

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİŞ HEKİMLİĞİ BİLİMLERİ MERKEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

VİTAMİN E İLE KOMBİNE SELENYUM UYGULAMASININ
PERİODONTAL DOKULARIN REJENERASYONU ÜZERİNE
ETKİSİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA
DEĞERLENDİRİLMESİ

Feridun DİŞÇİOĞLU

J.Diş Tbp.Kd.Ütđm.

DOKTORA TEZİ

Ankara

2012

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİŞ HEKİMLİĞİ BİLİMLERİ MERKEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**VİTAMİN E İLE KOMBİNE SELENYUM UYGULAMASININ
PERİODONTAL DOKULARIN REJENERASYONU ÜZERİNE
ETKİSİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Feridun DİŞÇİOĞLU

J.Diş Tbp.Kd.Ütđm.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
Lisansüstü EĞitim-ÖĞretim Yönetmeliğinin
Periodontoloji Doktora Programı için öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıőtır.

TEZ DANIşMANI

N.Işıl SAYGUN

Prof.Diş Tbp.Alb.

Ankara

2012

GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne:

“Vitamin E ile Kombine Selenyum Uygulamasının Periodontal Dokuların Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Hücre Kültürü Ortamında Değerlendirilmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Periodontoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Diş Tbp.Alb. N.İşıl SAYGUN
GATA Periodontoloji A.D.

Üye : Prof.Dr. Berrin ÜNSAL
Gazi Üniversitesi Periodontoloji A.D.

Üye : Prof.Diş Tbp.Kd.Alb. Tuncer ÖZEN
GATA Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi A.D.

Üye : Doç.Diş Tbp.Alb. Sermet ŞAHİN
GATA Periodontoloji A.D.

Üye : Yrd.Doç.Diş Tbp.Bnb. M.Vehbi BAL
GATA Periodontoloji A.D.

ONAY:

J.DişTbp.Kd.Ütğm. Feridun DİŞÇİOĞLU’nun 29.06.2012 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.


Ufuk DEMİRKILIÇ
Prof. Tbp. Tuğgeneral
Sağlık Bil. Enst. Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulunun 03 ŞUBAT 2011 gün ve 202 Sayılı kararı gereği GATA Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi Periodontoloji A.D.Bşk.lığı, Araştırma ve Geliştirme Merkez Bşk.lığı Kanser Araştırma Kısmı ve Tıbbi Biyokimya A.D.Bşk.lığında yapılmıştır.

Bu çalışmada; diş çevresi doku tiplerinde bulunan dişeti fibroblastları, periodontal ligament fibroblastları ve mezenkimal kök hücreleri kullanılarak oluşturulan yara modeli üzerinde selenyumun E vitamini ile birlikte kullanımının yara iyileşmesi üzerine etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Periodontoloji doktora eğitimim boyunca ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde bana daima fikirleri ile yol gösteren, bilgisi ve sevgisi ile her zaman destek olan ve yetişmemde büyük emeği bulunan değerli Hocam, Danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanım Sayın Prof. Diş Tbp. Alb. N. Işıl SAYGUN'a,

Araştırmamın laboratuvar aşamasında; her türlü bilgisini ve bölümlerinin imkanlarını paylaşan Sayın Prof.Tbp.Kd.Alb. Ali Uğur URAL'a, Sayın Doç.Dz.Tbp.Kd.Alb. Ferit AVCU'ya, Sayın Dz.Doç.Tbp.Alb. Muhittin A. SERDAR'a, Sayın Doç.Hv.Diş Tbp.Yb. Metin ŞENÇİMEN'e, hücre kültürün hazırlanmasında ve deneylerde hiçbir emeğini esirgemeyen Sayın Uzm.Biyolog M.Pınar ELÇİ'ye, Sayın Uzm.Biyolog Meral SARPER'e, Sayın Yrd.Doç.Diş Tbp.Bnb.M.Vehbi BAL'a Sayın Hv.Diş Tbp.Kd.Ütgm. V.Umut BENGLİ'ye, Sayın Hv. Tbp. Yzb. Metin UYANIK'a, Sayın J.Tbp.Kd.Ütgm. Erdim SERTOĞLU'na, Sayın Yrd.Doç.Ecz.Yzb. Cansel KÖSE ÖZKAN'a, istatistiksel değerlendirmelerin yapılmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Doç.Tbp.Yb. Cengizhan AÇIKEL'e, tezimin her aşamasında büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Dr.Dt. Nejat NİZAM'a,

Periodontoloji asistanlığım boyunca bu zorlu süreci benimle birlikte yaşayan, desteğini ve hoşgörüsünü hiç eksik etmeyen, doktora eğitimimin diplomasız kahramanı sevgili eşim Dürdane DİŞÇİOĞLU'na ve ihmal ettiğim oğlum Nedim'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması Gülhane Askeri Tıp Akademisi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

Dt. Feridun DİŞÇİOĞLU

ÖZET

DİŞÇİOĞLU, F., Vitamin E ile Kombine Selenyum Uygulamasının Periodontal Dokuların Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Hücre Kültürü Ortamında Değerlendirilmesi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji A.D. Doktora Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2012.

E vitamini ve selenyum peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize ederek hücre ve doku hasarını önleyen sinerjistik etkiye sahip olan antioksidanlardır. Bu tez çalışmasında; diş çevresi dokularda bulunan dişeti fibroblastları, periodontal ligament fibroblastları ve mezenkimal kök hücreleri kullanılarak oluşturulan in vitro yara modeli üzerinde selenyumun E vitamini ile birlikte kullanımının hücresel aktivite ve yara iyileşmesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada insan gingival fibroblast, mezenkimal kök hücre ve periodontal ligament fibroblastı primer hücre kültürü kullanıldı. Hücreler pasajlanıp seyreltikten sonra hücre canlılığı ve proliferasyonu değerlendirmek için 24., 48. ve 72. saatlerde 60 µM E vitamini ile 5×10^{-8} M, 10^{-8} M ve 5×10^{-9} M konsantrasyonlardaki selenyum kombine edilerek XTT testi yapıldı. E vitamini ile kombine selenyumun yara iyileşmesindeki etkisini araştırmak için oluşturulan yara modelinde, XTT testinde kullanılan aynı dozlar kullanılarak 0., 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde yara şekillerinin görüntüsü mikroskop altında çekildi. Elde edilen fotoğraflardan yara yüzeyinin alanı bir bilgisayar programı ile hesaplandı. Yara modeli deneyinden 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen süpernatantlarda ELISA yöntemi ile yumuşak ve sert doku için öneme sahip olan büyüme faktörleri (Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü, İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1) ve yara iyileşme süreci ile ilgili proteinlere (Tip 1 Kollajen, Osteokalsin, Osteonektin) bakıldı. Elde edilen sayısal veriler T testi ve One-Way Anova Testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; Alfa-tokoferolün tek başına ve selenyum ile değişen konsantrasyonlarda kombinasyonunun periodontal dokuları oluşturan hücrelerde sitotoksik etki yaratmadan erken dönem ya da geç dönem proliferatif etkileri ve yara iyileşme sürecine olumlu katkıları düşünülecek olursa bu antioksidanların ileride periodontal doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir alternatif olma potansiyeline sahip oldukları öngörülebilir.

Anahtar Kelimeler: Selenyum, E vitamini, Periodontal Rejenerasyon, Hücre kültürü.

Destekleyen Kurumlar: GATA Araştırma Bilimsel Kurulu tarafından AR-2011/50 proje numarası ile desteklenmiştir.

Yazar Adı: J.Diş Tbp.Kd.Ütğm.Feridun DİŞÇİOĞLU

Danışman: Prof.Diş Tbp.Alb. N.İşıl SAYGUN

SUMMARY

DIŞÇIOĞLU, F., Evaluation of the effect of selenium treatment combined with vitamin E on regeneration of periodontal tissues in cell culture, GMMA Institute of Medical Sciences, Department of Periodontics, Program of Doctorate, PhD Thesis. Ankara, 2012.

Vitamin E and selenium are antioxidants which have synergistic effect to prevent cell and tissue damages by neutralizing the peroxides and free oxygen radicals. It was the aim of the present study to evaluate the effect of vitamin E and vitamin E+selenium on cellular activity and wound healing process using an in vitro wound healing model.

Human gingival fibroblast, mesenchymal stem cells and primary cell cultures of periodontal ligament fibroblast were used. In order to evaluate the cell activity; 60 µM Vitamin E, and its combination with 5×10^{-8} M, 10^{-8} M and 5×10^{-9} M selenium were tested at 24th, 48th and 72th hours after seeding the cells using an XTT tests. The same concentrations of vitamin E and selenium were used in the wound healing model. In order to evaluate the healing processes in all groups the photographs were taken at 0th, 12th, 24th, 36th, 48th and 72nd hours under a microscope using a digital camera. An image analyses computer software program was used to calculate the wound surface area during that period. The supernatants were obtained from the wound healing model at 24th, 48th and 72nd hours and were used to evaluate the growth factors including Basic Fibroblast Growth Factor and Insulin-like Growth Factor -1 which have essential roles in soft and hard tissue formation. The proteins which are important in wound healing process such as Type 1 Collagen, Osteocalcin, Osteonectin were also evaluated using ELISA method. The obtained data were examined statistically by T test and One-Way Anova Tests.

When the obtained data are evaluated, without created a cytotoxic effect on the cells of peiodontal tissues, it is considered that the combination single alpha-tocopherol and its varying concentrations with selenium have positive contributions of early or late term proliferative effects and wound healing process. It is predicted that these antioxidants have an alternative potential for periodontal tissue engineering.

Key words: Selenium, Vitamin E, Periodontal Regeneration, Cell Culture

Supported by: GMMA, Center of Research and Development

Author: Dt. Feridun DISCIOGLU

Counsellor: Prof.Dr. N.Isil SAYGUN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI.....	iii
TESEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Periodontal Dokular	4
2.2. Periodonsiyumun Başlıca Hücreleri	4
2.2.1. Gingival Fibroblastlar	4
2.2.2. Periodontal Ligament Hücreleri	5
2.2.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)	5
2.2.4. Osteoblastlar	7
2.2.5. Sementoblastlar	8
2.3. Periodontal Hastalık ve Yara İyileşmesi	8
2.3.1. Yara İyileşmesinin Fazları	9
2.3.2. İn vitro Yara İyileşme Modeli	12
2.4. Periodontal Rejenerasyon.....	13
2.5. Büyüme Faktörleri.....	16
2.5.1. Fibroblast Büyüme Faktörleri.....	16
2.5.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri.....	17
2.6. Yara İyileşme Süreci İle İlgili Proteinler	17
2.6.1. Tip 1 Kollajen.....	17
2.6.2. Osteokalsin.....	18
2.6.3. Osteonektin	19
2.7. Oksidatif Stres.....	19
2.8. Antioksidanlar	20
2.8.1. E Vitamini	21

2.8.2. Selenyum	25
GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması	29
3.1.1. Gingival Fibroblastların Elde Edilmesi	29
3.2.2. Periodontal Ligament Fibroblastlarının Elde Edilmesi	31
3.3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi	33
3.2. E vitamininin Hazırlanması	34
3.3. Selenyumun Hazırlanması	35
3.4. XTT Testi	35
3.5. Yara Modeli	37
3.6. Image J Programı	39
3.7. Biyokimyasal Analizler	39
3.7.1. Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF)	39
3.7.2. İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)	40
3.7.3. Tip 1 Kollajen.....	41
3.7.4. Osteokalsin.....	41
3.7.5. Osteonektin	42
3.8. İstatistiksel Analiz.....	43
BULGULAR.....	44
4.1. XTT Bulguları	44
4.1.1. Gingival Fibroblastlara ait XTT Bulguları	44
4.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelere ait XTT Bulguları	45
4.1.3. Periodontal Ligament Fibroblastlarına ait XTT Bulguları	45
4.2. Yara Modeli Bulguları.....	47
4.2.1. Gingival Fibroblastlara ait Yara Modeli Bulguları	47
4.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelere ait Yara Modeli Bulguları	51
4.2.3. Periodontal Ligament Fibroblastlarına ait Yara Modeli Bulguları.....	56
4.3. Elisa Bulguları	63
4.3.1. Gingival Fibroblastlara ait Elisa Bulguları	63
4.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelere ait Elisa Bulguları	65
4.3.3. Periodontol Ligament Fibroblastlarına ait Elisa Bulguları	71

TARTIŞMA.....	76
SONUÇLAR	93
KAYNAKLAR	102
EKLER	
Ek-1: GATA Etik Kurul Toplantı Raporu	
Ek-2: Gönüllüleri bilgilendirme ve olur (rıza) formu (Gingival fibroblastlar için)	
Ek-3: Gönüllüleri bilgilendirme ve olur (rıza) formu (Periodontal ligament fibroblastları için)	
Ek-4: Gönüllüleri bilgilendirme ve olur (rıza) formu (Mezenkimal kök hücreler için)	

SİMGELER VE KISALTMALAR

a-FGF	: Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü
b-FGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BMP	: Kemik Morfojenetik Protein
CGF	: Sement Kaynaklı Büyüme Faktörü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FCS	: Fetal Calf Serum
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
GPx	: Glutasyon peroksidaz
IGF-1	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IL	: İnterlökin
I κ B α	: Sitozolik NF- κ B İnhibitörü
kDa	: Kilodalton
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
ml	: Mililitre
mm ²	: Milimetre kare
NF κ B	: Nükleer Faktör Kappa B
nm	: Nanometre
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PKC	: Protein Kinaz C
pm	: Pikometre
PTHrP	: Paratiroid Hormonla İlişkili Protein
Rpm	: Revolutions Per Minute
SPARC	: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
TGF- α	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-alfa
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta
TNF- α	: Tümör Nekroz faktör-alfa

VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
XTT	: 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Küçük parçalara ayrılan bağ doku parçacıklarının kültür kabına aktarılması.....	30
3.2. İnsan gingival fibroblast primer hücre kültürü.....	31
3.3. Kök yüzeyinden periodontal ligamentin kazınması	31
3.4. Periodontal ligamentin kültür kabına aktarılması.....	32
3.5. İnsan periodontal ligament fibroblastı primer hücre kültürü.....	32
3.6. MKH'lerin üretim basamakları	33
3.7. İnsan MKH primer hücre kültürü	34
3.8. 96 kuyucuklu hücre kültür plağı	36
3.9. Optik Okuyucu	37
3.10. Milimetrik ölçülü steril kuyucuk ve silikon yapı	38
4.1. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 0. saat görüntüleri	48
4.2. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 12. saat görüntüleri.....	48
4.3. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 24. saat görüntüleri	50
4.4. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 36. saat görüntüleri.....	50
4.5. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 48. saat görüntüleri.....	51
4.6. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 72. saat görüntüleri.....	51
4.7. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 0. saat görüntüleri.....	53
4.8. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 12. saat görüntüleri.....	53
4.9. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 24. saat görüntüleri.....	55

4.10. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 36. saat görüntüleri.....	55
4.11. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 48. saat görüntüleri.....	56
4.12. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 72. saat görüntüleri.....	56
4.13. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 0. saat görüntüleri.	58
4.14. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 12. saat görüntüleri.	60
4.15. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 24. saat görüntüleri.	60
4.16. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 36. saat görüntüleri	61
4.17. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 48. saat görüntüleri.	61
4.18. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 72. saat görüntüleri	62

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.1.1. Gingival Fibroblast Hücrelerinde 24., 48. ve 72. Saatlerde XTT Değerlerinin Grup İçi ve Gruplar Arası Dağılımı	44
4.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde 24., 48. ve 72. Saatlerde XTT Değerlerinin Grup İçi ve Gruplar Arası Dağılımı	45
4.1.3. Periodontal Ligament Fibroblastlarında 24., 48. ve 72. Saatlerde XTT Değerlerinin Grup İçi ve Gruplar Arası Dağılımı	46
4.2.1. Gingival Fibroblast Hücresi 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verileri	49
4.2.2. Gingival Fibroblast Hücresi 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verilerinin Grup içi ve Gruplar arası dağılımı	49
4.2.3. Mezenkimal Kök Hücre 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verileri	54
4.2.4. Mezenkimal Kök Hücre 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verilerinin Grup içi ve Gruplar arası dağılımı	54
4.2.5. Periodontal Ligament fibroblastı 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verileri	59
4.2.6. Periodontal Ligament fibroblastı 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verilerinin Grup içi ve Gruplar arası dağılımı	59
4.3.1. Gingival Fibroblast Hücrelerinde bFGF Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	64
4.3.2. Gingival Fibroblast Hücrelerinde T1K Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	65
4.3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerde bFGF Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	66
4.3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde T1K Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	68
4.3.5. Mezenkimal Kök Hücrelerde IGF-1 Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	69

4.3.6.	Mezenkimal Kök Hücrelerde OK Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	70
4.3.7.	Periodontal Ligament Fibroblastlarında bFGF Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	71
4.3.8.	Periodontal Ligament Fibroblastlarında T1K Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	72
4.3.9.	Periodontal Ligament Fibroblastlarında IGF-1 Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	74
4.3.10.	Periodontal Ligament Fibroblastlarında OK Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması	75

GİRİŞ

Periodontal hastalıklar; diş yüzeyi veya diş eti kenarının altında kolonize olan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonlardır (136). Bazı mikroorganizmalar ya da mikroorganizma grupları, konakla aralarındaki dengeyi kendi lehlerine bozarak periodontal ligament ve alveol kemiğini etkileyip, periodontal cep oluşmasına ve doku yıkımına sebep olurlar. Bakteriler doku yıkımına direkt olarak salgıladıkları toksik ürünlerle veya indirekt olarak konağın savunma sistemini aktive ederek neden olmaktadır (102). Periodontal hastalıkların tedavisinde amaç; mikrobiyal etiyojolojiyi ve periodontal hastalığa sebep olabilecek risk faktörlerini kontrol altına alarak enfeksiyonun ilerlemesini durdurmak ve yıkıma uğramış destek periodontal dokuların yeniden sağlıklı durumlarına dönmelerini ve rejenerasyonlarını sağlamaktır (82).

Periodontal rejenerasyon; hem sert hem de yumuşak dokuları içine olan oldukça kompleks bir yara iyileşme sürecine ihtiyaç duymaktadır. Periodonsiyumdaki gingival fibroblastlar, periodontal ligament hücreleri, mezenkimal kök hücreler, osteoblastlar, sementoblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve bunların yanında enflamatuar hücreler gibi çok farklı tipteki hücrelerin birbirleri ve çeşitli biyolojik moleküller ile etkileşimleri yara iyileşme sürecini ve tipini belirlemekte önemli rol oynamaktadır (70).

Geleneksel periodontal tedaviler; periodonsiyumdaki enflamasyonun giderilmesi, ceplerin ortadan kaldırılması, periodontal dokuların yapısı ile formunun yeniden geliştirilmesi ve korunmasını amaçlamaktadır. Ancak genellikle kaybolan sert ve yumuşak periodontal yapılar tamir dokusuyla iyileşmekte, sonuç olarak kaybedilen dokular morfolojik ve fizyolojik olarak rejenere olamamaktadır.

Son yıllarda periodontal rejenerasyonu sağlayabilecek materyal ve biyomoleküller ile ilgili yapılan çalışmalarda; yara iyileşmesini yönlendirebilecek biyolojik aracı moleküller ile hedef bölgede istenen dokuların oluşturulmasına dayanan doku mühendisliği uygulamalarına yönelik araştırmalar artmış olmakla birlikte ideal bir rejenerasyon malzemesi hala keşfedilememiştir.

Organizmalar; doku yıkımı sırasında ortama salınan reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerinden kendilerini koruyabilen ve antioksidanlar adı verilen savunma mekanizmalarına sahiptirler. Antioksidanlar; endojen enzim olarak vücutta sentezlenebildiği gibi ekzojen olarak dışarıdan besinler ve vitaminlerle de alınabilmektedirler. Antioksidan enzimler arasında; glutatyon peroksidaz, katalaz, superoksid dismutaz enzimleri, antioksidan vitaminler arasında ise E vitamini, C vitamini ve karotenoidler bulunmaktadır. Enzim sistemleri savunmada öncelikli olarak etkilidirler. Onların aktivitesi; serbest radikallerin sentezi, yıkılım hızı ve eser elementlerin (Se, Zn, Cu) alınması ile ilişkilidir (115,132,134).

E vitamini; güçlü bir antioksidan olup, hücre membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonunu engellemektedir. Aynı zamanda serbest radikallerinin oluşmasını engelleyip, hücre membranlarını stabilize edebildiğinden, hücre ve doku hasarını önlemektedir (76). Selenyum ise serbest radikallerin üretimini önlemek için gerekli olan, doymamış yağ asitlerinden türeyen, peroksitleri yok ettiği düşünülen glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesi için gerekli olan bir komponenttir. Aynı zamanda selenyumun E vitamini ile sinerjistik etki gösterdiği de bilinmektedir (23,90).

Günümüzde periodontal hastalıkların tedavisinde antienfektif yaklaşımları içeren konvansiyonel tedaviler ve onun yanında konak cevabını düzenleyen antienflamatuar medikasyonlar, vitaminler ve antioksidan uygulamalar ile ilgili araştırmalar artmıştır. Bununla birlikte periodontal hastalık ve diğer nedenlerle kaybedilen dokuların rejenerasyonunu sağlayabilecek materyal ve biyomoleküller ile ilgili çalışmalarda halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda; E vitamininin antioksidan özelliği yanında kollajen yıkımını azaltarak periodontitis gibi lokal doku kaybıyla karakterize bazı enflamatuar hastalıklarda olumlu etki gösterebileceği bildirilmiştir (7). Selenyumun da antioksidan etkisinin yanında enflamatuar sitokinleri ve akut faz proteinlerinin salınımını inhibe ederek antienflamatuar etki gösterdiği, hücre hasarını azalttığı ve hücre canlılığını arttırdığı rapor edilmiştir (42, 121).

Periodontal tedavide kullanılabilecek yeni materyallerin değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda; genellikle in vitro hücre kültürü deneylerinde sitotoksosite ve hücresel etkileşimler değerlendirilirken, hayvan deneyleri ile sürdürülen in vivo çalışmalar klinik çalışmalarla devam etmektedir. Deney hayvanlarının toksisite çalışmalarında kullanılmasının tepkilere sebep olması ve etik kurul onayı almadaki zorluklar, günümüzde in vitro hücre kültürü çalışmalarına ilgiyi daha da arttırmıştır.

Çalışmamızda önceki in vitro deneylerimizde proliferatif etkisi gösterilmiş olan E vitamini ile birlikte kullanıldığı zaman sinerjistik etki gösterdiği bildirilen selenyumun (10) hücre kültürü ortamında, deneysel olarak oluşturulmuş bir yara iyileşme modelinde periodonsiyumun önemli komponentleri olan gingival fibroblastlar, periodontal ligament fibroblastları ve mezenkimal kök hücreleri üzerine olan proliferatif etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Aynı zamanda hücrelerin çoğalması, migrasyonu, diferansiyasyonu gibi hücresel aktivitelerini düzenleyen büyüme faktörlerinden bazik fibroblast büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi periodontal rejenerasyonda stimülatör rol oynayan büyüme faktörleriyle, tip 1 kollajen, osteokalsin ve osteonektin gibi yara iyileşmesinde rol oynayan bazı proteinlerin değerlendirilmesi de hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Dokular

Sağlıklı periodonsiyum; dişlerin fonksiyon görebilmesi için onlara gerekli desteği sağlayan yapılardır. Periodonsiyum dört temel yapıdan oluşmaktadır. Bunlar: Dişeti, periodontal ligament, alveoler kemik ve sementtir. Periodontal yapıların her biri doku mimarisi, konum, biyokimyasal ve hücresel kompozisyon açısından farklı olmasına rağmen, tek bir yapı gibi fonksiyon göstermektedir (11). Periodonsiyumun yumuşak ve sert dokularını oluşturan dişeti bağ dokusu ve alveoler kemiğin hücresel yapıları fibroblastlar, osteoblastlar, osteoblast prekürsör hücreleri, sementoblast prekürsör hücreleri, osteoklastlar, çeşitli enflamatuvar hücreler, endotelyal ve nöral hücrelerden oluşmaktadır (128).

2.2. Periodonsiyumun Başlıca Hücreleri

2.2.1. Gingival Fibroblastlar

Fibroblastlar; embriyolojik olarak mezenşim kökenli hücrelerdir. Fenotipik olarak kasılabilen miyofibroblastlardan periodontal ligament fibroblastlarına kadar geniş bir dağılım gösterirler (36). Gingival fibroblastlar sağlıklı diş eti dokusunun temel hücreleridir. Periodontal dokuların yapısal bütünlüğünün sürdürülmesinde rol oynamaktadırlar.

Fibroblastlar; vücudun ekstraselüler matriks içeren doku ve organlarında bulunan iğ şeklinde, yassı ve uzun hücrelerdir. Bağ dokusunun en yaygın ve fonksiyonel olarak en önemli hücreleri fibroblastlardır. Dişeti bağ dokusundaki hücrelerin %65'ini oluşturan fibroblastların görevi; glikoproteinler ve glikozaminoglikanların yanı sıra yapısal bağ dokusu proteinleri, kollajen ve elastin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin çoğunu sentezlemek ve yıkmaktır (62). Bu hücrelerin tipik özellikleri arasında; protein sentezi yapan hücrelere mahsus gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumla sahip olmaları, geniş golgi kompleksi içermeleri ve bazofilik sitoplazma bulunması sayılabilir (92). Fibroblastlar, matriks metalloproteinaz olarak bilinen birçok aktif kollajenazlar sayesinde ekstraselüler matriksi yıkma kapasitesine sahiptir. Tüm metalloproteinazlar inaktif formda fibroblastlar

tarafından salgılanır. Ayrıca metalloproteinazlar aktif olduklarında bile çeşitli doku inhibitörleri tarafından etkili bir biçimde inhibe edilir. Fibroblastlar fibril demetlerinin uzun aksına paralel olarak konumlanmış bazofilik stoplazmada uzunlamasına görünürler. Elektron mikroskopuyla incelendiğinde fibroblastlar aktif sentez yapan hücrelerin tüm karakteristik özelliklerini gösterirler (62).

Doku yaralanmasından sonra fibroblastlar yara iyileşmesi ve tamirinde önemli bir rol üstlenirler. Yaralanmadan sonra pıhtı oluşumu ve trombosit degradasyonu gerçekleşir. Ortaya çıkan mediatörler iltihabi hücrelerin ve fibroblastik hücrelerin yara bölgesine gelmesine ve ilave bir takım mediatörlerin açığa çıkmasına neden olur. Bölgeye gelen fibroblastlar erken dönemde oluşturulmuş olan geçici matriksi, enflamatuar hücrelerden salınan mediatörlerin kontrolünde kollajen ve fibronektin içeren daha olgun bir ekstraselüler matriks ile devam ettirirler (36).

2.2.2. Periodontal Ligament Hücreleri

Periodontal ligament fibroblastları; periodontal dokulardaki en yaygın hücrelerdir ve morfolojileri, proliferasyon hızları ve protein ekspresyonları gibi bazı özellikleri ile gingival fibroblastlardan farklılık göstermektedirler. Temel fibriller boyunca dizilen oval ya da uzunlamasına hücreler olarak görülürler (27). Bu özelleşmiş hücrelerin alveoler segmentin homeostazisinin sürdürülmesinde önemli bir rolü vardır. Bağ dokusunun makromoleküllerini sentezleme ve ortadan kaldırma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle bu hücreler periodontal ligament yanında alveoler kemik ve sementin de ekstraselüler matriks sentez ve rezorpsiyonunun düzenlenmesine katkıda bulunurlar (62).

2.2.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Kemik iliğinde hematopoetik olmayan kök hücrelerin varlığı 19. yüzyılın sonlarına doğru Cohnheim tarafından gösterilmiş olsa da, bu hücreler ilk defa 1970'li yılların ortalarında Friedenstein tarafından tanımlanmışlardır (52). Friedenstein ve arkadaşları, kemik iliği aspiratının fetal buzağı serumu bulunan ortama yayılması ile adezyon yeteneği bulunan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen ve kemik hücreleri ile yağ

hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip hücre kolonilerinin varlığını bildirmişler ve bu hücre kolonilerini fibroblast kolonisi yapan ünit (CFU-F) olarak tanımlamışlardır (52,131). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin endoderm, mezoderm ve ektodermden de köken alan hücre ve/veya dokulara farklılaşabilen hematopoetik olmayan multipotent kök hücreler oldukları anlaşılmıştır (72,110,158). Hematopoetik olmayan kemik iliği progenitörleri olan MKH, günümüzde özellikle de immunoregülatuar özellikleri ve rejenerasyon yetenekleri sebebi ile klinik kullanıma girmiş ve Avrupa Birliği Tıp Ajansı tarafından ilaç hücre (Cell Drug) kapsamına alınmıştır (131). Genel olarak mezenkimal tip hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı günümüzde mezenkimal kök hücre olarak adlandırılan bu hücreler, multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak da isimlendirilmektedir (8,157).

MKH; kültür ortamında ışık veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde fusiform şeklinde morfolojiye sahip, fibroblast benzeri hücre toplulukları oldukları gözlenmiştir. Morfolojik özellikleri fibroblastlara benzemekle birlikte aralarındaki en önemli fark çekirdek yerleşiminin fibroblastlarda asimetrik olmasına karşın bu hücrelerde simetrik olmasıdır (40).

Günümüzde MKH birçok farklı dokulardan (kemik iliği, periferik kan, kordon kanı, yağ dokusu başta olmak üzere periodontal ligament, kemik trabeküler dokusu, plasenta, amnion sıvısı, tendonlar, sinoviyal membran, saç folikülü, akciğer ve karaciğer dokularından) elde edilebilmektedir (21,106).

MKH bugüne kadar sıklıkla kemik iliği aspirasyonu yöntemi ile elde edilmiştir. Kemik iliğinden elde edilen ve kültür ortamına ekilen MKH, plastik kültür petrisine hızlı adezyon yeteneği ile yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahiptirler (142,157). Bu hücrelerin basit bir kemik iliği aspiratından 10 haftada yaklaşık 50 kere ikiye katlanarak çoğaltılması mümkündür (55). Kemik iliğinde her 10.000-100.000 tek çekirdekli hücreden birinin MKH olduğu hesaplanmaktadır (Bu oran kordon kanında 1/108'e kadar düşebilmektedir). Çocuklarda 29 CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre

oranı varken ileri yaşlarda bu oran azalarak 3,2 CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranına kadar inmektedir (13). Yapılan çalışmalar, fetal MKH'nin erişkin kök hücrelerden sadece sayısal açıdan değil doku gelişiminde, hücre bölünmesinde ve immünolojik antijen sunumunda rol oynayan genler açısından da önemli farklılıklar taşıdığını göstermektedir (17,56). Ancak MKH'nin laboratuvarda farklılaştırılması-üretilmesi ile bu farklılıklar ortadan kaldırılabilmektedir (106).

MKH'nin yüksek proliferasyon ve diferansiyasyon yeteneklerine sahip olmaları doku mühendisliği alanı için onları ideal bir aday haline getirmiştir (157). Kolay elde edilebilirliği ve moleküler biyoloji mühendisliği ile çeşitli değişikliklerin yapılabilmesi bu hücrelerin doku onarımı ve yenilenmesinde kullanılabilmesini sağlamaktadır (142). Preklinik çalışmalarda beyin, miyokart, karaciğer ve eklem hasarını onarabildikleri gösterilmiştir (21). MKH'nin başta hematopoetik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyellerinin bulunması bu hücrelere olan ilgiyi gün geçtikçe artırmıştır (157).

MKH'nin osteosit ve kondrositlere in vitro olarak farklılaşabileceğinin gösterilmesi ile bu hücreler in vivo doku tamirinde kullanılmaya başlamıştır. Birçok hayvan modelinde MKH segmental kemik defektinin tedavisinde başarı ile kullanılmıştır (150). Hidroksiapatit matrikslerine yüklenmiş MKH, köpek segmental kemik defektinin rejenerasyonunda kullanılmıştır (5). Osteogenesis imperfektalı çocuklara kemik iliği hücrelerinin infüze edilmesiyle, hücreler herhangi bir yan etki gözlenmeksizin ortalama osteoblast sayısında 3 ay sonra artış göstermiş ve yeni lameller kemik oluşumu izlenmiştir. Bu çocuklarda kırık sıklığının azaldığı ve vücut büyüme hızının arttığı bildirilmiştir (66).

2.2.4. Osteoblastlar

Kemikte en aktif sekreter hücreler olan osteoblastlar; genellikle küboid ya da hafifçe uzamış, kemiğin organik matriksinin üretiminden primer olarak sorumlu olan ve büyük oranda kemik yüzeylerini oluşturan hücrelerdir. Osteoblastlar; mezenkimal kaynaklı hücrelerdir. Osteoblastlar tarafından

üretileen organik matriks; ağırlıklı olarak tip 1 kollajen, çeşitli non-kollajenöz kemik proteinleri ve plazma proteinlerinden oluşur. Kemikte kollajen fibril formasyonu; ekstraselüler fibrilleri oluşturmak için osteoblastlar tarafından kollajen filamentler salgılanmasıyla başlar (137).

Osteoblastlar pluripotent folikül hücrelerinden diferansiye olurlar. Alveoler kemik; fetal gelişim esnasında intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir ve laküna adı verilen boşluklar içerisindeki osteositler ve kalsifiye matriksten oluşmuştur. Kemik büyümesi osteoblastlar tarafından salgılanan organik matriksin birikmesi şeklinde oluşmaktadır. Kemiğin 2/3'ü inorganik maddelerden, 1/3'ü ise organik maddelerden oluşmaktadır. İnorganik madde genel olarak kalsiyum ve fosfattan oluşmaktadır. Organik matriks % 90 oranında tip 1 kollajenden, % 10 oranında da osteokalsin, osteonektin, proteoglikan gibi kollajen olmayan proteinlerden oluşmaktadır (27).

2.2.5. Sementoblastlar

Sement matriksinin sentezinden sorumlu sementoblastlar; sementin genç hücreleridir ve embriyonel olarak ektomezenkimden köken alırlar. Erişkinlerde ise periodontal ligament fibroblastlarından diferansiye olurlar. Sement dokusuna ait fibriller ve glikoprotein yapıdaki interfibriller ara maddeyi oluştururlar. Histolojik olarak fibroblastlara çok benzerler. Sement yüzeyine yakın olarak yerleşim gösterirler. Sentezden sorumlu oldukları için iyi gelişmiş endoplazmik retikulum ve golgi komplekslerine sahiptirler (30,124).

