme sahiptirler. Yaralanmayı takiben doku onarımı, implante edilmiş bir biyomateriyale karşı oluşan doku reaksiyonu ile birçok ortak noktaya sahiptir. Onarım süreçlerindeki önemli sitokinlerden biri, dönüştürücü büyüme faktörü beta'dır (TGF- β) (Kirkpatrick et al. 1998). Sitokinler/büyüme faktörleri, hücre fonksiyonlarının önemli araçlarıdır ve enflamatuvar yanıtlara önemli katkı sağlarlar. IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF gibi bazı sitokinler proenflamatuvar fonksiyonlara sahipken, diğerleri IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 ve TGF gibi anti-enflamatuvar fonksiyonlara sahiptir (Trubiani et al. 2012). IL-6, fibroblastlar tarafından üretilir ve iltihaplı diş eti dahil hastalıklı periodontal bölgelerde ekspresyonu artar. IL-6, osteoklast oluşumunu uyarak kemik rezorpsiyonunu uyarır. Periodontal dokunun rejenerasyonu, dönüştürücü büyüme faktörü- α (TGF- α) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) tarafından düzenlenir. TGF- β , kollajen I, fibronektin ve osteonektin sentezinin yanı sıra kemik matris oluşumunu ve temel fibroblast büyüme faktörünü uyarır. TGF- β 'nin implantasyon işlemi sırasında eksprese edildiği ve implant osseointegrasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (Pivodovaa, Frankovaa, and Ulrichovaa 2011). Çalışmada kullanılan dayanak materyallerinin biyouyumluluğu araştırılırken L-929 fare fibroblast hücre hattında IL6, TGF- β sentezi araştırılmıştır. Araştırmamızın IL6 sekresyonunu incelediğimiz deney sonuçlarına göre dayanak materyal gruplarından elde edilen sonuçlar sitotoksikite sınırına ulaşmamıştır; bütün materyaller IL6 salınımı yönünden biyouyumludur. TGF- β salınımı deney sonuçlarına göre sadece PMMA dayanak materyal grubuna ait 1. gün test değeri kontrol grubu test değeri ile karşılaştırıldığında sitotoksik bulunmuştur. PMMA materyal grubuna ait 3. ve 7. gün değerleri sitotoksik değildir. Diğer bütün dayanak materyal gruplarının tüm gün değerlendirmelerine göre biyouyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Dental materyallerin biyouyumluluğunu araştırmak için yaygın olarak sitotoksikite ve apoptoz testleri kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında sitotoksikiteyi değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan hücre kültürü yöntemlerinden XTT hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Bu yöntem, metabolik olarak aktif hücreler tarafından üretilen

formazan ürünlerini ölçen kolorimetrik bir test sistemidir (Atay et al. 2019). Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri, formazan denilen yapıya dönüşmelerini sağlayarak renk değişikliğini beraberinde getirir. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilirler. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybeder ve herhangi bir renk değişimine neden olmazlar. Bu değişimin, *in vitro* ortamda yalnızca canlı hücreler tarafından yapılabilmesi, tetrazolyum bileşiklerini biyolojik anlamda oldukça önemli kılmıştır. Mosmann tarafından geliştirilen MTT testinden sonra, XTT, MTS, WST-1, WST-8 gibi farklı özelliklere sahip tetrazolyum bileşikleri geliştirilerek kolorimetrik metodlara eklenmişlerdir (Mosmann 1983). Araştırmalarda, çok sayıda tetrazolyum- formazan maddesi kullanılmış olmakla beraber bunlardan sadece birkaç tanesi kabul görmüş ve biyolojik sistemlere uyumluluğu saptanmıştır. Bu bileşikler, hücre içine girebilme ve vasatta çözünme özelliklerine göre ikiye ayrılırlar. İlk grupta bulunan MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir ancak indirgenme sonucu oluşan formazan, suda çözünmez niteliktedir. Dolayısıyla vasatta kristal şeklinde çökelmektedir. İkinci grupta bulunan MTS, XTT ve WST bileşikler ise negatif yüklü olup hücre membranını geçemezler. Tetrazolyum bileşikler ile yapılan canlılık testleri, üç aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada hücreler belirli bir süre toksik maddeye maruz bırakılırlar. İkinci aşamada toksik madde uzaklaştırılıp tetrazolyum bileşiği vasata eklenir ve ortalama 1-4 saat boyunca inkübe edilir. Bu esnada canlı hücreler ilgili bileşikler indirgeyip formazana dönüştürerek renk değişimini gerçekleştirir. Son aşamada ise renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir. MTT bileşiği sarı renklidir, oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmez niteliktedir ve absorbansın ölçülebilmesi için uygun bir çözücüde çözdürülmelidir. MTT testinde oluşan formazanı çözdürmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanımının uygun olduğu ortaya konulmuştur. Çözücü olarak genellikle tercih edilen DMSO'nun hücreler üzerine olan toksik etkisi bilinmektedir ve bu da test güvenilirliğini azaltmaktadır. Ayrıca çözdürmek için yapılan pipetleme esnasında formazan kristallerinin zarar görmesi de test hassasiyetini düşüren diğer bir etkidir. XTT, MTS ve WST testlerinde, ek bir çözdürme işlemine gerek duyulmamasının yanında, deney süresince çeşitli zamanlarda absorbansın kaydedilmesi mümkün olmaktadır. XTT

yönteminde canlılığın değerlendirilmesi hakkında daha detaylı ve hücre sayısı hakkında MTT testine göre daha hassas bilgi elde edilir. Yukarıda anlatılan tüm bu nedenlerden dolayı çalışmamızda da XTT yöntemi kullanılmıştır. Atay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada XTT yöntemi ve apoptoz testleri ile tüm seramik ve geçici protez materyallerinin fibroblast hücreleri üzerine hücre canlılığı ve sitotoksite değerleri araştırılmıştır. Özellikle tüm seramik materyalleri için 24 ve 72 saat sonunda yüksek değerlerde (>%90) hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bu değerlerin elde edilmesinin nedeni olarak test yönteminin XTT olarak belirlenmesi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. (Atay et al. 2019; Tokur and Aksoy 2017). Bu çalışmalara dayanarak yaptığımız araştırmada sitotoksite deneyi için XTT proliferasyon deney düzeneği kullanılmasına karar verilmiştir. Yaptığımız XTT deney sonuçlarına göre;

- 24 saat inkübasyonda materyal x gün etkileşimi ve materyaller arası farklılık anlamlı bulunmamıştır. Günler arası farklılık ise anlamlıdır. Dayanak materyal gruplarının hepsinde canlılık değeri gün arttıkça azalmıştır. 1.- 3. gün ($p=0.042$) ve 1.- 7.gün ($p=0.001$) arasında fark anlamlı; fark 3.- 7. gün ($p=0.3633$) arasında fark anlamsız bulunmuştur.
- 48 saat inkübasyon değerleri incelendiğinde materyal x gün etkileşimi ve günler arası farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p=0.190$). Materyaller arası farklılık ise anlamlıdır ($p=0.008$). En yüksek canlılık değeri lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik ve titanyum alaşım dayanak materyal gruplarında, en düşük canlılık seviyesi ise PEEK grubunda tespit edilmiştir.

Forster ve arkadaşları cilalı lityum disilikat, yttrium ile modifiye edilmiş zirkonyum oksit ve kobalt- krom alaşım restoratif materyallerin insan epitel hücreleri üzerinde etkilerini MTT yöntemiyle ölçmüşler ve lityum disilikatın biyolojik olarak en uyumlu sonuçları verdiğini göstermişlerdir (Forster et al. 2014). Atay ve arkadaşlarının L929 fare fibroblast hücre hattı ile yaptıkları tam seramik ve geçici materyallerin etkilerini inceledikleri çalışmada XTT test yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda tüm materyallere ait değerler güven sınırları arasında olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Atay et al. 2019). Maria Rizo- Gorrita ve arkadaşları yaptıkları çalışmada içinde lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik materyal grubunun bulunduğu polimer ve seramik malzemelerden oluşan 4 çeşit CAD-CAM materyalin insan diş eti fibroblast hücresi üzerine biyoyuymuluklarını MTT test yöntemi ile araştırmışlardır.

