

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

# Titanyum Abutment Üzerinde Çeşitli Prosedürlerle Fikse Edilmiş HGF-1 Hücrelerinin Değerlendirilmesi

Ülkü Tuğba KALYONCUOĞLU<sup>1</sup>, Ebru ALİMOĞULLARI<sup>2</sup>, Mualla Pınar ELÇİ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Dış Hekimliği Fakültesi Protetik Dış Tedavisi Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>3</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Laboratuvarı, Ankara.

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, titanyum abutment üzerinde, insan gingival fibroblast hücre hattının (HGF-1), tutunma ve proliferasyon açısından fiksasyon solüsyon ve sürelerinin etkilerinin SEM ve İmmunofloresan görüntüleme ile değerlendirilmesi ve kıyaslanmasıdır. Hazır temin edilen insan gingival hücre hattı (HGF-1) 10x10x1cm<sup>3</sup> boyutunda 32 adet titanyum alaşım (Ti6Al4V) plaka üzerine ekildi. 8 grup belirlendi (n=4). 48 saat sonucunda hücreler değerlendirildi. Örnekler Gluteraldehit ile 30, 45, 60 dakika (Grup GA30, GA45, GA60), Formaldehit ile 6, 12, 24 saat (Grup FA6, FA12, FA24) ve Paraformaldehit ile 2 saat ve 20 dakika (Grup PFA2, PFA20) süre ile fikse edildi. Fiksasyon sonrası her gruptan 2 örnek Taramalı elektron mikroskopunda (SEM) ve 2 örnek İmmunofloresan mikroskopunda görüntülenmek için hazırlandı. Tüm gruplardaki hücrelerin temas alanları ölçüldü, saatler arasındaki farklılık istatistiksel olarak değerlendirildi. SEM değerlendirmesinde, en uygun HGF-1 hücre morfolojisi görüntülerinin formaldehit gruplarının içi şekilli homojen yayılım gösterdiği tespit edildi. FA12 grubunda hücre temas alanı %95,83 bulunmuş olup, tüm deney grupları içerisinde en iyi hücre yayılımını göstermiştir. Gluteraldehit ve paraformaldehit gruplarında birbirleriyle benzer şekilde hücrelerin uzamış, belirli alanlarda öbekleşmiş ve üst üste katmanlanmış belirgin çekirdekli hücre görüntüleri tespit edildi. İmmunofloresan görüntülerinde her üç (gluteraldehit, formaldehit, paraformaldehit) gruptaki hücrelerde de aktin filamentlerinin yoğunlukları benzer seviyelerde görülmesinin yanı sıra paraformaldehit gruplarında titanyum yüzeydeki hücre gövdelerinin diğer fiksatif gruplarına göre daha belirgin, iyi yayılmış ve daha büyük yüzey alanlarına sahip olduğu gözlemlendi. Fiksasyon hücre çalışmalarında görüntülemenin en kritik basamaklarından biridir. Araştırmacıların başarılı görüntü sonucu elde edebilmek için en uygun fiksasyon yöntemini göz önünde bulundurmaları gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ti6Al4V. HGF-1. Fiksasyon. İmmunofloresan.

## Evaluation of the HGF-1 Cells on Titanium Abutments Fixed by Various Procedures

### ABSTRACT

The aim of this study was to compare the effects of fixation protocols in terms of attachment and proliferation of human gingival fibroblasts (HGF-1) on titanium abutment surfaces. HGF-1 cells were seeded on Titanium alloy (Ti6Al4V) plates with dimensions of 10x10x1 cm<sup>3</sup>. Cells were evaluated at 48 hours. 8 groups were determined (n=4). The specimens were treated with glutaraldehyde (GA) for 30,45 and 60 minutes (Group GA30, GA45, GA60), with formaldehyde (FA) for 6, 12, and 24 hours (Group FA6,FA12,FA24) and with paraformaldehyde (PFA) for 2 hours and 20 minutes (Group PFA2, PFA20) for fixation. Specimens were evaluated under Scanning Electron Microscope (SEM) (n=2) and under Immunofluorescence (n=2). The contact areas of cells in all groups were measured and differences between hours was evaluated statistically. According to SEM images, HGF-1 cell were similar for FA groups as spindle and homogeneous. Cell contact area was 95.83% for FA12 which exhibited the best cell spread among all groups. In GA and PFA groups the cells were elongated, clustered in certain areas and layered with distinct nucleated. According to immunofluorescence images, the densities of actin filaments were observed at similar levels in cells in all three groups, and it was determined that the cell bodies on the titanium surface in the PFA groups were more prominent, and better spread. The fixation process is one of the most critical step of imaging in cell studies. Researchers are needed to consider the most appropriate fixation method in order to obtain successful image results.