2.3. Periodontal Hastalık ve Yara İyileşmesi

Periodontitis; periodontal ligament, sement, dişeti ve alveol kemiğini içeren destek periodontal dokuların yıkımıyla karakterize enflamatuar bir hastalıktır. Periodontal dokuların yıkımı, spesifik bakterilerle, konak savunmasını oluşturan hücreler arasındaki dengenin bakteriler lehine bozulmasıyla gerçekleşir (89) Periodontitisin primer klinik özellikleri arasında; gingival enflamasyon, periodontal cep oluşumu, alveoler kemik kaybı ve klinik ataşman kaybı yer almaktadır. Periodontitisin histolojik özellikleri ise; periodontal cep oluşumu, birleşim epitelinin mine sement sınırından daha

apikalde konumlanması, cep epiteline komşu kollajen fibrillerin kaybı, kemik kaybı, birleşim ve cep epitelinde çok sayıda polimorfonükleer lökositin bulunması ve yoğun enflamatuar hücrelerin plazma hücreleri, lenfositler ve makrofajlar ile infiltre olmasıdır (50).

Periodontal yara iyileşmesi; dişeti epiteli, bağ dokusu, periodontal ligament, sement ve kemiği içeren hücresel ve ekstra hücresel olaylar bütünüdür. Periodontal cerrahi sonrasında kök yüzeyine komşu yara bölgesi farklı dört tip hücre tarafından doldurulabilir. Bunlar; epiteliyal hücreler, dişeti bağ dokusu kaynaklı hücreler, alveolar kemikten derive olan hücreler ve periodontal ligamentten kaynaklanan hücrelerdir. Periodontal yara iyileşmesinde kök yüzeyi boyunca epiteliyal hücrelerin proliferasyonu gerçekleşirse uzun bağlantı epiteli meydana gelecektir. Eğer yara bölgesini gingival fibroblastlar dolduracak olursa yumuşak ve sert doku arasında bağ dokusu oluşacak ve kök rezorpsiyonuna zemin hazırlayabilecek bunun yanında kemik iliğinden köken alan hücreler kök yüzeyi ile temasa geçerse ankiloz ve kök rezorpsiyonu görülebilecektir. Periodontal yara iyileşmesinin ideal koşullarında yara iyileşme süreci sırasında periodontal ligament dokularından gelen hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve diferansiyasyonunun gerekli olduğu düşünülmektedir (57).

2.3.1. Yara İyileşmesinin Fazları

Yara iyileşmesi; travma ile başlayan ve yeni doku oluşumu ile sonuçlanan hücresel ve biyokimyasal olaylar sürecidir (47). Yara iyileşmesi farklı ama birbiri içine geçmiş 4 aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve remodelasyondur (38).

Hemostaz

Hemostaz; trombositler, damarlar, plazma pıhtılaşma proteinleri ve düşük molekül ağırlıklı maddeler arasında oluşan dengeli bir etkileşim olarak tanımlanmaktadır. Yaralanma sonrasında (örn; cerrahi bir travma) kan pıhtılaşmasını sağlayan ilk reaksiyonlar; trombositler ve kan damarlarının duvarlarındaki değişimler tarafından başlatılır. Hasara uğramış damar duvarı sub-endotelyal kollajen açığa çıkararak plazmadaki von Willebrand faktörü ile

birleşir. Böylece yapısı değişir ve trombositler damar duvarına yapışabilir. Bu mekanizma trombosit adhezyonu olarak tanımlanır ve trombosit membranında bulunan glikoprotein Ib ve IIb/IIIa reseptörleri vasıtasıyla gerçekleşir. Bu olaydan sonra trombositler aktive olur ve trombosit agregasyonu başlar. Aktive olan trombositler disk şeklinden küresel şekle geçer ve yara yüzeyinde dağılırlar. Bu sürece trombosit agregasyonu adı verilir. Trombosit agregasyonu arttıkça, trombositlerin içerisindeki alfa granüllerinden trombosit büyüme faktörleri salgılanarak fibrin pıhtı oluşturulur (48). Fibrin pıhtı; geçici bir matriks görevi görerek doku ve damarların tamiri yeni bağ dokusu ve damarlanma ile doğrudan ilgilidir (31).

Enflamasyon Fazı

Yara iyileşmesinin ilk iki gününde enflamatuvar faz nötrofillerin migrasyonu ile başlar. Nötrofillerin esas fonksiyonu; yara bölgesinde bulunan yabancı materyallerin, fonksiyonel olmayan konak hücrelerinin ve zarar görmüş matriks komponentlerinin ortadan kaldırılması, bakterilerin myeloperoksidaz ile parçalanması ve bakterilerin opsonizasyonudur (117).

Mast hücreleri yara iyileşmesinde önemli role sahip diğer bir hücre grubudur. Mast hücreleri; enzimler, histamin ve diğer aktif aminlerle dolu granüllerini ortama salarlar ve bu mediatörler yara bölgesindeki enflamasyon bulgularından sorumludurlar (6). Mast hücrelerinden salgılanan aktif aminler çevrelerindeki damarlarda sızıntıya sebep olur ve böylelikle mononükleer hücreler yara bölgesine ulaşırlar. Bununla birlikte, yara bölgesinde sıvı akümüasyonu ve enflamasyonun karakteristik özellikleri görülmeye başlanır.

Yaralanmadan 48 saat sonra, sabit doku monositleri, yara makrofajı olmak için aktive olurlar. Bu özelleşmiş yara makrofajları, normal iyileşme sürecinde belki de en önemli enflamatuvar hücrelerdir. Yara makrofajları aktive olduklarında Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) salgırlar. Ayrıca bu makrofajlar; fonksiyonel olmayan konak hücrelerinin, bakteri ile dolu nötrofillerin, hasar görmüş matriksin, yabancı maddelerin ve yara bölgesinde kalmış bakterilerin bölgeden uzaklaştırılmasından sorumludur. Yara

bölgesinde makrofajların varlığı, enflamatuar sürecin sona ermekte ve proliferatif sürecin başlamakta olduğunu göstergesidir (38).

Proliferasyon (Fibroblastik) Faz

Proliferasyon; yaralanmadan 2-3 gün sonra, yara bölgesine fibroblastların gelmesiyle başlar. Fibroblastlar enflamatuar faz sırasında oluşturulan fibrin kaynaklı geçici matriks vasıtasıyla yara kenarlarından göç eder. Yaralanmadan sonraki ilk hafta içinde fibroblastlar, makrofajlar tarafından salınmış olan TGF- β ve PDGF sayesinde proliferer olur ve glikozaminoglikan, proteoglikan ve kollajen sentezlerler. Üç ve beşinci günler arasında kollajen sentezinin başlamasını takiben anjiogenezis ve proliferasyon üçüncü günden sonra başlar (117). Fibroblastlar olgunlaşırken yara bölgesine mekanik olarak destekleyecek ve kapiller dokuya yataklık yapacak matriks dokusunu sentezler. Fibroblastlar kollajen fibrillerin üretimi yanında yara remodülasyonunda rol alan elastin, fibronektin, sülfat ya da sülfat olmayan glikozaminoglikanların ve kollajenaz gibi proteazları da üretirler (69).

İyileşmenin ilerleyen aşamalarında birkaç önemli biyolojik olay gerçekleşmektedir. Epitelizasyon süreci aktive olmuş yara makrofajları, trombositler ve keratinositlerden salgılanan Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü-alfa (TGF- α) tarafından başlatılır (129). Epitelial köprü tamamlandıktan sonra yara kabuğu enzimler ile eritilerek ortamdan uzaklaştırılır. Yara bölgesindeki yüksek metabolik aktiviteden dolayı yüksek oksijen ve besine ihtiyaç vardır. Yara içerisindeki düşük pH, azalmış oksijen basıncı ve artmış laktat gibi lokal faktörler bölgeye yeni kan desteğinin sağlanması için gerekli olan faktörlerin salgılanmasına neden olur (85). Bu sürece anjiogenezis veya neovaskülarizasyon denir ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) ve TGF- β tarafından stimüle edilir. Bu faktörleri epidermal hücreler, fibroblastlar, makrofajlar ve vasküler endotelial hücreler üretir (147).

Remodelizasyon Fazı

Proliferatif fazın ilerlemesi ile yara bölgesindeki baskın hücre tipi fibroblastlara dönüşür. Mezenkim kaynaklı bu hücreler, yaralanmış dokunun yapı ve fonksiyonunu yeniden kazandırmak için yeni matriks sentezlemekle görevlidir (31). Remodelizasyon aşamasında fibroblastlar bFGF, TGF- β , PDGF, Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF) ve İnsulin benzeri Büyüme Faktörü -1 (IGF-1) üretmeye başlar. Fibroblastlar, 7 ile 14 gün arasında baskın hücre grubunu oluşturur ve sayıları en üst düzeye ulaşır. Kollajen moleküllerinin üretilmesinin ardından fibroblastlar kollajen fiberlerin içinde ekstraselüler olarak toplanırlar. Bu fiberler daha sonra çapraz olarak bağlanır ve kollajen demetler içinde organize olurlar. Kollajen sonraki 6 hafta boyunca üretilerek yara bölgesindeki bağ dokusunun esas bir komponenti olur (117). Kollajen matüre oldukça ve yaşlandıkça moleküller arası ve molekül içi çapraz bağlar oluşturarak daha sağlam hale gelir. Bu önemli çapraz bağlanma süreci zamanla kollajenin sağlamlığını ve stabilitesini artırır (65). Remodelasyon safhasında kollajen yıkımı da meydana gelir (107). Fibroblastlar, nötrofiller ve makrofajlardan salgılanan spesifik kollajenazlar molekülün üç zincirini de kendine has bir formda kırar. Bu kollajen parçaları başka proteazlar tarafından daha küçük parçalarına ayrılırlar.

2.3.2. İn vitro Yara İyileşme Modeli

Lackler ve ark. (2000) periodontal yara iyileşmesi ve rejenerasyonun biyolojik temelini araştırmaya müsaade eden bir in vitro yara modeli geliştirmek ve in vitro yara modelinde periodontal hücreler ile gingival fibroblastların yara alanlarını doldurma oranlarını karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada; doku kültür kabının üzerinde bir baştan bir başa mekanik olarak bir plastik uç ile 3 mm genişliğinde bir yara modeli oluşturmuşlardır. Kültürler 12 gün boyunca çeşitli konsantrasyonlarda fetal bovine serum (FBS) ile inkübe edilmiştir. Örnekler fikse edilip boyandıktan sonra bilgisayar destekli histofotometri ile yara sınırlarındaki hücreler değerlendirilmiştir. Periodontal yara iyileşmesinin değerlendirildiği in vitro model kullanılan bu çalışmada 12 günlük iyileşme süresince gingival fibroblastların, periodontal ligament hücrelerinden daha hızlı yara alanını doldurduğunu bildirmişlerdir. İn vitro bu

modelde yara iyileşme karakteristiğinin hücre tipine, hücre tabakasının yaralanmasına ve serum konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir. (83)

Mumford ve ark. (2001) bir in vitro modelde trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (TKBF-BB)'nin yara dolumuna ve proliferasyona etkisini belirlemek ve gingival fibroblastlar ile periodontal ligament hücrelerinde spesifik büyüme faktörünün etkisini karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada; 12 gözlü kültür kabının tabanında mekanik olarak 3 mm genişliğinde yara modeli oluşturmuşlardır. Hücreler çeşitli konsantrasyonlarda FBS ile 2, 6 ve 9 gün inkübasyona bırakılmış ve bilgisayar destekli histomorfometri ile hücre sayıları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar; periodontal ligament hücrelerinin oluşturulan yara modelinde gingival fibroblastlar ile karşılaştırıldığında TKBF-BB'ye daha büyük proliferatif cevap verdiğini göstermiştir (97).

Arıkan ve ark. (2007) in vitro yara iyileşmesi modelinde trombin ve trombosit zengin plazma (TZP)'nin farklı konsantrasyonlarının gingival fibroblast, periodontal ligament fibroblastı ve osteoblastlar üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında kendi geliştirdikleri bir yara modelini kullanmışlardır. Oluşturulan 5 mm çapındaki araç ile hücre materyali dağıtmak ve birbirinden ayırmak için kabın yüzeyini süpürülerek ve bir kaç kez saat yönünde döndürülerek deneysel yara modeli oluşturulmuştur. Elde ettikleri sonuçlara göre TZP'nin periodontal hastalıklarda hasarlı bölgelerde yara iyileşmesini etkili bir şekilde destekleyebileceğini ve geliştirilmiş olan yara modelinin gelecekte periodontal yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılabilceğini öne sürmüşlerdir (4).

2.4. Periodontal Rejenerasyon

Günümüzde periodontal hastalıklar nedeniyle yıkıma uğramış olan sert ve yumuşak dokuların tekrar eski konumlarına getirilebilmesi için farklı cerrahi teknikler, çeşitli greft materyalleri, bariyer membranlar, büyüme faktörleri gibi çeşitli materyaller ve teknikler üzerinde çalışılmasına rağmen insanlarda tam ve ideal bir rejenerasyonu elde edebilmek mümkün olmamıştır (82).

Bazı mikroorganizmalar ya da mikroorganizma grupları konakla aralarındaki dengeyi kendi lehlerine bozup periodontal ligament ve alveol kemiğini etkileyerek periodontal cep oluşumuna ve sürekli artan bir şekilde doku yıkımına neden olurlar (102). Bundan dolayı periodontal hastalıkların tedavisinde amaç; mikrobiyal etiyolojiyi ve ilgili risk faktörlerini kontrol altına alarak enfeksiyonun ilerlemesini durdurmak ve yıkıma uğramış destek periodontal dokuların yeniden sağlıklı durumlarına dönmelerini ve rejenerasyonlarını sağlamaktır (82).

Periodontal rejenerasyon; kaybedilen dokuların form ve fonksiyon olarak tekrar oluşmasıdır (14). Periodontal dokuların rejenerasyonu, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerini kapsayan son derece dinamik bir süreçtir. İyileşme bölgesinde, yeni kemik, yeni sement ve periodontal ligament olduğu durumlarda ancak periodontal rejenerasyondan bahsetmek mümkündür (60). Periodontal dokuların rejenerasyonu; hücreler, büyüme faktörleri, hormonlar ve yeni dokuların oluşumunu tetikleyen bir dizi hücresel faaliyetleri içeren oldukça karışık bir yara iyileşme sürecini kapsamaktadır. Farklı tiplerdeki hücreler, hücresel aktiviteler, mikrobiyal komponent, sitokinler ve konağın yanıtı periodontal rejenerasyonda önemli rol oynarlar. Periodontal tedaviyi takip eden iyileşme sürecinde, kök yüzeyine komşu yara bölgesinde oluşacak hücrelerin tipi, yeni dokunun tipini ve kalitesini belirlemektedir. Bu alanda çoğalacak hücreler epitel, bağ dokusu, alveol kemiği ve periodontal ligamentten köken alırlar (57).

Periodontal dokuların rejenerasyonunda bazı temel komponentler bulunmaktadır. Bunlar; hücreler, kanlanma desteği, taşıyıcı iskelet yapılar ve uyarıcı moleküllerdir (144). Bu yapıların her biri iyileşme proçesinde ve rejenerasyonda önemli role sahiptirler. Hücreler yeni doku gelişimi ve diferansiyasyonunu sağlarken, büyüme faktörleri hücresel aktiviteyi modüle ederler ve matriks üretimi sağlarlar. Anjiyojenik uyarılarla oluşturulan yeni kanlanma ağı ise doku gelişimi ve homeostazisini sağlar. Periodontal rejenerasyonun elde edilmesindeki en önemli sınırlayıcı faktör ortamdaki mikrobiyal patojenlerin yara bölgesine kontamine olmasıdır. Bu nedenle optimal düzeyde bir rejenerasyon elde edebilmek için ortamdaki mikrobiyal

yapıyı kontrol altına alacak antimikrobiyal yaklaşımların mutlaka uygulanması gerekmektedir. (135).

Polipeptit hormonlar olan büyüme faktörleri; periodontal ligament hücrelerinin, sementoblastların ve osteoblastların migrasyonu, kemotaksisi, proliferasyonu, diferansiasyonu ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimi gibi hücresel olayları stimüle ederler (82). Doku tamiri sırasında mitogenez, migrasyon, matriks sentezi ve remodasyonda görev alırlar (91). Büyüme faktörlerinin çoğu ekstrasellüler matrikste depolanır. Matriksin yıkılmasıyla ortama salınan bu mediatörler doku remodelasyonu ve rejenerasyon sırasında farklı etkilere sahip karmaşık bir sinyal ağının bir parçası olarak görev yaparlar (26). Kendilerini üreten hücrelerin de etkilenmesini sağlayan otokrin yolla etkilerini gösterebilecekleri gibi, daha sıklıkla, üretildikleri hücre tipinden farklı bir hücre tipini etkileyecek parakrin yolla da etki gösterebilirler. Hücrelerin fenotipik durumlarını da kontrol ederek öncü hücreleri osteoblast gibi tam olgunlaşmış fonksiyonel hücrelere dönüştürebilirler (93). Periodontal dokularda bulunan büyüme faktörleri şunlardır: PDGF, IGF, TGF- β , asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF), bFGF, VEGF, EGF, sement kaynaklı büyüme faktörü (CGF), paratiroid hormonla ilişkili protein (PTHrP) ve kemik morfojenetik proteinler (BMP)'dir (3).

PDGF, IGF-1, bFGF, TGF- β , BMP-2,4,7,12 ve mine matriks proteinleri gibi komponentleri içeren bu biyoaktif moleküllerin periodontal rejenerasyonun stimülasyonunu pozitif yönde etkiledikleri bildirilmiştir (54,73,86,144). PDGF ve IGF-1 faktörlerinin kombine kullanıldığı bir çalışmada şiddetli periodontal hastalık bulunan bireylerde alveoler kemik onarımının stimüle edilebildiği gösterilmiştir (67). Periodontal onarımda anjiojenik etkili faktörlerinde oldukça önemli olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmış ve bunlar içerisinde bFGF'nin güçlü anjiojenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (99).

2.5. Büyüme Faktörleri

2.5.1. Fibroblast Büyüme Faktörleri

Fibroblast büyüme faktörü; beyin, hipofiz bezi ve diğer organlardan elde edilebilen, mezenkimal hücre ve endotel hücre kültürlerinde DNA ve protein sentezini uyarabilen polipeptid büyüme faktörüdür (58).

Normal yetişkin dokularda en çok bulunan proteinler aFGF ve bFGF'dir. bFGF osteoblastlardan eksprese edilir ve genellikle aFGF'ye göre daha potent özelliktedir (68). bFGF, 14-16 kilodalton (kDa), aFGF ise 15 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Her ikisi de aynı biyolojik aktivitelere sahiptir ve tek zincir proteinden meydana gelmektedirler. FGF'nin mitojenik kapasitesi, yalnızca fibroblastları değil birçok farklı hücre tipini kapsamaktadır. FGF çok fonksiyonludur ve mitozun yanında diğer birçok hücreyel olayı da stimüle edebilmektedir (58). Bazik fibroblast büyüme faktörü temel olarak; endotelial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, kondrositler ve mast hücreleri tarafından sentez edilerek salınır. Yara iyileşmesi sürecinde özellikle keratinositlerin migrasyon ve proliferasyonu artırmaktadır. Aynı zamanda fibroblastlardan kollegenaz enziminin salınımını ve kapiller endotelial hücrelerin proliferasyonunu uyararak, anjiyogenezis için zemin hazırlar (140). aFGF ve bFGF kemik matriksinde depolanmakta, osteoblast hücre düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (58).

bFGF'nin yara iyileşmesindeki önemi; periodonsiyumun rejenerasyonuna katkıda bulunması ve endotelial hücre bölünmesi ve kan damarı oluşumu için in vitro ve in vivo olarak güçlü bir stimulator olmasıdır (84).

bFBF; matriks mineralizasyonunda önemli bir yer tutmaktadır (101). bFBF'den yoksun farelerde trabeküler yapının oluşumunda belirgin bir düşüş, trabeküler kemik dokuda hacimsel kayıp, mineral birikimi ve kemik oluşum oranında da azalmaların olduğu bildirilmiştir (95). Olgunlaşmamış osteoblastların FBF'ye maruz bırakılmaları hücre proliferasyonunda olgun osteoblastların maruz bırakılmaları ise osteokalsin ve matriks mineralizasyonunda artışlara neden olduğu ortaya konulmuştur (35).

FBF'nin aynı zamanda IGF salınımını hem in vivo hem de in vitro olarak arttırdığı bazı çalışmalarda tespit edilmiştir (111,159).

2.5.2.İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri

İnsülin benzeri büyüme faktörleri, molekül ağırlığı 7600 civarında olan polipeptid yapıdaki maddelerdir. Kemik doku dahil pek çok dokuda sentezlenmektedirler. IGF-1 ve IGF-2, kemik yapıda özellikle etkili olan molekülüdür (33). Her iki protein de insülinle %47, birbirleriyle ise % 62 oranında yapısal benzerlik gösterirler. İnsülin, IGF-1 ve IGF-2'ye göre daha düşük dozlarda daha hızlı metabolik etkiler gösterirken, IGF'ler ise insüline göre daha düşük dozlarda hücre çoğalmasını stimüle etmektedir (58).

IGF-1, tek zincirli polipeptid yapıda bir büyüme faktörüdür. Otokrin etki gösterir ve osteoblastik hücrelerde alkalın fosfataz aktivitesini arttırmaktadır. PDGF ile birlikte uygulandığında yara iyileşmesi hızını ve kalitesini arttırmaktadır (122). IGF-1'in IGF-2'den 4-7 kat daha güçlü olduğu bilinmektedir. Lokal etkilerin kemik remodelling üzerine daha etkin olduğu sanılmaktadır. IGF-I, kemik kollajen ve matriks sentezini artırıcı, özellikle osteoblast serileri üzerinde hücre replikasyonunu artırıcı ve osteoblast fonksiyonlarını doğrudan modüle edici özelliklere sahiptir. IGF-1'in bilinen bir diğer etkisi de kollajen yıkımını azaltma potansiyeline sahip olmasıdır (33).

2.6. Yara İyileşme Süreci İle İlgili Proteinler

2.6.1. Tip 1 Kollajen

Yeni bağ dokusunun oluşumunda kollajen üretimi anahtar bir rol oynamaktadır. Periodontal ligament, gingival fibroblast ve osteoblastlar Tip I ve Tip III kollajeni üretmektedir (18). Tip I kollajen, kemikte majör yapısal proteindir ve organik materyalin % 90'ını oluşturur. Kemiğe dayanıklılık, esneklik ve güç kazandırır (118). Tip I kollajen, bilinen 19 kollajenden en önemlisi olup, kemik organik matriksinin ve dişeti bağ dokusunun en önemli bileşenidir. Kemik organik matriksinin kalitesi, düzeni ve devamı, kemiğin mekanik fonksiyonu ve kırık karşısındaki direnci üzerinde etkili olduğu ve

kemik defektlerinin rejenerasyonunu hızlandırmaya yardımcı olduğu bilinmektedir (34).

Tip I kollajen heterotrimerik bir molekül olup iki $\alpha 1(I)$ ve bir $\alpha 2(I)$ zincirinden oluşmaktadır. Her α zincirinde, her üç aminoasitte bir tekrarlayan glisin (Gly) bulunur (34). Tip I kollajen, ribozomlarda ilk olarak bir öncül molekül olan ve N terminalinde yaklaşık 100 aminoasitlik bir sinyal dizisi içeren preprokollajen şeklinde sentezlenir. Preprokollajenin N terminali endoplazmik retikulumun veziküler aralığına girdikçe sinyal dizisi ayrılır ve prokollajen molekülü oluşur. Bu yapı, hücreden salındıktan sonra prokollajenin N ve C terminalindeki propeptidler N-proteinaz ve C-proteinaz enzimleri ile uzaklaştırılmasıyla tropokollajen oluşur. Tropokollajen molekülüleri birçok hidroksillenmiş prolin ve lizin ile bağlanarak kollajen fibrillerini şekillendirir (153).

Tip I kollajen; üçlü heliksel bir moleküle sahiptir. Bütün bağ dokularında fibröz form oluştururlar. Prokollajen I adı verilen öncü molekül olarak osteoblastlarca sentezlenirler (61).

2.6.2. Osteokalsin

Osteokalsin; osteoblastlar, odontoblastlar ve az miktarda da hipertrofik kondrositlerden sentezlenen, küçük, hidroksiapatit bağlayan, kemik matriksinde yer alan ve kollajen kaynaklı olmayan bir protein olup sentezi K vitaminine bağımlıdır. Bu protein 5,9 kDa molekül ağırlıklı olup nonkollajenik matriks proteinidir. Osteokalsin, hidroksiapatit kristallerine yüksek afinite gösterir, kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayan bir protein olup gelişen kemikte mevcuttur ve kemik oluşumuna katkıda bulunur. Osteokalsin sentezi, D vitamini aracılığıyla olur. D vitamini, osteokalsin gen transkripsiyonunu regüle eder. D vitamini eksikliği olan deney hayvanlarının kemiklerinde, normale göre %50 daha az osteokalsin olduğu saptanmıştır. Osteokalsin, mineral depolanmasında ve kemiğin remodelinginin düzenlenmesinde önemli rol oynar (61).

Osteokalsinin görevi tam olarak bilinmemekle birlikte negatif feedback mekanizması ile kemiğin yeniden yapılandırılmasında görev aldığı

düşünülmektedir. Osteokalsin; spesifik olarak osteoblast fonksiyonunu gösterir, serum düzeyleri kemik yapımı ile koreledir (100).

2.6.3. Osteonektin

Kemik matriksinin majör non-kollajenöz bir proteini olan ve SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) olarak da adlandırılan osteonektin; birçok hücre tarafından salınan kalsiyum bağlayıcı matriselüler bir glikoproteindir (156). Osteonektinin insan ve bovin kemiğinde majör non kollajenöz bir eleman olduğu ilk kez Termine ve ark. (145) tarafından, in vitro olarak prolife olan hücreler tarafından salınan bir protein olduğu Sage (119,120) tarafından ve kültüre edilmiş fibroblastlar tarafından üretilen bir protein olduğu ise Otsuka ve ark. (105) tarafından tanımlanmıştır.

Hücre-matriks etkileşimlerini yöneten ekstraselüler regülatör makromoleküllerin homolog olmayan bir grubudur. Kemik dokusunda yüksek miktarda bulunan osteonektin diğer doku ve hücre tiplerinde de büyük ölçüde bulunmaktadır. Genellikle remodele olan dokular, mineralizasyon, anjiogenezis ve yaralanma ile tümör oluşumuna karşı oluşan patolojik cevaplar ile ilişkilidir. Osteonektin; anjiogenezis, tümör oluşumu, katarakt oluşumu ve yara iyileşmesinde aktivite göstermektedir. Olgunlaşmış dokularda osteonektinin ekspresyonu genellikle daha sınırlıdır. Kemik ve kırıkta mineralizasyonunda görev alır. Bağ dokusunda yaygın olarak bulunan osteonektin, tip 4 kollajenin bağlandığı bazal membranda da bulunmaktadır. Osteonektin yüksek affiniteli kalsiyum bağlayıcı proteindir, hem yapısı hem de fonksiyonu Ca^{2+} iyonları tarafından düzenlenir. Osteonektin sitokinlere de bağlanabilmektedir (156).

2.7. Oksidatif Stres

İnflamatuar bir hastalık olan periodontitiste bakteriler doku yıkımına direkt olarak salgıladıkları toksik ürünlerle, indirekt olarak da konak savunma sistemini aktive ederek neden olurlar. İltihaplı dokularda içinde reaktif oksijen türlerinin de olduğu birçok molekül yapıları bulunmaktadır (12).

Oral kavitede periodontitis gibi kronik inflamatuvar hastalıkların içinde olduğu çeşitli durumlar oksidatif strese neden olmaktadır (116). Normalden

fazla serbest oksijen radikalın oluşmasıyla veya organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla, hücrenin çeşitli elemanları ve hücre dışı makro moleküller, serbest radikaller ile etkileşerek, yapısal ve fonksiyonel bozukluğa uğrarlar. Serbest radikaller ile organizmanın antioksidan mekanizması arasında bu kritik dengenin bozulmasıyla oluşan oksidatif zarar, oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (115,134). Serbest radikaller, antioksidanlar ile engellenmedikleri durumlarda, en yakınındaki yağ, protein, karbonhidrat, RNA ve DNA moleküllerine saldırarak, yapısal ve fonksiyonel bozukluklar meydana getirmektedirler. Oral dokularda reaktif oksijen türleri hem endojen hem de eksojen oksitleyici ajanlar tarafından üretilir. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi oksidatif türler normal aerobik metabolizmanın ortak yan ürünleridir. Ayrıca reaktif oksijen türleri kronik periodontitisdeki gibi doku hasarında ve enflamasyonda immün sistem tarafından oluşturulmakta ve konak savunması için gerekli olmalarına rağmen fazla miktarda birikmeleri konak dokuda oksidatif hasara neden olmaktadır (116).

Serbest radikaller; 1, 3, 5 gibi tek sayıda, çiftleşmemiş elektrona sahip, stabil olmayan ve bundan dolayı da son derece reaktif olan basit moleküllerdir (115,132). Serbest radikaller, yapıları, fiziksel, kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları ve rol aldıkları reaksiyonlar ile hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar (132). Serbest radikallerin çiftleşmemiş elektronları kararlı duruma geçme eğiliminde olduklarından, kararlı halde bulunan başka bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürürler ve bu olay bir zincir reaksiyonu şeklinde devam eder (15). Antioksidanlar tarafından engellenmezse, bu radikaller, en yakınındaki yağ, protein, karbonhidrat, RNA ve DNA molekülü ile reaksiyona girerek, yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadırlar (115).

2.8. Antioksidanlar

Serbest radikaller pek çok mekanizma ile meydana gelse de bu bileşikler inaktif hale getirebilecek doğal bileşikler vardır. Serbest radikallere karşı savunma mekanizması oluşturan bu bileşiklere antioksidanlar denir (15). Antioksidasyon terimi, serbest radikal oluşumunu geciktiren veya

ortadan kaldıran tüm işlemleri kapsar. Etkili bir antioksidanın iki özelliği vardır. Birincisi, serbest radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturmamasıdır. İkincisi ise, oluşan yeni radikale komşu dokulara zarar vermeyen ve reaktif olmayan özellik kazandırmasıdır (24).

Serbest radikallerle antioksidanlar arasındaki hassas denge korunamadığı durumlarda hücre hasarına kadar giden birçok patolojik durum ortaya çıkmaktadır. Periodontal hastalıklarda antioksidanlar hücre hasarını önleyerek hastalığın ilerlemesini engelleyici ya da koruyucu fonksiyonlara sahip olabilirler. Antioksidanların ilk belirlenen etkileri zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmıştır. Günümüzde antioksidanların tanımı lipidlerin yanında proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkileri içerecek şekilde genişletilmiştir (109).

Mineral içeren antioksidanlar vücutta sentezlenirler. Diğerleri ise besin ögesi olarak sağlanan ve vücutta sentezlenemeyen antioksidan vitaminlerdir (78). Antioksidan enzim sistemleri içinde, glutatyon peroksidaz, superoksid dismutaz, katalaz enzimleri ve albumin, transferin, laktoferin gibi ekstrasellüler proteinler bulunmaktadır. Bu enzimlerin aktivitesi, serbest radikallerin sentezine yıkılım hızına ve eser elementlerin (Se, Mn, Zn, Cu) alınmasına bağlıdır. Antioksidan vitaminler arasında ise E vitamini, C vitamini ve karotenoidler bulunmaktadır (115,134).

2.8.1. E Vitamini

Evans ve Bishop tarafından 1922 yılında keşfedilen E vitamini, dört tokoferol (α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta)) ve dört tokotrienol (α , β , γ , δ) içeren, yağda çözünen, sekiz molekülden oluşan bir gruptur (20,63,76,94,126). Bu izomerlerin farklılığı fenol halkasındaki metil gruplarının farklı numara ve konumda olmasından kaynaklanmaktadır (28). Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip olan aromatik halka, aktif kısmını oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (41,63,76,126). α -tokoferol; E vitamini formlarının insanda en fazla bulunanı

ve en fazla biyolojik aktiviteye sahip olanıdır. Ancak insanlar E vitaminini sentezleyemezler, diyetel kaynaklardan alırlar (20,59,63,76,94)

E vitaminin en önemli kimyasal özelliği antioksidan etkinliğinin olması, peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötrale edebilmesidir (20,63,94,126,152). Hücrelerde, membran fosfolipidlerinin poli-doymamış yağ asitleri (linoleik asit, araşidonik asit gibi) spontan olarak ya da oksidan metabolitlerin etkisi sonucu kolayca oksitlenebilirler ve peroksit türevlerine dönüşebilirler. Bu olaya lipid peroksidasyonu ya da otoksidasyonu olayı adı verilir. Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötrale eden en güçlü antioksidan faktör E vitaminidir (63,76,94,126,152). E vitamini, hücre ve subsellüler yapıların membran lipidleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle membranları oksidatif zedelenmeye karşı korur. Lipitte çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle kolayca membran fosfolipitlerine diffüze olabilmektedir ve tüm hücre membranları üzerine stabilize edici etkisi vardır (76,126).

E vitamininin protein kinaz C (PKC) aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (19). PKC; siklooksijenaz (COX) ekspresyonu, interlökin 1 beta (IL-1b) üretimi, NADPH oksidaz tarafından O⁻² oluşturulması gibi inflamatuvar süreçle ilgili pek çok proteinin transkripsiyon ve aktivasyonunu düzenlemektedir (80). Ayrıca PKC'nin inhibe olmasının COX-2 ve PGE₂ inhibisyonuna sebep olduğuda gösterilmiştir (46). Nükleer faktör kappa B (NFkB) inflamatuvar sitokinlerin, adhesyon moleküllerinin esas düzenleyicisidir. NFkB; TNF- α tarafından aktive edilmiş hali alfa- tokoferol asetat ile tekrar inhibe edilebilmektedir (143). Bu bilgilere dayanarak alfa tokoferolün antioksidan özelliğinin yanında yukarıda belirtilen biyokimyasal mekanizmalar ile antienflamatuvar etki gösterdiği de anlaşılmıştır.

Kemik dokusu iyileşmesi; enflamasyon, onarım ve remodelasyon fazlarından oluşmaktadır. Kemik kırığı iyileşmesinin birinci fazı olan enflamasyon döneminde polimorfonükleer lökositler, makrofajlar ve mast hücreleri kırık alanına göç ederler. İnfiltrate olan bu hücrelerin aktivasyonu ile lipid peroksidasyonu meydana getiren serbest oksijen radikalleri oluşur. Serbest oksijen radikallerinin, granülasyon dokusu oluşması üzerine

dolayısıyla kemik kırığı iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri vardır. Serbest radikallerin, osteoklast hücrelerinin aktivasyonunu artırarak, kemik rezorpsiyonunu hızlandırdıklarını düşünülmektedir. E vitamininin, bu serbest radikalleri elimine edebileceği, lipid peroksidasyonunu engelleyebileceği ve kırık iyileşmesi üzerine pozitif etkisinin olabileceği bildirilmiştir (43,123,149).