Lityum disilikat materyal grubu en uyumlu hücre cevabının olduğu grup olarak bulunmuştur. Bu çalışmada MTT yöntemiyle ölçülen sitotoksikite değerlerinde ilk 24 saatte izlenen artışın tüm seramik tarafından ilk saatlerde salınan iyonlara bağlı olarak ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Rizo-Gorrita et al. 2019). Hahnel ve arkadaşları titanyum, zirkonya ve PEEK implant dayanakları üzerinde biofilm oluşumunu incelemişler; referans grubu olarak da PMMA dayanak seçmişlerdir. Biofilm oluşumunu MTT test yöntemi ile araştırmışlar, PEEK dayanak materyali üzerinde biofilm tabakası oluşumunun titanyum ve zirkonya dayanaklardan fazla olmadığını görmüşlerdir (Hahnel et al. 2015). Peng ve arkadaşları PEEK ve PEKK (Polieterketonketon) dayanakların insan ağız fibroblastları üzerindeki hücresel metabolik aktivite, sitotoksikite ve enflamatuar potansiyellerini titanyum alaşım (Ti-6Al-4V) ve yttria stabilize tetragonal zirkonya polikristalin (Y-TZP) dayanaklarla karşılaştırdıkları çalışmada MTT yöntemini kullanmışlardır. PEEK dayanak materyalinin ilk 24 saatte gösterdiği hücresel aktivite titanyum alaşım ve yttria stabilize zirkonya polikristalin dayanak materyalinden istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş; 48 saat değerlendirme sonuçlarında materyaller arasında anlamlı farklılık görülmemiştir (Peng et al. 2021). Yaptığımız çalışmada XTT yöntemi ile ölçtüğümüz canlılık seviyelerinde en düşük seviyeyi PEEK dayanak materyali göstermiştir. Bu yönüyle iki çalışma arasında farklılık bulunmaktadır. Campaner ve arkadaşları 2020 yılında yayımladıkları çalışmada ısı ile polimerize olan akrilik rezin, kendi kendine polimerize olan akrilik rezin, bisakrilik rezin, CAD-CAM nano-seramik rezin ve CAD-CAM prefabrike polimer bloktan oluşturdukları disklerin fare fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksikite değerlendirmişler; bunun için MTT testi, IL6 sekresyonu incelemişlerdir. Bütün materyal grupları içinde kendi kendine polimerizan akrilik rezin ve bisakrilik rezin fibroblast hücreleri için daha sitotoksik sonuçlar göstermişlerdir. CAD-CAM nano-seramik rezin ve prefabrike polimer bloklar periodontal dokuyu koruma yönünde daha doku uyumlu davranmışlardır (Campaner et al. 2020). Balos ve arkadaşları toz ve likit karıştırılmasıyla elde edilen PMMA materyaline %2 silika eklemişler; bu materyalin mekanik özelliklerini ve sitotoksikitesini araştırdıkları çalışmalarında sitotoksikite için L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde MTT test yöntemini uygulamışlardır. Test sonuçları sitotoksikitenin uygulanabilir sınırlar içinde olduğunu göstermektedir (Balos et al. 2020). Pituru ve arkadaşlarının yaptıkları derlemede metilmetakrilat monomerinin

ROS oluşumuna neden oldukları belirtilmektedir (Pituru et al. 2020). Pae ve arkadaşları insan oral fibroblast hücreleri ile yaptıkları çalışmada titanyum alaşım ve zirkonya materyal yüzeylerinin pürüzlü ve düzgün oluşunun büyüme ve bağlanma davranışı üzerinde etkilerini incelemişlerdir. MTT yöntemi ile 24 ve 48 saat çoğalma aktivitesini araştırmışlar; pürüzlü yüzeyde hücre tutunması, canlılığının daha yüksek olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Pae et al. 2009). Negahdari ve arkadaşları seramik ve titanyum dayanak çevresinde diş eti oluğu sıvısında enflamasyon öncesi sitokin seviyesini araştırdıkları çalışmada ELISA test yöntemi ile IL-6 seviyesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre IL-6 seviyesi seramik dayanak grubu için titanyum alaşım dayanak grubuna göre daha düşüktür (Negahdari Ramin et al. 2017). Bizim çalışmamızda lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik ve titanyum alaşım dayanak materyal grupları IL-6 seviyeleri yönünden karşılaştırma yapıldığında titanyum alaşım dayanak materyal grubu değerleri daha düşüktür. Chandar ve arkadaşları ticari saf titanyum ve titanyum alaşım (Ti-6Al-4V) materyallerin insan fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksitesini MTT test yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmanın sonunda titanyum alaşım materyali sitotoksitesinin ticari saf titanyuma göre daha yüksek olduğunu görmüşler; aradaki farkı titanyum alaşım içinde alüminyum ve vanadyum varlığına bağlamışlardır (Chandar et al. 2017). Zirkonya dayanak materyalinin diş eti fibroblast hücreleri ve ağız keratinosit hücrelerinin çoğalma ve göç yeteneği üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada hücre canlılığı için MTT test yöntemi kullanılmıştır. Pabst ve arkadaşları yaptıkları bu çalışma ile diş eti fibroblast hücrelerinin canlılığının zirkonya dayanak materyalinden olumsuz yönde etkilenmediğini bulmuşlardır (Pabst et al. 2016). Raffaelli ve arkadaşları fare fibroblast hücreleri üzerinde zirkonya ve feldspatik seramik materyalinin büyüme, canlılık ve yapışma kabiliyetini ölçtükleri çalışmalarında zirkonyanın feldspatik seramiğe göre daha yüksek olumlu sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir (Raffaelli et al. 2008).

Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. Fizyolojik bir süreçtir. Enflamatuvar hastalıklar, gelişimsel bozukluklar, kanser, nöro-dejeneratif rahatsızlıklar bu sürecin işleyişindeki bozukluklara dayandırılmaktadır. Apoptoz ile periodontal hastalık arasında bağlantı olduğu bilinmektedir (Tsuda H et al. 2012). Apoptozun evrelerinin ve nekrozun belirlenmesi amacı ile yapılan deney, normalde plazma zarının sitoplazmik yüzüyle sınırlı bir fosfolipid olan fosfatidilserinin (PS), çoğu hücre tipinde

ve birçok apoptotik uyaran tarafından apoptoz sırasında hücre yüzeyine yer değiştirdiği gözlemine dayanır. Normal şartlarda fosfatidilserin hücre zarının sitozolik (hücre iç yüzüne bakan) yüzeyinde bulunan bir fosfolipittir. Apoptozun erken evresinde bu fosfolipidler flip-flop hareketi ile ekstra selüler (hücre dışı) yüze geçer. Annexin V boyası fosfatidilserinlere bağlanarak erken apoptozun tespit edilmesini sağlar. Annexin V, fosfatidilserin kalıntıları ile güçlü ve spesifik olarak etkileşime giren ve apoptozun saptanması için kullanılabilen bir rekombinant fosfatidilserin bağlayıcı proteindir. En büyük avantajı duyarlılığıdır; tek bir apoptotik hücreyi tespit edebilir. Dezavantajı, nekrotik hücrelerin zarlarının da etiketlenmiş olmasıdır. Bu nedenle kritik kontrol, fosfatidilserin pozitif hücrelerin membran bütünlüğünü göstermektir (Elmore 2007). Propidyum iyodür (PI) nükleik asitleri boyayan, zar geçirimsiz floresan bir boyadır. Zar bütünlüğüne dayalı, nekrotik, apoptotik ve sağlıklı hücrelerin ayırt edilmesinde kullanılır. Sağlıklı hücre zarı seçici geçirgendir ve PI hücre zarını geçemez. Ancak apoptozun geç evresinde veya nekrotik hücrelerde zar bütünlüğü bozulduğu için nükleik asit içeren organelleri boyar (Boersma ve ark. n.d.). Apoptoz testi bu ilkeye dayanarak apoptotik, nekrotik ve canlı hücre ayırımını yapar. Kullanılan implant dayanak materyallerinin apoptotik etkilerinin belirlenmesi dokuda oluşabilecek enflamasyonun belirlenmesi açısından önemlidir. Çalışmamızın 1. gün apoptoz test değerleri incelendiğinde lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik dayanak materyali hücre açısından en güvenilir sonuçları ortaya koymuştur. 3. gün apoptoz değerlerine göre PMMA dayanak materyali hücre yönünden en uyumlu sonuçları vermiştir. Apoptoz testinin 7. gün değerleri incelendiğinde PMMA dayanak materyali; canlılık ve nekroz değerleri yönünden hücreler için en uygun materyal olarak değerlendirilmektedir. 1. Günde materyallerden deney ortamına hücre çeperinde apoptotik etkinliği arttıran uyaran salınımının en düşük lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik materyal grubunda olduğunu düşündürmektedir. Apoptotik etkinliği arttırıcı uyaran salınımının 3. ve 7. günler için en düşük gözlemlendiği materyal grubu PMMA'dır. Ancak materyaller arasındaki bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çal ve arkadaşları piyasada bulunan yedi farklı implant materyalinin sitotoksitelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında fare osteoblast hücreleri ile apoptoz testleri yürütmüşler ve apoptoz test sonuçlarına göre kontrol grubu değerlerinin benzeri

sonuçlar elde edilmiştir (Cal et al. 2017). Çalışmamızda kullanılan Ti alaşımı sonuçları da bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) retimi, birçok enflamatuar hastalığın ilerlemesinin merkezinde yer alır. ROS, polimorfonükleer nötrofiller (PMN'ler) gibi konak-savunma yanıtında yer alan hücreler tarafından üretilir ve tirozin fosfatazlar gibi önemli hücresel sinyal proteinlerinin oksidasyonu yoluyla endotelial disfonksiyonu teşvik eder. ROS, klasik olarak, gl oksitleme yeteneklerine sahip, kısmen indirgenmiş oksijen metabolitleri olarak tanımlanır. Hem bir sinyal molekülü hem de bir iltihaplanma aracısı olarak hareket eder. “Fizyolojik konsantrasyonlarda” ROS, hücre büyümesini, hücrelerin diğer hücrelere yapışmasını, farklılaşmayı, yaşlanmayı ve apoptozu düzenleyen sinyal molekülleri olarak işlev görür. Yüksek konsantrasyonlarda olduklarında protein ve lipid hücresel bileşenlerini oksitleyerek DNA'ya zarar verdikleri için hücrelere zararlıdırlar; ancak düşük konsantrasyonlarda, karmaşık sinyal işlevlerine hizmet ederler. Kronik veya uzun süreli ROS retimi kavramı, enflamatuar hastalığın ilerlemesinin odağı olarak kabul edilir (Mittal et al. 2014). ROS konsantrasyonundaki artış enflamatuar hasarın göstergesidir. Yüksek ROS konsantrasyonu saptanması hücre hasarını gösterir. Hücre biyoyumluluğunun araştırıldığı çalışmamızda değerlendirmede bu nedenle ROS retimi belirteci kullanılmıştır. Wei ve arkadaşları insan diş pulpa hücresi ve fare osteoblast öncüsü hücreler üzerinde titanyum ve zirkonyanın hücre yapışması ve oksidatif stres oluşumunu araştırmışlardır. Bu çalışmada hücre canlılığı için MTT test yöntemi ve oksidatif stres oluşumu için ROS oluşumu incelenmiş; zirkonya yüzeyinde titanyuma oranla daha yüksek ROS seviyesi llmştir. Hücre yapışmasının daha yüksek ROS seviyesi ile ilgili olduğunu ifade ettikleri çalışmada zirkonyanın titanyuma karşılaştırıldığında hücreler için daha uyumlu olduğu sonucunu paylaşmışlardır (Wei Chenxuan et al. 2019). Alzahrani ve arkadaşları yttria stabilize zirkonya nanopartiküllerinin insan deri epitel hücreleri üzerinde apoptotik ve DNA hasar etkilerini incelemişlerdir. ROS oluşumundaki artışa paralel olarak hücre canlılığında azalma olduğunu göstermişlerdir (Alzahrani et al. 2019). Çalışmamızın ROS üretiminin incelendiği deney sonuçlarına göre dayanak materyal gruplarının hiçbirinde kontrol grubu değerlerine göre sitotoksik değerler bulunmamıştır. Tüm materyal grupları ROS retimi yönünden biyoyumludur.