**Keywords:** Ti6Al4V. HGF-1. Fixation. Immunofluorescence.

**Geliş Tarihi:** 11.Kasım.2022

**Kabul Tarihi:** 13.Şubat.2023

Dr. Ülkü Tuğba KALYONCUOĞLU  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Dış Hekimliği Fakültesi  
Protetik Dış Tedavisi Anabilim Dalı,  
Ankara.  
Tel: 0312 304 14 28  
E-posta: tugba.kalyoncuoglu

### Yazarların ORCID Bilgileri:

Ülkü Tuğba KALYONCUOĞLU: 0000-0002-7444-9623  
Ebru ALİMOĞULLARI: 0000-0002-9557-3631  
Mualla Pınar ELÇİ: 0000-0003-1007-9456

Titanyum ve alaşımları (Ti6Al4V), mükemmel biyouyumlulukları, korozyon dirençleri ve biyolojik işlevsellikleri bakımından dental implant, abutment ve protetik alt yapı malzemesi olarak sık kullanılan malzemelerden biridir.<sup>1,2</sup> Dental implantların klinik başarısı, osseointegrasyonun yanı sıra implant-abutment arayüzündeki yumuşak dokunun iyileşme başarısına ve sağlığını idame ettirmesine bağlıdır.<sup>3,4</sup> Bu nedenle, araştırmacılar tarafından implant-abutment arayüzündeki yumuşak doku anatomisi ve fizyolojisinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir.<sup>2</sup>

İnsan gingival hücreleri (Human gingival fibroblast, HGF-1) dişeti bağ dokusunun adaptasyonundan, yara iyileşmesinden ve yenilenmeden sorumludur.<sup>4</sup>

HGF-1 hücreleri mikroskopik olarak çeşitli görüntüleme yöntemleri ile morfoloji, tutunma ve proliferasyon miktarı bakımından değerlendirilebilmektedir.<sup>2</sup>

Multidisipliner bir çalışma konusu olarak değerlendirildiğinde, biyolojik deneylerin gerçekleştirilmesinden mikroskopik görüntüleme ve değerlendirmeye uzanan süreçte her bir işlem basamağı öneme sahiptir. Yapılan HGF-1 çalışmalarında taramalı elektron mikroskobu (SEM)<sup>2,5</sup>, immunofloresan mikroskobu<sup>5-7</sup>, konfokal mikroskop<sup>8</sup>, atomik kuvvet mikroskobu (AFM)<sup>9</sup> gibi çeşitli görüntüleme yöntemlerinin kullanıldığı gözlemlenmektedir. SEM incelenen örneğin nanometre ile mikrometre ölçeğinde analizi için detaylı yapısal, morfolojik ve kimyasal bilgi edinmek amacıyla kullanılan bir görüntüleme yöntemidir.<sup>10</sup> Görüntüleme işlemi öncesi numunenin hazırlanması için ilk işlem olan fiksasyon, kullanılan çeşitli fiksasyon solüsyonlarının hücreye difüzyonu ile başlayan bir fizikokimyasal süreçtir. Kimyasal yapılarına göre fiksasyon solüsyonları aldehitler (gluteraldehit, formaldehit, paraformaldehit) alkoller, okside edici ajanlar ve metalik fiksatifler olarak sınıflandırılır.<sup>11</sup> Fiksasyon mekanizmaları kullanılan fiksasyon solüsyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir, çapraz bağlantı, dehidratasyon, ısı etkisi ve asit etkisi şeklinde etki edebilmektedir.<sup>12,13</sup> Yaygın olarak kullanılan hücre görüntüleme yöntemlerinden olan SEM görüntülemede fiksasyon sonrası dehidratasyon, kurutma, yüzey kaplama işlemleri gerçekleştirilmektedir.<sup>2</sup> Hücrelerin morfolojik değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer yöntem olan floresan antikor boyaması veya immunofloresan, hücre "smear'ları", kültürlenmiş hücreler veya donmuş doku kesitleri üzerinde kullanılan bir antijen tespit analizidir. Antijen, özel olarak modifiye edilmiş olan ajana özgü antikorların örnek matrisine bağlanmasıyla tespit edilmektedir.<sup>13</sup> Hücre morfolojilerinde ve yayılmasında meydana gelen değişikliklerin incelenebilmesi için hücreler, hücre iskeletine etki eden Phalloidin boyası ile boyanmaktadır.<sup>14</sup>

Literatürde, aynı titanyum altlık malzeme ve hücre hattı kullanılan çalışmalarda örneklerin çok farklı sürelerde, farklı fiksasyon solüsyonlarına maruz bırakıldığı tespit edilmiştir. Bugüne kadar hücre morfolojisini ideal olarak koruyan bir fiksasyon solüsyonu ve fiksasyon prosedürü belirtilmemiştir, bu konuda araştırmalar devam etmektedir.

Bilgimiz dahilinde literatürde, titanyum yüzeyi ile HGF-1 ilişkisi ile ilgili çalışmalar içinde SEM ve immunofloresan görüntüleme işlemleri öncesi uygulanan fiksasyon süresi ve fiksatiflerin etkisinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Titanyum alaşımı (Ti6Al4V) üzerinde proliferere olmuş HGF-1 hücrelerinin mikroskopik görüntülerini elde edebilmek için uygulanan farklı fiksatif ve fiksasyon sürelerinden oluşan protokollerin, hücre morfolojileri üzerine etkilerinin SEM ve immunofloresan mikroskobu ile kıyaslamalı olarak değerlendirmektir. Bu çalışmanın sıfır hipotezi, farklı sürelerin veya fiksatiflerin morfolojik bakımdan HGF-1 hücrelerini etkilemediğidir.