Çeşitli araştırmalar E vitamininin insan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Antioksidan vitaminler (C vitamini, E vitamini, β -karoten) hücre içinde hasara neden olan singlet (tekli) oksijenin oluşmasını önleyerek ya da oluştuktan sonra bağlayarak organizma içinde karsinogen oluşumunu baskılamaktadırlar (151). Alfa-tokoferol önemli bir hücre içi antioksidan olduğu için antitümöral etkinliğini lipid peroksidasyonunu azaltarak ve karsinogen maddeleri inhibe ederek gösterdiği düşünülmektedir (49). Yağda eridiği için özellikle gastrointestinal sistemde etkilidir. Selenitlerle birlikte verildiğinde hücrede glutatyon enzim aktivitesini ağır metallerin toksik etkisine karşı korumaktadır (151).

Yapılan çalışmalarda, E vitamininin, kollajenin yıkımını azaltarak, peridontitis gibi lokal destrüktif inflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve gingivektomi ameliyatı sonrasında yara iyileşmesinin hızlandırılmasında kullanılabileceği gösterilmiştir. E vitaminin yara iyileşmesi üzerine olan etki mekanizması tam olarak açıklanmamış olmasına rağmen, immünoestimulan ve antienflamatuvar etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir (7,79).

Periodontitisin tedavisinde mikrobelerin etkisini inceleyen bir çalışmada 16 periodontitis hastasına periodontal tedavi ile birlikte içinde α -tokoferol asetatın da bulunduğu mikrobelerin verilmesinden 6 ay sonra sondlamada kanama ve cep derinliğinde azalma değerlerinin plasebo verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu bildirilmiştir (108).

Periodontal sağlık ile karotenoid, retinol ve E vitamini gibi 3 farklı antioksidanın serum düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyen, 60-70 yaşlarındaki 1258 erkeğin dahil edildiği çalışmada ise α ve γ tokoferolün serum düzeyleri ile periodontal sağlık arasında bir ilişki bulunamamıştır (88).

Tokoferol'ün kemik kaybı üzerine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada; ratların mandibular molar dişlerinin lingualindeki alveol kemiği 90

gün boyunca rotasyonel kuvvet uygulayan bir aletle gerilime maruz bırakılmış ve kemik kaybı mine-sement sınırı ve alveol kreti arasındaki mesafe ölçülerek değerlendirilmiştir. E vitamininin rotasyonel gerilime bağlı olarak oluşan kemik kaybına karşı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde koruyucu olduğu ve periodontal sağlığın idamesinde önemli bir rolü olabileceği bildirilmiştir (32).

Ratlarda erken ve geç dönem kırık iyileşmesi üzerine antioksidan α -tokoferolün etkisini inceleyen bir çalışmada; 60 erkek rat, randomize olarak iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubunda her bir ratın sağ tibia'sı anestezi altında manuel olarak kırılıp sonrasında tellerle sabitlenirken deney grubundaki ratlara buna ek olarak intraperitoneal yolla 20 mg/kg α -tokoferol verilmiştir. 15. ve 45. günlerde serbest oksijen radikallerine bağlı olarak meydana gelen lipid peroksidasyonunun deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını, histopatolojik ve radyografik olarak kırık iyileşmesinin 60. günde α -tokoferol grubunda daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak; α -tokoferolün erken ve geç dönem kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir (149).

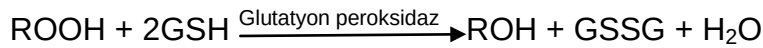
Alfa-tokoferolün erken dönem osteoporotik kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği ovariyektomize rat modeli kullanılan bir çalışmada 24 dişi rat; sham operasyon grubu, ovariyektomize kontrol grubu ve ovariyektomize + α -tokoferol grubu olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Tüm ratların sağ femuru kırılmış ve internal fiksasyon yapılmıştır. Tedaviden 2 hafta sonra bilgisayarlı tomografi ile kallus hacmi, kallus formasyonunun radyolojik aşamalandırılması ve kırık iyileşmesi ölçümleri yapılmış ve ayrıca kırık femurun oksidatif parametreleri de ölçülmüştür. α -tokoferol kullanımının yalnızca sham operasyonu yapılan gruptakine kıyasla anlamlı olarak daha fazla kemik iyileşmesini artırdığı bildirilmiştir. Yine α -tokoferol grubunda antioksidan enzim aktivitelerinin ovariyektomize kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla bulunduğu, sonuç olarak α -tokoferolün kallus hacmine ve kallus formasyonunun radyolojik aşamasına etkisi olamamasına rağmen kırık iyileşmesini artırdığı, bunun iyileşmenin erken fazındaki artmış antioksidan aktiviteye bağlı olabileceği rapor edilmiştir (133).

2.8.2. Selenyum

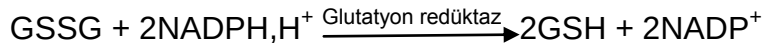
Selenyum, atomik numarası 34, atom ağırlığı 79 olan, periodik tabloda VI A alt grubunda yer alan ve aynı grupta bulunan sülfür ile kimyasal özellikleri büyük benzerlik gösteren semimetal bir elementtir. 1818 yılında Berzelius tarafından bulunmuş ve eski Yunan ay tanrıçası olan Selen'e göre adlandırılmıştır (51,90).

Selenyum oksidoredüksiyon reaksiyonlarının birçok basamağında rol oynayan bir elementtir. Elementer durumdaki selenyum elektron kaybederek ya katyonik şekle (Se^{+4}) ya selenite (Se^{+6}) ya da selenata dönüşür. Tersine elektron kazanarak anyonik şekle (Se^{-2}) dönüşmektedir. En sık rastlanan şekli selenit (Se^{+4})'tir. Organizmada selenyum R-SeH ya da R-Se-R şeklinde organik moleküllere bağlı durumdadır. R-SeH şekli tiyol grubuna (R-SH) eşdeğerdir. Ayrıca R-Se-CH₃ şeklide bulunur (41).

Selenyum bir selenosistein molekülü içinde birleşmiş ve her biri bir selenyum atomu içeren dört alt üiteden oluşan glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesi için gereklidir. Glutatyon peroksidaz enzimi ekstraselüler sıvılarda, hücrelerin sitozol ve mitokondrilerinde bulunur. Bu enzim aşağıdaki reaksiyona göre organik hidroperoksitlerin (özellikle lipid yapılların) ROOH tipini ROH şekline dönüştürür.



İndirgenmiş glutatyon, oksitlenmiş glutatyona dönüştürülmektedir. Bu oksitlenmiş glutatyon da glutatyon redüktaz enziminin etkisiyle rejenere olmaktadır.



Hidroperoksitler hücre için toksik serbest orijinli radikallerin kaynağı olabilir. Peroksitlerin fazlasını elimine ederek glutatyon peroksidaz hücreyi korumaktadır. Selenyum bir seleoprotein olan desiodinaz enzimi aracılığıyla troid hormonlarının metabolizmasında rol oynar. Selenyum uygulanması arsenik kadmiyum civa kurşun ve platin gibi diğer bazı elementlerin toksik etkilerini azaltabilmektedir (41).

Selenyumun antienflamatuar ve diğer fizyolojik etki mekanizmaları

Proenflamatuar süreci aktive eden enfeksiyonlar, serbest radikaller, oksidatif stres gibi etkenler, NFκB'yi aktive ederek proenflamatuar prosesi başlatır. NFκB; immün ve proenflamatuar cevapta hayati rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. NFκB; artmış enflamatuar cevap ile ilişkilidir ve aktivasyonu sonucu IL-6 ve TNF-α üretimi artar. NFκB stoplazmada IκBα (sitozolik NF-κB inhibitörü)'ya bağlanır ve reaktif oksijen türleri tarafından stimüle edilen protein kinazlar tarafından fosforile edilir. NFκB'nin IκB'den ayrılması sonrasında NFκB nükleusa gider ve burada enflamatuar sitokinlerin promotor bölgesine bağlanır. Bu olaya translokasyon ismi verilir. Bu olay sonucu üretilen TNF-α karaciğeri hedef alır ve IL-6 ile birlikte C-reaktif protein üretimini artırır. IL-1 ise IκBα fosforilasyonu ile TNF-α ile birlikte NFκB'yi tekrar aktive eder ve enflamasyonun artmasına sebep olur. Tüm enflamatuar hastalıklar; reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkışına neden olmalarıyla NFκB'yi aktive edebilirler. Selenyum seviyesi glutatyon peroksidazı etkilediği için hücre içi reaktif oksijen türlerinin seviyesini etkiler. Glutatyon peroksidaz IκBα fosforilasyonunu inhibe ederek NFκB translokasyonunu azaltır. Glutatyon peroksidazın IκBα yarı ömrünü iki katına çıkardığı ve parçalanmaktan koruduğu bildirilmiştir. Bundan dolayı artmış selenyum seviyesi enflamatuar sitokin genlerinin aktive olmasını azaltır ve akut faz proteinlerinin salınımını inhibe eder (42). Selenyumun antienflamatuar özelliği yukarıda anlatılan mekanizma ile gerçekleşmektedir.

Selenyum, bir selenosistein molekülü şeklinde, serbest radikaller üretimini önlemek için önemli olan, doymamış yağ asitlerinden türeyen hidroperoksidleri yok ettiği düşünülen, glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesi için gereklidir (23,39,41,51,90).

Glutatyon peroksidaz (GPx) enziminin her molekülünde 4 selenyum atomu bulunmaktadır. Bu enzimin aktif kısmında bulunan selenosistein direkt olarak hidroperoksidlerin (özellikle lipid yapıların) katalitik redüksiyonunda rol alır (41,51).

GPx enziminin aktivitesi selenyuma bağılıdır. GPx enzimi, radyasyon, kimyasal toksisite ya da buna benzer durumlarda oluşan oksidatif strese karşı vücudun oluşturduğu defans mekanizmasının önemli bir parçasıdır (22,51,90,113).

Düşük konsantrasyonda selenyum içeren diyetle beslenen dişi sıçanlarının doğurdukları yavrularda, büyüme ve gelişim bozukluğu ve kemik dokusunda osteopeni ile birlikte kemik metabolizmasında düzensizlik olduğu saptanmıştır (96).

Diyetle alınan selenyum miktarının fazlalılığı veya eksikliğinin kemik dokusunda bozukluklara ve kemiğin biyomekanik özelliklerinde anormallikler oluşturabileceği gösterilmiştir (148).

Selenyum iyonu, fosfolipidlerinin peroksidasyonunu engelleyen birinci savunma hattını oluşturan E vitaminini desteklemektedir. Selenyum vücutta E vitamini birikmesini ve gereksinimini azaltır. Bunun başlıca nedenleri şunlardır: 1) Selenyum glutatyon peroksidazın fonksiyonel bir ögesi olarak bu enzimi aktif durumda tutar ve peroksidasyona karşı savaşta E vitamini yükünü azaltır. 2) Pankreasın ekzokrin fonksiyonunu destekleyerek yağların ve onlarla birlikte E vitaminin sindirimini ve absorpsiyonunu artırır. 3) Selenyum henüz tam olarak açıklanamayan bir mekanizma ile E vitaminin plazma lipoproteinleri içinde tutulmasını destekler (75).

Selenyum desteğinin hücre kültüründe glutatyon peroksidaz-1 (GPx-1) üzerine ve prospektif klinik çalışmada endotelial fonksiyon üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada sodyum selenit desteğinin endotelial hücrelerde ve koroner arter hastalarında GPx-1 aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Bir selenoprotein olan GPx-1'in aktivitesindeki artışın antioksidan savunma ve kardiovasküler hastalıklardan korunmada önemli olabileceği sonucuna varılmıştır (125).

Ebert ve ark. (2006)'nın hücre hasarı ve antioksidatif kapasite üzerine yaptıkları çalışmada standart hücre kültüründe insan mezenkimal kök hücrelerinin ve kemik iliği hücrelerinin antioksidatif selenoenzim aktivitelerinin azalmış olduğunu, 100 nM selenit ilavesinin insan mezenkimal kök hücrelerinde rekatif oksijen türlerinin oluşumunu ve kemik iliği hücrelerinde

mikro çekirdek oluşumunu azalttığını bulmuşlardır. Bu sonuca göre kemik iliği hücresi kültürüne selenit ilavesinin antioksidatif kapasiteyi artırmak ve hücre hasarını azaltmak için önemli bir önlem olduğu görülmüştür (45).

Selenyum temel eser elementtir ve selenyumun hücre kültürü için gerekliliği iyi bilinmektedir. Ancak hücresel proliferasyon ve hücre canlılığındaki selenyumun etki mekanizması hala belli değildir. Saito ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada selenyum eksikliği durumunda, hücrelerde selenyuma bağlı enzim aktivitelerinde (glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz) ve hücre canlılığında azalma olduğu gösterilmiştir. Selenyumun bu etki mekanizmasını aydınlatılması için farklı mekanizmalarla çalışan diğer antioksidanların etkileri de araştırılmıştır. Yağda çözünen radikal temizleyici olan E vitamini; α -tokoferolün selenyuma bağlı enzim aktivitesini etkilememesine rağmen selenyum eksikliğine bağlı hücre ölümünü tamamen engellediği, hücre ölümünden önce artan hücresel reaktif oksijen türlerinin sodyum selenitin ve α -tokoferolün doza bağlı olarak etkisiz hale getirdiği bulunmuştur. Bu sonuçlara göre; reaktif oksijen türlerinin selenyum eksikliğine bağlı hücre ölümüne sebep olduğu, lipid hidroperoksitlerin oluşumunu inhibe ederek hücrelerdeki oksidatif strese karşı savunma oluşmasında selenyum ve E vitamininin birlikte çalıştığı ileri sürülmektedir (121).

GEREÇ VE YÖNTEM

“Vitamin E ile Kombine Selenyum Uygulamasının Periodontal Dokuların Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Hücre Kültürü Ortamında Değerlendirilmesi” başlıklı tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulunun 03 ŞUBAT 2011 gün ve 202 Sayılı oturumunda tez konusu olarak kabul edildi ve GATA Etik Kurul Başkanlığı'nın 07 Haziran 2011 tarih ve 175 numaralı toplantısında da onaylandı (Ek-1).

3.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmada; herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan, gönüllü olarak araştırmaya katılmayı kabul eden bireyler içinden iki aşamalı dental implant uygulaması yapılmış kişilerden elde edilen dişeti fibroblastları (Ek-2), ortodontik çekim endikasyonu olan bireylerden elde edilen periodontal ligament fibroblastları (Ek-3) ve allojenik kemik iliği nakli yapılacak olan bireylerden elde edilen mezenkimal kök hücreleri (Ek-4) primer insan hücre kültürü olarak kullanıldı.

Hücre kültürü çalışmalarının tümü steril laminar air-flow kabinde yapıldı. Hücre kültür vasatı olarak; 0,45 µm'lik filtreden geçirilen % 10 FCS (Fetal Calf Serum), 0,20 µm'lik filtreden geçirilen %1 L-glutamin, 0,20 µm'lik filtreden geçirilen %1 Penisilin/Streptomisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanıldı.

3.1.1. Gingival Fibroblastların Elde Edilmesi

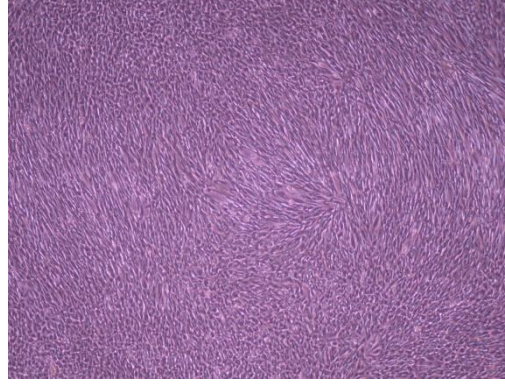
Gingival fibroblastlar; implant hastalarında protezin yapılabilmesi için implant üzerinden çıkartılan dişeti dokularından elde edildi. İki aşamalı olarak yapılan dental implantın üzerinin açılması esnasında epitelsiz bağ dokusu örnekleri alındı. 100 ml DMEM ile 1 ml penisilin ve streptomisinden hazırlanan taşıma solüsyonundan 5 ml, steril tüpler içine konularak örnekler işlem sonrasında vakit kaybetmeden laboratuara götürüldü. Doku örnekleri, laboratuarda steril laminar air-flow kabinde steril petri kabına alınarak taşıma solüsyonu ile iki defa yıkandı. Yıkama işleminden sonra 20 numaralı steril bisturi kullanılarak doku örnekleri küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan doku parçacıkları 25 cm²'lik doku kültür kaplarına steril

enjektör iğnesi ile aktararak dokunun kültür kabına yapışması sağlandı (Şekil 3.1). Doku kültür kaplarının üzerini kaplayacak şekilde 7 ml DMEM ilave edildi. Doku kültür kabının ağzı hafif açılarak, %5'lik CO₂, 37°C'deki inkübatöre hücrelerin üremesi için konuldu. Üç günde bir, hücre kültür besiyeri tazelandı.



Şekil 3.1. Küçük parçalara ayrılan bağ doku parçacıklarının kültür kabına aktarılması.

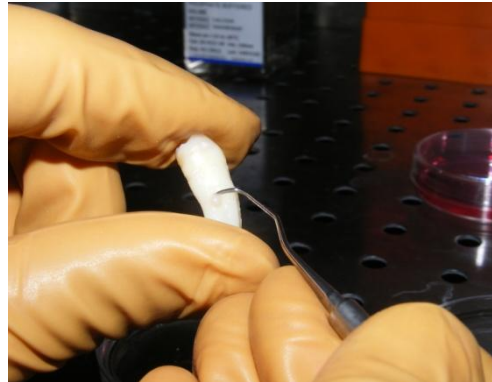
Hücrelerin üremesi inverted mikroskop kullanılarak kontrol edildi. Hücreler kültür kabının yaklaşık % 70'ini kapladıklarında, içindeki 7 ml'lik besiyeri alındı. Tripsinizasyon işlemi için % 0,25 tripsin ve 1 mM EDTA içeren 1,5 ml Tripsin-EDTA çözeltisinden kültür kabının içine boşaltıldı. Beş dakika 37°C'lik inkübatörde hücrelerin yapıştıkları kültür kabı yüzeyinden kalkmaları beklendi. Hafif pipetaj yapılarak hücrelerin birbirinden iyice ayrılması sağlandı. Doku kültür kabının içine 7 ml FCS eklenerek Tripsin-EDTA'nın aktivitesi inhibe edildi. Toplanan hücre süspansiyonu 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak, pellet 7 ml DMEM ile homojenize edilip kültür kabına hücre ekimi yapıldı. Devam eden günlerde, üç günde bir besiyeri değiştirildi. Hücreler kültür kabı yüzeyinin en az % 70'lik kısmını kapladığında insan gingival fibroblast primer hücre kültürü kullanıma hazır hale gelmiş oldu (Şekil 3.2).



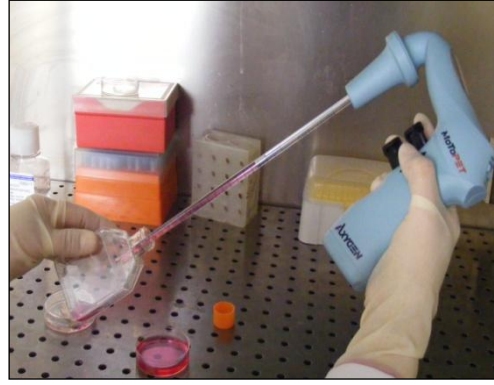
Şekil 3.2. İnsan gingival fibroblast primer hücre kültürü.

3.1.2. Periodontal Ligament Fibroblastlarının Elde Edilmesi

Periodontal ligament fibroblastları; ortodontik nedenlerle çekilen sağlıklı premolar dişlerin kök yüzeyinden elde edildi (139). Dişler; yeterli anestezi sağlandıktan sonra nazik bir şekilde alveol kemiğine ve periodontal ligamente zarar verilmemesine ve tükürük ile kontamine olmamasına dikkat edilerek çekildi. Çekilen dişler, 100 ml DMEM ile 1 ml penisilin ve streptomisinden hazırlanan taşıma solüsyonundan 5 ml, steril tüpler içine konularak örnekler işlem sonrasında vakit kaybetmeden laboratuara getirildi. Dişler, laboratuarda steril laminar air-flow kabininde steril petri kabına alınarak taşıma solüsyonu ile iki defa yıkandı. Apikal ve gingival doku kontaminasyonunu önlemek için kökün orta üçlüsünden periodontal ligament, steril Gracey küretleri yardımıyla kürete edildi (Şekil 3.3) ve elde edilen doku 25 cm²'lik doku kültür kabına aktarılarak (Şekil 3.4) dokunun üzerini kaplayacak şekilde 7 ml DMEM ilave edildi.

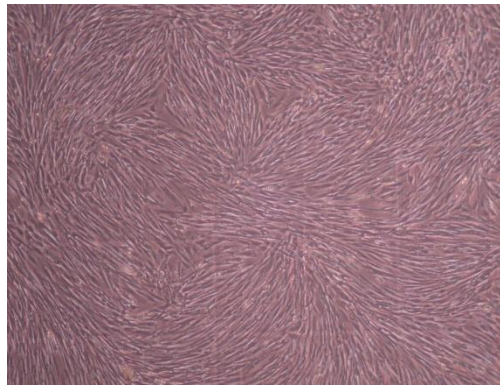


Şekil 3.3. Kök yüzeyinden periodontal ligamentin kazınması.



Şekil 3.4. Periodontal ligamentin kültür kabına aktarılması.

Doku kültür kabının ağzı hafif açılarak, %5'lik CO₂, 37°C'deki inkübatöre hücrelerin üremesi için konuldu. Üç günde bir, hücre kültür besiyeri tazelenildi. Hücrelerin üremesi inverted mikroskop kullanılarak kontrol edildi. Hücreler kültür kabının yaklaşık % 70'ini kapladıklarında, içindeki 7 ml'lik besiyeri alındı. Tripsinizasyon işlemi için % 0,25 tripsin ve 1 mM EDTA içeren 1,5 ml Tripsin-EDTA çözeltisinden kültür kabının içine boşaltıldı. Beş dakika 37°C'lik inkübatörde hücrelerin yapıştıkları kültür kabı yüzeyinden kalkmaları beklendi. Hafif pipetaj yapılarak hücrelerin birbirinden iyice ayrılması sağlandı. Doku kültür kabının içine 7 ml FCS eklenerek Tripsin-EDTA'nın aktivitesi inhibe edildi. Toplanan hücre süspansiyonu 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak, pellet 7 ml DMEM ile homojenize edilip kültür kabına hücre ekimi yapıldı. Devam eden günlerde, üç günde bir besiyeri değiştirildi. Hücreler kültür kabı yüzeyinin en az % 70'lik kısmını kapladığında insan periodontal ligament fibroblastı primer hücre kültürü kullanıma hazır hale gelmiş oldu (Şekil 3.5).

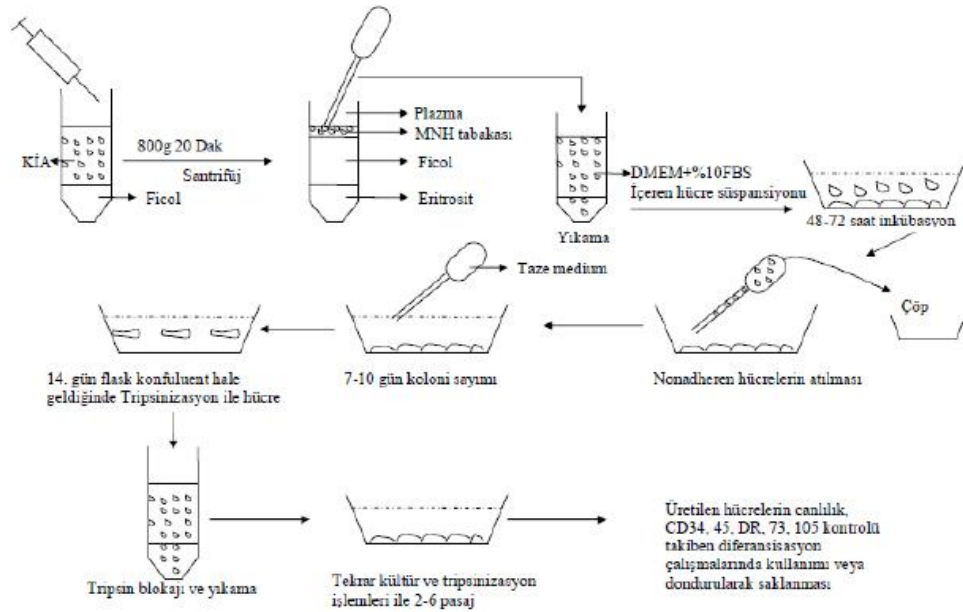


Şekil 3.5. İnsan periodontal ligament fibroblastı primer hücre kültürü.

3.1.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

MKH'leri izole etmek amacıyla sağlıklı insandan alınan kemik iliği ACD'li tüp içerisinde laboratuvar ortamına getirilerek 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde 1/2 oranında fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS-Phosphate Buffered Saline) ile seyreltildi. Başka bir 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisine seyreltilmiş kemik iliğinin 1/3 oranında ficoll-histopaque solüsyonu konuldu. Seyreltilen kemik iliği solüsyonu ficoll solüsyonu üzerine damla damla ilave edilerek tabakalandırıldı (gradient dansite yöntemi). Hazırlanan örnek oda ısısında 1800 rpm de 30 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda MKH'leri içeren kısım dikkatlice alınıp diğer bir tüpe aktarıldıktan sonra PBS ile seyreltildi ve oda ısısında 1800 rpm de 5 dk. santrifüj edilerek bir kez yıkama işlemi yapıldı. Böylelikle ficoll ve istenmeyen hücreler uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı (Şekil 3.6).

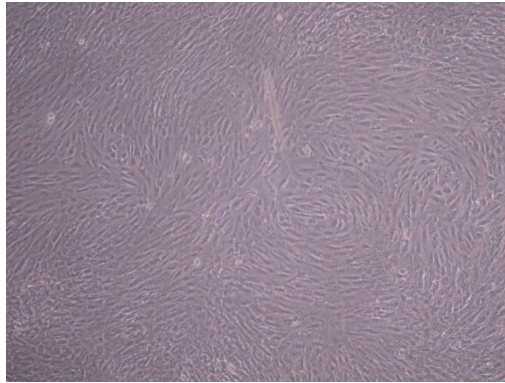
Hücrelerin yıkama işlemi tamamlandıktan sonra üstteki süpernatant atılarak elde edilen hücre pelletinin üzerine 7 ml DMEM ilave edilerek tüm içerik 25 cm²'lik kültür kabına alındı. 37°C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat boyunca kültüre edildi. İnkübasyon sonunda kültür kabındaki medya değiştirildi. Medya değiştirme işlemi 3 günde bir tekrarlandı.



Şekil 3.6. MKH'lerin üretim basamakları (74).

Genellikle 14. günde, kültür kabının % 70-80'inini kaplayan hücreler, hücre kültürünün devamı için pasajlandı. Pasajlama işleminde, tripsinizasyon için % 0,25 tripsin ve 1 mM EDTA içeren 1,5 ml tripsin-EDTA çözeltisi ile hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalkması sağlandı. Daha sonra tripsin-EDTA'nın etkisini uzaklaştırmak için bu hücrelerin üzerine 5 cc PBS eklenerek 800 rpm de 5 dk. oda ısısında santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti medya ile seyreltilip thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Daha fazla miktarda üretim yapmak için 75 cm²'lik kültür kaplarına 1x10⁶ hücre ekildi. Hücrelerin takibi inverted mikroskopunda yapıldı.

Üçüncü pasajdan sonra MKH'ler kültür kabı yüzeyinin en az % 70'lik kısmını kapladığında insan MKH primer hücre kültürü kullanıma hazır hale gelmiş oldu (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. İnsan MKH primer hücre kültürü

3.2. E vitamininin Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan E vitamini ((+)- α -Tocopherol acetate (T1157) (CAS Number 58-95-7))'nden laminar air flow kabini içinde aseptik koşullar sağlanarak 60 μ M E vitamini çözeltisi hazırlamak için mikropipet ile 40 μ l E vitamini alınarak 125 μ l etil alkolde çözüldü. Oluşan çözelti vasatla 10 ml'ye tamamlandı. Oluşan bu yeni çözeltiden 1 ml alınarak vasatla 10 ml'ye tamamlandı. Oluşan bu çözeltiden 30 μ l alınıp 2 ml'ye tamamlanınca 60 μ M

E vitamini çözeltisi hazırlanmış oldu. Elde edilen bu çözelti 0,20 µm'lik steril filtreden geçirilerek kullanıldı.

3.3. Selenyumun Hazırlanması

Laminar air flow kabini içinde aseptik koşullar sağlanarak ticari olarak satın alınmış olan selenyum ((Sodium selenite) (S5261) (CAS Number 10102-18-8))'dan çeşitli konsantrasyonlarda selenyum çözeltisi hazırlamak için toz haldeki selenyumdan 8,65 mg tartıldı. 100 ml steril distile suda çözölen bu çözeltiden 2 ml alınarak steril distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Tekrar bu çözeltiden 100 µl alınarak steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bundan sonra bu çözeltiden 500 µl alınıp 10 ml'ye tamamlanınca 5×10^{-8} M konsantrasyonda selenyum çözeltisi hazırlanmış oldu. Daha sonra her konsantrasyon için 5×10^{-8} M konsantrasyonda hazırlanan selenyumdan gerekli seyretmeler yapıldıktan sonra 10^{-8} M ve 5×10^{-9} M konsantrasyonda selenyum hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 0,20 µm'lik steril filtreden geçirilerek kullanıldı.

3.4. XTT (2,3- bis- (2- methoxy- 4-nitro- 5-sulfophenyl) -2H-tetrazolium-5-carboxanilide) Testi

E vitamini (α-tokoferol asetat) (60 µM) ve E vitamini ile birlikte çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan selenyum (Sodyum selenit) (5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M) kombinasyonlarının hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisini kıyaslamak için 24., 48. ve 72. saatlerde XTT testi yapıldı.

XTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup sarı renkli bir solüsyondur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu XTT turuncu renkli çözünebilir formazana dönüşür. Dehidrogenaz enzimleri canlı hücrelerin mitokondrilerinde mevcut olup ölü hücreler bu değişimi gerçekleştiremezler. Formazan konsantrasyonu canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Meydana gelen renk reaksiyonu 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunur ve absorbans değeri belirlenir.

Bu amaçla hücreler sayıları 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde seyreltildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına (Şekil 3.8) her kuyucukta 75 µl olacak şekilde taksim edildi.



Şekil 3.8. 96 kuyucuklu hücre kültür plağı

Hücreler % 5 CO₂ basıncı altında, 37 °C'lik inkübatörde bir gece bekletildi. Her bir hücre grubu için 24., 48. ve 72. saatlerde olmak üzere dokuz ayrı plak kullanıldı. Her plak aynı olmak üzere 96 kuyucuklu plakların dikey olarak;

1. sırasına boş vasat,
2. sırasına ilaçsız kontrol (K),
3. sırasına 60 µM E vitamini (E),
4. sırasına 60 µM E vitamini + 5×10^{-8} M selenyum (ES1),
5. sırasına 60 µM E vitamini + 10^{-8} M selenyum (ES2),
6. sırasına 60 µM E vitamini + 5×10^{-9} M selenyum (ES3),

olacak şekilde 25 µl ilaç süspansiyonları eklendi.

Kullanımdan önce XTT kiti (Cat. No:20-300-1000) -20 °C derin dondurucudan alınarak homojen bir şekilde çözünmesi sağlandı. XTT; 5 ml XTT solüsyonuna 0,1 ml aktivasyon solüsyonu ilave edilerek hazırlandı. İnkübasyon sonrası, her bir kuyucuğa 50 µl XTT solüsyonu dağıtıldı. Karanlık ortamda 37 °C'de %5'lik CO₂'li etüvde 4 saat inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. İşlem sonunda plate hafifçe çalkalandı ve bu gözlerdeki renk yoğunluğu optik okuyucuda (Şekil 3.9) 450 nm dalga boyunda belirlendi.



Şekil 3.9. Optik Okuyucu

Çıkan sonuçlara göre kontrol gözünün ve her konsantrasyondaki gözün ortalaması alındı medianın etkisini ortadan kaldırmak için boş vasat ortalaması bu değerlerden çıkarıldı. Sonra ilaçsız kontrol gözündeki hücrelerin hepsi yaşamış kabul edilerek orantı kurulup 100 ile çarpılarak yüzde cinsinden hücrelerin ilgili molar konsantrasyon ilaçla muamelesi sonucu yaşam yüzdeleri elde edildi. Bütün ilaç konsantrasyonlarında 24., 48. ve 72. saatler için bu işlemler yapıldı.

Değerlendirmenin yapılacağı 24., 48. ve 72. saatlerde plate içerisinden aspire edilen süpernatantlar toplanarak ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) kitlerinde değerlendirmek üzere -80 °C' de saklandı.

3.5. Yara Modeli

E vitamini (60 μ M) ile birlikte üç farklı konsantrasyondaki (5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M) selenyum (Sodyum selenit) kombinasyonunun yara iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi için her bir hücre tipi için dört test grubu ile E vitamini ve selenyumun bulunmadığı bir kontrol grubu oluşturuldu.

Kontrol (K),

60 μ M E vitamini (E),

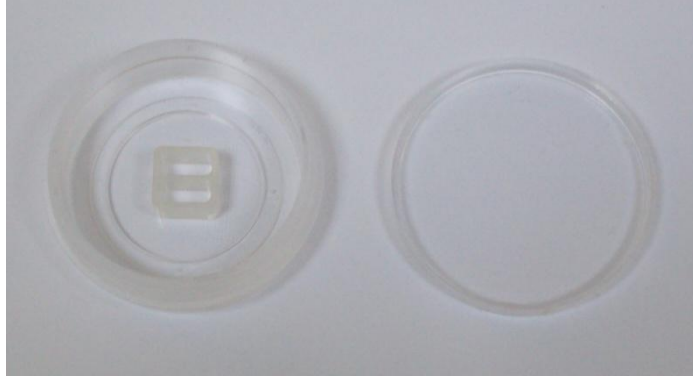
60 μ M E vitamini + 5×10^{-8} M selenyum (ES1),

60 μ M E vitamini + 10^{-8} M selenyum (ES2),

60 μ M E vitamini + 5×10^{-9} M selenyum (ES3),

Toplam 25 adet kuyucuğun her birine 1×10^4 adet hücre ekilerek ve işlem beş kez tekrar edildi.

Hücrelerin ekiminden hemen önce yara kenarlarının şeklini taklit edebilmesi amacı ile tabanında rakam ve harfler bulunan milimetrik ölçülü steril kuyucukların (Grid-500) içine 500 µm genişliğindeki steril silikon yapı (Culture insert) yerleştirildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Milimetrik ölçülü steril kuyucuk ve silikon yapı.