Yukarıda söz edilen çalışmalar ve bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bunun nedeninin sitotoksikite test yönteminin MTT testi yerine XTT testinin kullanılması ve farklı marka zirkonya materyallerinin içerik farklılıkları olduğu düşünülmektedir.

Lityum disilikat ile güçlendirilmiş seramik dayanak materyali ve zirkonyum oksit dayanak materyalinin biyouyumluluğunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, lityum disilikat dayanak materyal grubunun hücre yapışması ve yara iyileşmesi yönünde daha uyumlu olduğu görülmüştür (Brunot-Gohin et al. 2016). Bunun yanı sıra yapılan başka bir çalışmada geleneksel ve güncel dental seramiklerin sitotoksikitesi karşılaştırılmış ve lityum disilikat seramiklerin sitotoksik etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Messer et al. 2003). Brackett ve arkadaşlarının çalışmasında lityum disilikat seramiklerin sitotoksikitesi *in vitro* ortamda fare fibroblast hücreleri üzerinde MTT test yöntemi ile araştırılmış ve lityum disilikat seramiklerin sitotoksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Brackett et al. 2008). Maria Rizo-Gorrita ve ark., insan fibroblast hücreleri üzerinde CAD/CAM lityum disilikat, polimetilmetakrilat, zirkonya ile güçlendirilmiş lityum silikat seramik ve yttrium tetragonal zirkonya materyallerin sitotoksikitesini araştırmışlardır. 24 ve 48 saat temas süresi sonunda tüm materyaller sitotoksik sonuçlar ortaya koymuş; 72 saat sonunda ise bütün değerler biyolojik olarak kabul edilen seviyelere gerilemiştir. Lityum disilikat hücre canlılığı yönünden en iyi sonucu veren materyal olmuştur. Zirkonya ve zirkonya ile güçlendirilmiş lityum silikat için orta derecede sonuçlar elde edilmiş; PMMA ise en düşük değerleri sergilemiştir. Bu çalışma sonunda seramik materyallerin polimerlerden daha iyi hücre yanıtı oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır (Rizo-Gorrita et al. 2019). Andra's Forster ve ark., lityum disilikat ve zirkonya restoratif materyalleri ile insan fibroblast hücre kültürü üzerinde yaptıkları çalışmada MTT yöntemi ile hücre sitotoksikitesini test etmişlerdir. Biyouyumluluğu en yüksek olan materyalin lityum disilikat olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Forster et al. 2014). Atay ve ark., içlerinde lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramiğin de bulunduğu yedi adet CAD/CAM tam seramik ve altı adet geçici materyalin XTT yöntemi ile biyouyumluluklarını; Annexin- V/PI boyama ile apoptotik etkilerini inceledikleri çalışmalarında sonuçların güvenlik sınırları içinde olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlara dayanarak klinik uygulamalarda bu materyallerin güvenle kullanılabileceği sonucuna ulaşmışlardır (Atay et al. 2019). Lityum disilikat ile güçlendirilmiş seramik dayanak materyali ile yaptığımız XTT

deneyinde kontrol değerlerine göre 24 saat inkubasyonda en düşük canlılık 3. Gün, en yüksek canlılık 1. Günde izlenmiştir. 48 saat değerlerinde ise en düşük canlılık 3. Günde, en yüksek canlılık 7. Günde görülmüştür. Materyale daha uzun süre maruz kalma ile canlılık değerlerinin arttığı görülmüştür. Apoptoz testi sonuçlarında en yüksek canlılık değeri 3. gün ve nekroz değerleri 1. günde tespit edilmiştir. Bu değerler kontrol grubu değerlerine benzerdir. Bu sebeple apoptotik etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Bu sonuç; materyallerden ortama apoptoz miktarını arttırıcı yönde salınım olmadığını düşündürmektedir. IL6, TGF- β ve ROS salınım değerleri ise kontrol grubu değerlerine göre biyouyumluluk sınırını aşmamıştır.

Polietereterketon (PEEK) 1978 yılında geliştirilmiş poli-aril-eter-keton ailesine ait organik sentetik bir polimerdir. Hunter ve arkadaşları osteoblastları ve fibroblastların bağlanması ve çoğalması ile ilgili yaptıkları çalışmada PEEK materyalinin hücre sel sitotoksitesite oluşturmadığı sonucuna ulaşmışlardır (Hunter et al. 1995). Bu çalışmayı referans alarak Koutouzis ve arkadaşları tarafından yürütülen araştırmada da PEEK materyaline karşı oluşan yumuşak ve sert doku cevabının biyouyumlu olduğu görülmüştür (Koutouzis, Richardson, and Lundgren 2011). PEEK materyalinin V79 fibroblast hücre serisi üzerine sitotoksik etkilerini araştırmak için yapılan çalışmada hücreler üzerine sitotoksik etki saptanmamıştır (Katzner et al. 2002). Bir başka çalışmada insan fibroblast hücrelerinin çeşitli dayanak materyallerine yapışması ve MTT test yöntemi ile hücre canlılığı araştırılmış; PEEK dayanak grubunda en düşük değerler elde edilmiştir (Rozeik et al. 2022). Diğer bir araştırma Peng ve arkadaşları tarafından insan oral fibroblast hücre kültürü üzerinde yapılmıştır. Titanyum, PEEK ve zirkonyanın içinde olduğu çalışmada dayanak materyallerinin sitotoksitesitesi, hücre canlılığı, hücre tutunması üzerine etkileri ve oluşan inflamatuvar cevapları araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda dayanak materyal grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış; implant dayanak materyali olarak kullanıma uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Peng et al. 2021). L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada PEEK materyalinin biyouyumlu olduğu kabul edilmiştir (Wenz et al. 1990). Yaptığımız çalışmada PEEK dayanak materyaline ait XTT test değerleri incelendiğinde 24 saatte en yüksek canlılık değeri 3. Günde, en düşük canlılık değeri 7. Günde ölçülmüştür. Bu değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında biyouyumluluk sınırları içindedir. XTT testi 48 saat değerlerine göre en yüksek canlılık 7. Günde, en düşük canlılık 3. Günde ölçülmüştür. Kontrol

grubu değerlerine göre güvenli sınırlar içindedir. XTT test verilerine dayanarak PEEK dayanak materyalinin sitotoksik aktivite göstermediği izlenmektedir. Apoptotik fonksiyon değerleri en yüksek canlılığın 7. Günde, en düşük nekroz değerinin ise 1. Günde olduğunu göstermiştir. Kontrol değerlerinin altında olması PEEK dayanak materyaline bağlı olarak apoptotik aktivitenin azalmadığını göstermektedir. IL6, TGF- β ve ROS salınım değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Tüm bu verilere dayanarak PEEK materyalinin biyouyumlu olduğu düşünülmektedir.

Polimetilmetakrilat (PMMA) diş hekimliği alanında uzun yıllardır özellikle bölümlü ve tam protez üretiminde kullanılan metilmetakrilatın sentetik polimeridir. Diş ve implant destekli sabit protetik restorasyon yapımında geçici protetik restorasyon materyali olarak kullanılır. Isı, ışık veya kimyasal olarak başlatılan polimerizasyon işlemiyle üretilir. Üretim işlemi sırasında yapısındaki tüm monomer gruplarının polimerleşmesi sağlanamadığında ortaya çıkan artık monomer materyalin sitotoksitesinden, su emmesinden ve mekanik özelliklerinin zayıflamasından sorumludur (Andreescu et al. 2018). Gelişen CAD-CAM teknolojisi ve materyal üretimiyle günümüzde PMMA CAD-CAM bloklar fabrikasyon olarak üretilmektedir. Bu üretim şekliyle artık monomer oluşumu azaltılmış, buna bağlı olarak materyalin sitotoksik etkisi de azalmıştır. Rizo-Gorrita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CAD-CAM PMMA dayanak materyali, lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik, zirkonya ve zirkonya ile güçlendirilmiş lityum silikat seramik materyallerinin insan diş eti fibroblast hücre kültürü üzerinde MTT yöntemi ile hücre sitotoksitesi test edilmiştir. Bütün materyaller için hücre canlılığı ve tip I kolajen salınımı da deney planına dahil edilmiş; sonuç olarak her bir deney grubunda PMMA en düşük değeri göstermiştir (Rizo-Gorrita et al. 2019). Bir başka çalışmada PMMA, polietilmetakrilat, bis-akril ve hibrit seramik geçici dayanak materyallerinin sitotoksiteleri ve dişeti fibroblast hücrelerinin yapışması değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada bu materyallerin üretim şekilleri olan direkt, indirekt ve CAD/CAM yöntemleri de karşılaştırılmış; çalışmanın sonucunda PMMA materyal grubunun diğer gruplara göre daha düşük seviyede sitotoksite gösterdiği bulunmuştur. Üretim yöntemleri açısından CAD/CAM yöntemi artık monomer oluşturmaması sebebiyle uygun bulunmuştur (Shim et al. 2019). Campaner ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada farklı geçici restoratif materyallerin fare fibroblast hücreleri üzerinde