## Gereç ve Yöntem

### *Titanyum Örneklerin Hazırlanması*

Bu çalışmada r=10 mm h=1 mm boyutlarında Titanyum alaşım (Ti6Al4V) 32 adet disk kullandı. Deneyde kullanılan tüm örneklerin yüzey pürüzlülükleri profilometre (TR100 Surface Roughness Tester; Checkline Europe BV, Köln, Germany) ile ölçüldü. Cihaz ucunun iğne çapı 0.25µm 'dur. Ölçüm numune üzerindeki 4mm'lik bir aralıkta ve 0,5 mm/s hızda yapıldı. Her bir örnek yüzeyinde üç farklı noktadan ölçüm yapılarak her bir örneğin ortalama yüzey pürüzlülüğü değeri (Ra, µm) kaydedildi. Biyolojik deney öncesi örneklerin sterilizasyon işlemi %100'lük etanol içerisinde ve 15 dakika UV ışığı altında bekletildi. Daha sonra ikişer kere steril distile su ve steril fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı.

### *Hücre Kültürü Çalışmaları*

#### Hücre Kültürü Koşulları

Hücre kültür çalışmalarında hazır insan gingival hücre hattı (HGF-1) (ATCC-CRL-2014; American Type Culture Collection, Manassas, VA) kullanıldı. Bu sebeple etik kurula başvuruda bulunulmamıştır. HGF-1 hücreleri Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4500 mg/l glikoz, sodyum piruvat ve sodyum bikarbonat içeren Sigma D6429) besiyeri içinde %10'luk ısı ile inaktive edilmiş Fetal dana serumu FBS (Biochrom S0115) ve 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin (Biochrom A2213) eklenerek T75 hücre kültür kaplarında hücre yoğunluğu mililitrede  $1 \times 10^6$  ulaşana kadar 37°de %5 CO<sub>2</sub> 'li, %95 nemlendirilmiş etüv içerisinde inkübe edildi. Ti6Al4V örnekler üzerine 2ml besiyer içinde 24 kuyucuklu plakalarda militredeki hücre yoğunluğu  $5 \times 10^4$  olacak şekilde ekim yapıldı. Daha sonra örnekler 48 saatlik inkübasyona (%95 nem, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C doku kültürü etüvü) bırakıldı.

#### MTT analizi

Hücre proliferasyonu için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetra-zolium salt) test kiti (Sigma, St Louis, MO, USA) kullanıldı. 48 saat inkübasyon sonucunda kuyucukta 0.5 mg/ml (DMEM hazırlanmış) MTT solüsyonu kuyucuklara eklendi. Daha sonra hücreler MTT solüsyonu

## Titanyum Üzerinde HGF-1'in Fiksasyon Yöntemleri

içerisinde 2-4 saatlik inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda MTT solüsyonu ortamdan uzaklaştırılıp oluşan formazan kristalleri üzerine 100 µl isopropil alkol (0.04 M Hidroklorik asit (HCl) eklendi. Örnekler formazan kristallerinin çözünmesi için oda ısısında karanlıkta 1-2 saat bekletildi. Süre sonunda örnekler plaklarda çözünmüş olan formazan kristallerini içeren solüsyon alınıp Elisa okuyucuda (Biotek Epoch, Germany) 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kontrol grubu herhangi bir malzeme ile temas etmeyen hücreler ile temsil edildi. Spektrofotometrik veriler %100 olarak kabul edilen kontrol grubunun yüzdeleri olarak ifade edildi.

### Fiksasyon İşlemleri

Örnekler SEM görüntülemesi ve İmmüno Floresan mikroskopunda değerlendirilmek için 2 gruba ayrıldı. (Tablo I). Her bir fiksasyon süresi için iki örnek seçilerek belirtilen şekilde fiksasyon süreci başlatıldı.

**Tablo I.** Çalışmada SEM ve İmmüno Floresan görüntüleme öncesi uygulanan fiksatifler ve süreleri

Fiksatif adı	Süre	Grup adı
Gluteraldehit	30 dakika	GA30
	45 dakika	GA45
	60 dakika	GA60
Formaldehit	6 saat	FA6
	12 saat	FA12
	24saat	FA24
Paraformaldehit	2 saat	PFA2
	20 dakika	PFA20

Gluteraldehit fiksatifli kullanılan örnekler üç kez PBS ile yıkandıktan sonra %4 lük gluteraldehit ile GrupGA30 30 dakika<sup>15</sup>, GrupGA45 45 dakika, GrupGa60 60 dakika oda ısısında inkübe edildi. Süre sonunda iki kez PBS ile yıkayıp %40-50-60-70-80-90-95 alkol serisinden (5'er dakika) geçirildi. Kuruması sağlanarak +4 °C' de saklandı.

Formaldehit fiksatifli kullanılan örnekler üç kez PBS ile yıkandıktan sonra %4 lük formaldehit ile GrupFA6, 6 saat, GrupFA12 12 saat ve GrupFA24<sup>16</sup> 24 saat oda ısısında inkübe edildi. Süre sonunda iki kez PBS ile yıkayıp %30-40-50-60-70-80-90-99 alkol serisinden (5'er dakika) geçirildi. Kuruması sağlanarak +4 °C' de saklandı.