Hücreler, her bir kuyucukta 1×10^4 adet hücre olacak şekilde, steril silikon yapının içine ekildi. 37°C'de %5'lik CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda hücrelerin kuyucukların tabanını tamamen kapatması beklendikten sonra, daha önceden yerleştirilmiş olan silikon yapılar steril bir presel yardımı ile dikkatli bir şekilde çıkartılarak yara modeli oluşturulmuş oldu. Her bir kuyucuk yıkandıktan sonra yara modelinin görüntüsü mikroskop altında çekildi.

Fotoğraf çekiminden sonra E vitamini ve E vitamini ile birlikte çeşitli konsantrasyonlardaki selenyum kombinasyonları hücre ortamına eklendi. Her 24 saatte bir hücre ortamına yeni hazırlanmış E vitamini ve selenyum kombinasyonları eklenerek yara şeklinin görünümü dijital fotoğraf makinesi ile 12 saatte bir çekildi. Hücrelerin tamamı yara bölgesini kapattığında fotoğraf çekimleri tamamlandı.

Farklı zamanlarda çekilen fotoğraflarda, yara kenarları arasında kalan boş alan java tabanlı analiz programı (Image J for Windows) yardımı ile beş farklı kuyucuktaki ayrı ayrı yara alanını kapatma miktarı hesaplandı. Çıkan sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilerek yara iyileşmesinin aynı dönemlerinde E vitamini ve E vitamini ile birlikte çeşitli konsantrasyonlardaki selenyum kombinasyonlarının iyileşme üzerine etkisi değerlendirildi.

3.6. Image J Programı

Image J dijital bir fotoğraf üzerinde bir referans uzunluk verilerek aynı fotoğraf üzerinde kullanıcı tarafından işaretlenen doğrusal ölçümleri ve alan hesaplarını hatasız yapabilen java tabanlı bir bilgisayar programıdır. Fotoğrafta görülen her bir karenin kenarı 500 µm olduğundan herhangi bir karenin herhangi bir kenarı referans olarak kullanıldı. Buradan yola çıkılarak başlangıçtaki yara alanı fotoğraf alanı çizilerek işaretlendi ve başlangıç yara alanı hesaplanarak kaydedildi. Takip süresince ilgili saatlerde fotoğraf üzerindeki açıkta kalan yara alanları tekrar işaretlenerek o değerlendirme saatindeki açık yara alanı hesaplandı. Bu elde edilen değer başlangıçtaki değerden çıkartılarak o saate kadar olan kapanma alanları hesaplandı. Buradaki verilerden faydalanarak dolum yüzde değerleri de ölçüldü.

3.7. Biyokimyasal Analizler

3.7.1. Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (b-FGF)

Hücre kültürü gingival fibroblast, mezenkimal kök hücre ve periodontal ligament hücreleri yara modeli deneyleri esnasında elde edilen supernatant örnekleri bazik fibroblast büyüme faktörü düzeyleri ELISA (Human bFGF ELISA Kit, Kat no: ELH-bFGF-001) metodu ile ölçüldü. Örnekler analizin yapılacağı tarihe kadar -80°C'de dondurulmuş ve çalışma gününe kadar saklandı. Çalışmanın bir gün öncesinde örnekler +4°C'ye alındı ve yavaş olarak çözüldü. Kit için minimum deteksiyon limiti <50 pg/ml iken, tekrarlanabilirliği çalışma içi CV<%10, çalışmalar arası CV<%12 idi.

Kit Prosedürü: Kit ile temin edilen standartlar (10000 pg/ml, 4000 pg/ml, 1600 pg/ml, 640 pg/ml, 256 pg/ml, 102,4 pg/ml, 0 pg/ml) duplike çalışıldı ve absorbans-konsantrasyon eğrisi bu standartların ortalaması alınarak hesaplandı. Hazırlanan örneklerden 100µl alınarak antikor emdirilmiş Elisa plate kuyucuklarına ekildi. Sonrasında oda ısısında (25°C) shakerda 300 rpm'de 2,5 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hazırlanan yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Sonrasında sırasıyla 100 µl biotin işaretli antikor eklenip oda ısısında 1 saat inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı, 100 µl Streptavidin-solüsyonu eklenip oda ısısında 45 dk

inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı, 100 µl TMB One-Step Substrate Reagent eklenip oda ısısında 30 dk inkübasyon sonrası 50 µl stop solüsyonu eklenerek çalışma sonlandırıldı. Beş dakika içerisinde Elisa reader ile 450nm'de absorbans okundu. Absorbans değerleri elde edilen absorbans-konsantrasyon eğrisindeki formüle konularak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.7.2. İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)

Hücre kültürü mezenkimal kök hücre ve periodontal ligament fibroblastı yara modeli deneyleri esnasında elde edilen supernatant örnekleri insulin benzeri büyüme faktörü düzeyleri Elisa (Human IGF-1 ELISA Kit, Kat no: ELH-IGF-001) metodu ile ölçüldü. Örnekler analizin yapılacağı tarihe kadar -80°C'de dondurulmuş ve çalışma gününe kadar saklandı. Çalışmanın bir gün öncesinde örnekler +4°C'ye alındı ve yavaş olarak çözüldü. Kit için minimum deteksiyon limiti <0,2 ng/ml iken, tekrarlanabilirliği çalışma içi CV<%10, çalışmalar arası CV<%12 idi.

Kit Prosedürü: Kit ile temin edilen standartlar (60 ng/ml, 20 ng/ml, 6,67 ng/ml, 2,22 ng/ml, 0,74 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0 ng/ml) duplike çalışıldı ve absorbans-konsantrasyon eğrisi bu standartların ortalaması alınarak hesaplandı. Hazırlanan örneklerden 100µl alınarak antikor emdirilmiş Elisa plate kuyucuklarına ekildi. Sonrasında oda ısısında (25°C) shakerda 300 rpm'de 2,5 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hazırlanan yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Sonrasında sırasıyla 100 µl biotin işaretli antikor eklenip oda ısısında 1 saat inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı, 100 µl Streptavidin-solüsyonu eklenip oda ısısında 45 dk inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı, 100 µl TMB One-Step Substrate Reagent eklenip oda ısısında 30 dk inkübasyon sonrası 50 µl stop solüsyonu eklenerek çalışma sonlandırıldı. Beş dakika içerisinde ELISA reader ile 450nm'de absorbans okundu. Absorbans değerleri elde edilen absorbans-konsantrasyon eğrisindeki formüle konularak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.7.3. Tip 1 Kollajen

Hücre kültürü gingival fibroblast, mezenkimal kök hücre ve periodontal ligament fibroblastı yara modeli deneyleri esnasında elde edilen supernatant örnekleri tip 1 kollajen düzeyleri Elisa (Human Collagen Type I (Col I) ELISA Kit, Kat no: CSB-E08082h) metodu ile ölçüldü. Örnekler analizin yapılacağı tarihe kadar -80°C'de donduruldu ve çalışma gününe kadar saklandı. Çalışmanın bir gün öncesinde örnekler +4°C'ye alındı ve yavaş olarak çözüldü. Kit için deteksiyon aralığı 1,57 ng/ml - 100 ng/ml iken, tekrarlanabilirliği çalışma içi %CV<%8, çalışmalar arası %CV<%10 idi.

Kit Prosedürü: Kit ile temin edilen standartlar (100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml, 1,57 ng/ml, 0 ng/ml) duplike çalışıldı ve absorbans-konsantrasyon eğrisi bu standartların ortalaması alınarak hesaplandı. Hazırlanan örneklerden 100µl alınarak antikor emdirilmiş ELISA plate kuyucuklarına ekildi. Sonrasında 37°C'de etüvde 2 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda örnekler yıkanmadan plateden uzaklaştırılmış, plate 100 µl biotin işaretli antikor eklenip 37°C'de etüvde 1 saat inkübasyon yapıldı. Sonrasında yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. 100 µl HRP-avidin eklenip 37°C'de 1 saat inkübasyon sonrası tekrar yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı ve 90 µl TMB substratı eklenip 37°C'de 10 dakika karanlıkta inkübasyon sonrası 50 µl stop solüsyonu eklenerek çalışma sonlandırıldı. Beş dakika içerisinde Elisa reader ile 450nm'de absorbans okundu. Absorbans değerleri elde edilen absorbans-konsantrasyon eğrisindeki formüle konularak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.7.4. Osteokalsin

Hücre kültürü mezenkimal kök hücre ve periodontal ligament fibroblastı yara modeli deneyleri esnasında elde edilen supernatant örneklerinde osteokalsin düzeyleri Elisa (hOST-EASIA Kit, Kat no: KAP1381) metodu ile ölçüldü. Örnekler analizin yapılacağı tarihe kadar -80°C'de donduruldu ve çalışma gününe kadar saklandı. Çalışmanın bir gün öncesinde örnekler +4°C'ye alındı ve yavaş olarak çözüldü. Kit için minimum deteksiyon limiti 0,08 ng/ml iken, tekrarlanabilirliği çalışma içi CV %3,1-4,7 arasında, çalışmalar arası CV %3,5-5,6 arasında idi.

Kit Prosedürü: Kit ile temin edilen standartlar (75 ng/ml, 31,5 ng/ml, 12,7 ng/ml, 4,1 ng/ml, 1,56 ng/ml, 0 ng/ml) duplike çalışıldı ve absorbans-konsantrasyon eğrisi bu standartların ortalaması alınarak hesaplandı. Hazırlanan örneklerden 25 µl alınarak antikor emdirilmiş Elisa plate kuyucuklarına ekildi. Üzerine 100 µl anti-OST-HRP konjugatı eklenerek oda ısısında (25°C) shakerda 300 rpm'de 2 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hazırlanan yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Sonrasında 100 µl kromojen solüsyonu eklenerek oda ısısında 30 dakika güneş ışığından korunarak (karanlıkta) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 µl Stop solüsyonu eklenerek çalışma sonlandırıldı. Beş dakika içerisinde ELISA reader ile 450nm'de absorbans okundu. Absorbans değerleri elde edilen absorbans-konsantrasyon eğrisindeki formüle konularak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.7.5. Osteonektin

Hücre kültürü mezenkimal kök hücre ve periodontal ligament fibroblastı yara modeli deneyleri esnasında elde edilen supernatant örneklerinde Osteonektin düzeyleri Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Osteonectin (ON), Kat no: E90791Hu) metodu ile ölçüldü. Örnekler analizin yapılacağı tarihe kadar -80°C'de donduruldu ve çalışma gününe kadar saklandı. Çalışmanın bir gün öncesinde örnekler +4°C'ye alınmış ve yavaş olarak çözüldü. Kit için minimum deteksiyon limiti <0,137 ng/ml iken, tekrarlanabilirliği çalışma içi CV<%10, çalışmalar arası CV<%12 idi.

Kit Prosedürü: Kit ile temin edilen standartlar (20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,312 ng/ml, 0 ng/ml) duplike çalışıldı ve absorbans-konsantrasyon eğrisi bu standartların ortalaması alınarak hesaplandı. Örnekler 1/50 oranında PBS (pH:7,4) ile dilüe edilerek eppendorf tüplerinde hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu örneklerden 100µl alınarak antikor emdirilmiş Elisa plate kuyucuklarına ekildi. Sonrasında 37°C'de etüvde 2 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda örnekler plateden uzaklaştırıldı ancak yıkanmadı. 100 µl Detection Reagent A eklenip 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Sonrasında yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. 100 µl

Detection Reagent B eklenmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası yıkama işlemi tekrarlandı. Yıkama sonrasında 90 µl substrat solüsyonu eklenerek 10 dakika 37°C'de inkübe edildi ve bu sürenin sonunda 50 µl stop solüsyonu eklenerek çalışma sonlandırıldı. Beş dakika içerisinde Elisa reader ile 450nm'de absorbands okundu. Absorbans değerleri elde edilen absorbands-konsantrasyon eğrisindeki formüle konularak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 15 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortanca (minimum-maksimum) olarak gösterildi. Gruplar arası farkın önemliliği testinin değerlendirilmesi One-Way ANOVA testi ile yapılırken grup içi karşılaştırmalar da t testi ile yapıldı. Sonuçların anlamlı kabul edilmesi için $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

4.1. XTT Bulguları

4.1.1. Gingival Fibroblastlara ait XTT Bulguları

Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan XTT testinde elde edilen sonuçlara göre grup içi karşılaştırmaları yapıldığında 48. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla $p=0,021$, $p=0,019$, $p=0,007$, $p=0,002$, $p=0,004$) (Tablo 4.1.1).

XTT testinin 72. saat değerleri de tüm gruplarda 24. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla $p=0,044$, $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,004$) (Tablo 4.1.1).

XTT testinin 72. saat değerleri K, E, ES1, ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak ES2 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla $p=0,014$, $p=0,012$, $p=0,005$, $p=0,096$, $p=0,001$) (Tablo 4.1.1).

Hücre proliferasyonunda zamana bağlı artış olmasına rağmen aynı zaman dilimlerinde gruplar arasında benzer proliferasyon görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.1.1).

Tablo 4.1.1. Gingival Fibroblast Hücrelerinde 24., 48. ve 72. Saatlerde XTT Değerlerinin Grup İçi ve Gruplar Arası Dağılımı.

	Gingival Fibroblast (XTT)		
	Ortanca (Min-Maks)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	0,16 (0,13-0,17) ϕ, ω	0,44 (0,37-0,48) ω	0,69 (0,65-0,76)
E	0,15 (0,14-0,22) ϕ, ω	0,48 (0,28-0,73) ω	0,77 (0,72-0,83)
ES1	0,17 (0,12-0,34) ϕ, ω	0,51 (0,49-0,52) ω	0,77 (0,70-0,90)
ES2	0,16 (0,15-0,19) ϕ, ω	0,66 (0,52-0,70)	0,72 (0,68-0,80)
ES3	0,17 (0,12-0,37) ϕ, ω	0,48 (0,38-0,56) ω	0,79 (0,74-0,86)

Grup içi: ϕ : 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0,05$), ω : 72. saat ile istatistiksel fark ($p<0,05$), Min: Minimum, Maks: Maksimum.

4.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelere ait XTT Bulguları

Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan XTT testinde elde edilen sonuçlara göre grup içi karşılaştırmaları yapıldığında sadece ES1 grubunda 72. saat değeri 48 saat değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,026$). Bunun dışında diğer grupların grup içi karşılaştırmasında tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). XTT değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.1.2).

Tablo 4.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde 24., 48. ve 72. Saatlerde XTT Değerlerinin Grup İçi ve Gruplar Arası Dağılımı.

	Mezenkimal Kök Hücre (XTT)		
	Ortanca (Min-Maks)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	0,187 (0,053-0,234)	0,013 (0,057-0,231)	0,298 (0,054-0,337)
E	0,066 (0,053-0,200)	0,057 (0,057-0,206)	0,025 (0,054-0,291)
ES1	0,252 (0,053-0,544)	0,237 (0,203-0,326) ^ω	0,386 (0,249-0,594)
ES2	0,076 (0,053-0,354)	0,233 (0,057-0,266)	0,054 (0,054-0,383)
ES3	0,242 (0,053-0,311)	0,084 (0,057-0,245)	0,054 (0,054-0,334)

Grup içi: ω : 72. saat ile istatistiksel fark ($p<0,05$), Min: Minimum, Maks: Maksimum.

4.1.3. Periodontal Ligament Fibroblastlarına ait XTT Bulguları

Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan XTT testinde elde edilen sonuçlara göre grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden E ve ES2 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, K, ES1 ve ES3 gruplarında istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla $p=0,082$, $p=0,010$, $p=0,118$, $p=0,004$, $p=0,242$) (Tablo 4.1.3).

XTT testinin 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden E, ES2 ve ES3 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, K ve ES1 gruplarında istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. (K, E, ES1, ES2, ES3

grupları için sırasıyla $p=0,067$, $p=0,000$, $p=0,236$, $p=0,000$, $p=0,021$) (Tablo 4.1.3).

XTT testinin 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden K, E ve ES2 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, ES1 ve ES3 gruplarında istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla $p=0,010$, $p=0,029$, $p=0,223$, $p=0,026$, $p=0,062$) (Tablo 4.1.3).

XTT testinin 24., 48. ve 72. saatlerinde hücre proliferasyonunda zamana bağlı artış olmasına rağmen aynı zaman dilimlerinde benzer proliferasyon oranları görülmüş ve istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede farklılık sadece 72. saatte bulunmuştur. Bu farklılık incelendiğinde; ES2 grubunun K ve ES3 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (K ve ES3 grupları için sırasıyla $p=0,014$, $p=0,013$) (Tablo 4.1.3).

Tablo 4.1.3. Periodontal Ligament Fibroblastlarında 24., 48. ve 72. Saatlerde XTT Değerlerinin Grup İçi ve Gruplar Arası Dağılımı.

	Periodontal Ligament Fibroblastı (XTT)		
	Ortanca (Min-Maks)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	0,16 (0,13-0,17)	0,44 (0,37-0,48) ^ω	0,69 (0,65-0,76)
E	0,15 (0,14-0,22) ^{φ,ω}	0,48 (0,28-0,73) ^ω	0,77 (0,72-0,83)
ES1	0,16 (0,15-0,19)	0,66 (0,52-0,70)	0,72 (0,68-0,80)
ES2	0,17 (0,12-0,37) ^{φ,ω}	0,48 (0,38-0,56) ^ω	0,79 (0,74-0,86) ^{α,ε}
ES3	0,20 (0,20-0,26) ^ω	0,40 (0,37-0,44)	0,55 (0,54-0,61)

Grup içi: φ: 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), ω: 72. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$),

Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), ε: ES3 grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$)

Min: Minimum, Maks: Maksimum.

4.2. Yara modeli Bulguları

4.2.1. Gingival Fibroblastlara ait Yara modeli Bulguları

Gingival fibroblast hücreleri ile oluşturulan primer hücre kültürü yara modelinin 0.,12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde fotoğrafları çekilerek, inverted mikroskop altında yara modelinin görüntüsü alındı ve elde edilen fotoğraflar üzerinde bir bilgisayar programı (Image J) ile oluşan yara modelinin alanı belirtilen saatlerde mm² olarak hesaplandı. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Gingival fibroblast yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum miktarının ortanca (minimum-maksimum) değerleri Tablo 4.2.1'de verilmiştir. Elde edilen dolum yüzdesi değerlerinin 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde grup içi karşılaştırılması yapıldığında; tüm gruplarda 24., 36., 48. ve 72. saat değerleri 12. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (24., 36., 48. ve 72. saat için K grubunda p=0,000, E grubunda sırasıyla: p=0,040, p=0,014, p=0,000, p=0,000, ES1 grubunda sırasıyla; p=0,009, p=0,001, p=0,001, p=0,001, ES2 grubu için sırasıyla; p=0,012, p=0,006, p=0,000, p=0,000, ES3 grubu için sırasıyla p=0,008, p=0,004, p=0,000, p=0,000) (Tablo 4.2.2).

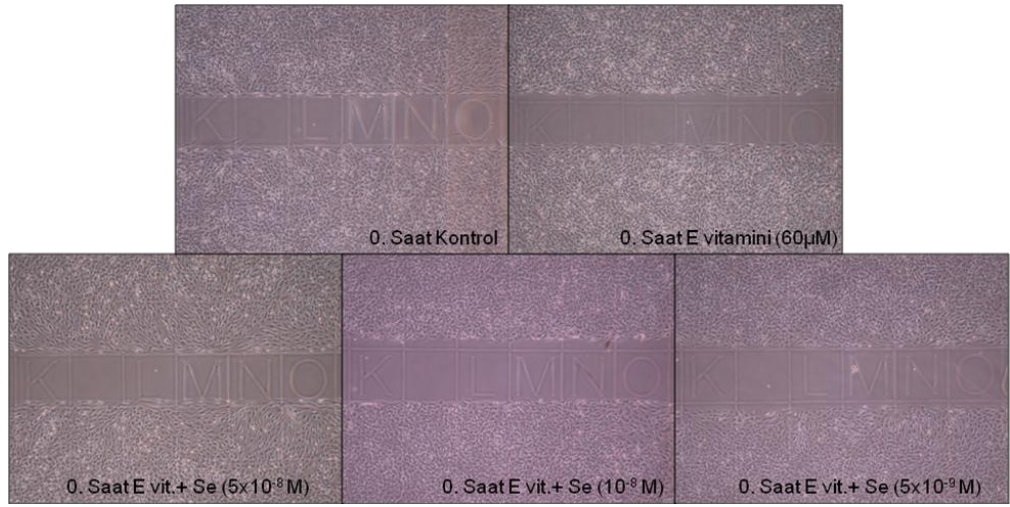
K, ES1, ES2 ve ES3 gruplarında 36., 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. E grubunda ise istatistiksel olarak fark yoktur (36., 48. ve 72. saat için K grubunda sırasıyla; p=0,002, p=0,000, p=0,000, E grubunda sırasıyla; p=0,074, p=0,172, p=172, ES1 grubunda sırasıyla; p=0,009, p=0,020, p=0,020, ES2 grubunda sırasıyla; p=0,005, p=0,023, p=0,023, ES3 grubunda sırasıyla; p=0,002, p=0,004 p=0,004) (Tablo 4.2.2)

K ve ES3 gruplarında 48. ve 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. E, ES1 ve ES2 grubunda ise istatistiksel olarak fark yoktur (48. ve 72. saat için K grubunda p=0,002, E grubunda p=0,271, ES1 grubunda p=0,152, ES2 grubunda p=0,184, ES3 grubunda p=0,030) (Tablo 4.2.2).

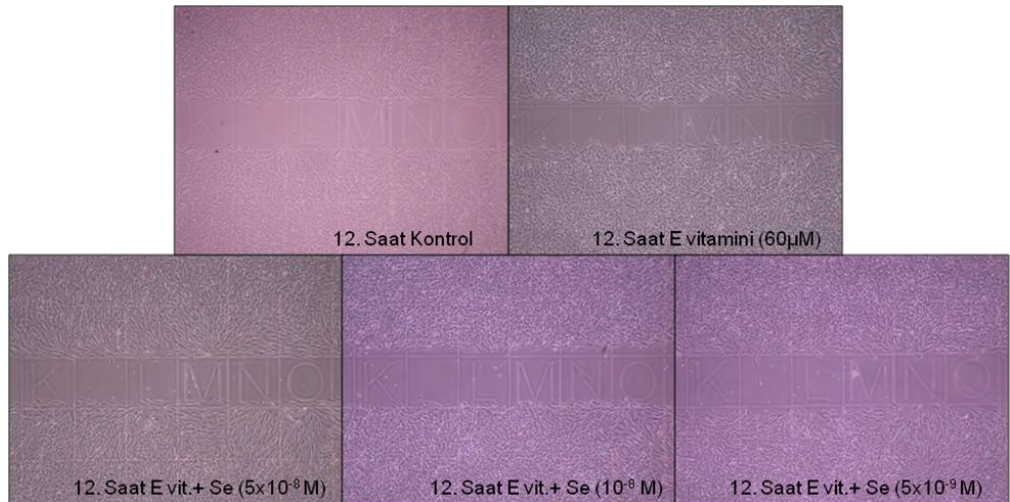
Tüm gruplarda 72. saat değerlerinde 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak fark yoktur ($p=0,423$) (Tablo 4.2.2).

Gingival fibroblast yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum yüzdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında; 12. saat dolum miktarı grubunda ES2 grubu K grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,013$) (Tablo 4.2.2).

Gingival Fibroblastlara ait Yara modeli Görüntüleri



Şekil 4.1. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 0. saat görüntüleri.



Şekil 4.2. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 12. saat görüntüleri.

Tablo 4.2.1. Gingival Fibroblast Hücresi 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verileri.

	Gingival Fibroblast					
	Ortanca (Min-Maks) (mm ²)					
		12. Saat	24. Saat	36. Saat	48. Saat	72. Saat
Dolum Miktarı	K	0,029 (0,017-0,039)	0,504 (0,497-0,505)	0,753 (0,735-0,785)	0,855 (0,841-0,856)	0,855 (0,841-0,856)
	E	0,109 (0,107-0,127)	0,673 (0,430-0,789)	0,768 (0,602-0,853)	0,853 (0,852-0,859)	0,853 (0,852-0,859)
	ES1	0,093 (0,066-0,159)	0,547 (0,447-0,602)	0,800 (0,714-0,806)	0,841 (0,835-0,848)	0,841 (0,835-0,848)
	ES2	0,144 (0,137-0,161)	0,538 (0,479-0,633)	0,714 (0,702-0,839)	0,838 (0,837-0,839)	0,838 (0,837-0,839)
	ES3	0,095 (0,085-0,106)	0,418 (0,381-0,469)	0,664 (0,593-0,705)	0,843 (0,840-0,847)	0,843 (0,840-0,847)

Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Tablo 4.2.2. Gingival Fibroblast Hücresi 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verilerinin Grup içi ve Gruplar arası dağılımı.

	Gingival Fibroblast					
	Ortanca (Min-Maks) (%)					
		12. Saat	24. Saat	36. Saat	48. Saat	72. Saat
Dolum Yüzdesi	K	3,388 (2,021-4,561)	58,995 (58,947-59,096) ^π	88,070 (87,396-91,706) ^{π,θ}	100,000 (100,000-100,000) ^{π,θ,λ}	100,000 (100,000-100,000) ^{π,θ,λ}
	E	12,689 (12,544-14,906)	78,991 (50,058-92,497) ^π	90,141 (70,081-100,000) ^π	100,000 (100,000-100,000) ^π	100,000 (100,000-100,000) ^π
	ES1	10,967 (7,848-19,042)	65,509 (53,151-70,991) ^π	94,340 (84,899-96,527) ^{π,θ}	100,000 (100,000-100,000) ^{π,θ}	100,000 (100,000-100,000) ^{π,θ}
	ES2	17,163 (16,368-19,212) ^α	64,200 (57,228-75,447) ^π	85,203 (83,871-100,000) ^{π,θ}	100,000 (100,000-100,000) ^{π,θ}	100,000 (100,000-100,000) ^{π,θ}
	ES3	11,269 (10,119-12,515)	49,351 (45,196-55,833) ^π	78,394 (70,344-83,929) ^{π,θ}	100,000 (100,000-100,000) ^{π,θ,λ}	100,000 (100,000-100,000) ^{π,θ,λ}

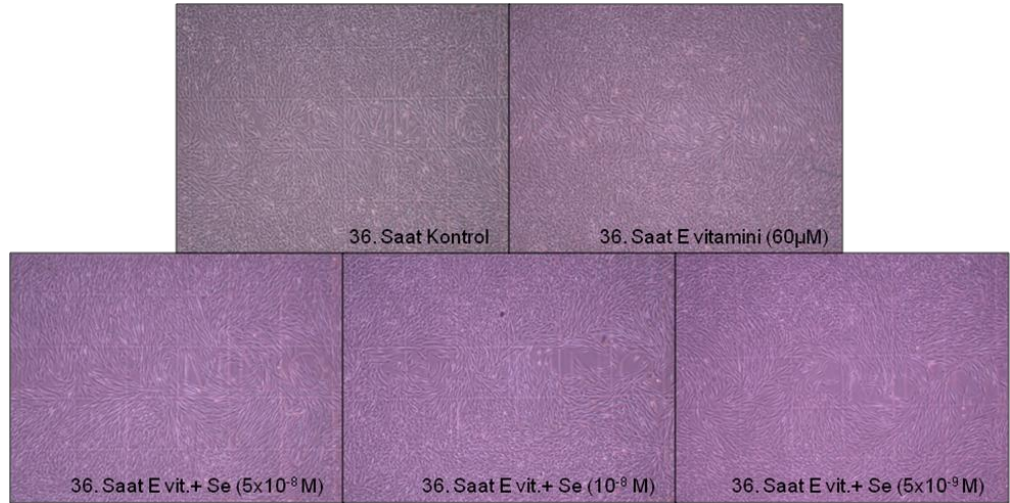
Grup içi: π: 12 saat ile istatistiksel fark (p<0.05), θ: 24. saat ile istatistiksel fark (p<0.05), λ: 36. saat ile istatistiksel fark (p<0.05),

Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark (p<0.05),

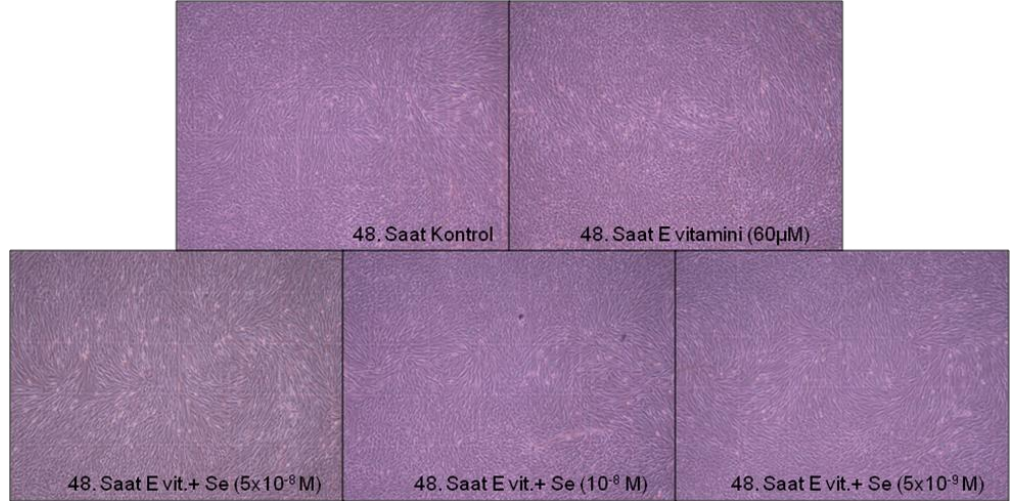
Min: Minimum, Maks: Maksimum.



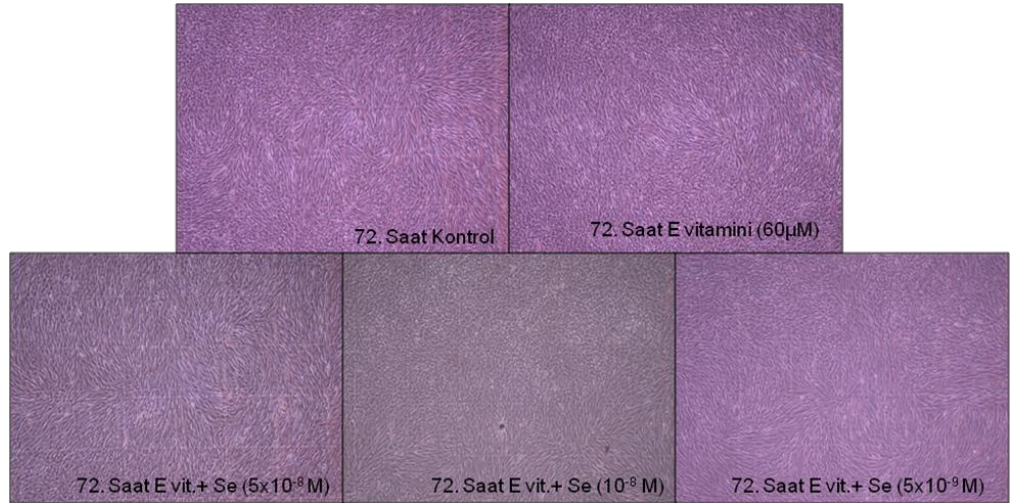
Şekil 4.3. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 24. saat görüntüleri.



Şekil 4.4. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 36. saat görüntüleri.



Şekil 4.5. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 48. saat görüntüleri.



Şekil 4.6. Gingival fibroblast yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 72. saat görüntüleri.

4.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelere ait Yara Modeli Bulguları

Mezenkimal kök hücreler ile oluşturulan primer hücre kültürü yara modelinin 0.,12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde fotoğrafları çekilerek, inverted mikroskop altında yara modelinin görüntüsü alındı ve elde edilen fotoğraflar üzerinde bir bilgisayar programı (Image J) ile oluşan yara modelinin alanı belirtilen saatlerde mm² olarak hesaplandı. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Mezenkimal kök hücre yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum miktarının ortanca (minimum-maksimum) değerleri Tablo 4.2.3'de verilmiştir. Elde edilen dolum yüzdesi değerlerinin 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde grup içi karşılaştırılması yapıldığında; K, E ve ES3 gruplarında 24., 36., 48. ve 72. saat değerleri, ES1 ve ES2 gruplarında 36., 48. ve 72. saat değerleri 12. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES1 ve ES2 gruplarının 24 saat değerleri ise 12. saate göre istatistiksel olarak farksızdır (24., 36., 48. ve 72. saat için K grubunda sırasıyla; $p=0,024$, $p=0,006$, $p=0,002$, $p=0,000$, E grubunda sırasıyla; $p=0,037$, $p=0,002$, $p=0,003$, $p=0,004$, ES1 grubunda sırasıyla; $p=0,099$, $p=0,040$, $p=0,001$, $p=0,001$, ES2 grubunda sırasıyla; $p=0,071$, $p=0,041$, $p=0,006$, $p=0,000$, ES3 grubunda sırasıyla; $p=0,004$, $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,002$) (Tablo 4.2.4).

K, E, ES1 ve ES3 gruplarında 36., 48. ve 72. saat değerleri, ES2 grubunda ise 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES2 grubunda 36. saat değeri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak farklı değildir (36., 48. ve 72. saat için K grubunda sırasıyla; $p=0,011$, $p=0,004$, $p=0,001$, E grubunda sırasıyla; $p=0,015$, $p=0,008$, $p=0,007$, ES1 grubunda sırasıyla; $p=0,020$, $p=0,048$, $p=0,047$, ES2 grubu için sırasıyla; $p=0,116$, $p=0,022$, $p=0,006$, ES3 grubu için sırasıyla; $p=0,008$, $p=0,005$, $p=0,004$) (Tablo 4.2.4).

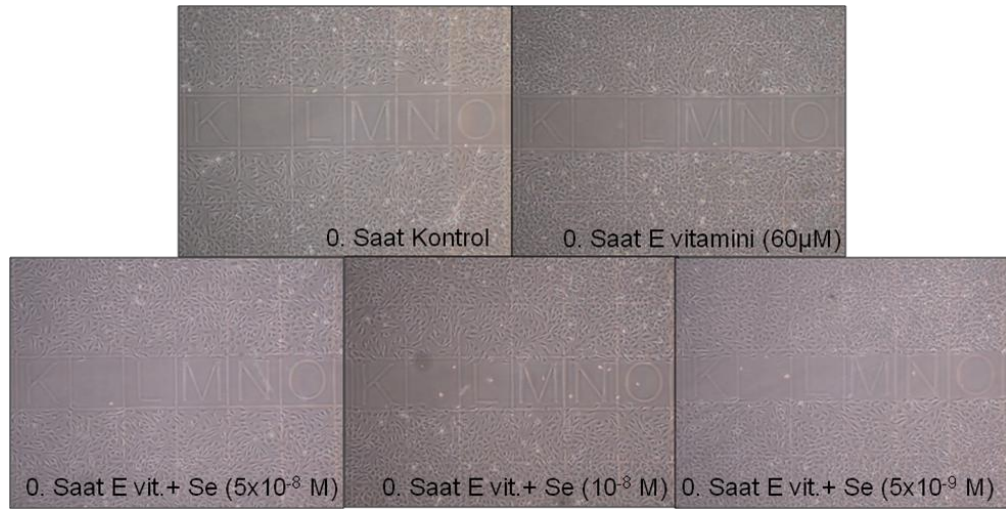
K, E, ES3 gruplarında 48. saat değerleri ve K, E, ES1 ve ES3 gruplarında 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES1 grubunda 48. saat ve ES2 grubunda ise 48. ve 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı değildir (48. ve 72. saat için K grubunda $p=0,002$, E grubunda sırasıyla; $p=0,008$, $p=0,004$, ES1 grubunda sırasıyla; $p=0,119$, $p=0,040$ ES2 grubu için sırasıyla; $p=0,103$, $p=0,085$, ES3 grubu için sırasıyla $p=0,004$, $p=0,019$) (Tablo 4.2.4).