hücrel ve enflamatuvar etkileri incelenmiştir. Bu amaçla ısı ile polimerize olan akrilik rezin, kendi kendine polimerize olan akrilik rezin, nanopartikül bis-akrilik rezin, nano-seramik rezin ve CAD/CAM PMMA materyaller MTT ve ELISA yöntemleriyle incelenmişlerdir. Çalışmanın sonucunda materyaller arasında en yüksek biyoyumluluk CAD/CAM PMMA blok ile elde edilmiş; en düşük IL6 enflamatuvar cevap ve hücrel toksisite bulunmuştur (Campaner et al. 2020). Taira ve arkadaşları metilmetakrilat monomerinin hücrel toksik etkilerini dört farklı fare hücre serisi üzerinde test etmişlerdir. Metilmetakrilat monomerinin hücrel toksik etkisinin doza bağlı olduğunu göstermişlerdir (Taira et al. 2000). Yapılan bir çalışmada metilmetakrilat monomerine kısa süre için maruz kalan hücrelerde ROS oluşumunun arttığı ve hücre tarafından antioksidan molekül olarak salgılanan glutatyon oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Hücre kültürlerinin kısa süreli de olsa polimetilmetakrilata maruz kalması hücrelerde ROS birikimini arttırmış; bu durumun polimerize olmayan artık monomerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda PMMA maruziyetiyle hücre içi yüksek ROS birikiminin hücrel hasarda ilk adım olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Pituru et al. 2020). Wedekind ve arkadaşları PMMA bazlı splint materyalini üç farklı yöntemle (toz- likit, 3D yazıcı ve kazıma) elde etmişler; hücre canlılığı üzerine etkisini XTT yöntemi ile insan dişeti fibroblast hücre kültürü üzerinde araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda kazıma yöntemi ile üretilen PMMA okluzal splintin biyoyumluluk açısından üstün olduğu ortaya çıkmıştır (Wedekind et al. 2021). Bizim çalışmamızda yaptığımız 24 saat XTT değerlendirmesinde en yüksek canlılık değeri 1. Günde, en düşük canlılık değeri 3. Günde ölçülmüştür. 48 saat değerlendirmesinde en yüksek canlılık değeri 1. Gün ve en düşük canlılık değeri ise 7. Günde gözlemlenmiştir. Apoptoz test sonuçlarına göre ise en yüksek canlılık değeri 7. Günde, en yüksek nekroz değeri 1. Günde ölçülmüştür. Bu değerlere göre PMMA dayanak materyalinin hücreler üzerinde ilerleyen zamana rağmen toksik etkili olmadığı düşünülmektedir. IL6 salınım değerlerine göre fibroblast hücreleri için sınır değerler aşılmamış, kontrol grubu değerlerine ulaşılmamıştır. TGF- β salınım değerlerine göre ise 1. Gün değeri ile kontrol grubu değeri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Diğer günlerde ise anlamlı farklılık görülmemiştir. Buna göre materyal ile ilk karşılaşmada hücrelerin TGF- β yönünden enflamatuvar cevap oluşturduğu düşünülebilir. Zamanın ilerlemesiyle salınım miktarı azalmıştır. ROS test değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Çalışmamızda

kullandığımız PMMA fabrikasyon olarak üretilmiş CAD-CAM blok şeklindedir. Üretim şekli itibariyle polimerizasyon, basınç altında ve tüm materyal içinde artık monomer kalmayacak şekilde yapılmaktadır. Sitotoksik etkinin olmayışı konvansiyonel yöntemlerle üretilen PMMA'tan farklı olarak artık monomer oluşmamasına bağlanmaktadır.

Titanyum ve alaşımları diş hekimliği alanında uzun yıllardır kullanılmakta olan materyallerdendir. Özellikle korozyona karşı gösterdiği direnç ve biyouyumluluğu sebebiyle ortodonti, endodonti, protetik diş tedavisi ve implantoloji alanlarında çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Biyouyumluluk bir materyalin bulunduğu biyolojik ortamda, temasta olduğu dokulara karşı ortama bıraktığı korozyon partikülleriyle ilişkilidir. Bu korozyon partiküllerine karşı hücrelerce enflamasyon medyatörleri salınır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, hücre kültürü ortamlarına bu materyallerce salınan partiküllere karşı; hücrelerce salınan medyatörlerin bulunduğu ortamlar araştırılır. Seramik ve titanyum dayanakların uygulandığı implantların bulunduğu ağız ortamında diş eti sıvısında enflamasyon öncüsü sitokinlerden IL6 ve IL1 β seviyelerinin ELISA yöntemi ile araştırıldığı çalışmada seramik dayanak çevresinde IL6 seviyesinde anlamlı farklılık bulunmuştur. Seramik dayanağın daha uygun bağışıklık yanıtı oluşturduğu ortaya çıkmıştır (Negahdari Ramin et al. 2017). Pae ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada titanyum ve zirkonya materyallerde insan dişeti fibroblast hücrelerinin MTT deney yöntemi ile hücre canlılığı araştırılmış; her iki materyal için hücre çoğalmasının güven sınırları içinde olduğu görülmüştür (Pae et al. 2009). Nicholson tarafından yürütülen bir araştırmada titanyum ve alaşımlarından en çok kullanılan Ti-6Al-4V incelenmiştir. Hücre hasarı MTT yöntemi ile araştırılmış; istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (W. Nicholson 2020). Chandar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan dişeti fibroblast hücreleri üzerinde ticari saf titanyum ve Ti-6Al-4V alaşımın toksik etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Hücre canlılığı üzerine ticari saf titanyumun titanyum alaşıma (Ti-6Al-4V/Grade V titanyum) göre daha az toksik olduğu sonucu elde edilmiştir. Titanyum alaşımın daha toksik etki göstermesinin nedeni içinde alüminyum ve vanadyum varlığı olarak değerlendirilmiştir (Chandar et al. 2017). Bir diğer çalışma Velasco-Ortega ve arkadaşları tarafından Ti-6Al-4V alaşımının insan ve fare fibroblastları üzerinde hücresel toksik etkilerinin araştırılmasıyla yapılmıştır. İnsan ve fare fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etki görülmemiştir (Velasco-Ortega et al.

2010). Grade V titanyumun (Ti-6Al-4V) dişeti fibroblast hücreleri için sitotoksik olup olmadığının araştırıldığı sistematik derlemede alüminyum ve vanadyum salınımına bağlı olarak titanyum alaşımının toksik etkileri saptanmıştır (Willis et al. 2021). Araştırmamızda titanyum dayanak materyalinin XTT değerlendirmesinin 24 saat inkübasyon sonuçlarında en yüksek canlılık 1. günde, en düşük canlılık ise 7. günde ölçülmüştür. 48 saat değerlendirme sonuçlarında en yüksek canlılık değerinin 1. günde, en düşük canlılık değerininse 3. günde ölçüldüğü görülmüştür. Bu verilere dayanarak materyale daha uzun süre maruz kalmanın sitotoksik etkili olmadığı sonucuna ulaşılabilir. Apoptoz test sonuçlarına göre en yüksek canlılık değeri ve en yüksek nekroz değeri 3. günde ölçülmüştür. Bu sonuç da XTT ile varılan yargıyı destekler şekildedir. IL6 test sonuçlarına göre 1. gün değeri en yüksek, 7. gün değeri ise en düşüktür. TGF- β test sonuçları için de en yüksek salınım değerinin alındığı gün 3. gün değeri iken, en düşük salınım değerinin alındığı gün 7. gündür. ROS test sonuçlarına göre en yüksek salınım değerinin alındığı gün 3. gün ve en düşük salınım değerinin alındığı 1. gündür. Yapılan istatistik analizlerine göre kontrol değerleri ile IL6, TGF- β ve ROS değerleri arasındaki fark anlamlı değildir. Çalışmamızda, bu sonuçlara dayanarak titanyum dayanak materyalinin sitotoksik etkili olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Diş hekimliği alanında estetik beklentilerin artmasıyla materyaller alanında da daha estetik sonuçlar verecek materyallerin araştırılması kaçınılmaz olmuştur. Özellikle ön bölgede doğal diş dokusuna benzer sonuçlar elde etmek amacıyla metal içermeyen tedavi seçenekleri sunmak zorunluluk halini almıştır. Buna paralel olarak hem diş üstü hem de implant üstü tedavi seçenekleri için metal içermeyen materyal seçimi tercih edilir hale gelmiştir. Ön bölge implant tedavilerinde titanyum sebebiyle diş eti bölgesinde izlenen gri renk yansımasından kurtulmak amacıyla zirkonyanın dayanak materyali olarak kullanılmasıyla daha üstün estetik sonuç hedeflenmiştir. İmplant tedavisinde uzun dönem başarı sağlanabilmesi komşu sert ve yumuşak doku ile uyumlu materyal kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenlerle zirkonyanın komşu doku hücreleriyle uyumunu inceleyen araştırmalar önemlidir. Diş eti fibroblast hücreleri ve oral keratinositler üzerine CAD/CAM zirkonyanın etkilerinin incelendiği bir araştırmada hücre canlılığını ölçmede MTT test yöntemi kullanılmıştır. Keratinositlerin hücre canlılığı ve migrasyonu zirkonya CAD/CAM materyal varlığında olumsuz etkilenirken dişeti fibroblast hücreleri üzerinde olumsuz etki tespit

edilmemiştir (Pabst et al. 2016). Raffaelli ve arkadaşları tarafından zirkonya ve feldspatik seramik üzerinde *in vitro* yöntemle fare fibroblast hücrelerin biyoyumluluğu araştırılan çalışmada zirkonyanın daha uyumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Raffaelli et al. 2008). 1993 yılında Li ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada zirkonyanın da içinde olduğu seramik materyallerinin biyoyumluluğu MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Materyallerin parça boyutu oluşan hücre yanıtını etkilemiştir (Li et al. 1993). Paul ve arkadaşları dental implant dayanak materyallerinin insan fibroblast hücreleri üzerinde çoğalması üzerine sistematik derleme modelinde araştırma yapmışlardır. 3, 4, 6 ve 7 gün üzerinden hücre çoğalması, yüzey pürüzlülüğü, yüzey ıslanabilirliği değerlendirilen 44 çalışma dahil edilmiştir. Bu araştırma sonucunda zirkonya ve titanyum dayanak materyal gruplarının insan fibroblast hücrelerinin çoğalmasını en yüksek oranda destekleyen materyal grupları olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Paul, Hanisch, and Nesic 2021). Picconi ve Maccauro tarafından yapılan derlemede zirkonyanın sinterize seramik olarak uygulandığı durumlarda fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı belirtilmektedir (Piconi and Maccauro 1999).

Çalışmamızda yaptığımız XTT testi 24 saat değerlerine göre en yüksek canlılık değeri 1. günde, en düşük canlılık değeri 7. günde ölçülmüştür. 48 saat test sonuçlarına göre ise en yüksek canlılık 7. günde, en düşük canlılık 3. günde testpit edilmiştir. Kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında aradaki farklılık anlamlı bulunmamıştır. Bu nedenle hücre canlılık seviyesi üzerine sitotoksik etkili olmadığı düşünülmektedir. Apoptoz testi değerleri incelendiğinde en yüksek canlı hücre değeri ve nekroz değerinin 1. günde olduğu gözlemlenmiştir. Günler arası farklılık anlamlı bulunmadığı için programlı hücre ölümü olan apoptozun materyal ile ilişkisi kurulamamıştır. IL6 salınım değerleri yönünden en yüksek değer 1. günde, en düşük değer 3. günde ölçülmüştür. Ölçülen bu değerler kontrol grubu değerlerinin altındadır. Bu nedenle zirkonya dayanak materyalinin IL6 salınımını arttırdığı düşünülmektedir. TGF- β test değerlerinde ise salınım miktarı günlere paralel artış göstermiştir. Fakat en yüksek değer alınmış 7. gün sonucu da dahil olmak üzere tüm salınım değerleri kontrol salınım değerlerinin altındadır. Zirkonya dayanak materyalinin TGF- β salınımını arttırmadığı düşünülmektedir. ROS değerleri incelendiğinde günlerle birlikte artış izlenmektedir. 7. gün ölçüm değeri kontrol grubu ölçüm değerinin üzerinde olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu verilere dayanarak ROS

değerleri açısından zirkonya dayanak materyali sitotoksik olarak değerlendirilmemiştir.

Çalışmamızda XTT, apoptoz, IL6 sekresyonu, TGF- β sekresyonu ve ROS sekresyonu ölçüm yöntemleriyle beş farklı implant dayanak materyalinin standart hücre kültürü L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde biyouyumluluğu araştırılmıştır. Planlanmış olan ön çalışmada ise insan diş eti fibroblast primer hücre kültürü elde edilerek aynı yöntemle biyouyumluluk testleri yapılması düşünülmüş; ancak dünya genelinde yaşanan Covid-19 salgın sürecinde insan ürününe ait biyolojik materyal çalışmaları ertelenmiştir. Salgın süreci sonunda çalışmanın bu yönde geliştirilerek farklı araştırmalar yapılması düşünülmektedir. Bu çalışmanın planlamasına göre dayanak materyallerine herhangi bir yüzey işlemi uygulanmamıştır. Farklı yüzey işlemlerinin ve yaşlandırma testlerinin materyal sitotoksitesisi üzerine etkisinin olup olmadığının araştırıldığı çalışmaların gelecekte yapılacak çalışma tasarımları arasında yer alabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca bu testlerin ağız koşullarını yansıtan bir ortamda uygulanarak klinik çalışmalarla desteklenmesi de düşünülebilir.

Sonuç ve Öneriler

Bu in vitro çalışmanın sınırlamaları dahilinde, aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

1. XTT yöntemi ile yapılan hücre sitotoksosite deney sonuçlarında en yüksek canlılık lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik ve titanyum grubunda izlenmiştir. En düşük canlılık ise PEEK materyal grubunda bulunmuştur.
2. Apoptoz testi sonuçları incelendiğinde 1. gün lityum disilikat ile güçlendirilmiş cam seramik materyal grubu; 3. ve 7. günlerde ise PMMA materyal grubu diğer gruplara göre en yüksek canlılık ve en düşük nekroz oranlarını göstermişlerdir. Ancak materyaller arası bu farklılıklar istatistiksek olarak anlamlı değildir.
3. IL6 ve ROS salınımı yönünden materyal gruplarının hiçbiri sitotoksik değerler göstermemiştir.
4. TGF- β salınımı deney sonuçlarında PMMA dayanak materyal grubuna ait 1. gün test sonucu sitotoksosite göstermekte, ancak 3. ve 7. güne ait sonuçlar sitotoksosite göstermemektedir. CAD-CAM PMMA dayanak materyalinin fabrikasyon üretimine bağlı olarak yapısında artık monomer oluşmaması sitotoksosite etkisinin ortaya çıkmamasının nedeni olarak düşünülmektedir.
5. Çalışmamızın tüm sonuçları değerlendirildiğinde kullanılan tüm dayanak materyallerinin geçici ve kalıcı implant üstü protetik restorasyonlarda klinikte güvenle kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Al-Dwairi, Ziad N., Kawkab Y. Tahboub, Nadim Z. Baba, Charles J. Goodacre, and Mutlu Özcan. 2019. "A Comparison of the Surface Properties of CAD/CAM and Conventional Polymethylmethacrylate (PMMA)." *Journal of Prosthodontics* 28(4):452–57. doi: 10.1111/jopr.13033.
- Alzahrani, Fatimah Mohammed, Khadijah Mohammed, Saleh Katubi, Daoud Ali, and Saud Alarifi. 2019. "Apoptotic and DNA-Damaging Effects of Yttria-Stabilized Zirconia Nanoparticles on Human Skin Epithelial Cells." doi: 10.2147/IJN.S212255.
- Andreescu, Claudia Florina, Doina Lucia Ghergic, Oana Botoaca, Violeta Hancu, Andreea Mariana Banateanu, and Dan Nicolae Patroi. 2018. "Evaluation of Different Materials Used for Fabrication of Complete Digital Denture." *Materiale Plastice* 55(1):124–28. doi: 10.37358/mp.18.1.4977.
- Atay, Ayşe, Işıl Gürdal, Vildan Bozok Çetintas, Aslıhan Üşümez, and Ebru Cal. 2019. "Effects of New Generation All-Ceramic and Provisional Materials on Fibroblast Cells." *Journal of Prosthodontics* 28(1):e383–94. doi: 10.1111/jopr.12915.
- Balos, Sebastian, Tatjana Puskar, Michal Potran, Bojana Milekic, Daniela Djurovic Koprivica, Jovana Laban Terzija, and Ivana Gusic. 2020. "Modulus, Strength and Cytotoxicity of Pmma-Silica Nanocomposites." *Coatings* 10(6):1–13. doi: 10.3390/coatings10060583.
- Bielemann, Amália Machado, Raissa Micaella Marcello-Machado, Altair Antoninha del Bel Cury, and Fernanda Faot. 2018. "Systematic Review of Wound Healing Biomarkers in Peri-Implant Crevicular Fluid during Osseointegration." *Archives of Oral Biology* 89:107–28.
- Black, J. n.d. *Biological Performance of Materials.3.Edition*. third edition.
- Boersma, Hendrikus H., Bas L. J. H. Kietselaer, ; Leo, M. L. Stolk, ; Abdelkader Bennaghmouch, ; Leonard Hofstra, Jagat Narula, Guido A. K. Heidendal, and Chris P. M. Reutelingsperger. n.d. *Past, Present, and Future of Annexin A5: From Protein Discovery to Clinical Applications**.
- Bosshardt, Dieter D., Vivianne Chappuis, and Daniel Buser. 2017. "Osseointegration of Titanium, Titanium Alloy and Zirconia Dental Implants: Current Knowledge and Open Questions." *Periodontology 2000* 73(1):22–40.

- Bossy- Wetzell, Ella, and Douglas R. Green. 2000. "MEASURING APOPTOSIS AND RELATED ENDONUCLEASES." in *Methods in Enzymology*. Vol. 322. Academic Press.
- Bostanci, Nagihan, and Georgios N. Belibasakis. 2018. "Gingival Crevicular Fluid and Its Immune Mediators in the Proteomic Era." *Periodontology 2000* 76(1):68–84.
- Brackett, Martha Goël, Petra E. Lockwood, Regina L. W. Messer, Jill B. Lewis, Serge Bouillaguet, and John C. Wataha. 2008. "In Vitro Cytotoxic Response to Lithium Disilicate Dental Ceramics." *Dental Materials* 24(4):450–56. doi: 10.1016/j.dental.2007.06.013.
- Brinemark, Per-Ingvar. n.d. *Osseointegration and Its Experimental Background*.
- Brunot-Gohin, Céline, Jean Luc Duval, Sandra Verbeke, Kayla Belanger, Isabelle Pezron, Gérard Kugel, Dominique Laurent-Maquin, Sophie Gangloff, and Christophe Egles. 2016. "Biocompatibility Study of Lithium Disilicate and Zirconium Oxide Ceramics for Esthetic Dental Abutments." *Journal of Periodontal and Implant Science* 46(6):362–71. doi: 10.5051/jpis.2016.46.6.362.
- Bultan, Özgür, Değer Öngül, and Pınar Türkoğlu. 2010. "ZİRKONYANIN MİKROYAPILARINA VE ÜRETİM ŞEKİLLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI FABRICATION TECHNIQUES AND MICROSTRUCTURE CLASSIFICATIONS OF ZIRCONIA." *İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi* 197–204.
- Cal, Ebru, Vildan Cetintas, Hayal Boyacioglu, and Pelin Güneri. 2017. "Cytotoxicity of Dental Implants: The Effects of Ultrastructural Elements." *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 32(6):1281–87. doi: 10.11607/jomi.5962.
- Campaner, Marcio, Aline Satie Takamiya, Sandro Basso Bitencourt, Leticia Cerri Mazza, Sandra Helena Penha de Oliveira, Ricardo Shibayama, Valentim Adelino Ricardo Barão, Cortino Sukotjo, and Aldiéris Alves Pesqueira. 2020. "Cytotoxicity and Inflammatory Response of Different Types of Provisional Restorative Materials." *Archives of Oral Biology* 111. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104643.

- Chandar, Sanchitha, Ravindra Kotian, Prashanthi Madhyastha, Shama Kabekkodu, and Padmalatha Rao. 2017. "In Vitro Evaluation of Cytotoxicity and Corrosion Behavior of Commercially Pure Titanium and Ti-6Al-4V Alloy for Dental Implants." *Journal of Indian Prosthodontist Society* 17(1):35–40. doi: 10.4103/0972-4052.197936.
- Crowther, John r. 2009. "2009_Bookmatter_TheELISAGuidebook."
- CUSABIO TECHNOLOGY LLC. n.d.-a. *Mouse Interleukin 6 (IL-6) ELISA Kit*.
- CUSABIO TECHNOLOGY LLC. n.d.-b. *Mouse Transforming Growth Factor B1 (TGF-B1) ELISA Kit*.
- Denry, Isabelle L. 1996. "Recent Advances in Ceramics for Dentistry." *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 7(2):134–43.
- Duarte, P. M., C. R. Serrão, T. S. Miranda, L. C. S. Zanatta, M. F. Bastos, M. Faveri, L. C. Figueiredo, and M. Feres. 2016. "Could Cytokine Levels in the Peri-Implant Crevicular Fluid Be Used to Distinguish between Healthy Implants and Implants with Peri-Implantitis? A Systematic Review." *Journal of Periodontal Research* 51(6):689–98.
- Edgerton, Mira, and J. Levine. 1993. "Biocompatibility: Its Future in Prosthodontic Research." *The Journal of Prosthodontic Dentistry* 69(4):406–15.
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35(4):495–516.
- Elshahawy, Waleed M., Ikuya Watanabe, and Phillip Kramer. 2009. "In Vitro Cytotoxicity Evaluation of Elemental Ions Released from Different Prosthodontic Materials." *Dental Materials* 25(12):1551–55. doi: 10.1016/j.dental.2009.07.008.
- Emecen-Huja, Pinar, Tim D. Eubank, Vladimir Shapiro, Vedat Yildiz, Dimitris N. Tatakis, and Binnaz Leblebicioglu. 2013. "Peri-Implant versus Periodontal Wound Healing." *Journal of Clinical Periodontology* 40(8):816–24. doi: 10.1111/jcpe.12127.
- Erkekoglu, Pinar, and Terken Baydar. 2021. "Güncel in Vitro Sitotoksiste Testleri." *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 41(1):45–63.
- Faot, Fernanda, Gustavo G. Nascimento, Amália M. Bielemann, Thiago D. Campão, Fábio R. M. Leite, and Marc Quirynen. 2015. "Can Peri-Implant Crevicular Fluid Assist in the Diagnosis of Peri-Implantitis? A Systematic Review and

- Meta-Analysis.” *Journal of Periodontology* 86(5):631–45. doi: 10.1902/jop.2015.140603.
- Forster, András, Krisztina Ungvári, Ágnes Györgyey, Ákos Kukovecz, Kinga Turzó, and Katalin Nagy. 2014. “Human Epithelial Tissue Culture Study on Restorative Materials.” *Journal of Dentistry* 42(1):7–14. doi: 10.1016/j.jdent.2013.11.008.
- Gautam, Chandkiram, Jarin Joyner, Amarendra Gautam, Jitendra Rao, and Robert Vajtai. 2016. “Zirconia Based Dental Ceramics: Structure, Mechanical Properties, Biocompatibility and Applications.” *Dalton Transactions* 45(48):19194–215. doi: 10.1039/c6dt03484e.
- Gehrke, Peter, Ralf Smeets, Martin Gosau, Reinhard E. Friedrich, Erika Madani, Dirk Duddeck, Carsten Fischer, Florian Tebbel, Robert Sader, and Philip Hartjen. 2019. “The Influence of an Ultrasonic Cleaning Protocol for CAD/CAM Abutment Surfaces on Cell Viability and Inflammatory Response in Vitro.” *In Vivo* 33(3):689–98. doi: 10.21873/invivo.11527.
- Gibbs, Susan, S. Roffe, M. Meyer, and A. Gasser. 2019. “Biology of Soft Tissue Repair: Gingival Epithelium in Wound Healing and Attachment to the Tooth and Abutment Surface.” *European Cells and Materials* 38:63–78. doi: 10.22203/eCM.v038a06.
- Gomes, Ana Luísa, and Javier Montero. 2011. “Zirconia Implant Abutments: A Review.” *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 16(1).
- Gómez-Florit, M., J. M. Ramis, R. Xing, S. Taxt-Lamolle, H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, and M. Monjo. 2014a. “Differential Response of Human Gingival Fibroblasts to Titanium- and Titanium-Zirconium-Modified Surfaces.” *Journal of Periodontal Research* 49(4):425–36. doi: 10.1111/jre.12121.
- Gómez-Florit, M., J. M. Ramis, R. Xing, S. Taxt-Lamolle, H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, and M. Monjo. 2014b. “Differential Response of Human Gingival Fibroblasts to Titanium- and Titanium-Zirconium-Modified Surfaces.” *Journal of Periodontal Research* 49(4):425–36. doi: 10.1111/jre.12121.
- Gracis, Stefano, Van Thompson, Jonathan Ferencz, Nelson Silva, and Estevam Bonfante. 2016. “A New Classification System for All-Ceramic and Ceramic-like Restorative Materials.” *The International Journal of Prosthodontics* 28(3):227–35. doi: 10.11607/ijp.4244.

- Hahnel, Sebastian, Angela Wieser, Reinhold Lang, and Martin Rosentritt. 2015. "Biofilm Formation on the Surface of Modern Implant Abutment Materials." *Clinical Oral Implants Research* 26(11):1297–1301. doi: 10.1111/clr.12454.
- Hanks', Carl T., John C. Watahaz, and Zhilin Suni. 1996. *In Vitro Models of Biocompatibility: A Review*. Vol. 12.
- Heimer, Sina, Patrick R. Schmidlin, and Bogna Stawarczyk. 2017. "Discoloration of PMMA, Composite, and PEEK." *Clinical Oral Investigations* 21(4):1191–1200. doi: 10.1007/s00784-016-1892-2.
- Held, Paul. 2015. *An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells*.
- Hisbergues, Michael, Sophie Vendeville, and Philippe Vendeville. 2009. "Review Zirconia: Established Facts and Perspectives for a Biomaterial in Dental Implantology." *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 88(2):519–29.
- Huettig, Fabian, Andreas Prutscher, Christoph Goldammer, Curt A. Kreutzer, and Heiner Weber. 2016. "First Clinical Experiences with CAD/CAM-Fabricated PMMA-Based Fixed Dental Prostheses as Long-Term Temporaries." *Clinical Oral Investigations* 20(1):161–68. doi: 10.1007/s00784-015-1475-7.
- Hunter, A., C. W. Archer, P. S. Walker, and G. W. B~um. 1995. *Attachment and Proliferation of Osteoblasts and Fibroblasts on Biomaterials for Orthopaedic Use*. Vol. 16.
- ISO_10993_5_2009. 2009. *Biological Evaluation of Medical Devices-16:45:28 MDT No Reproduction or Networking Permitted without License from IHS*
COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT 16:45:28 MDT No Reproduction or Networking Permitted without License from IHS.
- Ivanovski, Saso, and Ryan Lee. 2018. "Comparison of Peri-Implant and Periodontal Marginal Soft Tissues in Health and Disease." *Periodontology 2000* 76:116–30.
- Jing Wang, Peng Wu, Hai-lin Liu, Ling Zhang, Li-peng Liu, Chu-fan Ma, and Ji-hua Chen. 2021. "Polyetheretherketone versus Titanium CAD-CAM Framework for Implant-Supported Fixed Complete Dentures: A Retrospective Study with up to 5-Year Follow-Up." *Prosthodontics Research*.
- Katzer, A., H. Marquardt, J. Westendorf, J. v Wening, and G. von Foerster. 2002. *Polyetheretherketone Cytotoxicity and Mutagenicity in Vitro*. Vol. 23.

- Kirkpatrick, C. J., F. Bittinger, M. Wagner, H. Kohler, T. G. van Kooten, C. L. Klein, and M. Otto. 1998a. "Current Trends in Biocompatibility Testing." *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 212(2):75–84. doi: 10.1243/0954411981533845.
- Koutouzis, Theofilos, Joseph Richardson, and Tord Lundgren. 2011. "Comparative Soft and Hard Tissue Responses to Titanium and Polymer Healing Abutments." *Journal of Oral Implantology* 37(SPEC. ISSUE):174–82. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00102.1.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. v. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino. 2009. "Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death and Differentiation* 16(1):3–11.
- Li, J., Y. Liu, L. Hermansen, and R. Söremark. 1993. "Evaluation of Biocompatibility of Various Ceramic Powders with Human Fibroblasts in Vitro." *Clinical Materials* 12:197–201.
- Lindhe, Jan, and Tord Berglundh. 2000. "The Interface between the Rnucosa and the Implant." *Periodontology* 17:47–54.
- Liu, Xiaotian, Shuyang Chen, James K. H. Tsoi, and Jukka Pekka Matinlinna. 2017. "Binary Titanium Alloys as Dental Implant Materials-a Review." *Regenerative Biomaterials* 4(5):315–23.
- Mercan, Çiğdem. 2016. *Dental İmplantlarda Kullanılan Farklı Dayanak Sistemlerinin Dayanak-İmplant Bağlantısının Deneysel Olarak İncelenmesi: İn Vitro Çalışma*. İstanbul.
- Messer, Regina L. W., Petra E. Lockwood, John C. Wataha, Jill B. Lewis, Samuel Norris, and Serge Bouillaguet. 2003. "In Vitro Cytotoxicity of Traditional versus Contemporary Dental Ceramics." *The Journal of Prosthodontic Dentistry* 90(5):452–58.
- Misch, Carl E. 2008. *Contemporary Implant Dentistry*. Mosby Elsevier.
- Misch, Carl E. 2015. *Dental Implant Prosthetics*. 2nd ed. Elsevier Mosby.
- Misch, Carl E., and Craig M. Misch. n.d. *Generic Terminology for Endosseous Implant Prosthodontics*. doi: 10.1016/0022-3913(92)90207-q.

- Mishra, Sunil, and Ramesh Chowdhary. 2019. "PEEK Materials as an Alternative to Titanium in Dental Implants: A Systematic Review." *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 21(1):208–22.
- Mittal, Manish, Mohammad Rizwan Siddiqui, Khiem Tran, Sekhar P. Reddy, and Asrar B. Malik. 2014. "Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury." *Antioxidants and Redox Signaling* 20(7):1126–67.
- Morton, Dean, German Gallucci, Wei Shao Lin, Bjarni Pjetursson, Waldemar Polido, Stefan Roehling, Irena Sailer, Tara Aghaloo, Hugo Albero, Lauren Bohner, Vedrana Braut, Daniel Buser, Stephen Chen, Anthony Dawson, Steven Eckert, Michael Gahlert, Adam Hamilton, Robert Jaffin, Christian Jarry, Banu Karayazgan, Juhani Laine, William Martin, Lira Rahman, Andreas Schlegel, Makoto Shiota, Charlotte Stilwell, Christiaan Vorster, Anja Zembic, and Wenjie Zhou. 2018. "Group 2 ITI Consensus Report: Prosthodontics and Implant Dentistry." *Clinical Oral Implants Research* 29:215–23. doi: 10.1111/clr.13298.
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65:55–63.
- Murray, Peter E., Cristina García Godoy, and Franklin García Godoy. n.d. *How Is the Biocompatibility of Dental Biomaterials Evaluated?*
- Najeeb, Shariq, Muhammad S. Zafar, Zohaib Khurshid, and Fahad Siddiqui. 2016. "Applications of Polyetheretherketone (PEEK) in Oral Implantology and Prosthodontics." *Journal of Prosthodontic Research* 60(1):12–19.
- Negahdari Ramin, Rahbar Mahdi, Fakhrzadeh Vahid, Eslami Hosein, Akbari Taleb, and Bohluli Sepideh. 2017. "Comparison of Proinflammatory Cytokine Levels in Gingival Crevicular Fluid around Dental Implants with Ceramic and Titanium Abutments." *The Journal of Contemporary Dental Practice* 18(9):831–36. doi: 10.5005/jp-journals-10024-2135.
- Pabst, A. M., & C. Walter, & A. Bell, & M. Weyhrauch, I. Schmidtman, & H. Scheller, and & K. M. Lehmann. 2016. "Influence of CAD/CAM Zirconia for Implant-Abutment Manufacturing on Gingival Fibroblasts and Oral Keratinocytes." *Clinical Oral Investigations* 20:1101–8. doi: 10.1007/s00784-015-1598-x.

- Pae, Ahran, Heesu Lee, Hyeong Seob Kim, Yong Dae Kwon, and Yi Hyung Woo. 2009. "Attachment and Growth Behaviour of Human Gingival Fibroblasts on Titanium and Zirconia Ceramic Surfaces." *Biomedical Materials* 4(2). doi: 10.1088/1748-6041/4/2/025005.
- Paul, Stefan, Oliver Hanisch, and Dobrila Nesic. 2021a. "Human Gingival Fibroblast Proliferation on Materials Used for Dental Implant Abutments: A Systematic Review." *The International Journal of Prosthodontics* 34(6):811–28. doi: 10.11607/ijp.7388.
- Peng, Tzu-Yu, Yin-Hwa Shih, Shih-Min Hsia, Tong-Hong Wang, Po-Jung Li, Dan-Jae Lin, Kuo-Ting Sun, Kuo-Chou Chiu, and Tzong-Ming Shieh. 2021. "In Vitro Assessment of the Cell Metabolic Activity, Cytotoxicity, Cell Attachment, and Inflammatory Reaction of Human Oral Fibroblasts on Polyetheretherketone (PEEK) Implant-Abutment." *Polymers* 13(17). doi: 10.3390/polym13172995.
- Piconi, C., and G. Maccauro. 1999. *Zirconia as a Ceramic Biomaterial*. Vol. 20.
- Pitta, João, Jasmina Bijelic-Donova, Felix Burkhardt, Vincent Fehmer, Timo Närhi, and Irena Sailer. 2020. "Temporary Implant-Supported Single Crowns Using Titanium Base Abutments: An In Vitro Study on Bonding Stability and Pull-out Forces." *The International Journal of Prosthodontics* 33(5):546–52. doi: 10.11607/ijp.6778.
- Pituru, Silviu Mirel, Maria Greabu, Alexandra Totan, Marina Imre, Mihaela Pantea, Tudor Spinu, Ana Maria Cristina Tancu, Nicoleta Olivia Popoviciu, Iulia Ioana Stanescu, and Ecaterina Ionescu. 2020. "A Review on the Biocompatibility of PMMA-Based Dental Materials for Interim Prosthetic Restorations with a Glimpse into Their Modern Manufacturing Techniques." *Materials* 13(13):1–14.
- Pivodovaa, Veronika, Jana Frankovaa, and Jitka Ulrichovaa. 2011. "Osteoblast and Gingival Fibroblast Markers in Dental Implant Studies." *Biomedical Papers* 155(2):109–16. doi: 10.5507/bp.2011.021.
- Prosthodontics, Graduate. n.d. *Implants and Components: Entering the New Millennium*. Paul P. Binon DDS, MSD.
- Raffaelli, Luca, Pierfrancesco Rossi Iommetti, Elisabetta Piccioni, Amelia Toesca, Simona Serini, Federica Resci, Mauro Missori, Marco de Spirito, Paolo F. Manicone, and Gabriella Calviello. 2008. "Growth, Viability, Adhesion

- Potential, and Fibronectin Expression in Fibroblasts Cultured on Zirconia or Feldspathic Ceramics in Vitro.” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 86(4):959–68. doi: 10.1002/jbm.a.31693.
- Raton, Boca, London New, York Washington, Joon B. Park, and Joseph D. Bronzino. 2000. *Biomaterials: Principles and Applications*. New York.
- Riss, Terry L., and Richard A. Moravec. 2006. “Cell Proliferation Assays: Improved Homogeneous Methods Used to Measure the Number of Cells in Culture.” Pp. 25–31 in *Cell Biology*. Academic Press.
- Rizo-Gorrita, María, Cristina Herráez-Galindo, Daniel Torres-Lagares, María Ángeles Serrera-Figallo, and José Luis Gutiérrez-Pérez. 2019. “Biocompatibility of Polymer and Ceramic CAD/CAM Materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs).” *Polymers* 11(9). doi: 10.3390/polym11091446.
- Rozeik, Ahmed Said, Mohamed Sad Chaar, Sandra Sindt, Sebastian Wille, Christine Selhuber-Unkel, Matthias Kern, Samar El-Kholy, Christof Dörfer, and Karim M. Fawzy El-Sayed. 2022. “Cellular Properties of Human Gingival Fibroblasts on Novel and Conventional Implant-Abutment Materials.” *Dental Materials* 38(3):540–48. doi: 10.1016/j.dental.2021.12.139.
- Salvi, Giovanni E., Dieter D. Bosshardt, Niklaus P. Lang, Ingemar Abrahamsson, Tord Berglundh, Jan Lindhe, and Nikos Donos. 2015. *Temporal Sequence of Hard and Soft Tissue Healing around Titanium Dental Implants*.
- Saw, Tzuen Yih, Tong Cao, Adrian U. Jin Yap, and Mary Mah Lee Ng. 2005. “Tooth Slice Organ Culture and Established Cell Line Culture Models for Cytotoxicity Assessment of Dental Materials.” *Toxicology in Vitro* 19(1):145–54. doi: 10.1016/j.tiv.2004.08.006.
- Schmalz, G. 1994. *Use of Cell Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials-Advantages and Limitations*. Vol. 2.
- Schmalz, G. 1997. “Concepts in Biocompatibility Testing of Dental Restorative Materials.” *Clinical Oral Investigations* 1:154–62.
- Schupbach, Peter, and Roland Glauser. n.d. *Clinical Implications The Defense Architecture of the Human Periimplant Mucosa: A Histological Study*.
- Sculean, Anton, Reinhard Gruber, and Dieter D. Bosshardt. 2014. “Soft Tissue Wound Healing around Teeth and Dental Implants.” *Journal of Clinical Periodontology* 41:S6–22.

- ŞEN, Nazmiye, and Yeşim ÖLÇER US. 2019. "Abutment Selection for Implant Supported Fixed Prosthodontic Restorations." *Turkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences* 25(1):104–12. doi: 10.5336/dentalsci.2017-57252.
- Serichetaphongse, Pravej, Wareeratn Chengprapakorn, Sirikarn Thongmeearkom, and Atiphan Pimkhaokham. 2020. "Immunohistochemical Assessment of the Peri-Implant Soft Tissue around Different Abutment Materials: A Human Study." *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 22(5):638–46. doi: 10.1111/cid.12942.
- Shahi, Shahriar, Mutlu Özcan, Solmaz Maleki Dizaj, Simin Sharifi, Nadin Al-Haj Husain, Aziz Eftekhari, and Elham Ahmadian. 2019. "A Review on Potential Toxicity of Dental Material and Screening Their Biocompatibility." *Toxicology Mechanisms and Methods* 29(5):368–77.
- Shim, Ji, Hee Kim, Serk Park, Hyung Yun, and Jae Ryu. 2019. "Comparison of Various Implant Provisional Resin Materials for Cytotoxicity and Attachment to Human Gingival Fibroblasts." *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 34(2):390–96. doi: 10.11607/jomi.6707.
- de Souza Costa, Carlos A., Josimeri Hebling, Débora L. S. Scheffel, Diana G. S. Soares, Fernanda G. Basso, and Ana Paula D. Ribeiro. 2014. "Methods to Evaluate and Strategies to Improve the Biocompatibility of Dental Materials and Operative Techniques." *Dental Materials* 30(7):769–84. doi: 10.1016/j.dental.2014.04.010.
- Standards Authority of Ireland, National. 2012. (2012) (English): *Biological Evaluation of Medical Devices-Part 12: Sample Preparation and Reference Materials [Authority: The European Union Per Directive 90/385/EEC]*.
- Stepanova, I. I. 2007. "The Use of Fibroblasts in Periodontology and Implantology." *Cell Technologies in Biology and Medicine* (3):165–68.
- Taira, Masayuki, Hiroyuki Nakao, Takuya Matsumoto, and Junzo Takahashi. 2000. "Cytotoxic Effect of Methyl Methacrylate on 4 Cultured Fibroblasts." *The International Journal of Prosthodontics* 13(4):311–15.
- Talwar, B. S. 2012. "A Focus on Soft Tissue in Dental Implantology." *Journal of Indian Prosthodontist Society* 12(3):137–42.
- The Glossory of Prosthodontic Terms. n.d. *THE GLOSSARY OF PROSTHODONTIC TERMS*.

- Tokur, Orhan, and Abdurrahman Aksoy. 2017. "In Vitro Sitotoksiste Testleri." *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 6(1):112–18.
- Tomasi, Cristiano, Francesco Tessarolo, Iole Caola, Federico Piccoli, Jan L. Wennström, Giandomenico Nollo, and Tord Berglundh. 2016. "Early Healing of Peri-Implant Mucosa in Man." *Journal of Clinical Periodontology* 43(10):816–24. doi: 10.1111/jcpe.12591.
- Trubiani, O., E. Toniato, D. Di, F. Diomedè, I. Merciaro, C. D'arcangelo, and S. Caputi. 2012. *MORPHOLOGICAL ANALYSIS AND INTERLEUKIN RELEASE IN HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS SEEDED ON DIFFERENT DENTURE BASE ACRYLIC RESINS*. Vol. 25.
- Tsuda H, Ning Z, Yamaguchi Y, and Naota Suzuki. 2012. "Programmed Cell Death and Its Possible Relationship with Periodontal Disease." *Journal of Oral Science* 54(2):137–49.
- Uzun, İsmail Hakkı, and Funda Bayındır. 2010. *Dental Uygulamalarda Titanyum ve Özellikleri*. Erzurum.
- Velasco-Ortega, Eugenio, Angeles Jos, Ana M. Cameán, Jesús Pato-Mourelo, and Juan J. Segura-Egea. 2010. "In Vitro Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of a Commercial Titanium Alloy for Dental Implantology." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 702(1):17–23. doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.06.013.
- W. Nicholson, John. 2020. "Titanium Alloys for Dental Implants: A Review." *Prosthesis* 2(2):100–116. doi: 10.3390/prosthesis2020011.
- Wang, Jing, Peng Wu, Hai-lin Liu, Ling Zhang, Li-peng Liu, Chu-fan Ma, and Ji-hua Chen. 2021. "Polyetheretherketone versus Titanium CAD-CAM Framework for Implant-Supported Fixed Complete Dentures: A Retrospective Study with up to 5-Year Follow-Up." *Journal of Prosthodontic Research*. doi: 10.2186/jpr.jpr_d_20_00142.
- Wedekind, Lennart, Jan Frederik Güth, Josef Schweiger, Maximilian Kollmuss, Franz Xaver Reichl, Daniel Edelhoff, and Christof Högg. 2021. "Elution Behavior of a 3D-Printed, Milled and Conventional Resin-Based Occlusal Splint Material." *Dental Materials* 37(4):701–10. doi: 10.1016/j.dental.2021.01.024.

- Wei Chenxuan, Gong Ting, Pow Edmond H. N., and Botelho Michael G. 2019. "Adhesive and Oxidative Response of Stem Cell and Pre- Osteoblasts on Titanium and Zirconia Surfaces in Vitro." *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. doi: 10.1111/jicd.12407.
- Wenz, L. M., K. Memitt, S. A. Brown, A. Moet, and A. D. Steffee. 1990. "In Vitro Biocompatibility of Polyetheretherketone and Polysulfone Composites." *Journal of Biomedical Materials Research* 24:207–15.
- Willard, Alec, and Tien Min Gabriel Chu. 2018. "The Science and Application of IPS e.Max Dental Ceramic." *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 34(4):238–42.
- Williams, DF. 1981. "Fundamental Aspects of Biocompatibility." in *Fundamental aspects of biocompatibility*. Vol. 1. New York: CRC Press Llc.
- Willis, Jonathan, Siwei Li, St John Crean, and Fadi N. Barrak. 2021. "Is Titanium Alloy Ti-6Al-4 V Cytotoxic to Gingival Fibroblasts—A Systematic Review." *Clinical and Experimental Dental Research* 7(6):1037–44.
- Zhang, Lai Chang, and Liang Yu Chen. 2019. "A Review on Biomedical Titanium Alloys: Recent Progress and Prospect." *Advanced Engineering Materials* 21(4).

Teşekkür

Doktora eğitimimde ve tez çalışmamın her aşamasında tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana yol gösteren, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen, yolumu kaybettiğim zamanlarda sabırla bana ışık tutan, yaşama karşı duruşunu kendime örnek aldığım değerli tez danışmanım, Sevgili Hocam Sayın Prof. Dr.Ebru KARABECE ÇAL'a;

Tez çalışmamın sitotoksisite bölümünün kurgulanıp yürütülmesinde uzun dönemli destek ve katkılarından dolayı sayın Doc.Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a; testlerin yapımı ve yazımında destekleri ve sabırla yardımları için Zafer YILDIRIM ve Sevim AYDEMİR'e;

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca bana yardım ve desteğini yakından hissettiğim, motivasyonumu kaybettiğim zamanlarda elini üzerimden eksik etmeyen, Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Mine DÜNDAR ÇÖMLEKOĞLU' na;

Tez çalışmamın geliştirilmesindeki emekleri için Sayın Prof. Dr. Pelin GÜNERİ' ye;

Çalışmamın istatistik testlerin yapılması ve yorumlanmasında yardımcı olan Sayın Doc. Dr. Timur KÖSE'ye;

Bilgi ve tecrübeleriyle doktora eğitimim boyunca bana daima destek olan anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Tomurcuk Övül KÜMBÜLOĞLU'na;

Bilgi ve tecrübeleri ile doktora eğitimim süresince bana yardımcı olan Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri ve çalışma arkadaşlarıma;

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili arkadaşlarım Uzm. Dt. Tuğçe KIZILTUĞ ÇOMAK'a, Dr. Dt. Fatma ERŞİL'e;

Bana inanan, desteklerini her koşulda yanımda hissettiğim ikinci ailem kayınvalidem Sevgili Hatice ÇİMENTEPE ve kayınpederim Ahmet ÇİMENTEPE'ye;

Hayatım boyunca hep yanımda olan, sabır ve sevgileri le bana güç veren sevgili annem Nevim AYGÜN, babam Ali AYGÜN ve kardeşim Melike AYGÜN'e;

Hayatımda yer aldığı günden beri beni her koşulda destekleyen ve yalnız bırakmayan, sabrı ile her zaman yanımda olan, özellikle doktora eğitimimin en büyük mimarı, hayat arkadaşım, değerli eşim İsmail İlkey ÇİMENTEPE'ye;

Varlığı ile yaşamı bana sevdiren, birlikte büyüdüğüm, enerji kaynağım, gün ışığım, can yoldaşım, canım kızım Makbule Duru ÇİMENTEPE'ye minnetle teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 13.10.2022

Dt. Elif AYGÜN
ÇİMENTEPE

Özgeçmiş

Adı: Elif

Soyadı: AYGÜN ÇİMENTEPE

Doğum Tarihi: .

Doğum Yeri:

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Bilgileri:

Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 1997-2002

Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı (2017-Halen devam etmekte)