Paraformaldehit fiksatifli kullanılan örnekler üç kez PBS ile yıkandıktan sonra %4 lük paraformaldehit ile GrupPFA2 2 saat<sup>18</sup>, GrupPFA20 20 dakika oda ısısında<sup>6</sup> inkübe edildi. Süre sonunda iki kez PBS ile yıkayıp %20-30-40-50-60-70-80-90-99 alkol serisinden (5'er dakika) geçirildi. Kuruması sağlanarak +4 °C' de saklandı.

### Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi

SEM görüntülemesi için boş ve fiksasyon işlemleri uygulanan örnekler 5nm AuPd kaplanarak 500 ve 5000 büyütmede SEM cihazında incelendi (Zeiss LS-10, Germany). Her örnekten 3 fotomikrograf (1 tane merkezden ve 2 tane rastgele periferik alandan) 500 büyütmede seçildi. Görüntü boyutu kalibre edildikten sonra hücresiz örnekteki alan % total yüzey alanı olarak ifade edildi. Her mikrogram kodlanarak hücrelerin kaplanmış oldukları alan Image J-NIH (Bethesda, USA) programı ile değerlendirildi<sup>17</sup>.

### Floresan boyama

İmmüno Floresan görüntüleme için belirlenen örnekler hücre membran geçirgenliğini artırmak için, %0.5'lik Triton X-100 (Sigma) çözeltisinde +4 °C'de 20 dak bekletildi. Triton X-100 çözeltisi uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapıldıktan sonra üzerine bloklayıcı solüsyonu (%3 Bovine serum albumin, %10 rabbit serum) dökülüp 1 saat bekletildi. Bloklayıcı sonrasında Alexa Flour 488 Phalloidin (1:200) çözeltisi eklenerek 1 saat karanlıkta inkübe edildi. Hücreler floresan uyumlu kapatma medyumunu (Abcam) ile kapatıldı, floresan mikroskopu altında görüntüledi ve floresan mikroskopu kamerası aracılığıyla fotoğraflandırdı (Olympus BX53, Japan).

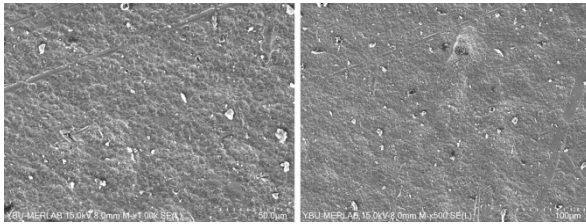
### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde GraphPad Prism programı kullanıldı. MTT 24 ve 48 saatte elde edilen spektrofotometrik ölçüm sonuçları, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Hücrelerin örnek yüzeylerinde kapladıkları temas alan ölçümlerinde fiksasyon solüsyonlarına göre saatler arası farklılıkların değerlendirilmesinde iki gruba ait örnekler Student's t-testi ile karşılaştırıldı. İki veya daha fazla grup birbiri ile karşılaştırılırken "Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA)" testi ve "Turkey" yardımcı testi kullanıldı. Tüm analizlerde anlamlılık değeri p <0.05 olarak kabul edildi.

## Bulgular

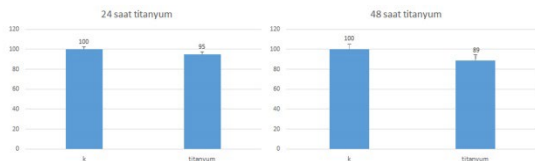
Disk örneklerin yüzey pürüzlülüğü  $Ra=0.27 \pm 0.03 \mu m$  olarak kaydedilmiştir. Ti6Al4V örneklerin hücre ekilmeden önceki SEM görüntüleri Şekil 1'de sunulmuştur. MTT analizinde 24 saat sonucunda disk örnekler üzerindeki HGF-1 hücre canlılık oranı kontrole göre %95 ve 48 saatte %89 olarak ölçülmüştür. İki sürede de kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ) (Şekil 2). SEM değerlendirmelerinde elde edilen mikrogramlardan hücrelerin temas alanları ölçümünde GA30 grubunun %70,43  $\pm 0.03$ , GA45 grubunun %58,91  $\pm 7,2$ , GA60 grubunun %65,73  $\pm 9,13$ ; FA6 grubunun, %69,39  $\pm 13,2$ , FA12 grubunun %95,83  $\pm 0,1$  FA24 grubunun %58,83  $\pm 1.11$ ; PFA20 grubunun %67,33  $\pm 9,3$  ve PFA120 grubunun ise %77,41  $\pm 2,43$