K, E, ES1 gruplarında 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES2 ve ES3 gruplarında ise 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak

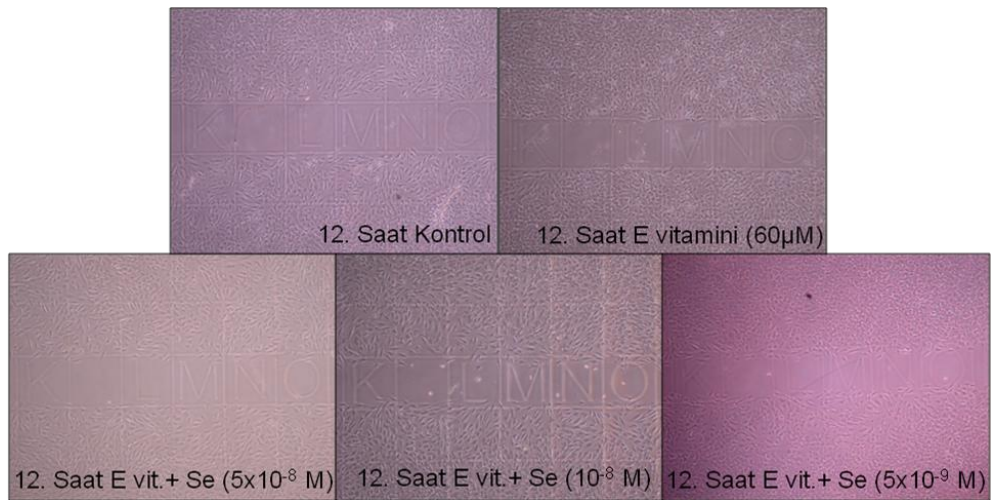
anlamalı değildir (72. saat için K grubunda $p=0,010$, E grubunda $p=0,037$, ES1 grubunda $p=0,011$, ES2 ve ES3 grubunda $p=0,423$) (Tablo 4.2.4).

Mezenkimal kök hücre yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum yüzdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında; 48. saat dolum yüzdesi grubunda ES1, ES2 ve ES3 grupları K grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Sırasıyla $p=0,040$, $p=0,044$, $p=0,037$). (Tablo 4.2.4).

Mezenkimal Kök Hücrelere ait Yara modeli Görüntüleri



Şekil 4.7. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 0. saat görüntüleri.



Şekil 4.8. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 12. saat görüntüleri

Tablo 4.2.3. Mezenkimal Kök Hücre 12., 24., 36., 48. ve 72. Saat Yara Modeli Verileri

	Mezenkimal Kök Hücre					
	Ortanca (Min-Maks) (mm ²)					
		12. Saat	24. Saat	36. Saat	48. Saat	72. Saat
Dolum Miktarı	K	0,040 (0,027-0,045)	0,174 (0,110-0,187)	0,293 (0,240-0,327)	0,546 (0,521-0,616)	0,845 (0,844-0,848)
	E	0,139 (0,119-0,142)	0,288 (0,282-0,389)	0,472 (0,468-0,503)	0,739 (0,736-0,807)	0,885 (0,815-0,889)
	ES1	0,137 (0,131-0,143)	0,372 (0,326-0,417)	0,512 (0,460-0,563)	0,742 (0,731-0,752)	0,831 (0,821-0,841)
	ES2	0,115 (0,106-0,146)	0,298 (0,234-0,386)	0,397 (0,365-0,715)	0,832 (0,643-0,846)	0,832 (0,803-0,846)
	ES3	0,125 (0,067-0,179)	0,406 (0,320-0,413)	0,568 (0,441-0,578)	0,830 (0,657-0,846)	0,832 (0,830-0,846)

Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Tablo 4.2.4. Mezenkimal Kök Hücre 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verilerinin Grup içi ve Gruplar arası dağılımı.

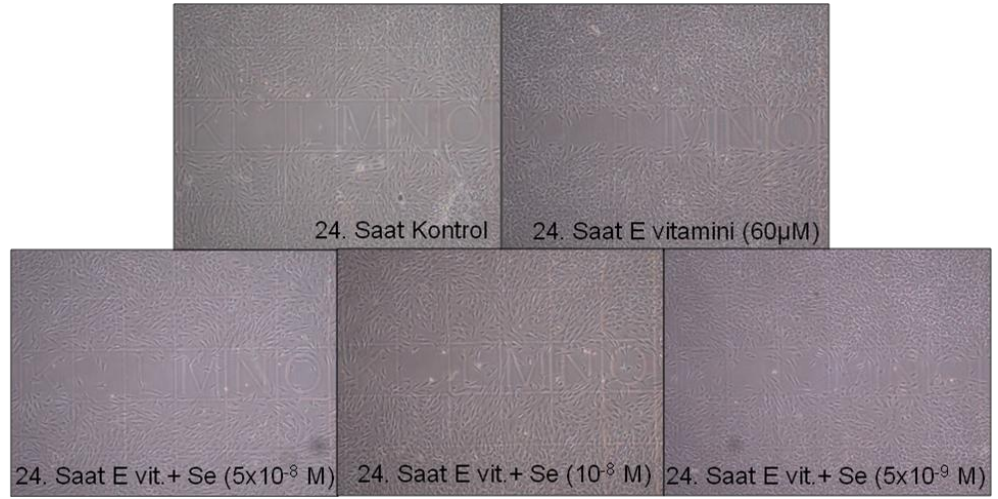
	Mezenkimal Kök Hücre					
	Ortanca (Min-Maks) (%)					
		12. Saat	24. Saat	36. Saat	48. Saat	72. Saat
Dolum Yüzdesi	K	4,717 (3,195-5,332)	20,616 (13,018-22,052) ^π	34,552 (28,402-38,744) ^{π,θ}	64,39 (61,66-72,99) ^{π,θ,λ}	100,00 (100,00-100,00) ^{π,θ,λ,φ}
	E	15,706 (13,386-17,423)	32,396 (31,864-47,730) ^π	53,333 (52,643-61,718) ^{π,θ}	90,31 (83,50-90,78) ^{π,θ,λ}	100,00 (100,00-100,00) ^{π,θ,λ,φ}
	ES1	16,480 (15,956-17,004)	44,646 (39,708-49,584)	61,487 (56,029-66,944) ^{π,θ}	89,23 (89,04-89,42) ^{π,θ,α}	100,00 (100,00-100,00) ^{π,θ,λ,φ}
	ES2	13,593 (13,200-17,548)	37,111 (28,125-45,626)	49,440 (43,870-84,515) ^π	100,00 (80,07-100,00) ^{π,θ,α}	100,00 (100,00-100,00) ^{π,θ}
	ES3	14,775 (8,053-21,566)	48,818 (38,462-48,916) ^π	68,322 (53,005-68,434) ^{π,θ}	100,00 (78,97-100,00) ^{π,θ,λ,α}	100,00 (100,00-100,00) ^{π,θ,λ}

Grup içi: π: 12. saat ile istatistiksel fark (p<0.05), θ: 24. saat ile istatistiksel fark (p<0.05), λ: 36. saat ile istatistiksel fark (p<0.05),

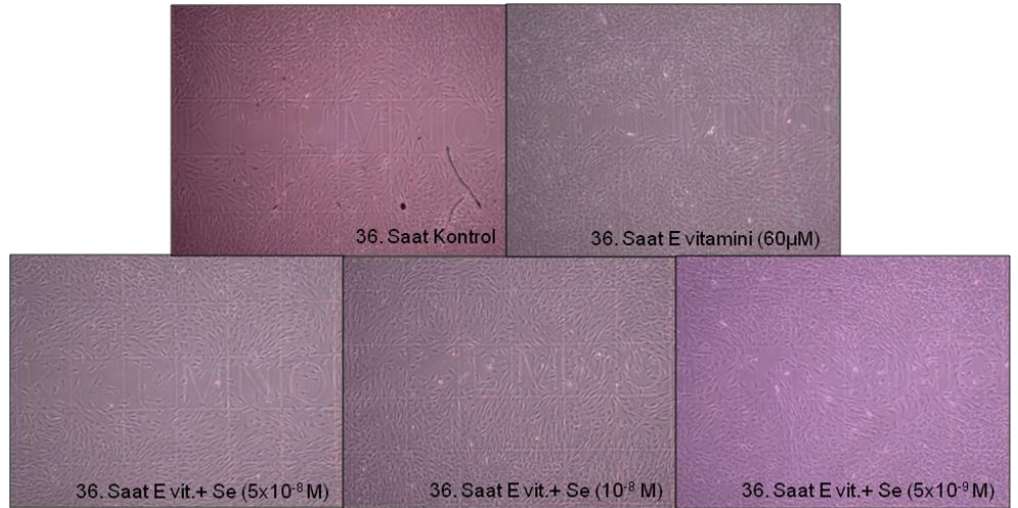
φ: 48. saat ile istatistiksel fark (p<0.05),

Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark (p<0.05)

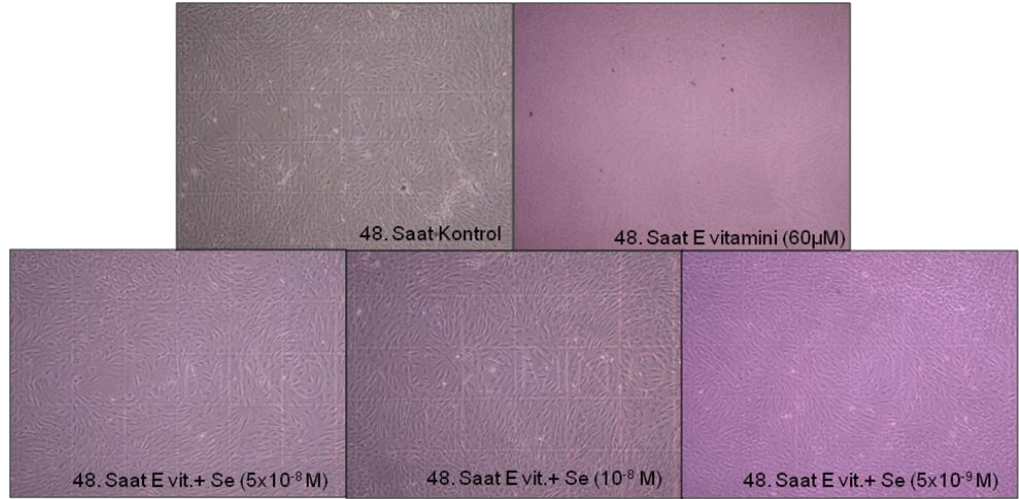
Min: Minimum, Maks: Maksimum



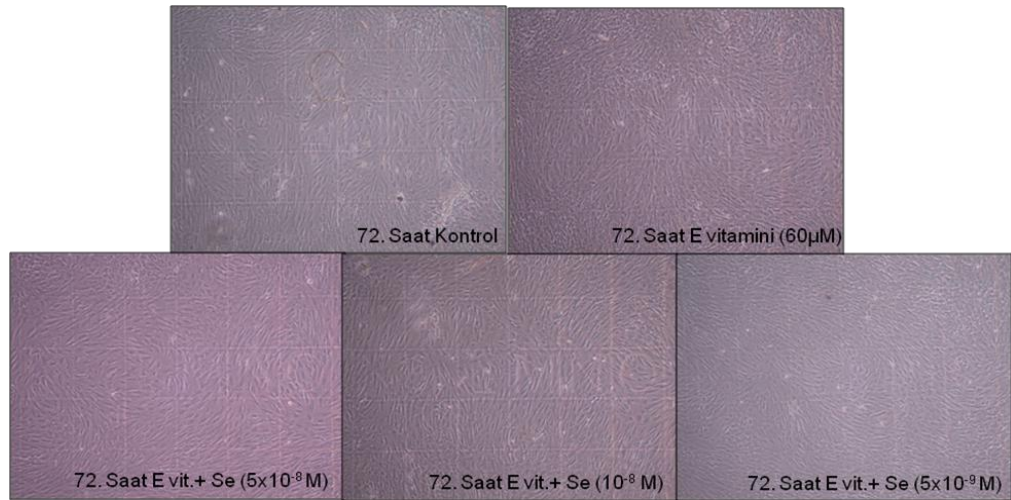
Şekil 4.9. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 24. saat görüntüleri.



Şekil 4.10. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 36. saat görüntüleri.



Şekil 4.11. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 48. saat görüntüleri.



Şekil 4.12. Mezenkimal kök hücre yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 72. saat görüntüleri.

4.2.3. Periodontal Ligament Fibroblastlarına Ait Yara Modeli Bulguları

Periodontal ligament fibroblastları ile oluşturulan primer hücre kültürü yara modelinin 0.,12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde fotoğrafları çekilerek, inverted mikroskop altında yara modelinin görüntüsü alındı ve elde edilen fotoğraflar üzerinde bir bilgisayar programı (Image J) ile oluşan yara

modelinin alanı belirtilen saatlerde mm² olarak hesaplandı. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Periodontal ligament fibroblastı yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum miktarının ortanca (minimum-maksimum) değerleri Tablo 4.2.5’de verilmiştir. Elde edilen dolum yüzdesi değerlerinin 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde grup içi karşılaştırılması yapıldığında; E, ES1 ve ES3 gruplarında 24., 36., 48. ve 72. saat değerleri, K ve ES2 grubunun 36., 48. ve 72. saat değerleri, 12. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. K ve ES2 grubunun 24. saat değerleri 12. saat değerlerine göre istatistiksel olarak farksızdır (24., 36., 48. ve 72. saat için K grubunda sırasıyla; p=0,59 p=0,041, p=0,013, p=0,000, E grubunda sırasıyla; p=0,048, p=0,025, p=0,007, p=0,000, ES1 grubunda sırasıyla; p=0,006, p=0,08 p=0,002, p=0,002, ES2 grubu için sırasıyla; p=0,204, p=0,014, p=0,037, p=0,043, ES3 grubu için sırasıyla; p=0,033, p=0,008, p=0,007, p=0,000) (Tablo 4.2.6).

K, E, ES1 ve ES3 gruplarında 36., 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES2 grubunda 36., 48. ve 72. saat değeri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak farklı değildir (36., 48. ve 72. saat için K grubunda sırasıyla; p=0,049, p=0,007, p=0,001, E grubunda sırasıyla; p=0,010, p=0,001, p=0,006, ES1 grubunda sırasıyla; p=0,017, p=0,005, p=0,003, ES2 grubu için sırasıyla; p=0,143, p=0,234, p=0,102, ES3 grubu için sırasıyla; p=0,009, p=0,009, p=0,004) (Tablo 4.2.6).

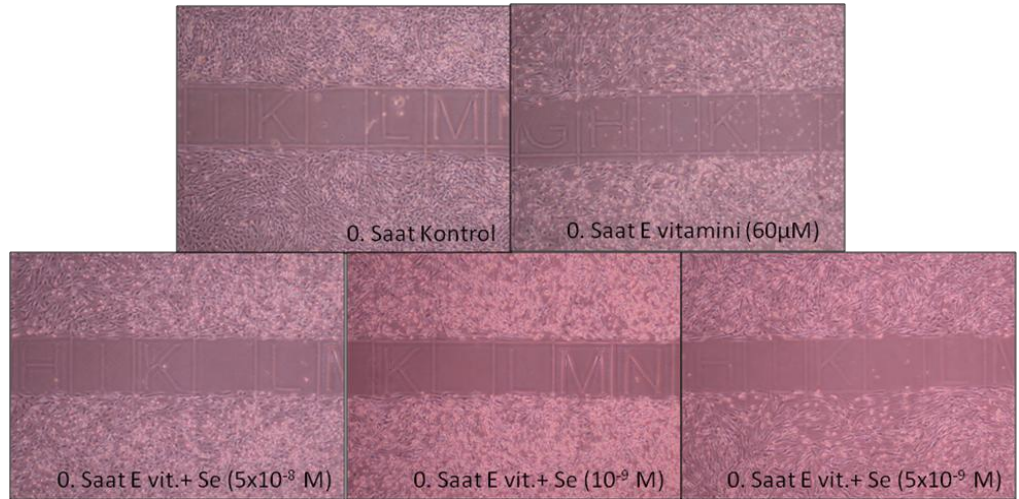
K, E, ES1 ve ES3 gruplarında 48. ve 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES2 grubunda ise 48. ve 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı değildir (48. ve 72. saat için K grubunda sırasıyla; p=0,004, p=0,019, E grubunda sırasıyla; p=0,000, p=0,021, ES1 grubunda sırasıyla; p=0,010, p=0,015, ES2 grubunda sırasıyla; p=0,324, p=0,082, ES3 grubunda sırasıyla; p=0,017, p=0,004) (Tablo 4.2.6).

K ve ES1 gruplarında 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. E, ES2 ve ES3

grubunda ise 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı değildir (72. saat için K grubunda $p=0,034$, E grubunda $p=0,108$, ES1 grubunda $p=0,017$, ES2 grubunda $p=0,134$, ES3 grubunda, $p=0,351$ (Tablo 4.2.6).

Periodontal ligament fibroblastı yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum yüzdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında; ES1, ES2 ve ES3 gruplarında 12. saat dolum yüzdesi K grubundan (Sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,000$ ve $p=0,004$), ES1 ve ES2 gruplarında 48. saat dolum yüzdesi ES3 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,019$, $p=0,011$) (Tablo 4.2.6).

Periodontal Ligament Fibroblastlarına ait Yara modeli Görüntüleri



Şekil 4.13. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 0. saat görüntüleri.

Tablo 4.2.5. Periodontal Ligament fibroblastı 12., 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verileri

	Periodontal Ligament Fibroblastı					
	Ortanca (Min-Maks) (mm ²)					
		12. Saat	24. Saat	36. Saat	48. Saat	72. Saat
Dolum Miktarı	K	0,016 (0,015-0,024)	0,127 (0,057-0,128)	0,355 (0,174-0,408)	0,556 (0,398-0,590)	0,819 (0,812-0,824)
	E	0,043 (0,042-0,062)	0,178 (0,178-0,321)	0,345 (0,319-0,524)	0,606 (0,579-0,779)	0,815 (0,811-0,827)
	ES1	0,058 (0,043-0,073)	0,171 (0,151-0,191)	0,369 (0,339-0,398)	0,552 (0,417-0,686)	0,775 (0,683-0,867)
	ES2	0,086 (0,084-0,119)	0,151 (0,147-0,154)	0,430 (0,385-0,464)	0,789 (0,648-0,851)	0,840 (0,814-0,851)
	ES3	0,034 (0,034-0,074)	0,146 (0,104-0,186)	0,370 (0,212-0,431)	0,589 (0,504-0,652)	0,830 (0,817-0,838)

Tablo 4.2.6. Periodontal Ligament fibroblastı 12. 24., 36., 48. ve 72. saat Yara Modeli Verilerinin Grup içi ve Gruplar arası dağılımı.

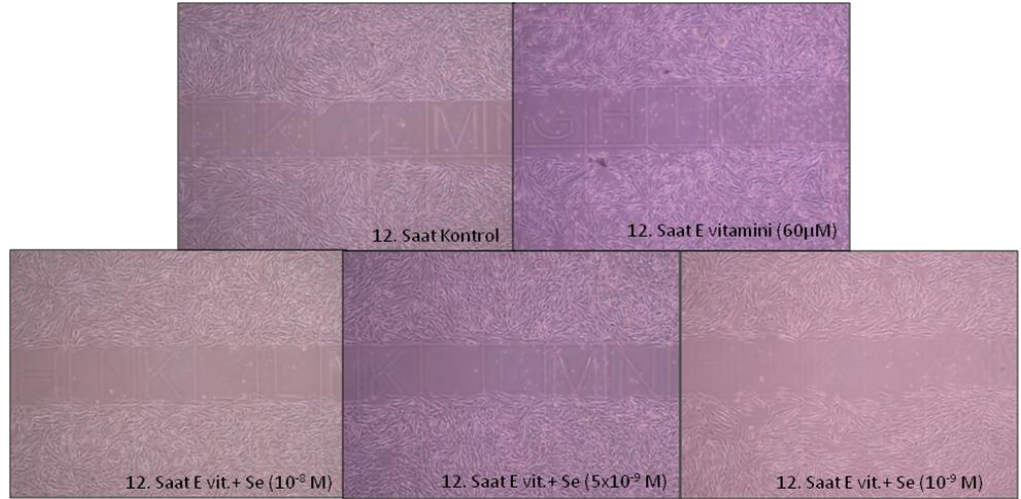
	Periodontal Ligament Fibroblastı					
	Ortanca (Min-Maks) (%)					
		12. Saat	24. Saat	36. Saat	48. Saat	72. Saat
Dolum Yüzdesi	K	1,954 (1,847-2,913)	15,507 (7,020-15,534)	43,083 (21,429-49,817) ^{π,θ}	67,48 (49,01-72,04) ^{π,θ,λ}	100,00 (100,00-100,00) ^{π,θ,λ,φ}
	E	5,302 (5,153-7,497)	21,948 (21,840-38,815) ^π	42,540 (39,14163,362) ^{π,θ}	74,72 (71,04-94,20) ^{π,θ,λ}	100,00 (100,00-100,00) ^{π,θ,λ}
	ES1	6,813 (5,206-8,420) ^α	20,270 (17,416-23,123) ^π	43,473 (41,041-45,905) ^{π,θ}	64,80 (50,48-79,12) ^{π,θ,λ,ε}	91,34 (82,69-100,00) ^{π,θ,λ,φ}
	ES2	10,319 (10,238-13,984) ^α	18,059 (17,976-18,096)	50,529 (45,833-57,002) ^π	96,93 (77,14-100,00) ^{π,ε}	100,00 (100,00-100,00) ^π
	ES3	4,096 (4,038-8,768) ^α	17,590 (12,352-22,038) ^π	44,578 (25,178-51,066) ^{π,θ}	70,96 (59,86-77,25) ^{π,θ,λ}	99,29 (97,03-100,00) ^{π,θ,λ}

Grup içi: π: 12 saat ile istatistiksel fark (p<0.05), θ: 24. saat ile istatistiksel fark (p<0.05), λ: 36. saat ile istatistiksel fark (p<0.05),

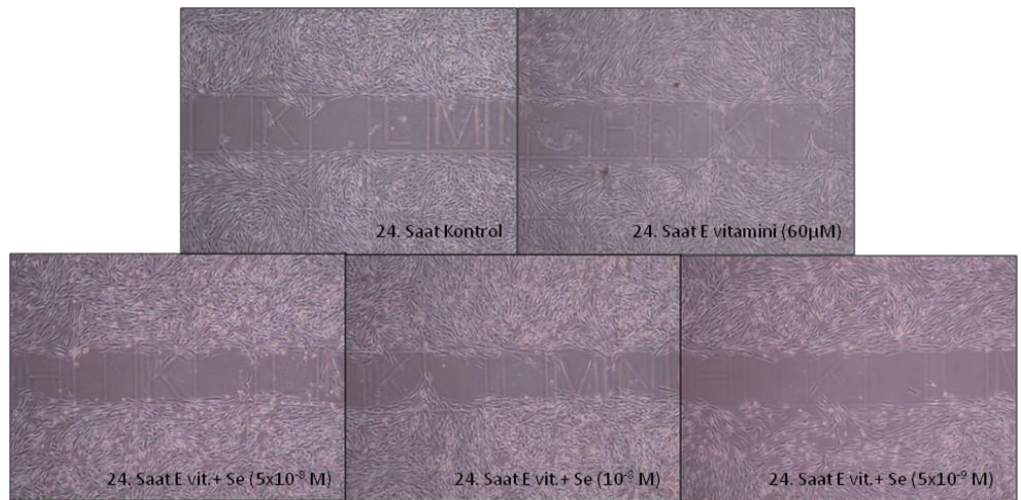
φ: 48. saat ile istatistiksel fark (p<0.05),

Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark (p<0.05), ε: ES3 grubu ile istatistiksel fark (p<0.05),

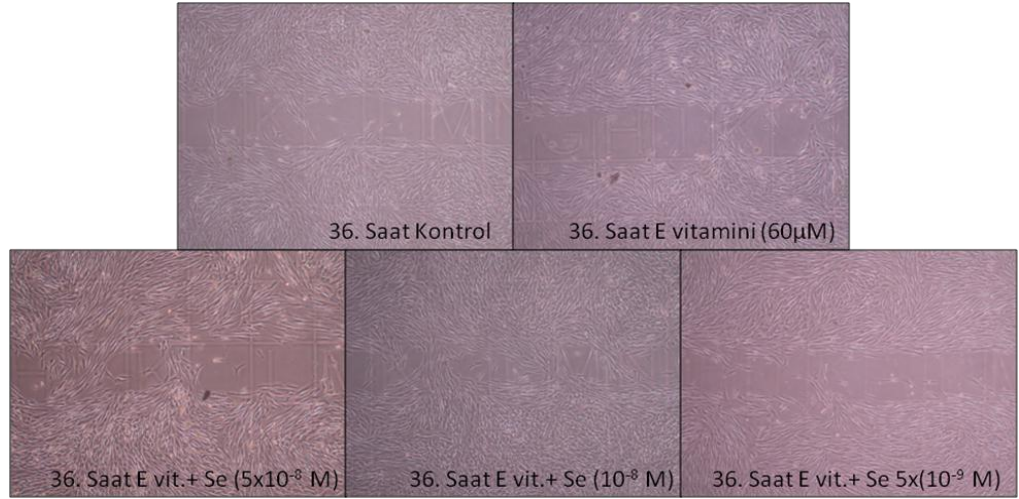
Min: Minimum, Maks: Maksimum.



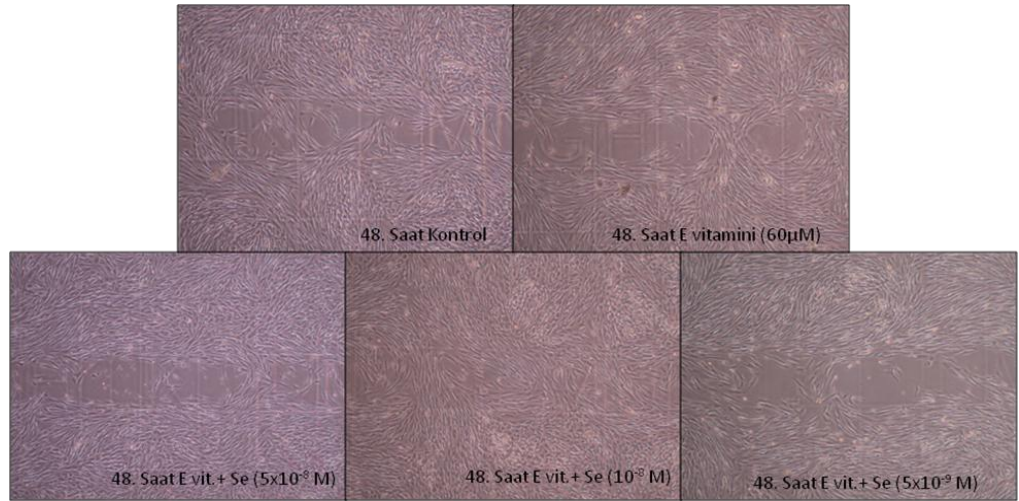
Şekil 4.14. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 12. saat görüntüleri.



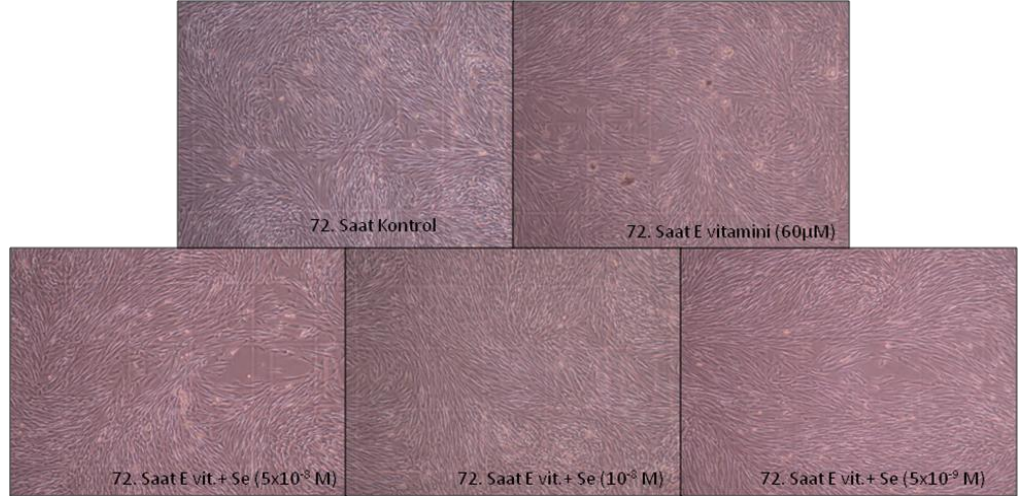
Şekil 4.15. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 24. saat görüntüleri.



Şekil 4.16. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 36. saat görüntüleri.



Şekil 4.17. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 48. saat görüntüleri.



Şekil 4.18. Periodontal ligament fibroblastı yara modeli K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının 72. saat görüntüleri.

4.3. Elisa Bulguları

4.3.1. Gingival Fibroblastlara ait Elisa Bulguları

Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF)

Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; ES1, ES2 ve ES3 gruplarında 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak K ve E gruplarında 48. saat değerleri ile 24. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,159$, $p=0,345$, $p=0,002$, $p=0,012$, $p=0,008$) (Tablo 4.3.1).

Elisa testinin 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,040$, $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,002$) (Tablo 4.3.1).

Elisa testinin 72. saat değerleri de tüm gruplarda 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,020$, $p=0,016$, $p=0,004$, $p=0,002$) (Tablo 4.3.1).

Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF ELISA testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24. ve 48. saatte E grubu değerlerinin K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (K, ES1, ES2, ES3 grupları 24. saat için sırasıyla; $p=0,003$, $p=0,001$, $p=0,000$, $p=0,000$, 48. saat için sırasıyla; $p=0,005$, $p=0,021$, $p=0,001$, $p=0,019$). E grubunun 72. saatte K ve ES1 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (K ve ES1 grupları 72. saat için sırasıyla; $p=0,005$, $p=0,039$) (Tablo 4.3.1).

Tablo 4.3.1. Gingival Fibroblast Hücrelerinde bFGF Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Gingival Fibroblast (bFGF)		
	Ortanca (Min-Maks) (pg/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	156,20 (136,10-176,10) ^β	158,50 (155,50-187,00) ^β	224,90 (214,80-256,20) ^{β,θ,φ}
E	261,90 (216,00-332,80)	264,20 (218,40-366,50)	317,90 (306,20-451,50) ^{θ,φ}
ES1	119,20 (113,50-159,00) ^β	187,20 (171,80-221,20) ^{β,θ}	262,50 (246,50-309,90) ^{β,θ,φ}
ES2	102,10 (90,70-122,00) ^β	121,50 (118,70-144,30) ^{β,θ}	283,40 (269,40-294,80) ^{θ,φ}
ES3	122,00 (70,70-179,00) ^β	201,30 (130,20-243,00) ^{β,θ}	291,30 (226,50-325,10) ^{θ,φ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark (p<0.05), φ: 48. saat ile istatistiksel fark (p<0.05),
Gruplar arası: β: E grubu ile istatistiksel fark (p<0.05),
Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Tip 1 Kollajen (T1K)

Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; tüm gruplarda 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; p=0,011, p=0,000, p=0,009, p=0,002, p=0,003) (Tablo 4.3.2).

Elisa testinin 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; p=0,006, p=0,000, p=0,002, p=0,002, p=0,001) (Tablo 4.3.2).

Elisa testinin 72. saat değerleri tüm gruplarda 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; p=0,007, p=0,001, p=0,016, p=0,002, p=0,002) (Tablo 4.3.2).

Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde 24. saatte K grubu değerlerinin E, ES1 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, E grubu değerinin ise ES2 grubunun değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (E, ES1 ve ES3 grupları için p=0,000, p=0,002, p=0,002, ES2 grubu için p=0,008). K grubu değerleri 48. ve 72.

saatlerde E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu bulunmuştur (E, ES1, ES2, ES3 grupları 48. saat için sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,001$, $p=0,006$, $p=0,001$, 72. saat için sırasıyla; $p=0,009$, $p=0,041$, $p=0,039$, $p=0,019$) (Tablo 4.3.2).

Tablo 4.3.2. Gingival Fibroblast Hücrelerinde T1K Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Gingival Fibroblast (T1K)		
	Ortanca (Min-Maks) (ng/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	37,10 (31,00-38,00)	78,90 (71,10-79,40) ^θ	140,70 (126,20-151,90) ^{θ,φ}
E	61,00 (56,60-63,80) ^α	106,00 (100,40-110,60) ^{α,θ}	169,90 (167,20-176,10) ^{α,θ,φ}
ES1	54,40 (54,10-55,50) ^α	98,80 (93,50-106,80) ^{α,θ}	160,30 (156,10-172,70) ^{α,θ,φ}
ES2	45,10 (42,50-45,70) ^β	93,50 (92,90-96,90) ^{α,θ}	161,50 (157,90-170,70) ^{α,θ,φ}
ES3	55,50 (44,30-64,10) ^α	97,40 (94,00-112,10) ^{α,θ}	165,30 (163,90-172,80) ^{α,θ,φ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), φ: 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), β: E grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$),
Min: Minimum, Maks: Maksimum.

4.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelere ait Elisa Bulguları

Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF)

Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; K, E ve ES3 gruplarında 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur Ancak ES1 ve ES2 gruplarında 48. saat değerleri ile 24. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,008$, $p=0,076$, $p=0,057$, $p=0,010$) (Tablo 4.3.3).

Elisa testinin 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,028$, $p=0,015$, $p=0,017$) (Tablo 4.3.3).

Elisa testinin 72. saat değerleri K, E, ES1 ve ES2 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak ES3 grubunda 72. saat değerleri ile 48. saat değerleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,005$, $p=0,029$, $p=0,020$, $p=0,112$) (Tablo 4.3.3).

Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24. saatte K grubu değerlerinin E grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur ($p=0,034$). K grubu değerlerinin 48. saatte E ve ES3 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (E ve ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,016$, $p=0,002$). Ayrıca 48. saatte ES1 ve ES2 değerleri de ES3 değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür (ES1 ve ES2 grupları için sırasıyla; $p=0,008$, $p=0,019$). K grubu değerlerinin 72. saatte E ve ES3 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (E ve ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,020$, $p=0,015$) (Tablo 4.3.3).

Tablo 4.3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerde bFGF Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Mezenkimal Kök Hücre (bFGF)		
	Ortanca (Min-Maks) (pg/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	32,10 (30,80-33,70)	34,50 (33,20-36,00) ^θ	78,30 (72,60-79,30) ^{θ,φ}
E	68,00 (67,90-68,00) ^α	90,30 (88,90-96,00) ^{α,θ}	141,10 (136,80-146,80) ^{α,θ,φ}
ES1	40,10 (36,50-43,70)	42,50 (38,90-46,10) ^ε	89,75 (88,30-91,20) ^{θ,φ}
ES2	53,70 (42,30-73,60)	56,10 (47,00-75,90) ^ε	126,80 (96,40-158,00) ^{θ,φ}
ES3	62,30 (36,50-87,80)	115,90 (80,20-150,10) ^{α,θ}	163,90 (105,40-166,70) ^{α,θ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), φ: 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), ε: ES3 grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Tip 1 Kollajen (T1K)

Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; tüm gruplarda 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak

anlamli derecede yu'ksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları i'gin sırasıyla; $p=0,018$, $p=0,002$, $p=0,043$, $p=0,001$, $p=0,002$) (Tablo 4.3.4).

Elisa testinin 72. saat değerleri t'um gruplarda 24. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamli derecede yu'ksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları i'gin sırasıyla $p=0,020$, $p=0,002$, $p=0,034$, $p=0,008$, $p=0,000$) (Tablo 4.3.4).

Elisa testinin 72. saat değerleri K, E ve ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamli derecede yu'ksek bulunmuştur. Ancak ES1 ve ES2 gruplarında 72. saat değerleri ile 48. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamli derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları i'gin sırasıyla; $p=0,027$, $p=0,008$, $p=0,133$, $p=0,069$, $p=0,006$) (Tablo 4.3.4).

Mezenkimal k'ok h'ucrerleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonu'clar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde istatistiksel olarak anlamli derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24. saatte K grubu değerlerinin E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamli derecede d'uşuk olduğu bulunmuştur (E, ES1, ES2 ve ES3 grupları i'gin sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,027$). Ayrıca 24. saatte ES1 değerinin ES3 değerinden istatistiksel olarak anlamli derecede yu'ksek olduğu bulunmuştur ($p=0,032$) (Tablo 4.3.4).

K grubu değerlerinin 48. saatte E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamli derecede d'uşuk olduğu (E, ES1, ES2 ve ES3 grupları i'gin sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,004$, $p=0,000$, $p=0,000$), E grubu değerlerinin ise ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamli derecede yu'ksek olduğu (ES1 ve ES2 grupları i'gin sırasıyla $p=0,001$, $p=0,003$) bulunmuştur. Ayrıca 48. Saatte ES3 değerinin ES1 değerinden istatistiksel olarak anlamli derecede yu'ksek olduğu bulunmuştur ($p=0,022$) (Tablo 4.3.4).

K grubu değerlerinin 72. saatte E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamli derecede d'uşuk olduğu (E, ES1, ES2 ve ES3 grupları i'gin sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,004$, $p=0,000$, $p=0,00$), E

grubu değerlerinin ise ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu (ES1 ve ES2 grupları için sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,000$) bulunmuştur. Ayrıca 72. saatte ES3 değerinin ES1 ve ES2 değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (ES1 ve ES2 grupları için sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,001$) (Tablo 4.3.4).

Tablo 4.3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde T1K Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Mezenkimal Kök Hücre (T1K)		
	Ortanca (Min-Maks) (ng/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	28,30 (23,80-33,80)	54,90 (40,30-56,20) ^θ	77,50 (53,50-79,70) ^{θ,φ}
E	69,10 (47,20-77,20) ^α	145,40 (116,70-148,30) ^{α,θ}	189,90 (176,00-196,50) ^{α,θ,φ}
ES1	69,60 (65,30-73,90) ^{α,ε}	90,40 (84,70-96,10) ^{α,β,ε,θ}	106,25 (103,90-108,60) ^{α,β,ε,θ}
ES2	60,20 (53,50-65,60) ^α	98,90 (91,70-108,60) ^{α,β,θ}	126,10 (120,90-135,10) ^{α,β,ε,θ}
ES3	46,60 (38,90-59,70) ^α	122,50 (109,80-125,80) ^{α,θ}	168,30 (157,20-183,60) ^{α,θ,φ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), φ: 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$),

Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), β: E grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), ε: ES3 grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$),

Min: Minimum, Maks: Maksimum.

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)

Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan IGF-1 Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; E ve ES3 gruplarında 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak K, ES1 ve ES2 gruplarında aynı zaman diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,122$, $p=0,014$, $p=0,126$, $p=0,170$, $p=0,032$) (Tablo 4.3.5).

Elisa testinin 72. saat değerleri de E ve ES3 gruplarında 24. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. K, ES1 ve ES2 gruplarında aynı zaman diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,122$, $p=0,005$, $p=0,098$, $p=0,089$, $p=0,015$) (Tablo 4.3.5).

Elisa testinin 72. saat değerleri E ve ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. K, ES1 ve ES2 gruplarında 72. saat değerleri ile 48. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla p=0,122, p=0,037, p=0,076, p=0,57, p=0,019) (Tablo 4.3.5).

Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan IGF-1 Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24. saatte ES3 grubu değerlerinin K, E, ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (E, ES1, ES2 ve ES3 grupları için sırasıyla; p=0,000, p=0,015, p=0,019, p=0,015)) (Tablo 4.3.5).

K grubu değerlerinin 48. saatte ES3 değerinden (p=0,036), 72. saatte ise ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (ES2 ve ES3 grupları için sırasıyla; p=0,036, p=0,014)) (Tablo 4.3.5).

Tablo 4.3.5. Mezenkimal Kök Hücrelerde IGF-1 Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Mezenkimal Kök Hücre (IGF-1)		
	Ortanca (Min-Maks) (ng/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	0,09 (0,05-0,17) ^ε	0,14 (0,08-0,18) ^ε	0,14 (0,08-0,18)
E	0,19 (0,18-0,25) ^ε	0,32 (0,29-0,35) ^θ	0,42 (0,39-0,43) ^{θ,φ}
ES1	0,21 (0,16-0,25) ^ε	0,31 (0,28-0,33)	0,43 (0,42-0,44)
ES2	0,19 (0,16-0,20) ^ε	0,35 (0,29-0,71)	0,44 (0,40-0,77) ^α
ES3	0,42 (0,36-0,48)	0,54 (0,45-0,65) ^θ	0,75 (0,58-0,81) ^{α,θ,φ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark (p<0.05), φ: 48. saat ile istatistiksel fark (p<0.05),

Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark (p<0.05), ε: ES3 grubu ile istatistiksel fark (p<0.05),

Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Osteokalsin (OK)

Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan OK Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; tüm

gruplarda 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden, 72. saat değerleri ise tüm gruplarda 24. ve 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları 24. saat için sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,000$, $p=0,015$, $p=0,000$, $p=0,000$, 48. saat için sırasıyla; $p=0,003$, $p=0,001$, $p=0,007$, $p=0,000$, $p=0,000$ ve 72. saat için sırasıyla; $p=0,022$, $p=0,005$, $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,001$) (Tablo 4.3.6).

Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan OK Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; üç saat diliminde de K grubu değerlerinin E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (E, ES1, ES2, ES3 grupları 24. saat için $p=0,008$, 48. ve 72. saat $p=0,000$) (Tablo 4.3.6).

Tablo 4.3.6. Mezenkimal Kök Hücrelerde OK Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Mezenkimal Kök Hücre (OK)		
	Ortanca (Min-Maks) (ng/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	24,03 (22,39-24,41)	48,63 (44,93-49,16) ^θ	66,96 (66,28-71,98) ^{θ,φ}
E	33,45 (29,34-39,79) ^α	68,42 (62,87-73,42) ^{α,θ}	98,68 (97,21-100,31) ^{α,θ,φ}
ES1	35,14 (34,93-35,34) ^α	68,42 (67,83-69,01) ^{α,θ}	102,05 (101,56-102,53) ^{α,θ,φ}
ES2	33,64 (30,43-34,58) ^α	68,56 (66,04-69,41) ^{α,θ}	103,43 (99,53-104,91) ^{α,θ,φ}
ES3	32,41 (30,02-34,62) ^α	67,36 (64,63-70,00) ^{α,θ}	101,68 (101,38-104,23) ^{α,θ,φ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), φ: 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$),
Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$),
Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Osteonektin (ON)

Mezenkimal kök hücre kültüründen elde edilen süpernatantların Elisa testi ile değerlendirilmesinde osteonektin tespit edilemediğinden istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

4.3.3. Periodontal Ligament Fibroblastlarına ait Elisa Bulgular

Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF)

Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; 48. ve 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları 48. saat için sırasıyla; $p=0,015$, $p=0,013$, $p=0,003$, $p=0,005$, $p=0,004$, 72. saat için sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,005$, $p=0,006$, $p=0,022$, $p=0,001$) (Tablo 4.3.7).

Elisa testinin 72. saat değerleri K, E ve ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak ES1 ve ES2 gruplarında 72. saat değerleri ile 48. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,010$, $p=0,005$, $p=0,065$, $p=0,116$, $p=0,037$) (Tablo 4.3.7).

Periodontal ligament hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24., 48. ve 72. saatlerde K grubu değerlerinin ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (Sırasıyla $p=0,011$, $p=0,011$, $p=0,031$). (Tablo 4.3.7).

Tablo 4.3.7. Periodontal Ligament Fibroblastlarında bFGF Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Periodontal Ligament Fibroblastı (bFGF)		
	Ortanca (Min-Maks) (pg/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	580,00 (452,40-646,20)	710,60 (568,80-731,10) ^θ	789,50 (636,60-827,50) ^{θ,φ}
E	774,40 (626,20-851,10)	885,00 (774,00-1015,80) ^θ	938,60 (822,00-1058,00) ^{θ,φ}
ES1	817,70 (802,80-958,00)	904,90 (902,60-1048,70) ^θ	962,00 (932,90-1128,00) ^θ
ES2	846,80 (804,00-875,50)	948,80 (908,90-957,70) ^θ	979,90 (942,60-1025,20) ^θ
ES3	936,70 (651,90-1466,60) ^α	1035,90 (768,20-1562,90) ^{α,θ}	1052,50 (779,10-1585,20) ^{α,θ,φ}

Grup içi: θ : 24. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), ϕ : 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$),
Gruplar arası: α : K grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$),
Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Tip 1 Kollajen (T1K)

Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; 48. ve 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları 48. saat için sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,006$, $p=0,003$, 72. saat için sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,004$, $p=0,004$), 72.saat değerleri de tüm gruplarda 48. saat değerlerinden (72. saat için sırasıyla; $p=0,003$, $p=0,000$, $p=0,003$, $p=0,004$, $p=0,011$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 4.3.8).

Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde de istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24., 48. ve 72. saatlerde K grubu değerlerinin E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (E, ES1, ES2, ES3 grupları 24. saat için sırasıyla; $p=0,003$, $p=0,002$, $p=0,004$, $p=0,011$, 48. saat için sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,008$, $p=0,002$, $p=0,001$ ve 72. saat için sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,008$, $p=0,001$, $p=0,000$). (Tablo 4.3.8). Ayrıca 48. saatte E grubu değerleri ES3 grubu değerlerine göre ($p=0,030$), 72. saatte ise ES3 grubu değerleri ES1 ve ES2 değerlerine göre (Sırasıyla $p=0,006$, $p=0,043$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo 4.3.8).

Tablo 4.3.8. Periodontal Ligament Fibroblastlarında T1K Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Periodontal Ligament Fibroblastı (T1K)		
	Ortanca (Min-Maks) (ng/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	43,80 (36,70-46,70)	107,60 (97,60-115,90) ^θ	152,60 (145,80-170,20) ^{θ,φ}
E	62,00 (50,20-63,90) ^α	160,60 (139,60-162,00) ^{α,θ}	230,40 (208,10-233,60) ^{θ,φ}
ES1	60,30 (56,60-60,80) ^α	135,90 (125,60-139,40) ^{α,θ}	197,30 (185,70-209,90) ^{ε,θ,φ}
ES2	55,00 (53,40-64,40) ^α	137,40 (132,10-150,20) ^{α,θ}	210,80 (194,50-228,20) ^{ε,θ,φ}
ES3	54,50 (54,30-57,40) ^α	142,90 (134,60-146,40) ^{α,β,θ}	231,70 (228,70-261,60) ^{θ,φ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), φ: 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$),
Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), β: E grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), ε: ES3 grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$),
Min: Minimum, Maks: Maksimum.

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)

Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan IGF-1 Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; E, ES1, ES2, ES3 gruplarında 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden (E, ES1, ES2, ES3 grupları 48. saat için sırasıyla; $p=0,018$, $p=0,044$, $p=0,040$, $p=0,034$, 72. saat için sırasıyla; $p=0,007$, $p=0,004$, $p=0,002$, $p=0,019$), 72. saat değerleri de E, ES1, ES2, ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden (E, ES1, ES2, ES3 gruplarında 72. saat için sırasıyla; $p=0,015$, $p=0,000$, $p=0,016$, $p=0,023$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. K grubunda 24. 48. ve 72. Saatte değerlerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p=0,257$) (Tablo 4.3.9).

Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan IGF-1 Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde de istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde 24. saatte E grubu değerlerinin K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (K, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,026$, $p=0,015$, $p=0,01$) (Tablo 4.3.9).

Elisa testinin 48. saatinde K grubu değerlerinin E, ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (E, ES1 ve ES2 grupları için sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,026$, $p=0,015$, $p=0,01$). Ayrıca E grubunun 48. saat değerleri K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (K, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,002$ $p=0,005$, $p=0,006$, $p=0,005$) (Tablo 4.3.9).

Elisa testinin 72. saatinde K grubu değerlerinin E, ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (E, ES1 ve ES2 grupları için sırasıyla; $p=0,000$, $p=0,010$, $p=0,025$, $p=0,020$). Ayrıca E grubunun 72. saat değerleri K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu

bulunmuştur (K, ES1, ES2, ES3 grupları için sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,005$, $p=0,011$, $p=0,004$) (Tablo 4.3.9).

Tablo 4.3.9. Periodontal Ligament Fibroblastlarında IGF-1 Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Periodontal Ligament Fibroblastı (IGF-1)		
	Ortanca (Min-Maks) (ng/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	0,10 (0,07-0,15) ^β	0,10 (0,07-0,15) ^β	0,15 (0,13-0,15) ^β
E	0,45 (0,36-0,51)	0,60 (0,52-0,61) ^{α,θ}	0,85 (0,70-0,88) ^{α,θ,φ}
ES1	0,23 (0,16-0,35) ^β	0,29 (0,21-0,45) ^{α,β,θ}	0,48 (0,41-0,65) ^{α,β,θ,φ}
ES2	0,18 (0,17-0,25) ^β	0,32 (0,26-0,44) ^{α,β,θ}	0,59 (0,55-0,67) ^{α,β,θ,φ}
ES3	0,12 (0,10-0,25) ^β	0,27 (0,20-0,33) ^{β,θ}	0,53 (0,52-0,55) ^{α,β,θ,φ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$), φ: 48. saat ile istatistiksel fark ($p<0.05$),

Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$), β: E grubu ile istatistiksel fark ($p<0.05$),

Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Osteokalsin (OK)

Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan OK Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; tüm gruplarda 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden (K, E, ES1, ES2, ES3 grupları 48. saat için sırasıyla $p=0,000$ $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,000$, $p=0,000$, 72. saatte tüm gruplar için $p=0,000$), 72. saat değerleri de tüm gruplarda 48. saat değerlerinden (K, E, ES1, ES2, ES3 gruplarında 72. saatte tüm gruplar için $p=0,000$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 4.3.10).

Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan OK Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında her saat diliminde de istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde üç saat diliminde de E grubu değerlerinin K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (K, ES1, ES2, ES3 grupları 24. saat için sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,006$, $p=0,004$, $p=0,004$, 48. saat için sırasıyla;

p=0,000, p=0,006, p=0,6 p=0,006, 72. saat her grup için p=0,000) (Tablo 4.3.10).

Tablo 4.3.10. Periodontal Ligament Fibroblastlarında OK Değerlerinin 24., 48. ve 72. Saatlerde Grup İçi ve Gruplar Arası Karşılaştırılması.

	Periodontal Ligament Fibroblastı (OK)		
	Ortanca (Min-Maks) (ng/ml)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat
K	21,39 (20,48-23,05)	45,93 (43,63-47,20) ^θ	71,61 (69,51-72,03) ^{θ,φ}
E	38,97 (32,59-39,79) ^α	72,18 (68,02-76,13) ^{α,θ}	106,51 (102,57-111,47) ^{α,θ,φ}
ES1	36,02 (31,63-39,39) ^α	71,70 (64,27-72,10) ^{α,θ}	108,03 (100,07-108,82) ^{α,θ,φ}
ES2	34,67 (33,59-35,29) ^α	68,78 (66,72-69,20) ^{α,θ}	104,79 (103,05-105,29) ^{α,θ,φ}
ES3	34,08 (30,95-37,93) ^α	68,89 (65,33-73,26) ^{α,θ}	107,39 (105,83-112,62) ^{α,θ,φ}

Grup içi: θ: 24. saat ile istatistiksel fark (p<0.05), φ: 48. saat ile istatistiksel fark (p<0.05),
Gruplar arası: α: K grubu ile istatistiksel fark (p<0.05),
Min: Minimum, Maks: Maksimum.

Osteonektin (ON)

Periodontal Ligament Fibroblastı hücre kültüründen elde edilen süpernatantların ELISA testi ile değerlendirilmesinde osteonektin tespit edilemediğinden istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

TARTIŞMA

Oksijenin hücre içerisinde enerji üretim süreçlerinde kullanılması ile doğal bir yan ürünü olan serbest oksijen radikalleri açığa çıkmaktadır. Bu serbest radikaller yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (71). Serbest radikallerin zararlarını engellemeye yönelik doğal savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Antioksidanlar olarak adlandırılan bu savunma mekanizmaları sayesinde serbest radikallerin oluşturabileceği doku hasarının önüne geçilmesi hedeflenmektedir. Çeşitli enflamatuar hastalıkların patogeneğinde de serbest radikallerin rolünün olabileceği ve antioksidanların kullanımının tedavide etkili olabileceği düşüncesi ile dejeneratif doku yıkımının engellenmesi amacıyla antioksidanlar kullanılmaya başlanmıştır (9,104,112,138). Periodontal hastalık da enflamatuar bir hastalık olduğu için, periodontal hastalığa bağlı doku yıkımının antioksidanlar yardımı ile engellenebileceği veya azaltılabileceği düşüncesi doğmuş ve bu amaç ile farklı antioksidanların kullanımı gündeme gelmiştir (25,37,87). Ancak antioksidanların periodontal dokular üzerinde etkileri hala tam olarak ortaya konamamış ve periodontal hücreler üzerindeki rolleri belirlenememiştir. Buradan yola çıkarak çalışmamızda antioksidanların kullanımına karar verilmiş ve periodontal hücreler üzerindeki proliferasyon, yara iyileşmesi ve iyileşmede rol oynayan bazı biyolojik mediatörlerin salımı gibi yaşamsal faaliyetlere olan etkilerinin irdelenmesi hedeflenmiştir.

Hücrelerde, membran fosfolipidlerinin poli-doymamış yağ asitleri (linoleik asit, araşidonik asit gibi) spontan olarak ya da oksidan metabolitlerin etkisi sonucu kolayca oksitlenebilirler ve peroksit türevlerine dönüşebilirler. Bir E vitamini formu olan α - tokoferolün en önemli kimyasal özelliği; antioksidan etkinliğinin olması, peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize ederek hücre ve doku hasarını önlemesidir (63,76,94,126,152). Aynı zamanda α - tokoferol; E vitamininin insanda en fazla bulunan ve en fazla biyolojik aktiviteye sahip olan formudur. Çeşitli çalışmalarda α - tokoferolün hücre proliferasyonu ve fonksiyonu üzerine etkilerinin olduğu gösterilmiştir (53,154). Ancak α - tokoferolün periodontal hücreler üzerindeki biyolojik etkileri henüz ortaya konamamıştır. Ulaşılabilirliğinin de kolay olması göze

alındığında, çok sayıda antioksidan bulunmasına karşın çalışmamızda α -tokoferolün kullanılmasına karar verilmiştir.

Selenyum memeliler için hayati öneme sahip bir eser elementtir. Tiroid hormon metabolizması, çeşitli immün reaksiyonlar ve serbest radikallerin detoksifikasyonu için gerekli oldukları bildirilmiştir (81,127,141). Selenyum, glutathion peroksidaz, tioredoksin redüktaz, deiodinaz ve selenoprotein P gibi çeşitli selenoproteinlerin içerisinde bulunmaktadır ve selenyumun esas biyolojik aktivitesi bu şekilde oluşmaktadır. Selenyumun kondrojenik hücreler (ATDC5) üzerinde proliferatif etkisi olduğu da gösterilmiş (155) olmasına karşın periodontal hücreler üzerine etkisini inceleyen çalışmaya rastlanmamaktadır. Bununla birlikte, selenyum ve E vitamini sinerjistik etkiye sahip oldukları ve serbest radikallerin oluşturduğu hasara karşı birbirlerinin etkisini artırdığını gösteren verilerin bulunması (10,29,130) selenyumu çalışmaya dahil etmemizin nedenleridir.

Günümüzde ilaçların ve çeşitli materyallerin değerlendirilmesi için yapılan çalışmalar, genellikle hücre kültürü, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalardan oluşmaktadır. İlk denemeler genellikle hücre kültürü ortamında yapıldıktan sonra hayvan çalışmalarına geçilmektedir. Hücre kültürü sonuçları olmadan doğrudan üst basamak çalışmalar tasarlamak etik nedenlerden dolayı uygun bulunmamaktadır. Bununla birlikte toksisite çalışmalarında deney hayvanlarının kullanılmasına yönelik tepkilerin artması ve etik kurul onay zorluğu, in vitro hücre kültürü çalışmalarının önemini daha da arttırmıştır. Periodontal dokularda bulunan hücrelerde, E vitamini ve selenyumun tek başına veya kombinasyonunun sitotoksisite, proliferasyon ve hücresel aktivasyonla ilişkili biyomarkerlar üzerine etkisini gösteren çalışmalara literatürde rastlanılmadığı için çalışmamızda hücre kültürü yöntemleri kullanılmıştır.

Periodontal dokulara ait hücreler kullanılarak, farklı materyallerin test edildiği çeşitli çalışmalarında hücrelerdeki proliferasyon miktarları değerlendirilirken genellikle hücre proliferasyon oranları veya miktarlarına bakılmıştır (1,2,64). Bununla birlikte çeşitli şekillerde oluşturulmuş in vitro yara modelleri kullanılarak ilgili materyalin yara iyileşmesi üzerine etkisini test

eden çalışmalar da mevcuttur (83,98,103). Bir materyalin hücre proliferasyonunu arttırmasının yara iyileşmesini de arttıracadı kesinliğinin bulunmamasından dolayı çalışmamızda proliferasyon oranlarının tespiti ve in vitro yara modelindeki iyileşme değerlendirmesi ayrı ayrı yapılmıştır.

Periodontolojide kullanılmış olan yara modelleri genellikle hücrelerin tam olarak bir yüzeyi kapatmasından sonra herhangi bir materyal ile yüzeyin çizilmesi ile hücrelerin uzaklaştırılarak bir boşluk oluşturulması ile meydana getirilmiştir (83,98,103). Takibinde, oluşturulan boşluğın belirli zaman dilimlerinde hangi oranlarda hücreler tarafından kapatıldığına bakılmıştır. Oysa bu tip bir yara modelinde bireye bağımlı olan pek çok değişken mevcuttur. Yarayı oluşturmada kullanılan materyalin şekli, uygulanan kuvvet, yapılan iziğin yn ve şekli kişiye bağlı olduğundan her seferinde aynı özellikte bir yaranın oluşturulması mümkün olmamaktadır. Standart bir yüzey oluşturulamaması çalışmanın güvenilirliği açısından olumsuz bir durum yaratmaktadır. Bunun yanında, yüzeyden kazınarak hücrelerin uzaklaştırılması esnasında zedelenen, kopan ve ortamdan uzaklaşan hücrelerin de her defasında aynı olması mümkün olamamaktadır. Bu gibi dezavantajlardan dolayı çalışmamızda özel dizayn edilmiş ekipmanların kullanılması ile kişiye bağımlı olmayan standart bir yara modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan yara modelindeki genişlik ve uzunluklar bilindiği için oransal verilere ihtiyaç duyulmadan alan hesaplamaları (mm²) yapılabilmıştir. Bilgimiz dahilinde çalışmamız, periodontolojide bu yara modelini kullanan ve alan hesaplamaları yapan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Periodontal yara iyileşmesi veya rejenerasyonuna yönelik hücre seçimi yapılırken periodonsiyumda bulunan tüm hücre tipleri kullanılabilmektedir (103). Çalışmamızda dişeti fibroblastları ile periodontal ligament fibroblastlarının yanında mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır. Her üç hücre grubu periodonsiyumdaki yara iyileşmesi ve rejenerasyonda görev alan temel hücreler olmaları seçimlerindeki esas nedendir.

Yara iyileşmesi ve rejenerasyonda hem yumuşak dokular hem de sert dokuların oluşumu için önemli olan ve fibroblastlar ile mezenkimal hücrelerin

salgıladıkları büyüme faktörleri ve yara iyileşmesi süreci ile ilgili proteinlerin değerlendirilmesi çalışmamızın diğer bir basamağını oluşturmaktadır. Bu bağlamda hücrelerden salınan bazik fibroblast büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü-1, tip I kollagen, osteokalsin ve osteonektin seviyelerinin de değerlendirilmiş olması önemlidir. Seçimlerinde literatürde geniş bir şekilde çalışılmış olmaları ve yumuşak doku ve sert doku metabolizmalarındaki rollerinin net bir şekilde ortaya konmuş olmaları etkili olmuştur.

Çalışmamızın ilk basamağına proliferasyon ve toksisite testlerinin yapılması ile başlanmıştır. Dişeti fibroblastlarının grup içi XTT sonuçlarının kıyaslamasında tüm gruplarda, 24. saat değerleri ile diğer zaman dilimleri arasında anlamlı derecede yüksek bir fark olduğunun saptanması α - tokoferolün 60 μ M'lık konsantrasyonda tek başına ve 5×10^{-8} M, 10^{-8} M ve 5×10^{-9} M'lık selenyum konsantrasyonları ile birlikte kullanımının dişeti fibroblastları üzerinde sitotoksik etkilerinin olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte K, E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarının tamamında 24. saate göre bir artışın bulunması, ancak kontrol grubu ile diğer gruplar arasında bir farkın saptanamaması α -tokoferolün ilgili konsantrasyonda dişeti fibroblastlarının proliferasyonunu üzerine ilave bir etkisinin olmadığını gösterirken, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M ve 5×10^{-9} M'lık dozlarda selenyum ilave edilmesinin de bu proliferasyon oranları üzerine pozitif veya negatif yönde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir. K, E, ES1 ve ES3 gruplarının kendi içerisinde 72. saat XTT değerleri, 48. saat XTT değerlerinden anlamlı derecede yüksek bulunurken ES2 grubunda ilgili saatler arasında bir fark saptanamamıştır. Bu bulgu da benzer şekilde ilgili dozlardaki α -tokoferolün ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonunun dişeti fibroblastları üzerinde benzer etkileri olduğunu doğrulamaktadır. ES2 grubunda kullanılan selenyum dozunun ES1 ve ES3 gruplarındakinin arasında olmasına karşın 48. ve 72. saat arasında sadece ES2 grubunda fark bulunamaması ilgili gruptaki dişeti fibroblastlarının daha çabuk kültür kabının zeminini kaplayarak kontakt inhibisyona geçmiş olmalarına bağlanabilir. 48. saatte ES2 grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel bir

fark olmamasına karşın sayısal değerlerin ES2 grubunda diğer gruplardan daha yüksek olması bu olasılığı arttırmaktadır. Yaptığımız literatür taraması sonucunda, dişeti fibroblast yara modelinde antioksidan uygulamaları ve XTT'nin değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanmaması nedeniyle bulgularımızı kıyaslama imkanımız olmamıştır.

Mezenkimal kök hücrelerinin grup içi kıyaslamasında tüm grupların 24. saat XTT sonuçlarının 48. ve 72. saatlerdeki sonuçlar ile benzer olması ve herhangi bir zaman aralığında gruplar arasında istatistiksel bir fark oluşmaması dişeti fibroblastlarında da olduğu gibi α -tokoferolün 60 μ lık konsantrasyonda tek başına ve 5×10^{-8} M, 10^{-8} M ve 5×10^{-9} M'lık selenyum konsantrasyonları ile birlikte kullanımının mezenkimal kök hücreler üzerinde sitotoksik etkilerinin olmadığını göstermektedir. Ancak kontrol grubunun kendi içerisinde de takip dönemlerinde 24 saat ile herhangi bir istatistiksel farkın bulunamaması α -tokoferol ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonun mezenkimal hücreler üzerindeki proliferatif etkisi üzerine sınırlı yorum yapma imkanı tanımaktadır. 72 saatlik takip süresince kontrol grubunda bile bir farkın bulunamaması mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon hızının yavaş olmasına (114,146) dolayısıyla 24, 48 ve 72. saatlerde elde edilen verilerin birbirine yakın olması sonucu istatistiksel bir farkın oluşmamış olmasına bağlanabilir. Bunun yanında ES1 grubunda 72. saat ile 48. saatler arasında XTT değerlerinde anlamlı bir artışın bulunması α -tokoferol ile 5×10^{-8} M dozda selenyumun mezenkimal kök hücreler üzerinde proliferasyonu artırıcı bir etkisinin olabileceğine işaret olarak kabul edilebilir. ES2 ve ES3 gruplarında aynı zaman dilimlerinde bir farkın bulunamaması selenyumun bu gruplardaki dozunun daha düşük olmasına bağlanabilirken yüksek dozdaki selenyum, α -tokoferolün mezenkimal kök hücreleri üzerindeki proliferatif etkisini artırıyor olabilir. Ancak kesin bir sonucun çıkartılabilmesi için α -tokoferol ile selenyumun daha yüksek dozlarının da test edildiği benzer dizaynda bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Yaptığımız literatür taraması sonucunda, mezenkimal kök hücre yara modelinde α -tokoferol ve selenyumun uygulandığı ve proliferasyonun değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanmaması nedeniyle bulgularımızı kıyaslama imkanımız olmamıştır.

Periodontal ligament fibroblastlarının XTT sonuçlarının değerlendirilmesinde önceki çalışılan hücrelerde de olduğu gibi negatif değerlerin oluşmaması α -tokoferol ile selenyumun çalışmada kullanılan dozlarının periodontal ligament fibroblastları üzerine de sitotoksik etkilerinin olmadığını göstermektedir. XTT değerlerinin grup içerisi kıyaslamasında ES1 grubu hariç tüm gruplarda 24 saate göre 48 ve/veya 72. saatte istatistiksel anlamlı bir artış saptanmıştır. ES1 grubunda takip dönemlerinde bir farkın saptanamamış olmasının kullanılan selenyum dozunun diğer gruplardan fazla olmasına bağlanabilir. Periodontal ligament fibroblastları ile ES1 grubunda XTT değerlendirmesinde istatistiksel bir değişim izlenmezken mezenkimal kök hücre grubunda istatistiksel bir artışın saptanması, gingival fibroblastlarda da benzer bir artışın bulunması, α -tokoferol ile selenyumun değişik hücre tiplerine değişik oranlarda etki edebileceğine dair bir veri olarak kabul edilebilir.

Periodontal ligament fibroblastlarının gruplar arası kıyaslanmasında ise iki önemli bulgu göze çarpmaktadır. Bunlardan birincisi ES2 grubunun 72. saate K grubuna göre XTT sonuçlarının anlamlı derecede yüksek bulunması, diğeri de ES3 grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmasıdır. K grubu ile E grubu arasında 72. saatte bir fark bulunmazken α -tokoferol ile selenyumun kombinasyonunda (ES2) bir yükselmenin bulunması α -tokoferole selenyum eklenmiş olmasına ve bu etkinin selenyumdan kaynaklı olmasına bağlanabilir. Ancak ES2 grubunun sonuçlarının ES3 grubunun aynı dönemdeki sonuçlarından da yüksek bulunması yine ES3 grubundaki selenyum dozuna bağlanabilir. Alfa-tokoferole eklenen selenyum dozunun yükselmesinin periodontal ligament hücrelerinin proliferasyon hızını düşürebileceğine dair bir veri olarak kabul edilebilir. Benzer şekilde bu veri α -tokoferole eklenen aynı dozdaki selenyumun farklı hücrelere farklı etkiler yapabileceğini göstermektedir. Bilgimiz dahilinde periodontal ligament hücre yara modelinde α -tokoferol ve selenyumun uygulandığı ve proliferasyonun değerlendirildiği başka bir çalışmaya literatürde rastlanmaması nedeniyle bulgularımızı karşılaştırma imkanımız olmamıştır.

Her 3 hücre tipinin XTT sonuçlarının değerlendirilmesinde Kontrol grupları ile test grupları arasında tek fark periodontal ligament fibroblastlarında ortaya çıkmıştır (ES2) ve hiçbir grupta sitotoksikite belirtisine rastlanmamıştır. Burada elde edilen veriler α -tokoferol ve selenyum kombinasyonunun periodontal hücreler üzerine etkisi olabileceği ve en azından periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu arttırabileceğini göstermektedir. Ancak α -tokoferolün tek başına kullanımının böyle bir etki yapabileceğine dair bir veri bu çalışmadaki XTT sonuçları dahilinde mevcut değildir. Bu bağlamda; α -tokoferol ve selenyum kombinasyonunun periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu arttırabileceği ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. Bu bulgu literatürde selenyum ve E vitaminin sinerjistik etkiye sahip oldukları ve birbirlerinin etkisini arttırdıklarını gösteren çalışma verileriyle uyumludur (10,29,130).

Çalışmada kullanılan yara modeli analizleri yapıldığında tüm örneklerdeki yara şekillerinin üniform oldukları gözlenmiş ve yapılan ölçümler ile yara yüzey alanlarının birbiri ile benzer oldukları teyit edilmiştir.

Gingival fibroblastların, mezenkimal kök hücrelerin ve periodontal ligament fibroblastlarının kullanıldığı yara modelinin değerlendirilmesinde tüm gruplarda oluşturulan boşluğun hedeflendiği gibi hücreler tarafından kapatılmaya başlandığı izlenmiştir. Bu veri oluşturduğumuz in vitro yara modelinin planlandığı şekilde çalıştığını ve periodontal hücre kültürü çalışmalarında başarıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

Gingival fibroblastların yara modeli verilerinin grup içi kıyaslanmasında; 24 saat ile 12 saat arasında tüm gruplarda kapanma yüzdeleri açısından istatistiksel anlamlı bir artış bulunmaktadır. Bu veri α -tokoferol ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonu kullanıldığında da yara iyileşmesinin devam ettiğini göstermektedir. Benzer şekilde 24. ve 36. saatlerde E grubu hariç diğer tüm gruplarda yara yüzeyinin kapanmasında istatistiksel anlamlı bir artış saptanmıştır. E grubunda 24. ve 36. saatler arasında anlamlı bir artışın bulunamaması bu gruptaki hücrelerin ilk 24 saatlik süreçte daha hızlı bir yara iyileşmesi sağlamasına, dolayısıyla 24. ve 36. saatler arasında kontakt inhibisyona geçmesi ve proliferasyondaki

yavaşlamaya bağlanabilir. 24. saatteki E grubundaki sayısal verinin diğer gruplardan fazla olması bu olasılığı güçlendirmektedir. 48. saate kadar tüm gruplardaki yara iyileşmeleri tamamlandığından (%100 dolum) bu saat itibari ile önceki istatistiksel farklar korunmaktadır.

Gingival fibroblastların gruplar arası kıyaslanmasında ise sadece ES2 grubu ile kontrol grubu arasında 12. saatte istatistiksel anlamlı bir fark saptanırken diğer zaman dilimlerinde bir fark bulunamamıştır. ES2 grubunda istatistiksel anlamlı bir artışın saptanması ancak bu farkın diğer zaman dilimlerinde korunmaması α -tokoferol ve selenyum kombinasyonunun gingival fibroblastlarda yara iyileşmesinin erken döneminde (ilk 12 saat) iyileşmeyi hızlandırabilecek kapasitelerinin olabileceğini göstermektedir. E grubunda kontrol grubuna göre aynı saate bir artış saptanmazken, ES2 grubunda bu artışın gözlenmesi etkinin selenyumdan veya α -tokoferol ile olan sinerjistik etkilerinden kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Çalışmada 3 farklı doz selenyum kullanılmış olmasına karşın bu etkinin orta dozda çıkması ilginç bir bulgudur. Bu veri yara iyileşmesinde doza bağımlı bir durum olabileceğini ve selenyumun etkili olduğu bir doz aralığının varlığını düşündürmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerinin yara modeli verilerinin grup içi kıyaslamalarında 12. saat verileri ile ilk istatistiksel artış K, E ve ES3 grubunda 24. saatten itibaren oluşurken, ES1 ve ES2 grubunda bu fark 36. saatten sonra meydana gelmektedir. Bu veriler α -tokoferole eklenen selenyum dozunun yükselmesi ile erken dönem yara iyileşmesinde mezenkimal kök hücrelerinde bir gecikme oluşabileceğini göstermektedir. Çünkü çalışmamızdaki orta ve yüksek doz selenyum kullanıldığında (ES1 ve ES2) bu gruplarda 36 saatteki kapanma oranları diğer gruplardaki 24 saat kapanma oranları ile benzer olmaktadır. Bu veriler α -tokoferole eklenen selenyum dozunun artmasının mezenkimal kök hücrelerin yara iyileşmesine olan etkilerini yavaşlatabileceğini göstermektedir. Dişeti fibroblastlarının yara modeli verilerinde de olduğu gibi bir kez daha selenyumun etkisinin doza bağımlı olabileceği gösterilmiştir. Diğer taraftan dişeti fibroblastlarında α -tokoferol ile birlikte kullanılan selenyum erken dönemde fibroblastlarda

oluşan yara iyileşmesini hızlandırırken mezenkimal kök hücrelerinde böyle bir etki gözlenmemiştir. Bu bulgular α - tokoferol ile birlikte kullanılan selenyumun değişik hücre tiplerine yara iyileşmesinin değişik fazlarında farklı etkileri olabileceğini göstermektedir.

İn vitro yara modelinde mezenkimal kök hücrelerin gruplar arası kıyaslamasında ise selenyum kullanılan tüm grupların (ES1, ES2, ES3) 48. saat verilerinin K ve E gruplarından istatistiksel anlamli seviyede yüksek oldukları bulunmuştur. Diğer dönemlerde gruplar arasında bir fark bulunamamıştır. Bu veriler α - tokoferol ile birlikte kullanılan selenyumun yara iyileşmesinin erken dönemini takiben mezenkimal kök hücrelere bağıli iyileşmeyi hızlandırabileceğini göstermektedir. ES2 ve ES3 gruplarında yara yüzeyinin 36. ve 48. saatler arasında çok hızlanarak 48. saatte %100 doluluğa ulaşması bu olasılığı güçlendirmektedir. Aynı dönemde α - tokoferolün tek başına kullanıldığı E grubunda benzer bir gelişimin oluşmaması bu etkinin ya selenyuma ya da α - tokoferol ile sinerjistik etkisinin oluşuna bağlanabilir.

Periodontal ligament fibroblastlarının in vitro yara modeli sonuçlarının grup içi kıyaslanmasında; ES2 grubu hariç diğer tüm gruplarda 24. saat ile 12. saat arasında istatistiksel anlamli bir fark oluşmuş ve bu farklar çalışma süresince korunmaya devam etmiştir. ES2 grubunda 12. saat ile anlamli fark 36. saat sonrası oluşmuştur. ES2 grubunda 24. saatte anlamli bir fark bulunamaması ES2 grubunun 12. saatteki sayısal ortalamasının diğer gruplardan yüksek olmasına bağlanabilir. Periodontal ligament fibroblastlarının grup içi kıyaslamalarında takip dönemlerinde ortaya çıkan istatistiksel olarak anlamli yara yüzeyi dolum oranları α - tokoferol ve α - tokoferol+selenyum kombinasyonunun periodontal ligament fibroblastlarından kaynaklı yara iyileşmesini bozmadıklarını ortaya koymaktadır. Bu hücrelerin gruplar arası kıyaslanmasında ise 12. saatte selenyum kullanılan grupların (ES1,ES2,ES3) K ve E gruplarına göre anlamli derecede fazla yara yüzeyi kapanması sağladıkları izlenmektedir. Bu bulgular periodontal ligament hücrelerine bağıli yara iyileşmesinin erken döneminde α - tokoferole ilgili dozlarda selenyum eklenmesinin yara iyileşmesini

hızlandırabileceğini göstermektedir. Bu etki tek başına α -tokoferol grubunda ortaya çıkmadığından ya selenyumun etkisine ya da α -tokoferol ile sinerjistik etkilerine bağlanabilmektedir. Mezenkimal kök hücrelerinin yara modeli sonuçlarında da selenyum kullanılan grupların diğer gruplar ile istatistiksel olarak anlamlı artışın bulunduğu ancak bu farkın 48. saatte ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu bulgular α -tokoferol+selenyumun farklı hücre tiplerine yara iyileşmesinin farklı dönemlerinde benzer etkiler oluşturarak yara iyileşmesini hızlandırabileceğini göstermektedir.

Gingival ve periodontal ligament fibroblastları ile mezenkimal kök hücrelerine α -tokoferol ve selenyumun uygulandığı in vitro yara modelinde elde edilen bulgularımızı literatürde başka bir çalışma olmaması nedeniyle kıyaslama imkanımız olmamıştır.

XTT ile elde edilen proliferasyon miktarları ve in vitro yara modeli ile elde edilen dolum oranları göz önüne alındığında test edilen ilaçların proliferasyon miktarına farklı yara iyileşmesi oranına farklı etki ettikleri gözlemlenebilir. Örneğin çalışmamızda mezenkimal kök hücrelerin XTT sonuçlarına göre takip döneminde sadece 48. saat ile 72. saat arasında ve sadece ES1 grubunda anlamlı bir artış bulunmuş ve gruplar arasında herhangi bir fark saptanamamışken, aynı hücrelerin in vitro yara modelinde dolum oranları kıyaslandığında tüm gruplarda 24. saatten itibaren anlamlı farklar ortaya çıkmış ve 48. saatte gruplar arasında da anlamlı farklar saptanmıştır. Bu veriler proliferasyon oranları ile yara yüzeyini kapatma oranlarının bir birinden farklı olduklarını ve birbirlerinin yerine kullanılmamaları gerektiğini ortaya koymaktadır.

Dişeti ve periodontal ligament fibroblastları ile mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen XTT değerleri ve in vitro yara modeli sonuçlarının yanında Elisa ile elde edilen bFGF, Tip I Kollajen, IGF-1 ve Osteokalsin seviyeleri de ölçülmüştür. Bilgimiz dahilinde araştırmamız bu hücrelerde hem XTT, hem in vitro yara iyileşme modeli hem de Elisa ile ilgili faktörlerin tespitini yapan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Gingival fibroblastlardan salınan bFGF miktarlarının grup içi kıyaslanmasında; K ve E grubunda 24. saat ile istatistiksel anlamlı artış 72.

saatte oluşurken selenyum kullanılan gruplarda anlamlı artış 48. saatte oluşmakta ve 72. saatte de aynı artış izlenmektedir. Bu veriler α - tokoferol ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonunda da gingival fibroblastlar tarafından bFGF salımının devam ettiğini göstermektedir. 24 saatlik sürenin geçmesinden sonra selenyum kullanılan gruplarda istatistiksel anlamlı yükselişin K ve E grubundan daha erken ortaya çıkması ilgili dozlarda kullanılan selenyumun (ES1, ES2, ES3) ilk 24 saatlik sürede salınan bFGF miktarını baskılamakta takibinde arttırabileceğini göstermektedir. Bu etki ya selenyumun kendisine ya da α -tokoferol ve selenyumun sinerjistik etkisine bağlanabilmektedir. ES1, ES2 ve ES3 gruplarında 48. ve 72. saatler arasında da anlamlı bir artış bulunurken K ve E gruplarında bulunmaması bu olasılığı güçlendirmektedir.

Gingival fibroblastlar tarafından salınan bFGF miktarlarının gruplar arası kıyaslanmasında; tek başına α -tokoferol kullanılan grupta tüm değerlendirme dönemlerinde bFGF miktarının istatistiksel anlamlı derece yüksek olduğu bulunmuştur. Bu veri α -tokoferolün gingival fibroblastları etkileyerek ilgili büyüme faktörünün salımını arttırabileceğini göstermektedir. Alfa-tokoferolün tek başına kullanıldığı gruba kıyasla selenyum kullanılan gruplarda da bFGF miktarının E grubuna göre tüm takip dönemlerinde anlamlı derecede düşük olması selenyum ve α -tokoferolün bFGF salımı üzerine antagonist etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Alfa-tokoferolün gingival fibroblastlardan bFGF salımını arttırabileceği bulgusu ve selenyumun olası antagonist etkisi ilk defa bu çalışma ile ortaya konmaktadır. Hücre kültürü yara modelinde α -tokoferol ve selenyum gibi antioksidanların gingival fibroblastlardan bFGF salımına etkisini araştıran bir çalışma literatürde mevcut olmadığı için bulgularımızı kıyaslama imkanımız olmamıştır.

Gingival fibroblastlar tarafından salınan tip I kollajen miktarlarının gruplar içi kıyaslamasında tüm gruplarda 24. ve 48. saatler arasında ve 48. ve 72. saatler arasında istatistiksel anlamlı artışlar saptanmıştır. Bu artışlar α -tokoferol ve α -tokoferol+selenyum varlığında da dişeti fibroblastlarından tip I kollajen salımının devam ettiğini ve olumsuz bir etkilerinin olmadığını göstermektedir. Gruplar arası kıyaslamada ise α -tokoferol ve α -

tokoferol+selenyum kombinasyonları (E, ES1, ES2, ES3) kullanıldığında kontrol grubuna göre tip I kollajen miktarında anlamlı bir artış olduğu izlenmektedir. Bu veri α -tokoferol ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonlarının dişeti fibroblastlarından tip I kollajen oluşturma miktarını arttırabileceğini göstermektedir. İlginç bir veri de ES2 grubunda 24. saatte tip I kollajen miktarının E grubundan anlamlı derecede az olmasıdır. Selenyum kullanılan gruplardan sadece ES2 grubunda anlamlı bir fark bulunurken ES1 ve ES3 gruplarında istatistiksel bir fark bulunmamasına karşın sayısal bir farkın bulunduğu da göz önünde bulundurulmalıdır.

Kesin bir yorum yapılamamasına karşın α -tokoferole selenyum eklenmesinin gingival fibroblastlardan en azından erken dönemde tip I kollajen salımına negatif etkisi olabileceği düşünülebilir.

Gingival fibroblastlardan elde edilen Elisa sonuçları α -tokoferolün bu hücrelerden salınan bFGF ve tip I kollajen miktarları üzerine pozitif etkiliyen ortama selenyumun eklenmesi negatif bir etki yapabileceğini göstermektedir.

Mezenkimal kök hücrelerden salınan bFGF miktarlarının gruplar içerisinde kıyaslamasında; K,E ve ES3 grubunda 24. ve 48. saatler arasında istatistiksel bir artış olduğu gözlenirken, bu artış diğer gruplarda 72. saatte ortaya çıkmaktadır. Bu veriler α -tokoferol ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonunun kullanıldığı durumda da mezenkimal kök hücrelerin bFGF salımlarının devam ettiğini göstermektedir. ES1 ve ES2 gruplarında 24. ve 48. saatler arasında bir fark bulunmazken, ES3 grubunda bir fark saptanması artan selenyum dozunun α -tokoferol üzerine olumsuz bir etkisinin olabileceğine işaret olabilir. Gruplar arası kıyaslamada; 48. saatte ES1 ve ES2 grubundan salınan bFGF miktarlarının ES3 grubundan anlamlı derecede daha az bulunması, bununla birlikte E ve/veya ES3 gruplarındaki miktarların tüm takip dönemlerinde kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunması bu olasılığı doğrular niteliktedir. Mezenkimal kök hücre in vitro yara modelinde antioksidan ilavesinin bu hücrelerden salınan bFGF miktarını kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırdığı ve bu etkinin özellikle α -tokoferolün tek başına ya da düşük doz selenyum kombinasyonu gruplarında istatistiksel olarak anlamlılık kazandığı görülmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerden salınan tip I kollajen miktarları gruplar içerisinde değerlendirildiğinde; K, E ve ES3 grubunda 24. saat ile 48. saat arasında ve 48. saat ile 72. saat arasında istatistiksel anlamlı bir artış saptanırken, ES1 ve ES2 gruplarında sadece 24. saat ile 48. ve 72. saatler arasında istatistiksel bir artış izlenmektedir. Bu veri α -tokoferol ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonunun kullanıldığı durumda da mezenkimal kök hücrelerinden tip I kollajen salımının devam ettiğini göstermekle birlikte artan selenyum dozunun (ES1 ve ES2) oluşan tip I kollajen miktarını etkilediği izlenimini vermektedir. Tip I kollajen miktarı; ES1 grubunda ES3 grubuna göre 24. saatte anlamlı derecede daha fazla iken 48. ve 72. saatte durum tam terine dönmektedir ve ES3 grubunda ES1 grubuna göre anlamlı derecede daha fazla tip I kollajen saptanmaktadır. Bu veri α -tokoferole eklenen selenyumun farklı zaman dilimlerinde aynı hücreler üzerine farklı etkileri olabileceğini göstermektedir. Ancak 24. saat hariç bu artışların ES3 grubunun lehine olması artan selenyum dozunun mezenkimal kök hücreler üzerine negatif etkisinin daha baskın olduğu izlenimi oluşturmaktadır. ES2 ve ES1 gruplarında 48. ve 72. saatlerde tip I kollajen miktarlarının E grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede az bulunması bu olasılığı doğrulamaktadır.

Mezenkimal kök hücrelerden salınan IGF-1 seviyelerinin grup içi kıyaslamasında; E ve ES3 gruplarında hem 24. ve 48. saatler arasında hem de 48. ve 72. saatler arasında istatistiksel anlamlı bir artış saptanırken diğer gruplar için bir fark saptanamamıştır. Bu veri artan selenyum dozunun (ES1 ve ES2) mezenkimal kök hücrelerden IGF-1 salımını azaltabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan gruplar arası kıyaslama yapıldığında; 24. saatte ES3 grubundaki IGF-1 miktarının diğer tüm gruplardan istatistiksel anlamlı seviyede yüksek bulunması α -tokoferole eklenen düşük doz selenyumun (ES3) mezenkimal kök hücrelerden IGF-1 salımını arttırabileceğini göstermektedir. Bu veriler α -tokoferole eklenen selenyumun doza bağımlı etki gösterebileceği, düşük dozda (ES3) pozitif etki yaparken dozun arttırılmasının (ES1 ve ES2) negatif etki ile sonuçlanabileceğini göstermektedir. Bu etki selenyumun kendisine bağlı olabileceği gibi α -

tokoferol ile olan sinerjistik etkisine de bağılı olabilir. IGF-1 hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve kollajen sentezi gibi hücresel olayları stimüle eden önemli bir büyüme faktörüdür. Alfa-tokoferol ve düşük doz selenyumun mezenkimal kök hücreden IGF-1 salınımını artırması periodontal rejenerasyon çalışmaları için umut vaat eden bir veri olabilir.

Mezenkimal kök hücrelerden salınan osteokalsin miktarlarının grup içi kıyaslamasında tüm gruplarda 24. saat ile 48. ve 72. saatler arasında ve 48. saat ile 72. saat arasında istatistiksel bir artışın saptandığı izlenmektedir. Bu veriler; mezenkimal kök hücrelerden salınan osteokalsinin α -tokoferol ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonu varlığında da devam edebileceğini göstermektedir. Gruplar arası kıyaslamada ise tüm değerlendirme dönemlerinde (24., 48. ve 72. saatler) osteokalsin miktarının E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarında K grubundan istatistiksel anlamlı seviyede yüksek olduğu ancak gruplar arası başka bir fark olmadığı gözlenmektedir. Bu veriler; mezenkimal kök hücrelere eklenen α -tokoferolün salınan osteokalsin miktarını arttırabileceğini ancak α -tokoferole eklenen selenyumun (ES1, ES2, ES3 dozlarında) osteokalsinin miktarı üzerine negatif veya pozitif bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Periodontal ligament fibroblastlarından salınan bFGF miktarlarının gruplar içerisinde kıyaslanmasında tüm gruplarda 48. saat sonrasında 24. saat değerlerine kıyasla anlamlı bir artış izlenmektedir. Bu veriler; test edilen ilaçların varlığında da periodontal ligament fibroblastlarından bFGF salımının devam edebileceğini göstermektedir. Gruplar arası kıyaslamada ise ES3 grubunda tüm değerlendirme dönemlerinde (24., 48. ve 72. saatler) bFGF miktarının kontrol grubundan anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu düşük dozda selenyumun (ES3) α -tokoferol ile birlikte periodontal ligament fibroblastlarından bFGF salımını arttırabileceğini ve bu artışın doza bağımlı olabileceğini göstermektedir. Çünkü ES1 ve ES2 grubunda daha yüksek dozlarda selenyum bulunmakta ancak kontrol grubu ile bir fark yakalanamamaktadır. Ortaya çıkan bu etki düşük dozdaki selenyuma bağlanabileceği gibi α -tokoferol ile selenyumun ilgili dozdaki sinerjistik etkisine bağlanabilir. Aynı zaman diliminde E grubu ile kontrol

grubu arasında da bir istatistiksel bir farkın saptanamaması bu varsayımı doğrular niteliktedir.

Periodontal ligament fibroblastlarından salınan tip I kollajen miktarlarının grup içi kıyaslanmasında bFGF'e benzer bir durum söz konusudur. Tüm gruplarda 24. saat değerleri ile istatistiksel fark 48. saat itibari ile oluşmaktadır. Bu veri test edilen ilaçların varlığında da periodontal ligament fibroblastlarından tip I kollajen salımının devam edebileceğini göstermektedir. Gruplar arası kıyaslamalar yapıldığında 24. ve 48. saatlerde E, ES1, ES2 ve ES3 gruplarında K grubuna göre istatistiksel anlamlı seviyede yüksek miktarda tip I kollajen oluşumu bulunmuştur. Bu veri α - tokoferol ve α -tokoferol+selenyum kombinasyonunun periodontal ligament fibroblastlarından tip I kollajen sentezini arttırabileceğini göstermektedir. 72. saatte ise ES3 grubunda, ES2 ve ES1 grubuna göre anlamlı seviyede yüksek tip I kollajen bulunması bu etkinin doza bağımlı olabileceğini ve düşük doz selenyumun daha etkili olabildiğini düşündürmektedir. ES3 grubundaki 48. saatte değer E grubundan yüksek olması da bu varsayımı destekler niteliktedir.

Periodontal ligament fibroblastları tarafından salınan IGF-1 değerlerinin grup içi kıyaslamasında; antioksidanların kullanıldığı tüm gruplarda 24. saat ile 48. ve 72. saatler arasında ve 48 ile 72. saatler arasında istatistiksel anlamlı artışlar saptanırken, kontrol grubunda herhangi bir farkın saptanamaması α -tokoferol ve α -tokoferol+selenyumun periodontal ligament fibroblastlarından salınan IGF-1'i arttırabileceğini göstermektedir. 48. ve 72 saatlerde antioksidan gruplarının değerlerinin kontrol grubundan istatistiksel anlamlı seviyede yüksek çıkması bu olasılığı doğrulamaktadır. Gruplar arası kıyaslamada E grubundaki IGF-1 miktarının tüm değerlendirme dönemlerinde hem kontrol grubundan hem de selenyum eklenen gruplardan (ES1,ES2 ve ES3) istatistiksel anlamlı seviyede yüksek olması ise α -tokoferol'ün yalnız başına periodontal ligament fibroblastlarından IGF-1 salınımını indüklemeye daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu azalma selenyumun ya periodontal ligament hücreleri üzerine yada α -tokoferol'e olan olumsuz etkisine bağlanabilir.

Periodontal ligament hücrelerinden salınan osteokalsin değerlerinin gruplar içerisinde kıyaslamasında; her grupta takip dönemlerinde istatistiksel bir artış saptanırken gruplar arası kıyaslamada antioksidanların kullanıldığı gruplardaki osteokalsin miktarının kontrol grubundan anlamlı seviyede yüksek bulunması α - tokoferol ve α - tokoferol+selenyum kombinasyonunun periodontal ligament fibroblastlarına pozitif etkileri olduğu ve osteokalsin salımını arttırabileceğini göstermektedir. E grubu ile ES1, ES2 ve ES3 grupları arasında takip dönemlerinde anlamlı bir farkın saptanamaması ise ilgili dozlardaki selenyumun α - tokoferol üzerine olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Gingival fibroblastlar, mezenkimal kök hücreler ve periodontal ligament fibroblastları ile yapılan Elisa sonuçlarına göre α - tokoferol ve/veya α - tokoferol+selenyum bazı medyatörlerin salımını yavaşlatabilirken, bazılarını arttırabilmekte bazılarını da etki etmeyebilmektedir. Benzer şekilde farklı hücre tiplerine göre farklı etkileri ortaya çıkabilmektedir. Bu veriler α - tokoferol ve selenyumun değişik hücre tiplerine farklı şekillerde etki ederek farklı medyatörlerin salınımlarını pozitif veya negatif yönde etkileyebileceğini veya doza bağımlı olarak bu etkileri gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; çalışmada kullanılan in vitro yara iyileşme modelinin gingival fibroblast, periodontal ligament fibroblastı ve mezenkimal kök hücrelerinde başarılı olarak çalıştığı ve periodontal yara iyileşmesinin biyolojik temellerinin araştırıldığı çalışmalarda da kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızın verileri proliferasyon oranları ile yara yüzeyini kapatma oranlarının birbirinden farklı olduklarını ve birbirlerinin yerine kullanılmamaları gerektiğini de ortaya koymaktadır. Alfa-tokoferolün tek başına ve selenyum ile değişen konsantrasyonlarda kombinasyonunun periodontal dokuları oluşturan hücrelerde sitotoksik etki yaratmadan erken dönem ya da geç dönem proliferatif etkileri ve yara iyileşme sürecine olumlu katkıları düşünülecek olursa bu antioksidanların ileride periodontal doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir alternatif olma potansiyaline sahip oldukları öngörülebilir. Ancak periodontal yara iyileşmesinde ve

rejenerasyonda uygun dozların tespiti için doz aralığının artırıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Çalışmamızda E vitamini ile birlikte selenyum uygulamasının hücre kültürü ortamında gingival fibroblast, mezenkimal kök hücre ve periodontal ligament hücreleri üzerine olan proliferatif etkileri deneysel olarak oluşturulmuş bir yara iyileşme modelinde in vitro olarak araştırılmıştır. Bu amaçla, XTT testi, yaramodeli deneyi ve elde edilen süpernatantlardan da spesifik biyokimyasal testler yapılmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde;

1. Gingival fibroblast hücreleri ile yapılan XTT testinde elde edilen sonuçlara göre grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; 48. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

2. XTT testinin 72. saat değerleri de tüm gruplarda 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

3. XTT testinin 72. saat değerleri K, E, ES1, ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak ES2 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

4. Hücre proliferasyonunda zamana bağlı artış olmasına rağmen aynı zaman dilimlerinde gruplar arasında benzer proliferasyon görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunamamıştır.

5. Mezenkimal kök hücreleri ile yapılan XTT testinde elde edilen sonuçlara göre grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; sadece ES1 grubunda 72. saat değeri 48 saat değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bunun dışında diğer grupların grup içi karşılaştırmasında tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

6. XTT değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunamamıştır.

7. Periodontal ligament fibroblastları ile yapılan XTT testinde elde edilen sonuçlara göre grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden E ve ES2 gruplarında istatistiksel olarak

anlamli derecede yu'kse'k, K, ES1 ve ES3 gruplarında istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

8. XTT testinin 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden E, ES2 ve ES3 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yu'kse'k, K ve ES1 gruplarında istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

9. XTT testinin 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden K, E ve ES2 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yu'kse'k, ES1 ve ES3 gruplarında istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

10. XTT testinin 24., 48. ve 72. saatlerinde hu're proliferasyonunda zamana bağlı artış olmasına rağmen aynı zaman dilimlerinde benzer proliferasyon oranları go'ru'mu's' ve istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı derecede farklılık sadece 72. saatte bulunmuştur. Bu farklılık incelendiğinde; ES2 grubunun K ve ES3 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yu'kse'k olduğu go'ru'mu's'tu'.

11. Gingival fibroblast yara modelinden elde edilen dolum yu'zdesi değerlerinin grup i'ci karşılaştırılması yapıldığında; tu'm gruplarda 24., 36., 48. ve 72. saat değerleri 12. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yu'kse'k bulunmuştur.

12. K, ES1, ES2 ve ES3 gruplarında 36., 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yu'kse'k bulunmuştur. E grubunda ise istatistiksel olarak fark yoktur.

13. K ve ES3 gruplarında 48. ve 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yu'kse'k bulunmuştur. E, ES1 ve ES2 grubunda ise istatistiksel olarak fark yoktur.

14. Tu'm gruplarda 72. saat değerlerinde 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak fark yoktur.

15. Gingival fibroblast yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum yu'zdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında; 12. saat dolum miktarı grubunda ES2 grubu K grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yu'kse'k bulunmuştur.

16. Mezenkimal ko'k hu're yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum yu'zdesi değerlerinin grup i'ci karşılaştırılması

yapıldığında; K, E ve ES3 gruplarında 24., 36., 48. ve 72. saat değerleri, ES1 ve ES2 gruplarında 36., 48. ve 72. saat değerleri 12. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES1 ve ES2 gruplarının 24 saat değerleri ise 12. saate göre istatistiksel olarak farksızdır.

17. K, E, ES1 ve ES3 gruplarında 36., 48. ve 72. saat değerleri, ES2 grubunda ise 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES2 grubunda 36. saat değeri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak farklı değildir.

18. K, E, ES3 gruplarında 48. saat değerleri ve K, E, ES1 ve ES3 gruplarında 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES1 grubunda 48. saat ve ES2 grubunda ise 48. ve 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı değildir.

19. K, E, ES1 gruplarında 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES2 ve ES3 gruplarında ise 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı değildir.

20. Mezenkimal kök hücre yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum yüzdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında; 48. saat dolum yüzdesi grubunda ES1, ES2 ve ES3 grupları K grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

21. Periodontal ligament fibroblastı yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum yüzdesi değerlerinin grup içi karşılaştırılması yapıldığında; E, ES1 ve ES3 gruplarında 24., 36., 48. ve 72. saat değerleri, K ve ES2 grubunun 36., 48. ve 72. saat değerleri, 12. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. K ve ES2 grubunun 24. saat değerleri 12. saat değerlerine göre istatistiksel olarak farksızdır.

22. K, E, ES1 ve ES3 gruplarında 36., 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES2 grubunda 36. 48. ve 72. saat değeri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak farklı değildir.

23. K, E, ES1 ve ES3 gruplarında 48. ve 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ES2 grubunda ise 48. ve 72. saat değerleri 36. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı değildir.

24. K ve ES1 gruplarında 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. E, ES2 ve ES3 grubunda ise 72. saat değerleri 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı değildir.

25. Periodontal ligament fibroblastı yara modelinden 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde elde edilen dolum yüzdeleri gruplar arası karşılaştırıldığında; ES1, ES2 ve ES3 gruplarında 12. saat dolum yüzdesi K grubundan, ES1 ve ES2 gruplarında 48. saat dolum yüzdesi ES3 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

26. Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; ES1, ES2 ve ES3 gruplarında 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak K ve E gruplarında 48. saat değerleri ile 24. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

27. Elisa testinin 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. ve 48. saat değerlerinden, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

28. Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF ELISA testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde 24. ve 48. saatte E grubu değerlerinin K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. E grubunun 72. saatte K ve ES1 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

29. Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları

yapıldığında; tüm gruplarda 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

30. Elisa testinin 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. ve 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

31. Gingival fibroblast hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde 24. saatte K grubu değerlerinin E, ES1 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, E grubu değerinin ise ES2 grubunun değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

32. Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; K, E ve ES3 gruplarında 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak ES1 ve ES2 gruplarında 48. saat değerleri ile 24. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

33. Elisa testinin 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

34. Elisa testinin 72. saat değerleri K, E, ES1 ve ES2 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak ES3 grubunda 72. saat değerleri ile 48. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

35. Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24. saatte K grubu değerlerinin E grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. K grubu değerlerinin 48. saatte E ve ES3 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca 48. saatte ES1 ve ES2 değerleri de ES3 değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür.

36. Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; tüm gruplarda 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

37. Elisa testinin 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

38. Elisa testinin 72. saat değerleri K, E ve ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak ES1 ve ES2 gruplarında 72. saat değerleri ile 48. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

39. Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24. saatte K grubu değerlerinin E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur.

40. K grubu değerlerinin 48. saatte E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, E grubu değerlerinin ise ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca 48. saatte ES3 değerinin ES1 değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

41. K grubu değerlerinin 72. saatte E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, E grubu değerlerinin ise ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca 72. saatte ES3 değerinin ES1 ve ES2 değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

42. Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan IGF-1 Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; E ve ES3 gruplarında 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak K, ES1 ve ES2

gruplarında aynı zaman diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

43. Elisa testinin 72. saat değerleri de E ve ES3 gruplarında 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. K, ES1 ve ES2 gruplarında aynı zaman diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

44. Elisa testinin 72. saat değerleri E ve ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. K, ES1 ve ES2 gruplarında 72. saat değerleri ile 48. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

45. Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan IGF Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24. saatte ES3 grubu değerlerinin K, E, ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

46. K grubu değerlerinin 48. saatte ES3 değerinden, 72. saatte ise ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur.

47. Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan OK Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; tüm gruplarda 48. saat değerleri 24. saat değerlerinden, 72. saat değerleri ise tüm gruplarda 24. ve 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

48. Mezenkimal kök hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan OK Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; üç saat diliminde de K grubu değerlerinin E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur.

49. Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları

yapıldığında; 48. ve 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

50. Elisa testinin 72. saat değerleri K, E ve ES3 gruplarında 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak ES1 ve ES2 gruplarında 72. saat değerleri ile 48. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamamıştır.

51. Periodontal ligament hücreleri ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan bFGF Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında her saat diliminde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24., 48. ve 72. saatlerde K grubu değerlerinin ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur.

52. Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; 48. ve 72. saat değerleri tüm gruplarda 24. saat değerlerinden, 72. saat değerleri de tüm gruplarda 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

53. Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan T1K Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde de istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24., 48. ve 72. saatlerde K grubu değerlerinin E, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca 48. saatte E grubu değerleri ES3 grubu değerlerine göre, 72. saatte ise ES3 grubu değerleri ES1 ve ES2 değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

54. Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan IGF-1 Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; E, ES1, ES2, ES3 gruplarında 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden, 72. saat değerleri de 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. K grubunda 24. 48. ve 72. saatle değerlerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır.

55. Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan IGF-1 Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında; her saat diliminde de istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; 24. saatte E grubu değerlerinin K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

56. Elisa testinin 48. saatinde K grubu değerlerinin E, ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca E grubunun 48. saat değerleri K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

57. Elisa testinin 72. saatinde K grubu değerlerinin E, ES1 ve ES2 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca E grubunun 72. saat değerleri K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

58. Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan OK Elisa testinde elde edilen sonuçların grup içi karşılaştırmaları yapıldığında; tüm gruplarda 48. ve 72. saat değerleri 24. saat değerlerinden, 72. saat değerleri de tüm gruplarda 48. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

59. Periodontal ligament fibroblastları ile 24., 48. ve 72. saatlerde yapılan OK Elisa testinde elde edilen sonuçlar gruplar arası karşılaştırıldıklarında her saat diliminde de istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmuştur. Bu farklılıklar incelendiğinde; üç saat diliminde de E grubu değerlerinin K, ES1, ES2 ve ES3 grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Al-Khateeb, T., Stephens, P., Shepherd, J.P., Thomas, D.W., An investigation of preferential fibroblast wound repopulation using a novel in vitro wound model, J Periodontol., Nov, 68(11), 1063-9, 1997.
2. Anitua, E., Troya, M., Orive, G., Plasma Rich in Growth Factors Promotes Gingival Tissue Regeneration by Stimulating Fibroblast Proliferation and Migration and by Blocking TGF- β 1-Induced Myodifferentiation, J Periodontol., [Epub ahead of print] Dec 6, 2011.
3. Anusakthien, O. ve Giannobile, W.V., Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues, Current Pharmaceutical Biotechnology, 3,129-139, 2002.
4. Arıkan, F., Becerik, S., Sönmez, Ş., Deliloğlu Gürhan, İ., Trombositten Zengin Plazmanın Farklı Konsantrasyonlarının Üç Farklı Hücre Üzerine Etkisi - Yeni in vitro yara iyileşmesi modeli, EÜ Dişhek Fak Derg; 28: 85-92, 2007.
5. Arinzeh, T.L., Peter, S.J., Archambault, M.P., van den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A., Kadiyala, S., Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect, J Bone Joint Surg Am 85-A(10), 1927-1935, 2003.
6. Artuc, M., Hermes, B., Steckelings, U.M., Grutzkau, A., ve Henz, B.M., Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders?, Exp Dermatol, 8, 1, 1999.
7. Asman, B., Wijkander, P., Hjerpe, A., Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium, J Clin Periodontol, Jan 21(1), 45-7, 1994.
8. Avcu, F., Mezenkimal Kök Hücrelerin Immunreglatuvar Fonksiyonları, THD, MKHK., s.4-16, 2008.
9. Ayaz, M., Can, B., Ozdemir, S., Turan, B., Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations, Biol Trace Elem Res,;89, 215-26, 2002.