HGF-1 ile kaplandığı tespit edildi. Hücrelerin disk yüzeylerinde kapladıkları temas alanları bakımından aynı fiksasyon solüsyonlarına göre farklı sürelerin etkisi; GA ile fiksasyon sonucu GA30 ile GA45, GA45 ile GA60 ve GA30 ile GA60 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). FA ile fiksasyon sonucunda, FA6 ile FA12, FA6 ile FA24 ve FA12 ile FA24 gruplararası değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). PFA ile fiksasyon sonucu PFA20 ile PFA120 değerlendirildiğinde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 3). SEM görüntülerinde HGF-1 hücre morfolojileri değerlendirildiğinde, her üç GA grubunda birbiriyle benzer olacak şekilde, yüzeyde hücrelerin uzamış, disk yüzeylerinde kısmi olarak belli alanlarda titanyum yüzeylerinden daha yüksek öbelenmiş, belirgin çekirdek görüntüsü gösterdikleri tespit edilmiştir. Tüm gruplarda Ti6Al6V yüzeylerinde yer yer boşlukların olduğu ve benzer yayılım gösterdiği gözlemlenmiştir. En geniş alana ulaşmış HGF-1 görüntüsünü GA30 grubunun verdiği görülmektedir. FA fiksasyonu sonucu tüm gruplarda HGF-1'lerin disk yüzeyinde iğsi şekilli ve homojen yayılım gösterdikleri gözlemlenmiştir. Bunlar içerisinde en yüksek yayılım oranını FA12 göstermiştir. Paraformaldehit gruplarında SEM değerlendirmesinde, birbirleriyle benzer olmak üzere hücrelerin uzun yapıda ve üst üste konumlandığı, belirgin çekirdek görüntüsünün gluteraldehit ve formaldehit gruplarına nazaran daha düzensiz büyüklükte heterojen olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6A). Fiksasyon süresinin paraformaldehit için hücre morfoloji bazında bir değişiklik meydana getirmediği görülmüştür. SEM değerlendirmesi için FA12 tüm solüsyon ve süreler içerisinde en iyi hücre morfolojisi görüntüsünün ve en iyi hücre yayılımının gözlemlendiği grup olmuştur.



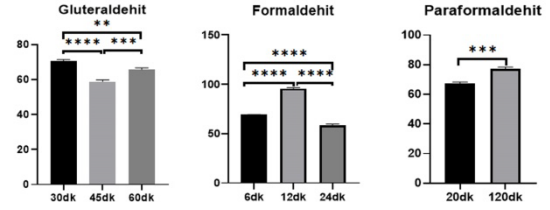
Şekil 1:

Ti6Al4V örneklerin boş SEM görüntüleri (x1000 ve x500 büyütme)



Şekil 2:

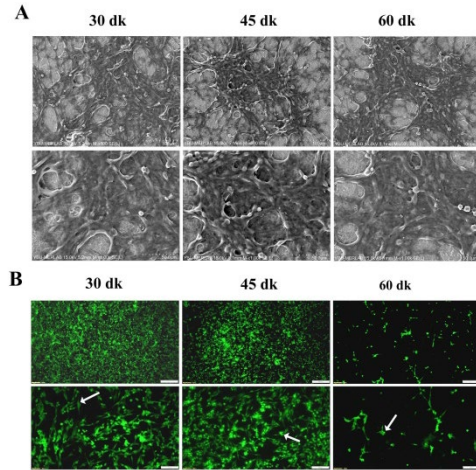
HGF-1 MTT sonuçlarının kontrole göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi (24 ve 48 saat) ( $p > 0.05$ )



Şekil 3:

HGF-1 hücrelerinin disk yüzeyine kapladıkları alanların fiksasyon solüsyonu ve süreye göre değerlendirilmesi. İstatistiki değerlendirme iki gruba ait örneklerin karşılaştırılmasında, Student's t-testi yöntemi; iki veya daha fazla grup birbiri ile karşılaştırılmasında "Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA)" testi ve "Tukey" yardımcı testi ile yapılmıştır. ( $\pm SS, n=3$ )  $p^* < 0.05$  aynı fiksasyon solüsyonlarında farklı sürelerin etkileri karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıkları gösterir.

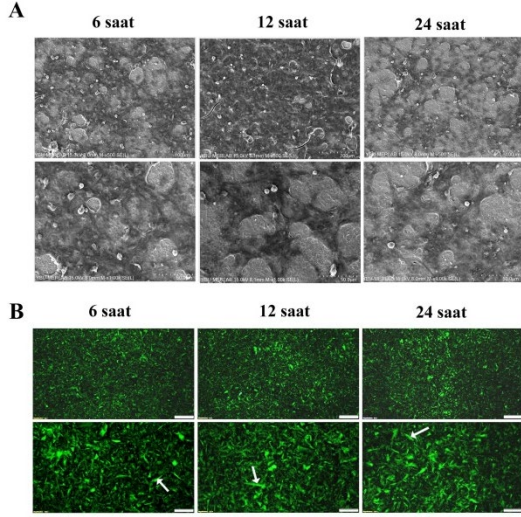
İmmunofloresan mikroskopundan elde edilen görüntüler incelendiğinde her üç (gluteraldehit, formaldehit, paraformaldehit) gruptaki hücrelerde de aktin filamentlerinin yoğunlukları benzer seviyelerde görülmektedir. Bununla birlikte paraformaldehit grubunda titanyum yüzeydeki hücre gövdelerinin diğer fiksatif gruplarına göre daha belirgin, yaygın iğsi ve uzamış oldukları tespit edilmiştir. Bu grubun hücrelerinin daha iyi yayılmış ve daha büyük yüzey alanlarına sahip olduğu izlenmiştir. Her iki GrupPA2 ve GrupPA20 paraformaldehit grubunda, floresan görüntülerinin benzer olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6B).



Şekil 4:

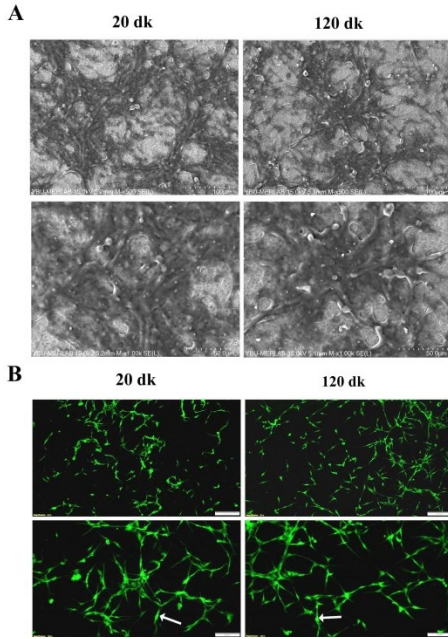
A) 30, 45 ve 60 dakika GA solüsyonu ile fiksasyon sonrası HGF-1'lerin x500 ve x1000 büyütmede SEM görüntüleri. Her üç sürede de Ti6Al4V yüzeyleri yer yer kaplanamamıştır. HGF-1 belirgin çekirdeklere sahiptir. Hücreler uzamış ve üst üste öbelenmiş şekilde bulunmaktadır; B) 30, 45 ve 60 dakika GA solüsyonu ile fiksasyon sonrası immünofloresan görüntüleri, Bar; A: 50 µm, 100 µm. B: 200 µm, 100 µm

## Titanyum Üzerinde HGF-1'in Fiksasyon Yöntemleri



**Şekil 5:**

A) 6, 12 ve 24 saat FA solusyonu ile fiksasyon sonrası HGF-1'lerin x500 ve x1000 büyütmede SEM görüntüleri. Ti6Al4V yüzeylerinin homojen kaplandığı, hücrelerin iğsi uzamış şekilde az katmanlı yaygın yayılım gösterdiği görülmektedir. FA12 tamamen HGF-1 ile kaplanmıştır. B) 6, 12 ve 24 saat FA solusyonu ile fiksasyon sonrası HGF-1'lerin immunofloresan görüntüleri, Bar; A: 50 µm, 100 µm. B: 200 µm, 100 µm



**Şekil 6:**

A) 20 ve 120 dakika PFA solusyonu ile fiksasyon sonrası HGF-1'lerin x500 ve x1000 büyütmede SEM görüntüleri. Ti6Al4V yüzeylerinin yer yer kaplanmadığı, hücrelerin belirgin çekirdeklere sahip olduğu, hücrelerin uzun yapıda ve öbeklenerek üst üste konumlandıkları görülmektedir. B) 20 ve 120 dakika PFA solusyonu ile fiksasyon sonrası HGF-1'lerin immunofloresan görüntüleri, Bar; A: 50 µm, 100 µm. B: 200 µm, 100 µm

Gluteraldehit ile fikse edilmiş GA30 ve GA45 gruplarında hücrelerin uzun yapıda ve üst üste konumlandığı gözlenirken, GA60 grubunda hücre sayısında azalma ve morfolojisinde farklılıklar izlenmiştir. GA30 ve GA45 gruplarının hücreleri daha fazla çıkıntıya ve hücreler arası etkileşime sahipken, GA60 grubunda bu özellikler izlenilememiştir (Şekil 4B).

Formaldehit ile fikse edilmiş GrupFA6, GrupFA12 ve GrupFA24'daki hücrelerin geniş temas alanı ile hücre gövde sınırlarının paraformaldehit ve gluteraldehit gruplarına göre daha belirsiz olduğu gözlenmiştir. Bu grubun hücrelerinin çıkıntıları ve hücreler arası etkileşimi diğer iki fiksatif grubu kadar net izlenilememiştir (Şekil 5B). Her üç GrupFA6, GrupFA12 ve GrupFA24'teki immunofloresan görüntülerinin benzer olduğu tespit edilmiştir.

## Tartışma ve Sonuç

İnsan gingival fibroblast hücrelerinin mikroskopik olarak görüntülenebilmesi için en kritik safhalardan olan fiksasyon prosedürü için literatürde farklı solüsyon ve fiksasyon süreleri uygulandığı görülmektedir. Bu çalışmada, titanyum üzerine ekilen HGF-1 hücrelerinin 48 saat sonundaki proliferasyonlarının SEM ve İmmünoFloresan ile mikroskopik görüntülenmesi öncesinde fiksasyon solüsyonlarının ve sürelerinin neden olduğu değişim incelendi. Bu amaçla gluteraldehit, formaldehit ve paraformaldehit solüsyonları literatüre uygun süreler ve yüzdelerde hücrelere uygulandı. Günümüzde yaygın kullanılan fiksasyon solüsyonları, aldehit grubu (Gluteraldehit, formaldehit, paraformaldehit) solüsyonlardır.<sup>11-13</sup> Bunlardan gluteraldehit karbonhidratlar, proteinler ve enzimlerin çoğunu fikse edebilmektedir.<sup>13</sup> Bu solüsyon ile fiksasyondan sonra örneklerin tamponlarda büzüşmeden uzun bir süre muhafaza edilebildiği bilinmektedir. Gluteraldehit lipitleri iyi fikse edememe ve bunlarla tespit edilmiş örneklerin boyalarını yeterince alamama gibi dezavantajlara sahiptir. Bu yüzden aldehitle fiksasyondan sonra OsO<sub>4</sub>'le postfiksasyon önerilmektedir.<sup>13</sup> Araştırmacılar, formaldehitin gluteraldehitten daha küçük moleküle sahip olması sebebiyle doku ve biyolojik moleküllere daha kolay penetre olabildiğini belirtmiştir.<sup>11,13</sup> Bu çalışmada hücrelerin örnek yüzeylerinde kapladıkları temas alanları yüzde oran olarak değerlendirildiğinde, %95,83 ile en yüksek değeri FA12 grubu göstermiştir. Her üç fiksasyon solüsyonu ile fikse edilmiş HGF-1 hücrelerinin temas alanları ölçümlerinde fiksasyon sürelerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0.05). Thavarajah ve ark., fiksasyonda kullanılan formaldehit solüsyonunun düşük moleküler ağırlığa sahip olmasından ötürü hücrelerden çok çabuk penetre olduğunu ancak

fiksasyon için gerekli sürenin uzun olduğunu, rutin uygulamada 25°C'de 24 saatte veya 37°C'de 18 saatte uygun fiksasyonun gerçekleşebildiğini belirtmişlerdir.<sup>11</sup> Bu durum hücre fiksasyon yapılan doku veya hücrenin tipine, fiksasyon solüsyonunun Ph'sına, uygulama hızı ve şekline, miktarına, osmolaritesine, kimyasal özelliklerine göre değişiklik göstermektedir.<sup>18</sup> Çalışmamızda, tüm inkübasyonlar oda ısısında gerçekleştirilmiş olup, aynı tip formaldehit solüsyonunun farklı süreler ile uygulanması sonucunda hücrelerin morfolojik özelliklerinin benzer olduğu ancak hücrelerin yüzeyde kapladıkları alanların istatistiksel olarak farklı oldukları tespit edildi.

Al Shehadat ve arkadaşları, amniyotik membranları formaldehit veya gluteraldehit fiksasyon solüsyonları ile fikse ederek kıyasladıkları SEM çalışmasında, formaldehit ile fikse edilen hücrelerin daha uygun morfolojide SEM görüntüsü sonucu verdiğini belirtmiştir.<sup>19</sup> Bu sonuç kullanılan hücre hattı farklı olmasına rağmen bizim çalışmamızla uyum göstermektedir. Bu çalışmada, gluteraldehit ve paraformaldehit solüsyonları ile fiksasyon, süreye bağlı olmaksızın hücre morfolojilerinde benzerlik gösterirken, en uygun hücre morfolojisi SEM görüntüleri formaldehit solüsyonu ile fikse edilen gruplarda elde edildi.

Farklı yüzey pürüzlülük değerlerine sahip titanyum örnekler üzerine uygulanan insan gingival hücrelerinin 48 saat canlılık sonucu görüntülenmesi için 2 saat süre ile %4'lük paraformaldehit fiksasyonu uygulanıp SEM ile değerlendirildiği bir çalışmada, hücrelerin titanyum yüzeyine uygun yayılım gösterdiği, pürüzlülüğün fazla olduğu örneklerde daha fazla tutulum gerçekleştiği bildirilmiştir.<sup>20</sup> Bahsedilen çalışmanın SEM görüntüleriyle çalışmamızın paraformaldehit grupları değerlendirildiğinde, fiksasyon işlemindeki farklılıkla beraber, hücrelerin titanyum yüzeyinde yayılım gösterdiği ancak bizim çalışmamızda kullanılan titanyumun yüzey pürüzlülük ortalamasının çok daha düşük olması sebebiyle (Ra: 0.27 ±0.03 µm) yayılımın farklı olduğu gözlenmiştir. Belirli hücre ve dokuların fiksasyon metodlarını değerlendiren araştırmacılar fiksasyon yönteminde her tipe uygun tek bir yöntem olmadığı, bazı fiksatiflerin belirli hücre bileşenlerini korumada diğerlerinden daha etkili olduğunu belirtmektedir.<sup>21</sup> Bizim sonuçlarımıza göre FA12 grubuTi6Al4V yüzeyine ekilen HGF-1 için 48 saat sonucunda SEM görüntüsü elde etmede en uygun fiksasyon yöntemi olduğu önerilmektedir. Diğer yöntemler başarısız bulunmuştur. İmmunofloresan görüntülerinde paraformaldehit fiksasyonu ile elde edilen gruplarda ise diğer fiksasyon gruplarına göre morfolojik olarak hücre şekilleri ve uzantıları daha belirgin gözlenmiştir.

Daha ileri çalışmalar dış hekimliğinde spesifik kullanılan hücre çeşitlerinin fiksasyon yöntemleri için uygun oran, solüsyon ve süre gibi parametreleri

kapsayan veriler sunarak multidisipliner konularda çalışan araştırmacılar için yol gösterici olmalıdır. Fiksasyon işlemi sonrası hücreler kullanılan fiksasyon solüsyonunun cinsi, hacmi, yüzdesi, uygulanma süresi gibi birçok parametreden etkilenebilmektedir.<sup>18</sup> Bu in vitro çalışmanın sınırları dahilinde de, altlık malzeme olarak Ti6Al4V yüzeyine ekilen HGF-1 hücrelerinde, farklı fiksasyon solüsyonları ve uygulama sürelerinin hücrelerin morfolojik ve proliferasyon özelliklerini etkilediği gözlenmiştir.

Çalışmanın limitasyonları, tek tip altlık malzeme, tek tip hücre ile fiksasyonların etkinliklerinin değerlendirilmiş olmasıdır. Ortam ısısı ve nem parametreleri değerlendirilmemiştir. Sonraki çalışmalarda hücrelerin ileri mikroskobik morfolojik değerlendirmesi, farklı fiksatif karışımlarının ve post-fiksasyon işlemlerinin de kıyaslanması amaçlanmaktadır. Araştırmacılara, başarılı hücre görüntüsü elde edilebilmesi için ön çalışma ile fiksasyon protokolünün kesinleştirilmesi önerilmektedir.

#### **Etik Kurul Onay Bilgisi:**

Bu çalışmada hazır hücre hattı kullanıldığı için etik kurul onayına gerek yoktur.

#### **Araştırmacı Katkı Beyanı:**

Fikir ve tasarım: Fikir ve tasarım: Ü.T.K.; Veri toplama ve işleme: E.A, M.P.E.; Analiz ve verilerin yorumlanması: E.A, Ü.T.K.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: Ü.T.K., E.A.

#### **Destek ve Teşekkür Beyanı:**

Herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

#### **Çıkar Çatışması Beyanı:**

Yazarların bu çalışma ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## **Kaynaklar**

1. Garza-Ramos MA, Estupiñan-Lopez FH, Gaona-Tiburcio C, et al. Electrochemical behavior of Ti6Al4V alloy used in dental implants immersed in *Streptococcus gordonii* and *Fusobacterium nucleatum* solutions. *Materials* 2020; 13(18): 4185.
2. Kalyoncuoğlu UT, Yılmaz B, Güngör S, et al. Evaluation of the chitosan-coating effectiveness on a dental titanium alloy in terms of microbial and fibroblastic attachment and the effect of aging. *Mater Technol* 2015; 49(6):925-931.
3. Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, et al. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *J Pros Res* 2016; 60(1):3-11.
4. Pandoleon P, Bakopoulou A, Papadopoulou L, Koidis P. Evaluation of the biological behaviour of various dental implant abutment materials on attachment and viability of human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 2019; 35(7):1053-1063.
5. Zhang C, Zhou L, Quian S, J et al. Improved response of human gingival fibroblasts to titanium coated with micro-/nano-structures tantalum. *Int J Impl Dent* 2021; 36(7):1-12.
6. Grenade C, Pauw-Gillet MC, Gailly P, et al. Biocompatibility of polymer-infiltrated-ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Dent Mat* 2016; 32(9):1152-1164.
7. Wisse E, Braet F, Duimel H, et al. Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. *World J Gastroenterol* 2010; 16(23):2851-2866.

## Titanyum Üzerinde HGF-1'in Fiksasyon Yöntemleri

8. Pansani TN, Basso FG, Souza IR, Hebling J, Costa CAS. Characterization of titanium surface coated with wpidermal growth factor and its effect on human gingival fibroblasts. *Arch Oral Bio* 2019; 102:48-54.
9. Chao Y, Zhang T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morpology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 92(2):381-392.
10. Kashi AM, Tahermanesh K, Chaichian S, Joghataei MT, Moradi F. How to prepare biological samples and live tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). *Galen Med J* 2014; 3(2):63-80.
11. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J of Oral Maxillofac Pathol* 2012; 16(3):400-405.
12. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Path* 2002; 161(6):1961-1971.
13. Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Micros Today* 2000; 8(1):8-12.
14. Goding J. *Monoclonal Antibodies Principles and practices*. Third edition. Melbourne: Elsevier Ltd. eBook ISBN: 9780080536958
15. Guida L, Oliva A, Basile MA, Giordano M, Natri L. Human gingival fibroblast functions are stimulated by oxidized nano-structured titanium surfaces. *J Dent* 2013(10); 41:900-9007.
16. Rausch MA, Shokoohi-Tabrasi H, Wehner C, et al. Impact of implant surface material and microscale roughness on the initial attachment and proliferation of primary human gingival fibroblasts. *Biology* 2021(5); 10:1-14.
17. Martinez MAF, Balderrama IF, Karam PSBH, et al. Surface roughness of titanium disks influences the adhesion, proliferation and differentiation of osteogenetic properties derived from human. *Int J Impl Dent* 2020(6);46.
18. Eltoun I, Fredenburgh J, Grizzle WE. *Advanced Concepts in Fixation: 1. Effects of Fixation on Immunohistochemistry, Reversibility of Fixation and Recovery of Proteins, Nucleic Acids, and other Molecules from Fixed and Processed Tissues. 2. Developmental methods of fixation.* *J Histotech* 2013; 24:201-210.
19. Al Shehadat S, Gorduyus MO, Hamid SSA, et al. Optimization of scanning electron microscope technique for amniotic membrane investigation: A preliminary study. *Eur J Dent* 2018; 12(4):574-578.
20. Lee SW, Kim SY, Rhyu IC, et al. Influence of microgroove dimension on cell behavior of human gingival fibroblasts cultured on titanium substrata. *Clin Oral Impl Res* 2009(1); 20:56-66.
21. Hobro A. Smith NI. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibr Spect* 2017; 91:31-45.