10. Bartfay, W.J., Hou, D., Brittenham, G.M., Bartfay, E., Sole, M.J., Lehotay, D., Liu, P.P., The synergistic effects of vitamin E and selenium in iron-overloaded mouse hearts, *Can J Cardiol.*, Jul, 14(7), 937-41, 1998.
11. Bartold, P.M., Walsh, L.J., Narayanan, A.S., *Molecular And Cell Biology Of The Gingiva, Periodontology 2000*, Vol. 24, 28–55, 2000.
12. Battino, M., Bullon, P., Wilson, M., Newman, H., *Oxidative Injury And Inflammatory Periodontal Diseases: The Challenge Of Anti-Oxidants To Free Radicals And Reactive Oxygen Species*, *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(4), 458-476, 1999.
13. Baxter, M.E., Wynn, R., F., Jowitt, S., N., Wraith, J., Ed., Fairbairn, L., J., Bellantuono, I., Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion, *Stem Cells* 22, 675–682, 2004.
14. Becker, W., Becker, B., Periodontal regeneration updated, *J Am Dent Assoc.*, 124, 37-43, 1993.
15. Bendich, A., Antioxidant nutrients and immune functions, *Adv Exp Med Biol.*; 262:1-12, 1990.
16. Berberoğlu, A., Periodontal Dokuların İyileşmesinde Büyüme Faktörlerinin Rolü, *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, Cilt 31, Sayı 3, Sayfa 114-121, 2007.
17. Bobis, S., Jarocha, D., Majka, M., Mesenchymal stem cells: Characteristics and clinical applications, *Fol Histochemica Cytobiologica*, 44, 215-230, 2006.
18. Borsani, E., Salgarello, S., Mensi, M., Boninsegna, R., Stacchiotti, A., Rezzani, R., Sapelli, P., Bianchi, R., Rodella, L.F., Histochemical and immunohistochemical evaluation of gingival collagen and metalloproteinases in peri-implantitis, *Acta Histochem*, 107(3), 231-40, 2005.
19. Boscoboinik, D., Szewczyk, A., Hensey, C., Azzi, A., Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C., *J Biol Chem*, Apr 5, 266(10), 6188-94 1991.

20. Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G., Vitamin E: function and metabolism, *FASEB J.* Jul 13(10), 1145-55, 1999.
21. Brooke, G. ve ark., Therapeutic application of mesenchymal stromal cells, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18, 846–858, 2007.
22. Burk, R.F., Selenium, An Antioxidant Nutrient, *Nutr Clin Care*, Mar-Apr 5(2), 75-9, 2002.
23. Burk, R.F., Selenium: Recent Clinical Advances, *Current Opinion in Gastroenterology*, 17, 162-166, 2001.
24. Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K. U., Is Vitamin E Only Lipid-Soluble, Chain-Breaking Antioxidant in Human Blood Plasma and Erythrocyte Membranes? *Arch. Biochem. Biophys*, 221(1), 281-290, 1983.
25. Cai, X., Li, C., Du, G., Cao, Z., Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats, *J Periodont Res*, 43, 14-21, 2008.
26. Carlson, N.E., Roach, R.B., Platelet-rich plasma. Clinical applications in dentistry, *J Am Dent Assoc.*, 133, 1383-1386, 2002.
27. Carranza, F.A., Bernard, G.W., Carranza's Clinical Periodontology, The Tooth-Supporting Structures, 9TH ED, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 36-57, 2002.
28. Chan, K.M., Decker, E.A., Endogenous skeletal muscle antioxidants, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 34(4), 403-26, 1994.
29. Chen, X., Mikhail, S.S., Ding, Y.W., Yang, G., Bondoc, F., Yang, C.S., Effects of vitamin E and selenium supplementation on esophageal adenocarcinogenesis in a surgical model with rats, *Carcinogenesis*, Aug, 21(8), 1531-6, 2000.
30. Cho, M.I., Garant, P.R., Development and general structure of the periodontium, *Periodontol* 2000, Oct, 24, 9-27, 2000.
31. Clark, R.A., Fibrin and wound healing, *Ann N Y Acad Sci*, 936, 355 2001.

32. Cohen, M.E., Meyer, D.M., Effect of dietary vitamin E supplementation and rotational stress on alveolar bone loss in rice rats, *Archives of Oral Biology*, Volume 38, Issue 7, July, s601-606, 1993.
33. Çay, H.F., Sezer, N., Kemik Yapısı ve Kemik Döngüsü Üzerine Bir Derleme, *Fiziksel Tıp*, 5(3), 177-184, 2002.
34. Dalglish, R., The Human Type I Collagen Mutation Database, *Nucleic Acids Res*, 25, 1, 181–187, 1997.
35. Debiais, F., Debiais, F., Lefèvre, G., ve ark., Fibroblast growth factor2 induces osteoblast survival through a phosphatidylinositol 3kinasedependent, betacatenindependent signaling pathway, *Exp Cell Res*, 297, 23546, 2004.
36. Desmoulière, A., Darby, IA., Gabbiani, G., Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis, *Lab Invest.*, Dec, 83(12), 1689-707, 2003
37. Di Paola, R., Mazzon, E., Zito, D., Maier, D., Britti, D., Genovese, T., Cuzzocrea, S., Effects of tempol, a membrane permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis, *J Clin Periodontol*, 32, 1062-8, 2005.
38. Diegelmann, R.F., Evans, M.C., Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing, *Front Biosci*, 9, 283-9, 2004.
39. Diplock, A.T., Trace Elements in Human Health With Special Reference To Selenium, *Am J Clin Nutr*, May 45(5 Suppl), 1313-22, 1987.
40. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E.. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8, 315-7 2006.
41. Dökmeci, İ., *Farmakoloji Temel Kavramlar*, İstanbul, Nobel, 703-704, 718-719, 2000.
42. Duntas, L.H., Selenium and Inflammation: Underlying Anti-inflammatory Mechanisms, *Horm Metab Res*, 41, 443 – 447, 2009.

43. Durak, K., Sonmez, G., Sarisozen, B., Ozkan, S., Kaya, M., Ozturk, C., Histological assessment of the effect of alpha-tocopherol on fracture healing in rabbits, *J Int Med Res*, Jan-Feb 31(1), 26-30, 2003.
44. Dutta, A., Dutta, S.K., Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review, *J Am Coll Nutr*, Aug 22(4), 258-68, 2003.
45. Ebert, R., Ulmer, M., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., Selenium Supplementation Restores the Antioxidative Capacity and Prevents Cell Damage in Bone Marrow Stromal Cells In Vitro, *Stem Cells*, 24, 1226–1235, 2006
46. Egger, T., Schuligoi, R., Wintersperger, A., Amann, R., Malle, E., Sattler, W., Vitamin E (alpha-tocopherol) attenuates cyclo-oxygenase 2 transcription and synthesis in immortalized murine BV-2 microglia, *Biochem J*. Mar 1, 370(Pt 2), 459-67, 2003.
47. Engin, A., . Yara iyileşmesi In: Temel Cerrahi. Edited by Sayek, İ., 3. Baskı Güneş Kitabevi, Ankara, s266-277, 2004.
48. Everts, P.A., Knape, J.T., Weibrich, G., Schönberger, J.P., Hoffmann, J., Overvest, E.P., Box, H.A., van Zundert, A., Platelet rich plasma and platelet gel, A review, *J Extra Corpor Technol*, 38(2), 174-187, 2006.
49. Fiala, E.S., Reddy, B.S., Weisburger, J.H., Naturally occurring anticarcinogenic substances in foodstuffs, *Annu Rev Nutr*, 5:295-321, 1985.
50. Flemmig, T.F., Periodontitis, *Ann Periodontol*, 4, 32-37, 1999.
51. Fox, J.M., Selenium: Nutritional Implications and Prospects for Therapeutic Medicine, *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, 14(4), 275-287, 1992.
52. Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., Kulagina, N.N., Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs, *Exp Hematol*, 4, 267-74, 1976.
53. Fujita, K., Iwasaki, M., Ochi, H., Fukuda, T., Ma, C., Miyamoto, T., Takitani, K., Negishi-Koga, T., Sunamura, S., Kodama, T., Takayanagi, H., Tamai, H., Kato, S., Arai, H., Shinomiya, K., Itoh, H., Okawa, A., Takeda, S.,

Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion, *Nat Med.*, Mar 4, 18(4), 589-94, 2012.

54. Giannobile, W.V., Lee, C.S., Tomala, M.P., Tejeda, K.M., Zhu, Z., Platelet derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering, *J Periodontol* 72, 815-823, 2001.

55. Giordino, A., Galderesi, U., Marino, I.R., From the laboratory bench to the patients bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells, *J Cell Physiol*, 211, 27-35, 2007.

56. Gotherstrom, C., West, A., Liden, J., Uzunel, M., Lahesmaa, R., Le Blanc, K., Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells, *Haematologica*, 90, 1017-1026, 2005.

57. Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., Wennstrom, J., New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration, Case reports, *J Clinical Periodontol.*,13, 604-616, 1986.

58. Graves, D.T., Cochran, D.L., Mesenchymal Cell Growth Factors, *Oral Biology and Medicine*, 1(1), 17-36, 1990.

59. Hacquebard, M., Carpentier, Y.A., Vitamin E: absorption, plasma transport and cell uptake, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, Mar, 8(2), 133-8, 2005.

60. Hakkı, S.S., Nohutcu, R.M., Basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF) ve Dexamethasone (Dex)'un Pre-osteoblastların (MC3T3-E1) Proliferasyonu, Total Protein Miktarı ve Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi, *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, Cilt 29, Sayı 4, Sayfa 42-50, 2005.

61. Haspolat, K., Söker, M., Kemiğe Ait Biyokimyasal Değerler ve Onkoloji, *Dicle Tıp Dergisi*, C29, S3, 2002.

62. Hassell, T.M., Tissues and cells of the periodontium, *Periodontology* 2000, Vol 3, 9-38, 1993.

63. Herrera, E., Barbas, C., Vitamin E: action, metabolism and perspectives, *J Physiol Biochem*, Mar 57(2), 43-56, 2001.
64. Hoang, A.M., Oates, T.W., Cochran, D.L., In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative, *J Periodontol.*, Aug, 71(8), 1270-7, 2000.
65. Hornstra, I.K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A.J., Mecham, R.P., Shapiro, S.D., Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice, *J Biol Chem*, 278, 14387, 2003.
66. Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Fitzpatrick, L.A., Koo, W.W., Gordon, P.L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J.C., Pyeritz, R.E., Brenner, M.K., Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta, *Nat Med* 5(3), 309-313, 1999.
67. Howell, T.H., Fiorellini, J.P., Paquette, D.W., Offenbacher, S., Giannobile, W.V., Lynch, S.E., A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease, *J Periodontol* 68, 1186-1193, 1997.
68. Hughes, F.J., Turner, W., Belibasakis, G., Martuscelli, G., Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation, *Periodontology* 2000, 41, 48-72, 2006.
69. Hunt, T.K., The physiology of wound healing, *Ann Emerg Med.*, Dec., 17(12), 1265-73, 1988.
70. Ivanovski, S., Gronthos, S., Shi, S., Bartold, P.M., Stem cells in the periodontal ligament, *Oral Dis.*, Jul, 12(4), 358-63, 2006.
71. Janos, Z., Krishnamurti, D., *Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and cell signaling*, Taylor & Francis, Önsöz, 2005.
72. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie,

C.M., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, Nature, 418, 41-9, 2002.

73. Kao, R.T., Conte, G., Nishimine, D., Dault, S., Tissue engineering for periodontal regeneration., Calif Dent Assoc 33, 205-215, 2005.

74. Karaöz, E., Ovalı, E., Kök Hücreler, ATİ Teknoloji A.Ş., Trabzon, s92-93, 2004.

75. Kayaalp, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11. Baskı, Ankara, Hacettepe-Taş, 1316-21, 2005.

76. Kayden, H.J., Traber, M.G., Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans, J Lipid Res, Mar 34(3), 343-58, 1993.

77. Kayden, H.J., Traber, M.G., Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans, J Lipid Res, Mar 34(3), 343-58, 1993.

78. Kazanc, M.B., Antioksidan vitaminler, Sendrom, Tem, 14-22, 1997.

79. Kim, J.E., Shklar, G., The effect of vitamin E on the healing of gingival wounds in rats, J Periodontol, May 54(5), 305-8, 1983.

80. Koya, D., Haneda, M., Kikkawa, R., King, G.L., d-alpha-tocopherol treatment prevents glomerular dysfunctions in diabetic rats through inhibition of protein kinase C-diacylglycerol pathway, Biofactors, 7(1-2), 69-76, 1998.

81. Köhrle, J., Jakob, F., Contempré, B., Dumont, J.E., Selenium, the thyroid, and the endocrine system, Endocr Rev., 26, 944-984, 2005.

82. Kurtiş, B., Rejeneratif Periodontal Tedavide Doku Mühendisliği Yaklaşımları, GÜ Diş Hek Fak Derg, 25 (1), 51-57, 2008.

83. Lackler, K.P., Cochran, D.L., Hoang, A.M., Takacs, V., Oates, T.W., Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells, J Periodontol., Feb, 71(2), 226-37, 2000

84. Lacoste, E., Martineau, I., Gagnon, G., Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release, *J Periodontol*, 74(10), 1498-507, 2003.
85. LaVan, F.B., Hunt, T.K., Oxygen and wound healing, *Clin Plast Surg*, 17, 463, 1990.
86. Lee, Y. M., Nam, S.H., Seol, Y.J., Kim, T.I., Lee, S.J., Ku, Y., Rhyu, I.C., Chung, C.P., Han, S.B., Choi, S.M., Enhanced bone augmentation by controlled release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from bioabsorbable membranes, *J Periodontol* 74, 865-872, 2003.
87. Leitaó, R.F.C., Rocha, F.A.C., Chaves, H.V., Lima, V., Cunha, F.Q., Ribeiro, R.A., Brito, G.A.C., Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats, *J Periodontol*, 75, 1227-32, 2004.
88. Linden, G.J., McClean, K.M., Woodside, J.V., Patterson, C.C., Evans, A., Young, I.S., Kee, F., Antioxidants and periodontitis in 60-70-year-old men, *J Clin Periodontol*, Oct, 36(10), 843-9, 2009.
89. Lindhe, J., Karring, T., Araújo, M., *Clinical Periodontology and Implant Dentistry, The Anatomy of Periodontal Tissues*, 5TH ED, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, s3-49, 2008.
90. Lockitch, G., Selenium: Clinical Significance And Analytical Concepts, *Crit Rev Clin Lab Sci*, 27(6), 483-541, 1989.
91. Lynch, S.E., Current techniques and concepts in periodontal therapy. In: Polson AM. *The Role of Growth Factors in Periodontal Repair and Regeneration*: Alan R. Liss. New York USA., 179-198, 1994.
92. McAnulty, R.J., Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 39(4), 666-71, 2007.
93. McCauley, L.K., Somerman, M.J., Biologic modifiers in periodontal regeneration, *Dent Clin North Amer*, 42, 361-387, 1998.
94. Meydani, M., Vitamin E, *Lancet*, Jan 21, 345(8943), 170-5, 1995.

95. Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., ve ark., Disruption of the fibroblast growth factor2 gene results in decreased bone mass and bone formation, J Clin Invest, 105, 1085-93, 2000.
96. Moreno-Reyes, R., Ergise, D., Neve, J., Pasteels, J.L., Schoutens, A., Selenium Deficiency-Induced Growth Retardation Is Associated With An Impaired Bone Metabolism And Osteopenia, J Bone Miner Res, Aug 16(8), 1556-63, 2001.
97. Mumford, J.H., Carnes, D.L., Cochran, D.L., Oates, T.W., The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model, J Periodontol, Mar, 72(3), 331-40, 2001.
98. Mumford, J.H., Carnes, D.L., Cochran, D.L., Oates, T.W., The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model, J Periodontol, 72(3), 331-40, 2001.
99. Murakami, S., Takayama, S., Ikezawa, K., Shimabukuro, Y., Kitamura, M., Nozaki, T., Terashima, A., Asano, T., Okada, H., Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor, J Periodontal Res 34, 425-430, 1999.
100. Nelson, H.D., Helfand, M., Screening for postmenopausal osteoporosis, Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US), Sep., 2002.
101. Noff, D., Pitaru, S., Savion, N., Basic fibroblast growth factor enhances the capacity of bone marrow cells to form bonelike nodules in vitro, FEBS Lett, 250, 619-21, 1989.
102. Novak, M.J., Carranza's Clinical Periodontology, Classification of diseases and conditions affecting the periodontium, 9 th. Ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, 64-73, 2002.
103. Oates, T.W., Mumford, J.H., Carnes, D.L., Cochran, D.L., Characterization of proliferation and cellular wound fill in periodontal cells using an in vitro wound model, J Periodontol, 72(3), 324-30, 2001.
104. Oh, T.Y., Yeo, M., Han, S.U., Cho, Y.K., Kim, Y.B., Chung, M.H., Kim, Y.S., Cho, S.W., Hahm, K.B., Synergism of Helicobacter Pylori infection and

stress on the augmentation of gastric mucosal damage and its prevention with α -tocopherol, *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 1447-57, 2005.

105. Otsuka, K., Yao, K.L., Wasi, S., Tung, P.S., Aubin, J.E., Sodek, J., Termine, J.D., Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells in vitro, *J Biol. Chem.*, 259, 9805-9812, 1984.

106. Ovalı, E., Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları ve Üretimi, THD, MKHK. s7-10, 2008.

107. Parks, W.C., Matrix metalloproteinases in repair, *Wound Repair Regen*, 7, 423, 1999.

108. Pavel, L., Pave, S., Usefulness of micronutrients in the treatment of periodontitis, *Ned Tijdschr Tandheelkd*, Feb, 117(2), 103-6, 2010.

109. Percival, M., Antioxidants, *Clinical Nutrition Insights*, Nut 031, 1/96 10/98.

110. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7, 1999.

111. Power, R.A., Iwaniec, U.T., Wronski, T.J., Changes in gene expression associated with the bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in aged ovariectomized rats, *Bone*, 31, 1438, 2002.

112. Prabhu, K.S., Zamamiri-Davis, F., Stewart, J.B., Thompson, J.T., Sordillo, L.M., Reddy, C.C., Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor- κ B in up-regulation, *Biochem. J*, 366, 203-9, 2002.

113. Rayman, M.P., The Argument For Increasing Selenium Intake, *Proc Nutr Soc*, May 61(2), 203-15, 2002.

114. Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I., Ancans, J., Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions, *Cytotechnology*, Nov, 58(3), 153-62, 2008.

115. Rock, C.L., Jacob, R.A., Bowen, P.E., Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids, *J Am Diet Assoc*, Jul 96(7), 693-702, 1996.
116. Royack, G.A., Nguyen, M.P., Tong, D.C., Poot, M., Oda, D., Response of human oral epithelial cells to oxidative damage and the effect of vitamin E, *Oral Oncology* 36, 37-41, 2000.
117. Rozman, P., Bolta, Z., Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, Review*,16(4), 156-65, 2007.
118. Russell, R.G.G., The assesment of bone metabolism in vivo using biochemical approaches. *Horm Metab Res*, (29), 138,144, 1997.
119. Sage, H., Johnson, C., and Bornstein, P., Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture, *j Biol. Chem*, 259, 3993-4007, 1984.
120. Sage, H., Pritzl, P., and Bornstein, P., Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: comparison of aortic, venous, capillary, and corneal endothelium, *Arteriosclerosis* 1, 427-422, 1981.
121. Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa T., Takahashi, K., Niki, E., Cell Death Caused by Selenium Deficiency and Protective Effect of Antioxidants, *The Journal Of Biological Chemistry*, 278, 41, 39428–39434, 2003.
122. Sanchez, A.R., Sheridan, P.J., Kupp, L.I., Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18(1), 93-103, 2003.
123. Sarisozen, B., Durak, K., Dincer, G., Bilgen, O.F., The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats.*J Int Med Res*, May-Jun 30(3), 309-13, 2002.
124. Saygin, N.E., Giannobile, W.V., Somerman, M.J., Molecular and cell biology of cementum, *Periodontol* 2000, Oct,24, 73-98, 2000.

125. Schnabel, R., Lubos, E., Messow, C.M., Sinning, C.R., Selenium supplementation improves antioxidant capacity in vitro and in vivo in patients with coronary artery disease: The SElenium Therapy in Coronary Artery disease Patients (SETCAP) Study, *Am Heart J*, 156, 1201.e1-1201.e11, 2008.
126. Schneider, C., Chemistry and biology of vitamin E, *Mol Nutr Food Res*, Jan 49(1), 7-30, 2005.
127. Schoenmakers, E., Agostini, M., Mitchell, C. ve ark., Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans, *J Clin Invest*, 120, 4220–4235, 2010.
128. Schroeder, H.E., Listgarten, M.A., The gingival tissues: the architecture of periodontal protection, *Periodontol* 2000. Feb, 13, 91-120, 1997.
129. Schultz, G., Rotatori, D.S., Clark, W., EGF and TGF- α in wound healing and repair, *J Cell Biochem*, 45, 346, 1991.
130. Schwenke, D.C., Behr, S.R., Vitamin E combined with selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations, *Circ Res.*, Aug, 24, 83(4), 366-77, 1998.
131. Sensebe, L., Clinical grade production of mesenchymal stem cells, *Bio-Med Mat Eng.*, 18, 3-10, 2008.
132. Seven, A., Candan, G., Antioksidant defense systems, *Cerrahpasa J Med*, 27, 41-50, 1996.
133. Shuid, A.N., Mohamad, S., Muhammad, N., Fadzilah, F.M., Mokhtar, S.A., Mohamed, N., Soelaiman, I.N., Effects of α -tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing, *J Orthop Res*, Nov, 29(11), 1732-8, 2011.
134. Sies, H., Stahl, W., Sundquist A.R., Antioxidant functions of vitamins, Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids, *Ann N Y Acad Sci*, Sep 30, 669, 7-20, 1992.

135. Slots, J., MacDonald, E.S., Nowzari, H., Infectious aspects of periodontal regeneration, *Periodontology* 2000, 19,164–72, 1999.
136. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., *Clinical Periodontology and Implant Dentistry, Periodontal Infections*, 5TH ED, Blackwell Publishing Ltd., 207-267, 2008.
137. Sodek J., McKee, M.D., Molecular and cellular biology of alveolar bone, *Periodontology* 2000, Vol. 24, 99–126, 2000.
138. Sodhi, S., Sharma, A., Brar, A.P.S., Brar, R.S., Effect of α tocopherol and selenium on antioxidant status, lipid peroxidation and hepatopathy induced by malathion in chicks, *Pestic Biochem Physiol*, 90, 82–6, 2008.
139. Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R., Foster, R.A., A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, *J Dent Res*, 67, 66-70, 1988.
140. Steed, D.L., Modifying the wound healing response with exogenous growth factors, *Clin Plast Surg.*, 25(3), 397-405, 1998.
141. Steinbrenner, H., Sies, H., Protection against reactive oxygen species by selenoproteins, *Biochim Biophys Acta*, 1790, 1478–1485, 2009.
142. Sucak, Türköz, G., Hematolojik Hastalıklarda Mezankimal Kök Hücre, *THD, MKHK*, s17-20, 2008.
143. Suzuki, Y.J., Packer, L., Inhibition of NF-kappa B DNA binding activity by alpha-tocopheryl succinate, *Biochem Mol Biol Int.*, Nov, 31(4), 693-700, 1993.
144. Taba, M.Jr., Jin, Q., Sugai, J.V., Giannobile, W.V., Current concepts in periodontal bioengineering, *Orthod Craniofac Res.*, Nov, 8(4), 292-302, 2005.
145. Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L., Martin, G.R., Osteonectin, a bonespecific protein linking mineral to collagen, *Cell* 26, 99-105, 1981.
146. Tokumitsu, A., Wakitani, S., Takagi, M., Noninvasive estimation of cell cycle phase and proliferation rate of human mesenchymal stem cells by phase-shifting laser microscopy, *Cytotechnology*, Apr, 59(3), 161-7, 2009.

147. Tonnesen, M.G., Feng, X., Clark, R.A., Angiogenesis in wound healing, *J Invest Dermatol Symp Proc*, 5, 40, 2000.
148. Turan, B., Balcik, C., Akkas, N., Effect of dietary selenium and vitamin E on the biomechanical properties of rabbit bones, *Clin Rheumatol*, Sep 16(5), 441-9, 1997.
149. Turk, C., Halici, M., Guney, A., Akgun, H., Sahin, V., Muhtaroglu, S., Promotion of fracture healing by vitamin E in rats, *J Int Med Res.*, Sep-Oct, 32(5), 507-12, 2004.
150. Ural, A.U., Kas-İskelet Sistemi Hastalıklarında Mezankimal Kök Hücre Kullanımı, THD, MKHK, s21-23, 2008.
151. Wetherilt, H., Beslenme ve Kanser 2, Vitamin ve Mineraller, 23,47,1991.
152. Wolf, G., The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill, *J Nutr*, Mar 135(3), 363-6, 2005.
153. www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-23.pdf, [10/10/2011]
154. Yamaguchi, N., Mezaki, Y., Miura, M., Imai, K., Morii, M., Hebiguchi, T., Yoshikawa, K., Antiproliferative and proapoptotic effects of tocopherol and tocol on activated hepatic stellate cells, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 57(5), 317-25, 2011.
155. Yan, J., Tian, J., Zheng, Y., Han, Y., Lu, S., Selenium promotes proliferation of chondrogenic cell ATDC5 by increment of intracellular ATP content under serum deprivation, *Cell Biochem Funct.*, May 29, 2012.
156. Yan, Qi., Sage, E.H., SPARC, a Matricellular Glycoprotein with Important Biological Functions, *J Histochem Cytochem*, 47, 1495–1505, 1999.
157. Yılmaz, M., Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması ve Fenotipik Özellikleri, THD, MKHK, s11-13, 2008.
158. Yoo, J.U., Barthel, T.S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Johnstone, B., The chondrogenic potential of human bone-

marrow-derived mesenchymal progenitor cells, J Bone Joint Surg Am., 80, 1745-57, 1998.

159. Zhang, X., Sobue, T., Hurley, M.M., FGF2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF1 mRNA in mouse marrow stromal cells, Biochem Biophys Res Commun, 290, 52631, 2002.

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
ETİK KURUL TOPLANTI RAPORU

OTURUM NO : 175
OTURUM TARİHİ : 07 Haziran 2011
OTURUM BAŞKANI : Prof. Dr. Ecz. Kd. Alb. Adnan ATAÇ
OTURUM SEKRETERİ : Prof. Tbp. Kd. Alb. Ali Uğur URAL

GATA Etik Kurulu'nun 07 Haziran 2011 günü yapılan 175. oturumunda, GATF Periodontoloji AD'dan J. Diş. Tbp. Ütğm. Feridun DİŞÇİOĞLU'nun sorumlu araştırmacılığını yaptığı "Vitamin E İle Kombine Selenyum Uygulamasının Periodontal Dokuların Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Hücre Kültürü Ortamında Değerlendirilmesi" başlıklı, tek merkezli, hücre kültürü çalışması olan araştırma dosyası değerlendirildi.

Araştırma dosyasının amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere UYGUN olduğuna karar verildi.

BAŞKAN
Adnan ATAÇ
Prof.Dr.Ecz.Alb.

ÜYE
Orhan KOZAK
Prof.Hv.Tbp.Alb.

ÜYE
Cem TAYFUN
Prof.Dz.Tbp.Alb.

ÜYE
Ali Uğur URAL
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE
Y. Merc. TUNCA
Prof.Dz.Tbp.Alb.

ÜYE
Ali ALBAY
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE
F.Mehmet MUTLU
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE
Serik GURAN
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE
Fuat TOSUN
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE
Mahir GÜLEÇ
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE
Fatih ÖZDAĞ
Doç.Dz.Tbp.Alb.

ÜYE
Toplantıya Katılmadı
Aygül AKYÜZ
Doç.Dr.Sağ.Alb.

ÜYE
Harun TUĞCU
Doç.Tbp.Yb.

GÖNÜLLÜLERİ BİLGİLENDİRME VE OLUR (RIZA) FORMU (GİNGİVAL FİBROBLASTLAR İÇİN)

GATA Periodontoloji AD ve GATA Arş. ve Gel. Mrk. Bşk.lığı Kansere Tıbbi Arş. Lab. tarafından yürütülen bu çalışmada, dişin çevre dokularında bulunan hücre çeşitleri kullanılarak vitamin E ile kombine selenyum uygulamasının periodontal dokuların rejenerasyonu üzerine etkisinin hücre kültürü ortamında değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada, yaptırmış olduğunuz diş implantının protezinin yapılabilmesi için üzerinin açılması esnasında çıkartılan ve normalde çöpe atılacak olan dişetiniz kullanılacaktır. Çalışmaya dahil olmanız bile protezinizin yapılabilmesi için aynı dişetinin çıkartılması gerekecektir. Çalışmaya dahil olmanız halinde ise normalde yapılması gereken işlemden farklı bir uygulama yapılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir veya verilmeyecektir.

Çalışmaya dair her sorunda J.Diş Tbp.Kd.Ütğm. Feridun DİŞÇİOĞLU ile direkt temasa geçilebilir. Telefon: 3046037.

Bu araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Araştırma başladıktan sonra devam etmek istemediğinizde, araştırmadan ayrılma hakkına sahipsiniz. Kendi rızasına bakılmaksızın araştırma harici bırakılabilirsiniz. Araştırmaya katılma önerisini kabul etmediğinizde ya da kabul ettiğiniz takdirde araştırmanın herhangi bir aşamasında araştırmayı bıraktığınızda yapılacak uygulamalarda hiç bir aksaklık olmayacaktır.

Sorumlu Araştırmacı:

J.Diş Tbp.Kd.Ütğm. Feridun DİŞÇİOĞLU

Diğer Araştırmacılar:

Prof.Diş Tbp.Alb.İşıl SAYGUN

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Laboratuvar Araştırma için kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, İmzası, Görevi:

**GÖNÜLLÜLERİ BİLGİLENDİRME VE OLUR (RIZA) FORMU
(PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARI İÇİN)**

GATA Periodontoloji AD ve GATA Arş. ve Gel. Mrk. Bşk.lığı Kanser-Tıbbi Arş. Lab. tarafından yürütülen bu çalışmada, dişin çevre dokularında bulunan hücre çeşitleri kullanılarak vitamin E ile kombine selenyum uygulamasının periodontal dokuların rejenerasyonu üzerine etkisinin hücre kültürü ortamında değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada, ortodontik tedavinizin gereği olarak çekilecek ve çöpe atılacak olan dişiniz kullanılacaktır. Çalışmaya dahil olmanız bile ortodontik tedavinizin devam edebilmesi için bu dişinizin çekilmesi gerekecektir. Çalışmaya dahil olmanız halinde ise normalde yapılması gereken işlemden farklı bir uygulama yapılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir veya verilmeyecektir.

Çalışmaya dair her sorunda J.Diş Tbp.Kd.Ütğm. Feridun DİŞÇİOĞLU ile direkt temasa geçilebilir.

Telefon: 3046037.

Bu araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Araştırma başladıktan sonra devam etmek istemediğinizde, araştırmadan ayrılma hakkına sahipsiniz. Kendi rızasına bakılmaksızın araştırma harici bırakılabilirsiniz. Araştırmaya katılma önerisini kabul etmediğiniz ya da kabul ettiğiniz takdirde araştırmanın herhangi bir aşamasında araştırmayı bıraktığınızda yapılacak uygulamalarda hiç bir aksaklık olmayacaktır.

Sorumlu Araştırmacı:

J.Diş Tbp.Kd.Ütğm. Feridun DİŞÇİOĞLU

Diğer Araştırmacılar:

Prof.Diş Tbp.Alb.İşıl SAYGUN

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Laboratuvar Araştırma için kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, İmzası, Görevi:

**GÖNÜLLÜLERİ BİLGİLENDİRME VE OLUR (RIZA) FORMU
(MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İÇİN)**

GATA Periodontoloji AD ve GATA Arş. ve Gel. Mrk. Bşk.lığı Kansere Tıbbi Arş. Lab. tarafından yürütülen bu çalışmada, dişin çevre dokularında bulunan hücre çeşitleri kullanılarak vitamin E ile kombine selenyum uygulamasının periodontal dokuların rejenerasyonu üzerine etkisinin hücre kültürü ortamında değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışma için, Hematoloji kliniğinde hastalığınızın teşhis edilebilmesi için sizden alınan kemik iliğinin, teşhis konduktan sonra normalde çöpe atılması gereken kısmı bu çalışmada kullanılacaktır. Size bu çalışmaya dahil olmanız halinde ayrıca herhangi bir işlem yapılmayacaktır. Kemik iliğinizin alınma işlemi Hematoloji BD doktorları tarafından size izah edildiği şekilde yapılacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir veya verilmeyecektir.

Çalışmaya dair her sorunda J.Diş Tbp.Kd.Ütğm. Feridun DİŞÇİOĞLU ile direkt temasa geçilebilir. Telefon: 3046037.

Bu araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Araştırma başladıktan sonra devam etmek istemediğinizde, araştırmadan ayrılma hakkına sahipsiniz. Kendi rızasına bakılmaksızın araştırma harici bırakılabilirsiniz. Araştırmaya katılma önerisini kabul etmediğiniz ya da kabul ettiğiniz takdirde araştırmanın herhangi bir aşamasında araştırmayı bıraktığınızda yapılacak uygulamalarda hiç bir aksaklık olmayacaktır.

Sorumlu Araştırmacı:

J.Diş Tbp.Kd.Ütğm. Feridun DİŞÇİOĞLU

Diğer Araştırmacılar:

Prof.Diş Tbp.Alb.İşıl SAYGUN

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Laboratuvar Araştırma için kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, İmzası, Görevi:

