

T.C.
GENEL KURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞHEKİMLİĞİ BİLİMLERİ MERKEZİ
ORTODONTİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**AĞRI KONTROLÜNDE KULLANILAN BENZİDAMİN HCl'ÜN
OSTEOBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Enver Akın ÖZKAN
J.Diş Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
Ortodonti Doktora Programı
Doktora Tezi

ANKARA
2008
T.C.

GENEL KURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞHEKİMLİĞİ BİLMİLERİ MERKEZİ
ORTODONTİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**AĞRI KONTROLÜNDE KULLANILAN BENZİDAMİN HCl'ÜN
OSTEOBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Enver Akın ÖZKAN

J.Diş Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünün
Ortodonti Doktora Programı
İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Hüseyin ÖLMEZ
Doç. Dr. Diş Tbp. Kd. Alb.

**ANKARA
2008**

GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne:

“Ağrı Kontrolünde Kullanılan Benzidamin HCl’ün Osteoblast Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Hücre Kültürü Çalışmaları ile Değerlendirilmesi ” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Ortodonti Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç.Dr.DişTbp.Kd.Alb. Hüseyin ÖLMEZ

ÜYE : Prof.Dz.DişTbp.Kd.Alb. Deniz SAĞDIÇ, GATA Ortodonti AD.

ÜYE : Prof.Dr. Ali S.GÜLTAN, Gazi Üniversitesi Ortodonti AD.

ÜYE : Prof.Tbp.Kd.Alb Ali Uğur URAL, GATA Hematoloji BD.

ÜYE : Doç.DişTbp.Kd.Alb. A.Osman BENGİ, GATA Ortodonti AD.

ONAY:

J.DişTbp.Yzb. Enver Akın ÖZKAN’ nın 25.06.2008 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Tahir ÜNAL
Prof. Tbp. Tuğg.
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Md.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulunun 12 OCAK 2007 gün ve 183 Sayılı kararı gereği GATA Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Ortodonti Anabilim Dalı, Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kanseri Araştırma Kısmı, Biyokimya ve Kl. Biyokimya Anabilim Dalı, Eczacılık Bilimleri Merkez Başkanlığı, Mikrobiyoloji ve Kl. Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır.

Bu çalışmada ağırlı kontrolünde kullanılan Benzidamin HCl' ün osteoblast hücreleri üzerindeki etkilerinin hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamda bana her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen Ortodonti Anabilim Dalı Başkanım Sayın Prof.Dr. Deniz SAĞDIÇ ve Doç.Dr. Osman BENLİ' ye, tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Hüseyin ÖLMEZ' e tüm Asistan arkadaşlarıma ve Ortodonti AD. Personeline teşekkürü bir borç bilirim. Tezin tüm aşamalarında yardımlarını gördüğüm Sayın Dr. İbrahim ÖZKURT' a; deneylerin yapılmasında bilgisini, emeğini ve bölümlerinin imkânlarını paylaşmaktan çekinmeyen Sayın Prof.Dr.Ali Uğur URAL' a ve Yrd.Doç.Dr. Adnan HAŞİMİ' ye; hücre kültürü laboratuvarında, kültürün hazırlanmasında, idamesinde ve deneylerde her türlü emeklerini esirgemeyen Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kanseri Araştırma Kısmı personeli Biyolog Meral SARPİR ve Pınar ELÇİ' ye; PCR aşamasında Lab.Yakup ALPTEKİN' e; Histokimyasal değerlendirmeler aşamasında GATA Eczacılık Bilimleri Merkez Başkanlığı personeli ve Biyolog Ayşe EKEN' e; istatistiksel analizlerinin yapılmasındaki çalışma ve yorumlarından dolayı Sayın Doç.Dr. Erol AKIN ve Yavuz SANISOĞLU'na müteşekkirim.

Ayrıca tezimin hazırlanması sırasında benden desteğini asla esirgemeyen sevgili eşim Cansel ÖZKAN' a; sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

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

ÖZET

Ağrı Kontrolünde Kullanılan Benzidamin HCl'ün Osteoblast Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Hücre Kültürü Çalışmaları ile Değerlendirilmesi

Benzidamin HCl (BN) genel tıp ve diş hekimliği alanında sıklıkla kullanılan ağrı kesici ve antienflamatuar etken maddesidir. Bu tez çalışmasında; BN'ün, ortodontik diş hareketlerinin gerçekleşmesi için gerekli kemik yapım ve yıkım faaliyetlerinde başrol oynayan osteoblast hücrelerinin proliferasyonu, diferansiyasyonu ve aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada mouse calvaria pre osteblast hücre hattı (MC3T3-E1 subclone 14) kullanıldı. Hücreler pasajlanıp seyreltildikten sonra 24, 48 ve 72. saatler de 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M ilaç süspansiyonları için MTT testi yapıldı ve çıkan sonuçlara göre IC₅₀ oranı hesaplanarak çalışmanın tamamında 34.3 µM konsantrasyon ilaç kullanımına karar verildi.

Doz tespitinden sonra ise 1, 4, 7, 14 ve 21 günlük inkübasyon dönemlerinde hücresel artış ve canlılık XTT ve hücre sayımı metoduyla, osteoblast gelişimde önemli bir belirteç olan alkalen fosfataz (ALP) enzimi; ALP aktivite testi ve histokimyasal olarak ALP boyaması ile değerlendirildi. Osteoblast fenotipinin değerlendirilmesinde kullanılan osteokalsin, osteopontin, alfa 1 kollajenaz, alkalen fosfataz ve çekirdek bağlayıcı faktör alfa 1 genleri RT-PCR ile tespit edildi. Kemik nodülleri ve hücresel mineralizasyonu göstermek için de alizarin red s ve von-Kossa boyamaları yapıldı.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde BN'ün osteoblast hücrelerinin proliferasyonu, diferansiyasyonu ve aktivitesi üzerine olumsuz etkilere sahip olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler	:Hücre Kültürü, Benzidamin HCl, Osteoblast
Destekleyen kurumlar	:Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Yazar Adı	:Enver Akın ÖZKAN
Danışman	:Hüseyin ÖLMEZ

SUMMARY

Evaluation of the effects of Benzydamine HCl, used in pain control, on osteoblast cells through cell culture study.

Benzydamine HCl (BN) is the active ingredient of an anti inflammatory and analgesic drug which is used frequently in general medicine and dentistry. In our study, we aimed at investigating the effects of BN on osteoblasts proliferation, differentiation and activity that play a major role in orthodontic tooth movement through bone apposition and resorption.

In this study MC3T3-E1 subclone 14 was used. The cells, after passaging and diluting, were incubated with 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M BN suspension for 24, 48 and 72 hours and MTT test was performed to calculate IC₅₀ value. Based on the result, BN was used at the concentration of 34.3 μ M for the rest of the study.

After determining the dosage, cells were incubated for 1, 4, 7, 14. and 21 days with BN. Then, XTT and cell counting methods were performed to determine short and long term effects of BN on osteoblast differentiation and activity. Alkaline phosphatase enzyme, which is an important marker for the differentiation of osteoblasts, was measured by ALP activity test and ALP staining histochemically. Osteocalcin, osteopontin, alpha 1 collagenase, alkaline phosphatase, core binding factor alpha 1 which are important markers of osteoblast phenotype were assessed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Alizarin red s and von Kossa staining were performed to determine bone nodules and cellular mineralization.

In conclusion, BN had inhibitory effect on all markers tested in this study. Our findings indicate that BN has negative impact on osteoblasts proliferation, differentiation and activity.

Keywords	:Cell Culture, Benzydamine HCl, Osteoblast
Supported by	:Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Author	:Enver Akın ÖZKAN
Counsellor	:Hüseyin ÖLMEZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KEMİK DOKUSU	3
2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	16
2.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR).....	40
2.4. NON STEROİDAL ANTİENFLAMATUVAR İLAÇLAR VE BENZİDAMİN	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	57
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI.....	57
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILACAK İLAÇ DOZU TESPİTİ.....	59
3.3. XTT TESTİ.....	63
3.4. HÜCRE SAYIMI VE MORFOLOJİK İNCELEME	66
3.5. ALKALEN FOSFATAZIN BİYOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	66

3.6. MİNERAL BİRİKİMLERİNİN HİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	68
3.7. ALKALEN FOSFATAZIN HİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	69
3.8. RT-PCR.....	71
4. BULGULAR.....	80
4.1 HİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRMELER.....	80
4.2 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	86
4.3 HÜCRE SAYISI DEĞERLENDİRMELERİ	87
4.4 XTT DEĞERLENDİRMELERİ	94
4.5 ALP AKTİVİTESİ DEĞERLENDİRİLMESİ	100
5.TARTIŞMA.....	106
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	132
7. KAYNAKLAR	134

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Derece santigrat
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikron
ALP	: Alkalen Fosfataz
Å	: Angström
BN	: Benzidamin HCl
FCS	: Fetal Calf Serum
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
IC ₅₀	: Half maximal inhibitory concentration
IGF	: Insulinlike growth factor
IL	: Interleukin
nm	: Nanometre
NSAİİ	: Nonsteroid antienflamatuar ilaç
MTT	: 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MEM	: Modified Eagle's Medium
OB	: Osteoblastlar
OC	: Osteoklast
PAS	: Periyodik asit schiff
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PTH	: Parathormon
PGE	: Prostoglandin E
RT-PCR	: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
TNF	: Tumor necrosis factor
TGF	: Transforming Growth Factor
XTT	: 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5 carboxanilide

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Osteoblast hücresi	5
2.2. Thoma Lamına Ait Kesit Görüntüsü	37
2.3. PCR Reaksiyonunun şematik gösterimi	42
2.4. Benzidamin HCl' ün yapısı	51
2.5. Benzidamin HCl' ün metabolizasyonu	54
3.1. 96'lık plate yerleşimi	61
3.2. XTT Hücre Proliferasyon Kiti	64
3.3. Hücre kültür vasatlarının kuyucuklu kültür kabına aktarılması	65
3.4. Elisa reader cihazına yerleştirilmiş 96 kuyucuklu kültür kabının görünümü	65
3.5. Thoma lamı ve hücrelerin bu lamda mikroskop görüntüsü	66
3.6. PCR Örneklerinin Havuzlanması.....	71
3.7. Thermal cycler cihazına örneklerin yerleştirilmesi	77
3.8. Yeni Dökülmüş Jel	78
3.9. Elektroforez	78
4.1.-4.10. Alkalen Fosfotaz Boyaması	81-83
4.11.-4.13. Mineral Birikimlerinin Histokimyasal Olarak Değerlendi- rilmesi.....	84-85
4.14.-4.15. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	86-87

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Benzidamin HCl'ün Piyasa İsimleri.....	55
4.1. Çalışmamızda kullanılan deney ve kontrol grupları	88
4.2. Hücre Sayısı, deney grupların kendi içinde karşılaştırılması	90
4.3. Hücre Sayısı, kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması	92
4.4. Hücre Sayısı, aynı deney gününde deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması	93
4.5. XTT Testi, deney grupların kendi içinde karşılaştırılması	96
4.6. XTT Testi, kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması	98
4.7. XTT Testi, aynı deney gününde deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması	99
4.8. ALP Aktivitesi, deney grupların kendi içinde karşılaştırılması	102
4.9. ALP Aktivitesi, kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması..	104
4.10. ALP Aktivitesi, aynı deney gününde deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması	105

1. GİRİŞ

Ortodonti, orofasial yumuşak dokuların, çenelerin ve dişlerin pozisyonel anomalileri ve patolojik gelişimleri ile ilgilenen bir bilim dalıdır. Ortodontinin amacı; ortodontik anomalilerin meydana gelmesinin önlemek, meydana gelmiş ortodontik anomaliyi tedavi ederek iyi bir estetik ve fonasyon elde etmek, erişilen durumun kalıcı olmasını sağlamaktır. Başka bir deyişle ortodonti, dişlerin ve çenelerin normale yakın bir estetiğe getirilmesiyle hastanın sosyal çevresine uyum kazanmasını sağlayan bir dişhekimliği dalıdır. Ortodontik tedavi, kuvvet uygulanması sonucu alveol kemik içinde dişlerin hareketi prensibine dayanmaktadır. Dişler üzerine uygulanan kuvvet etkisiyle, alveol kemik ve periodontal ligamentlerde meydana gelen lokal hücresel cevap kemikte yeniden şekillenmeye neden olmakta, bu sayede çeneler üzerinde dişlerin hareketi ve yeni bir pozisyon kazanması mümkün olmaktadır.

Ortodontik tedaviler iki temel çerçevede gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi, iskeletsel düzensizliklerin tedavisi, ikincisi ise dişsel seviyede düzensizliklerin tedavisidir. İskeletsel tedavilerde direk kemik gelişimi üzerine etki hedeflenirken, dişsel tedavilerde dişler kemik içinde hareket ettirilirler. Her iki tedavi şeklinde de sert dokularda meydana getirilmek istenen değişikliklerden dolayı hastalarda ağrı şikayeti meydana gelir. Hastada ağrı şikayetleri genellikle kuvvet uygulandıktan sonra 4. ve 24. saatlerde en yüksek düzeyde olup, 7. gün sonunda minimuma inmektedir. Bu ağrıları gidermek için hastalara ağrı kesici ilaçlar tavsiye edilmektedir. Bu ilaçlar çoğunlukla nonsteroid antienflamatuarlar (NSAİ) olup COX-1 (siklooksijenaz 1) ve COX-2 (siklooksijenaz 2) enzimlerinin inhibisyonu yoluyla etki göstermektedir. Aynı zamanda COX-1 ve COX-2 enzimleri araşidonik asidin prostoglandinlere dönüşümünde kilit rol oynamaktadır. Prostoglandinler ise osteoblast ve osteoklastlar üzerinde etki göstererek kemiğin yeniden şekillenmesinde görev almaktadırlar.

Kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında meydana gelen olaylarda esas görev osteoblastlara düşmektedir. Osteoblastlar hem kemik oluşumundan sorumluyken, aynı zamanda kemik yıkımıyla da ilişkilidir.

Kemik rezorpsiyonunu uyaran hormonların çoğu osteoblastlar üzerinde etkilidir. Osteoblastik hücreler kemik rezorpsiyonunu düzenleyen sitokinler, büyüme faktörleri, prostoglandinler gibi maddeler salgılar. Osteoklastların aktivitesini sınırlayan kemik yüzeyi proteinlerini yıkan kollejenaz, metalloproteinazlar ve plazminojen aktivatör gibi maddeler salgılayarak kemiği osteoklastik rezorpsiyona hazırlar. Osteoklastlar ise kemiğin yıkımından sorumludurlar.

Tez çalışmamızda kullandığımız Benzidamin HCl her ne kadar bir NSAİİ ise de bilinen NSAİİ'lerden farklı bir yapıya sahiptir. Diğer asidik NSAİİ'lerden farklı olarak alkalik pH'ya sahiptir. Bu alkali tabiatı sistemik dolaşıma geçmesini takiben enflamatuar dokularda yoğunlaşmasını sağlar. Benzidamin HCl'ün farmakolojisi konusunda yapılan araştırmalar birbirleriyle uyum göstermemektedir.

Bu tez çalışmasının temel amacı, tavsiye edilen ağrı kesicilerden biri olan Benzidamin HCl'ün kemik yapımı ve dolaylı yoldan yıkımından sorumlu osteoblastların gelişim ve fenotipleri üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Benzidamin HCl konusunda şimdiye kadar yapılan çalışmalar arasındaki farklılıklar, farmakolojisinin tam olarak aydınlatılmaması ve çok bilinmeyenli bir denklem olan osteoblastik faaliyetler üzerine bilinmeyen etkilerinin olabileceği bu tez çalışmasının önemini arttırmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKUSU

Kemik; bir çatı içerisinde entegre olmuş metabolik olarak hücrelerden oluşmuş dinamik, biyolojik yönden aktif olan bir dokudur. Vücutta kalsiyum depolanmasından sorumludur ayrıca vücudun desteklenmesini de sağlar. Kendisini çevreleyen kas dokularının yapışmasını sağlayarak vital yumuşak dokuları korur. İskeletin, hareket fonksiyonunda çok önemli bir yeri vardır. Kemik, bir doku olarak işlevleri ile ideal bir uyum içindedir ve yapı işlev ilişkisi kavramı fazlası ile özelleşmiş bu dokuda açıkça görülmektedir. Vücudun desteklenmesine ve dayanıklılığına yardım etmesine karşın hafiftir ve vücut ağırlığının yaklaşık onda birini oluşturur. Gerilme direnci neredeyse döküm demire eşit iken ağırlığı onun üçte biri kadardır. İleri derecede dayanıklıdır ve kırılma direnci orta sertlikteki çeliğe denk gelmektedir. Ancak buna rağmen esnek ve elastik bir yapıya sahiptir. Elastisite sınırlarını aşmayan kuvvetler ile eğildiğinde ya da büküldüğünde tekrar eski formuna döner. Kemik, aksiyel yöndeki kuvvetlere karşı dayanıklıdır, ancak kemiğin rotasyonel kuvvetlere direnci düşüktür. Kemik ve karaciğer, yapısal kayba uğradığında kendi kendini onarabilen tek organlardır. Yapı işlev ilişkisi, organizasyonun hem kimyasal, hem hücresel, hem doku, hem de organ seviyelerinde görülmektedir (66,108).

2.1.1. Kemik Dokusunun Elemanları

Kemiğin yaklaşık %8'i su ve %92'si katı materyalden oluşur. Bu katı materyalin %21'i organik matriks ve %71'i inorganik matrikstir (66).

2.1.1.1. Organik Matriks

Organik matriksin büyük bölümü kollajen liflerden (Tip I), protein ve glikozaminoglikanlardan oluşan temel maddeden (amorfe madde) oluşmuştur. Lifler gelişmiş bir kemik dokuda paralel ve belirli aralıklarla porlar bırakacak

şekilde yerleşmiş olup hidroksiapatit kristalleri aralarında yerleşiktir. Kemik matriksi genel olarak asidofildir. Doku kollajenlerden zengin olduğundan bu liflere uygun boyalarla gayet iyi boyanırlar. Histolojik incelemede dokuya eğer dekalsifikasyon uygulanırsa inorganik tuzların ortadan kalkmasıyla kemik demineralize olur ve yumuşar, ancak mikroskopik yapısını, şeklini ve sağlamlığını korur. Bunun yanı sıra histolojik teknik organik elemanların ortadan kaldırılmasına yönelik ise (maserasyon gibi) kemiğin sağlamlığı ve esnekliği bozulur ve kolay kırılır hale gelir (66,67).

Kemiğin temel cismi hücresel ve fibröz elemanlar arasında destek ve yapışkanlık sağlar. Ayrıca büyüme, tamir ve remodeling için gerekli hücresel metabolik işlevlerde aktif rol oynar. Bağ dokusu hücreleri, kemik matriksindeki lifleri çevreleyen jelimsi ve homojen temel cismi salgırlar.

Kondroitin sülfat hem kemik hem de kıkırdakta bulunan önemli bir temel cisim bileşenidir. Kimyasal olarak glikozaminoglikanlarla bir bileşik halindedir. Kondroitin sülfat ve glikozaminoglikan kemik ve kıkırdağın tamir ve bakımının sağlanmasında gereklidir.

Organik matriksin bileşenleri genel dayanıklılığı sağlamakla kalmazlar; makul düzeylerde kuvvet uygulandığında kırılma olmadan bir dereceye kadar esneme özelliği de verirler (67,108)

2.1.1.2. İnorganik Matriks

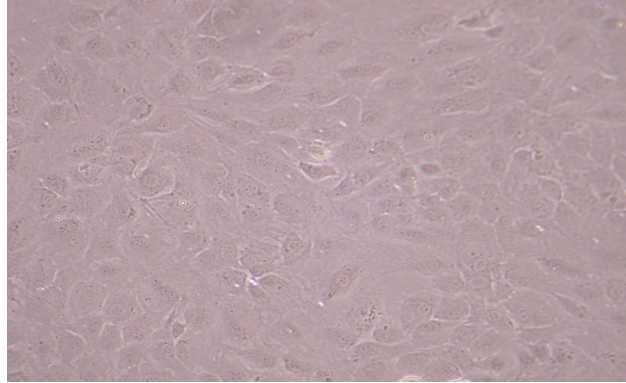
Kemik dokunun inorganik bileşenlerinin başında kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum gibi maddeler gelir. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte iç içe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadırlar. Hidroksil apatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) denilen kimyasal kristallerin depolanmasından kaynaklanır. Bu sürece kalsifikasyon denir. İğne benzeri apatit kristalleri 300 Å uzunluğunda ve 20 Å kalınlığındadır. Bunlar

kollajen lifleri arasındaki mikroskobik boşluklar arasına yerleşerek stres ve mekanik deformasyona karşı en iyi direnci sağlarlar. Kemikteki temel inorganik tuz, kristal hidroksil apatittir. Mineral tuzları aşırı derecede küçüktür. Çapları 25–75 nm ve uzunlukları yaklaşık olarak 200 nm'dir. Bu özellik çok geniş bir yüzey/hacim oranı sağlar. Kristallerin yüzeyini çevreleyen sudan oluşan bir kabuk vardır (hidrasyon kabuğu) ve iyonlar bu kabuk ve kristal yüzeyi arasında serbestçe hareket eder. Kemik kristallerinin kollajen içerisinde özel bir dizilimde olduğu gösterilmiştir. Kristalin uzun eksen, kollajen lif içinde demetin uzun eksenine paralel olarak seyreder. Kollajen lifinin boşluk bölgesindeki bu düzen, yüzey alanını artırarak hidroksil apatit oluşumunu artırır. Kemikte kalsiyum ve fosfata ilave olarak magnezyum, sodyum, sülfat ve flor gibi mineral bileşenler de bulunmaktadır (41, 67, 108).

2.1.1.3. Kemik Dokusunun Hücreleri

Kemik dokusunda 4 tip hücre ayırt edilir bunlar: Osteoblast, osteosit, osteoklast ve osteoprogenitör hücreler olarak sıralanır.

2.1.1.3.1. Osteoblastlar



Şekil 2.1. Osteoblast hücresi.

Osteoblastlar esas olarak kemikte matriksin yapımından sorumludur. Kübik ya da alçak prizmatik boylu hücrelerden yapılmıştır (Şekil 2.1). İri nükleusları olup sitoplazmaları koyu bazofiliktir. Golgi ve endoplazmik retikulumları elektron mikroskopunda iyi gelişmiş olarak görülür.

Sitoplazmalarında lipid damlacıkları ve lizozom benzeri yapılar da yer alır. Osteoblastlar birbirleriyle kısa çıkıntılarla ilişkidir. Kuvvetli alkali fosfatase ve PAS pozitif reaksiyon verirler (67). Osteoblastlar iç yüzeydeki hücrelerden, periostun kambiyum tabakasından ya da komşu mezenşimal dokudaki osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasından elde edilir. Boyutlar 15–20 µm arası değişir ve mikroskopik olarak aktif haldeyken protein sentezi yapan hücrelerin karakteristik özelliklerine sahiptirler (matris salgısı yapılan bölgenin uzağındaki kutupta yerleşmiş bazofilik bir çekirdek, girintili çıkıntılı bir endoplazmik retikulum, belirgin golgi cisimciğı ve ektoenzim alkali fosfatase) (48).

Osteoblastlar matris proteinleri yığarken, TGF-β (Transforming Growth Factor), IGF-I (Insulinlike Growth Factor), IGF-II, FGF (Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) ve BMP'ler (Bone Morphogenic Protein) gibi osteoblastlar tarafından üretilen büyüme faktörleri yapısal matris proteinlerine katılırlar. Bu büyüme faktörleri, kemik rezorpsiyonu sırasında matristen salınırlar ve osteoklastik rezorpsiyonla matris oluşumunun entegrasyonunu sağlayan bir mekanizma oluştururlar. Osteoblast hücre zarında büyüme faktörlerine ait reseptörlerin bulunması, faktörlerin temel etkilerini hem otokrin hem de parakrin olarak gösterebileceklerini düşündürmektedir. Ayrıca osteoblastlar, PTH (parathormon), vitamin D₃ ve östrojen gibi sistemik hormonlara ait reseptörlere de sahiptirler (108,144).

2.1.1.3.2. Osteositler

Osteositler kemiğin esas hücreleri olup, olgun kemik hücresi adını da alırlar. Bu hücreler lakünaları içinde yerleşmişlerdir. Gelişimlerini tamamlamış olduklarından sentez yapamazlar. Bu nedenle granüllü endoplazmik retikulum ve golgilerinde azalma görülür. Sitoplazma bazofilisi de daha azdır. Osteositlerin kalsiyumun kemiklerden kana verilmesinde ve homeostatik mekanizmayı düzenleme (kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyerek) gibi

önemli metabolik rolleri de vardır. Hücrelerin ölmesi halinde ise matrikste rezorbsiyon olayı görülür (67).

Osteoblastlardan geliştiği düşünülen osteositler, mineralize kemik matriksinin derinlerinde gömülü olarak bulunurlar. Birbirleriyle ve kemik yüzeyindeki osteoblastlarla, hücresel uzantıları ya da kanaliküller aracılığı ile bağlantı kurarlar. Bu noktalarda neksuz ve aralıklı bağlantı kompleksleri olduğu elektron mikroskopunda gösterilmiştir. Osteositler, kesitlerinde yassı ve ovaldirler. Boyutları 20–60 µm arasında değişir. Bu hücrelerin, kan dolaşımı ile aralarındaki gelişmiş kanaliküler sistemleri sayesinde oksijen ve metabolitlerin (kalsiyum) transferini sağlayarak kemiğin beslenmesinde etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir (41,108).

2.1.1.3.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar kemiği ve kalsifiye kartilajı rezorbe eder. Bu geniş ve çok çekirdekli hücreler, tek çekirdekli öncü hücrelerin kaynaşması ile şekillenir. Osteoklastların tahminen öncü mezenşimal osteoblasttan ziyade hematopoetik stem hücreden türediği düşünülmektedir. Osteoklast hücre şekli monosit-makrofaj serisinden kaynaklanabilir, ancak makrofaj yüzey belirteçlerinin çoğunda osteoklastlara rastlanmaz ve osteoklast ve monosit öncü hücrelerinin şekilleri tahminen farklılaşmanın erken dönemlerinde ayrılır. Öncü osteoklast hücre kopyalanmasının stimülasyonu artan kemik rezorbsiyonu için önemli bir mekanizma olmaktadır. Bu nedenle bir kez kaynaşma gerçekleştikten sonra osteoklast içindeki çekirdekler daha fazla hücre bölünmesine uğramaz (144,145).

Osteoklast sitoplazması bol mitokondri, pek çok lizozom ve nispeten daha az pürüzlü bir endoplazmik retikülüm içerir. Osteoklastın eşsiz olan özelliği aktif rezorbsiyon sahasına komşu buruşuk, kabartılı bir sınırının olmasıdır. Bu sınır temiz bir bölge ile çevrelenmiştir. Bu temiz bölgenin fonksiyonu osteoklastın kemiğe yapışmasını ve lizozomal enzimler ile hidrojen iyonlarının yüksek konsantrasyonda korunabilmesi için buruşuk hücre sınırının ekstraselüler sıvıdan izole olmasını sağlamaktır. Osteoklastlar

asit fosfataz yanında diğ er lizozomal enzimler ve hidrojen iyon sekresyonuna yardımcı olan karbonik anhidrazdan da zengindir. Buru uk hücre sınırı dışa dönmüş dev bir fagolizozom görünümünü taklit eder. Hidrojen iyonları, mineral mobilizasyonu yanında kemik matriks bileşenlerini (d     bir pH da kollajeni de içerir) azaltabilen lizozomal enzimlerin aktivasyonunda da önemlidir. Osteoklastik kemik rezorpsiyonu hyaluronik asit sentezindeki bir artışla da birleşir (43, 108).

2.1.1.3.4. Osteoprogenitör Hücreler

Kemiğ n ana hücreleri olup mezan imden kaynaklanırlar. Genellikle soluk boyanan nükleuslu, asidofilik sitoplazmalı hücreler olup endosteumda, periosteumun i  katında ve havers kanalları gibi bölgelerde bulunurlar. Osteoprogenitor hücreleri mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu hücreler kemik büyümesinde, zedelenmesi ya da kırık tamirinde aktif hale gelerek b l n rl r ve osteoblast hücrelerine d n   rl r (66, 67).

2.1.2. Kemik Yapım ve Yıkımı

Kemik, yapım ve yıkım faaliyetleri ile sürekli şekillenme halindedir. Kemik yapım ve yıkımı arasında g     bir ilişki vardır. Kemik kitlesi de yapım ve yıkım arasındaki dengeye bağlı olarak değişir. Kemiklerin genetik olarak kodlanmış olan biçimlerini alma sürecine modelizasyon, erişkinlik boyunca görülen ve birbirini izleyen yapım ve yıkım sürecine de remodelizasyon adı verilir. Normalde, vücuttaki tüm kemikler sürekli bir yapım-yıkım durumundadırlar. Temel çok hücreli birim tarafından yönlendirilen bu süreç; sistemik hormonal etkilerin yanı sıra, yerel olarak üretilen (parakrin) maddelerin kontrolündedir. Osteoblastik aktivite rezorpsiyonu (yıkımı); rezorpsiyon, osteoblastik aktiviteyi (yapımı) uyarır. Bu etkileşim coupling olarak adlandırılır (150). Bu ilişkiyi biraz açmak gerekirse;

Kemikte yapım-yıkım e le mesinin başlıca nedeni, PTH ve vitamin D reseptörlerinin yalnız osteoblastlar üzerinde bulunması, osteoklastlar  zerin-

de bulunmamasıdır. Mesela, PTH arttığında osteoblastlar uyanmakta ve kemik yapımı artmakta, osteoblastların salgıladığı maddeler aynı zamanda osteoklastik aktiviteyi, yani kemik rezorpsiyonunu uyarmaktadır. Osteoblast-osteoklast ilişkisini sağlayan, osteoblastlardan salgılanan iki proteindir: Osteoklast farklılaşma faktörü (ODF, RANKL) ve osteoprotegerin (OPG). Periferik uyarılar kemik yenilenmesinin artmasını gerektiriyorsa RANKL salgılanır, azalmasını gerektiriyorsa RANKL salgısı azalır, OPG salgısı artar. RANKL, osteoklastlar üzerindeki reseptörleri yolu ile yeni osteoklast proliferasyonunu artırır. OPG ise RANKL'ı bağlayarak, bir yalancı reseptör gibi hareket eder ve RANKL etkisini azaltır.

Bazı maddeler kemik yıkımını artırır. Bunların başlıcaları, parathormon, aktif D vitamini (1,25 dihidroksi-1 roksikolekalsiferol), heparin, osteoklast aktive edici faktör (OAF) gibi sitokinler ve prostaglandin sentezini uyarak etkisini gösteren "transforming growth factor alpha gibi ligantlardır. Kalsitonin ise kemik yıkımını baskılar (43).

2.1.3.Kemik Histogenezi

Temel olarak intramembranöz ve endokondral olmak üzere 2 tür kemikleşme vardır. Bunlardan intramembranöz kemikleşme bağ dokusu, endokondral tip ise kıkırdak dokunun katılımıyla oluşmaktadır. Kemikleşme hangi türde olursa olsun ilk oluşan kemik dokusu primer kemik yani olgunlaşmamış kemiktir. Oluşan bu primer kemik kalıcı olmayıp yerini esas yani olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi kemik yapımı, yıkımı ya da rezorpsiyonu ile uyumlu bir biçimde olmaktadır. Kemik dokusu aktif bir yapıdır dolayısıyla devamlı olarak yenilenmektedir. Bu yenilenme özellikle mekanik, kimyasal ve hormonal koşullarla yakın ilgilidir (150).

İntramembranöz kemik oluşumu bağ dokusu tarafından gerçekleştirilir. Organizmada kafatasının frontal, parietal, temporal gibi kemikleriyle çene bu tür kemikleşmeyle oluşmaktadır. Bu kemiklere membran kemikleri de denmektedir. Kemiğin gelişmesi şöyle olmaktadır: Önce mezenşim hücreleri

damarlar etrafında toplanır ve çoğalırlar. Aradaki boşluklar sertleşmemiş matriks ve içindeki kollajen liflerce doldurulmuştur. Mezenşim hücreleri osteoblastlara dönüşebilen hücrelerdir. Bu hücreler hücrelerarası madde ve lif sentezini de yaparak osteositlere farklılaşırlar. Bu bölgeye kemikleşme merkezi adı verilir. Oluşan kemik spongiyöz (trabeküler) yapıdadır ve lamel içermez araya henüz kalsiyum bileşikleri de çökmemiştir ve osteoid doku adını alır. Damar çevresindeki osteoblastların osteositlere dönüşerek boşalttıkları yerlere arkadan yeni hücrelerin gelmesiyle olayda devamlılık sağlamaktadır. Trabeküller büyür, çoğalır ve anastomozlaşarak spongiyöz kemik dokusu şekillenmiş olur. Bu tür kemikleşmede peristeum ve endosteum kemikleşmeye katılmayan bağ dokusu tarafından yapılmaktadır. Trabeküllerarası boşluklardaki bağ dokusu da kemik iliğinin miyeloid ya da hemapoetik dokusuna (kan hücrelerinin yapımı) dönüşmektedir (131).

Enkondral kemikleşmede ise kıkırdak hücreleri önemli rol almaktadırlar. Özellikle uzun kemiklerin şekillenmesi bu yolla olur. Bu tür kemikleşme esas olarak kıkırdak hücrelerinin özellikle uzun kemiklerin diyafiz bölgesinde birtakım değişimleri şeklinde olmaktadır. Uzun kemikler epifiz (yuvarlakça uç kısımlar) ve uzun bir diyafizden oluşur. Daha önce bahsedildiği üzere meydana gelecek ilk kemik önce diyafizi saran perikondriumda intramembranöz yolla olmakta (kemik halkası oluşumu) ve periost şekillenmektedir. Diyafizdeki kemikleşme primer kemikleşmedir ve bölge tamamen kemikleşinceye kadar devam eder. Bunu epifiz bölgesindeki kemikleşme izler ve sekonder kemikleşme merkezi adını alır. Epifizdeki eklem kıkırdağı ise kemikleşmeye katılmaz. Uzun kemiğin diyafizinde meydana gelen ve kemiğin uzunlamasına büyümesini sağlayan olayları ise kısaca şöyle özetleyebiliriz:

Kıkırdak hücrelerinde görülen farklılaşmalar neticesinde doku birtakım zonlara (bölgelere) ayrılmaktadır. Bu zonlar şöyle sıralanmaktadır;

1. Dinlenme zonu: Morfolojik değişim göstermeyen hyalin kıkırdak hücrelerinin olduğu bölgedir.

2. Poliferasyon zonu: Kıkırdak hücrelerinin hızla bölünüp çoğalması ve uzun kolonlar yapmasıdır.
3. Hipertrofi zonu: Büyümüş ve sitoplazmalarında glikojen birikmiş kıkırdak hücrelerinin olduğu bölgedir.
4. Kalsifikasyon zonu: Kıkırdak hücreleri bozulmaya başlamıştır ve ortama kalsiyum çöker, dokunun bazofilisi artar.
5. Kemikleşme zonu: Bölgede oluşan bol damarlı yeni kemik dokusudur (enkondral tipte).

Yukarıdaki açıklamalarda görüldüğü gibi ilk zonda mitozla çoğalan (proliferasyon zonu) kıkırdak hücreleri kemik uzun eksenine doğru dizilmeler yapmaktadırlar. Çoğalma diyafiz ortalarında durur. Bundan sonra hücreler sitoplazmalarında madde depolamaya başlarlar ve büyürler (hipertrofi zonu). Buradaki hücrelerde alkalen fosfataz enzimi çok artmıştır ve bu enzimin dışarı çıkmasıyla kalsifikasyon başlar. Kalsifikasyondan sonra görülen kemik yıkımı ya da rezorbsiyon olayı osteoklastlarca yerine getirilir. Bu bölge kan damarlarından da zengindir. Rezorbsiyon sonucu ortaya çıkan boşluklara kemik kovukları denir. Bu bölgeye periyosteumdan gelen osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşürler ve kaviteletin yüzeyine yerleşerek kemik matriksini yaparlar daha sonra da osteosit haline dönüşürler. Matriks de ileride kalsifiye olmaktadır. Havers lamel sistemi ise şu şekilde ortaya çıkmaktadır: Osteoklastların civar dokuyu eriterek açtıkları kovukların anastomozlaşmasıyla bir nevi tünel ya da labirent benzeri yapı oluşmaktadır. Bunların içi kemik iliği, bağ dokusu ve osteoklastlarca dolmuştur. İşte buradaki bağ dokusunda yer alan hücreler osteoblastlara farklılaşıp kanal duvarına dizilirler ve Havers'in en dış lamelini yaparlar. Olay sürekli ve bu şekilde periferden merkeze doğru lamel tabakası ortaya çıkar (osteon). Sonuç olarak perikondral kemikleşme perikondriumun osteojenik aktivitesiyle, enkondral kemikleşme ise kondrositlerin yani hyalin kıkırdak hücrelerin çoğalması ve diğer bir takım değişikliklerle meydana gelmektedir. Kemik bir yandan devamlı olarak yapılıırken bir yandan da osteoklastlarca

yıkıma uğratılmakta ve bu iki olayın uyumlu çalışmasıyla kemik normal formunu korumaktadır (88).

2.1.4. Kemik Hastalıklarının Değerlendirilmesi

Genel olarak kemik hastalıklarının değerlendirilmesi için üç tanı yöntemi vardır: Kemik dansitesi, kemik biopsileri, ve kemik yapım-yıkımının biyokimyasal göstergeleri. Kemik dansitesi, osteoporoz tanısı için temel tanısal yoldur, fakat kemik yapımı ve rezorbsiyonunun dinamizmi hakkında bilgi sağlamaz. Bu bilgiyi kemik biopsileri ve biyokimyasal bulgular verir. Kemik biopsileri invaziv işlemler olduğundan, hastaların izlenmesinde günlük tetkiklerde kullanılamaz. Kemik yapımı ve yıkımının biyokimyasal göstergeleri ise oluşum ve yıkım markırları olarak iki grupta incelenebilir (6).

2.1.4.1 Kemik Oluşumu (Formasyon) Markırları

En etkili formasyon markırları; Alkalen fosfataz ve osteokalsindir.

Alkalen Fosfataz (ALP): İskelet alkalen fosfatazı osteoblast membranında bulunur ve kemik oluşumu esnasında kana salınır, kemik yapımının ölçütüdür. ALP hücre membranlarının ekstrasellüler yüzeyindeki glukozil-fosfatidilinozitol kalıntılarına sıkıca bağlanan bir glukoproteindir. Enzim membrana bağlı iken bir tetramerdir, ancak dolaşıma katıldığında diamerdir. İskeletin ALP'ı osteoblastların membranında yerleşmiştir ve henüz anlaşılamayan bir mekanizma ile dolaşıma salgılanır. Serum total ALP'ı sıklıkla kullanılan kemik yapımı göstergesidir. Paget hastalığı, raşitizm, osteomalasi ve renal osteodistrofi gibi kemik metabolizması ile ilgili bozukluklarda, enzim aktivitesi değişiklikleri tedavi gidişatını yansıtır ve yeni kırıkların iyileşmesinin izlenmesi açısından yararlı bir göstergedir (48).

Kemik ALP'ının kesin fonksiyonu bilinmemesine rağmen, hipofosfataz defektlerinden anlaşıldığına göre enzim, mineralizasyonda çok önemli rol oynar. ALP, mineralleşme başlangıcının odağı olduğuna inanılan membrandaki matriks keseciklerinde bol miktarda bulunur. Kıkırdakta

kalsiyum pirofosfat dihidrat kristallerinin çözölüşünde de rolü olduğu düşünölmektedir.

Osteoblastlar aktif olarak kemik matriksini depolamaları sırasında, çok miktarda alkalen fosfataz salgırlar. Bu fosfatazın inorganik fosfat konsantrasyonunu arttırdığı ya da kollajen liflerini, kalsiyum tuzlarının depolanmasını sağlayacak şekilde aktive ettiğı sanılmaktadır. Alkalen fosfataz düzeyi, genellikle kemik yapım hızının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Alkalen fosfataz enziminin temel rolü kemik yapımının başlatılmasını sağlamaktır (6,66).

Osteokalsin:Osteoblastlar tarafından sentezlenen bir matriks proteini dir.Kemikte en çok bulunan glutamik asitten zengin 49 aminoasitli nonkallojenik matriks proteini olup kemiğe oldukça spesifiktir. Osteokalsin kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayan bir proteindir. Osteokalsin gelişen kemikte mevcuttur ve kemik oluşumuna katkıda bulunur (74)

Bunlardan başka;

Tip I Prokollagen Karboksiterminal Propeptid (PCIP) ve Tip I Prokollagen Aminoterminal Propeptid (PNIP): Kollojenler kemiğin majör formudur ve organik matriksin % 90'dan fazlasını oluşturur aynı zamanda bir konnektif doku proteini dir. Kollajen sentez ve yıkımı (kollajen turnover) gelişim esnasında belirgindir Mineralize kemikte kollajen olarak tip I kollajen bulunur. Tip I kollajen, prokollajen I adı verilen öncü molekül olarak osteoblastlarca sentez olurlar. Prokollajen 1, kollajen üretimini ve büyümeyi gösteren biyokimyasal bir markırdır (34, 60).

Kemik Sialoproteini (Bone Sialoprotein-BS): Osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından sentezlenir. Kemiğin nonkollajenöz organik matriksinin önemli kısmını oluşturur. Tam spesifik sayılmasa da kemik turnoverinin hassas bir markeri olan BS preosteoblastlar için mitojeniktir ve osteoblastlara differansiye olmalarını sağlar. BS diferansiyasyonun geç

safhalarında eksprese olan kemik matriksinin osteoblast kaynaklı komponentidir (60,128).

Osteopontin: ilk defa 1979 yılında extrasellüler bir matriks proteini olarak tanımlanmıştır. Osteopontin ekspresyonu, kemik ve epitel yüzeylerde yapısaldır. Osteopontin kemikte ve hasarlanmış veya inflame olmuş dokulardaki kalsifikasyonda (distrofik kalsifikasyon) kalsiyum depozisyonunu düzenler, osteoporoz, ateroskleroz patogenezi, tümör büyümesi gibi bir çok olayda da görev alabileceği de öne sürülmüştür (156).

Core binding factor alpha 1: Kemik oluşumunda olmazsa olmaz transkripsiyon (DNA'nın RNA'ya kopyalanma işlemi, DNA'dan mRNA sentezlenmesi) faktörlerinin başında gelir. Kemik oluşturma gibi bir faaliyet içinde olan her hücrede mutlaka vardır. CBF gurubundaki genler bir çok dokunun farklılaşmasında rol oynayan çeşitli hedef genlerle heterodimer kompleksi oluşturarak işlev görür. DNA'ya bağlanarak işlev gören alfa ve DNA'ya bağlanmadan transkripsiyonel aktiviteyi artıran beta alt üniteleri vardır. İkiside hastalık tanısı ve takibinde kullanılan markırlardır. Osteoblast gelişim mekanizmaları tam anlaşılamamış olmakla birlikte, Cbfa1'in (core binding transcription factor = osteoblast stimüle edici faktör 2 = Osf2), osteoblast farklılaşmasındaki temel faktör olduğu bilinmektedir (28).

2.1.4.2 Rezorpsiyon Markırları

Kollagen Cross-Linklerin İdrarla Atılımı (İdrar Pyridinium Cross-Link):Kemik organik matriksinin %90 kadarını tip I kollajen oluşturmaktadır Kollajen yıkımının en spesifik ve en duyarlı göstergesi olan Pyridinium ve D-pyridinium matür kollajen yıkımı ile açığa çıkmakta yeni sentezlenen kollajenden kaynaklanmamakta ve başka ürünlere metabolize olmamaktadır Ayrıca diyetin bu bileşikler üzerine etkisi yoktur. Bu fragmanlar karaciğer ve böbrekte daha ileri düzeyde metabolize olarak, idrar yolu ile atılır (60).

Açlık İdrar Kalsiyumu: 24 saatlik idrardaki kalsiyum atılımı ve ilk idrardaki kalsiyum/kreatinin oranı kemik rezorpsiyonun en önemli biyokimyasal belirleyicilerindendir . Bu belirleyicilerin spesifitesi için idrar toplamadan önce birkaç gün ve toplandığı süre boyunca kalsiyumdan fakir diyet verilmelidir. Sabah aç karnına atılan idrardaki (ilk idrar) kalsiyum/kreatinin oranı kemik resorpsiyon ve formasyonu arasındaki farkı yansıtır, çünkü intestinal kalsiyum absorpsiyonunun etkisi minimaldir (34).

İdrar Hidroksiprolin: Hidroksiprolin başlıca kollajende bulunur ve molekülün aminoasit içeriğinin %13'ünü gösterir. Hidroksiprolin, peptid zinciri içinde meydana gelen post-translational hidroksilasyonla prolinden meydana gelir. Kollajen degradasyonu esnasında salınan serbest hidroksiprolin tekrar kullanılmaz. Biyolojik sıvılarda bulunan endojen hidroksiprolinin çoğu kollajenin çeşitli formlarının degradasyonundan oluşur. İdrar total hidroksiprolin total kollajen metabolizmasının sadece %10'unu gösterir Bu açıdan kemik rezorpsiyonuyla kötü korelasyon gösterir (34, 60).

İdrar Hidroksilizin Glikozidler: Hidroksiprolin gibi, hidroksilizin düzeylerinin de idrarla atılmasında artış, kollajen ve kemik yıkımının potansiyel bir markıdır. Tip 1 kollajenden türeyen hidroksilizin glikozidleri olan glikozil-galaktozil hidroksilizin(GGHL) ve galaktozil hidroksilizin(GHL) doku tiplerine göre farklılık gösterdiğinden kollajen yıkımı için hidroksiprolinden daha iyi belirteç olduğu kabul edilmektedir. Laboratuar şartlarında GHL ve GGHL tayinleri yapılabilir. Birincisi kemik rezorpsiyonu için, ikincisi ise deri kollajen rezorpsiyonu için daha özgündür (3, 60).

Plazma Tartarat-Rezistant Asid Fosfataz: Osteoklastik aktivite esnasında salınır ve rezorpsiyon markırı olarak kullanılır. Asit fosfatazin enzimatik özellikleri alkali fosfataza benzer, sadece pH optimum şartları alkali olma yerine asidiktir. Asit fosfataz aktivitesi; kemik, prostat, dalak, eritrosit ve trombosit gibi birçok dokuda ve hücrede bulunur . Kemik izoenzimi sadece osteoklastlar tarafından üretilir. Bu bakımdan, kemik yıkımının iyi bir

göstergesi olur. Örneğin Paget hastalığı, osteomalazi, kemik metastazları, hipertroidizm gibi durumlarda kemik asid fosfataz düzeyi belirgin artar (3).

Tip 1 Kollajen Çapraz Bağlı Telopektid: Tip 1 kollajen karboksiterminal çapraz bağlı telopektid (ICTP), tip 1 kollajende yani büyük miktarı kemikte yer alır ancak yeni sentezlenen kollajenden de orijin alabilir. Tip I kollajen degradasyonunu ölçer. Hafif böbrek yetmezliğinde yüksek bulunabilir, osteoporoz için hassas bir belirleyici değildir (60).

2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürleri, canlı dokuların vücut dışında yaşatılması, sürekli üretim ve gelişimini ifade etmektedir. Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısılarında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik durumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde araştırma çalışmalarının önemli bir yerini tutmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda (örneğin kanser) belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini (örneğin bir protein) belirlemek amacıyla özel bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak canlı ortamında (in vivo) elde edilebilecek sonuçlara ulaşılabilir.

Hücre kültürlerinin elde edilmesinde temel şart, steril ortamların korunmasıdır. Vücut dışında izole edilmiş hücre ya da organlar, enfeksiyonlara karşı koyabilecek kapasitede olmadıklarından, hücre kültürü çalışmalarında, özel ekipman ve malzemenin deneyimli personelce kullanımının yanı sıra kontaminasyondan kaçınmak için sterilizasyona azami dikkat gösterilmelidir.

Hücre ya da doku kültürü çalışmaları son yıllarda uygulamada büyük bir gelişim göstererek dişhekimliği de dahil olmak üzere modern bilimin birçok

dalında kendine yer bulmuş, hayvan ve insan haklarına gösterilen saygının artmasına paralel olarak önemi de o derece artmıştır. (39,61),

2.2.1. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları, Avantajları ve Dezavantajları

Hücre kültürü çalışmaları günümüzde çok yaygın kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şöyle sıralanabilir;

- Kanser araştırmalarında (in vitro toksikoloji)
- Sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik çalışmalarda,
- Çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında,
- Doku ve deri mühendisliğinde,
- Aşı üretimi, kök hücre çalışmalarında,
- Tüp bebek ve kısırlık tedavilerinde,
- Farmasötik proteinlerin üretiminde,
- Hormon üretiminde,
- Bitki ve hayvan ıslahı ve geliştirilmesi çalışmalarda (2,61).

Avantajları;

Son yıllarda hayvan hakları savunucularının kamuoyunda oluşturdukları baskı nedeniyle hayvan haklarına geçmişe nazaran daha çok önem verildiği düşünülürse hücre kültürü çalışmaları birçok hayvan çalışmasını gereksiz kılacak bir araştırma türüdür. Hayvan hakları savunucuları, hayvan deneylerinin birçoğunun gereksiz yapıldığı yönündeki düşüncelerini, bu deneylerden çıkan sonuçların güvenilemeyecek kadar değişken olmasına ya da hayvanların acı çektirilerek öldürülmelerine deymeyecek kadar önemsiz oldukları savlarına dayandırmaktadırlar (2).

- Ağıza yeni uygulandıkları durumda, henüz tam olarak polimerize olmamış materyallerin test hücreleri ya da dokuları ile her hangi bir

immunolojik etkileşim olmadan teması, gerçek akut kimyasal toksisitenin belirlenmesinde yararlı olmaktadır. Bu da hücre kültürü test yöntemlerinin kullanımı ile sağlanabilir (15).

- Hücre kültürü test yöntemlerinin kontrol edilebilme olanakları yüksektir ve tekrarlanabilme özellikleri vardır. Ayrıca sonuçlar daha kısa sürede alınabilmektedir.
- Brauner ve Kaden (14) hücre kültürü test yöntemlerinin dental materyallerin, biyolojik uyumunun belirlenmesinde eleme metodu olarak yararlı olduklarını bildirmiştir
- Hücreler üzerindeki etki doğrudan doğruya gözlenir
- Kimyasal maddelerin etkileri her cins doku ya da hücrelerde ayrı ayrı araştırılabilir.
- Organizmadaki karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmalar in vitro da yapılabilir.
- Etkiler doğrudan doğruya olduğundan süratlidir.
- İstatistik olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılamayacak kadar fazla hücre kullanılabilir.
- Hücre soyları kolayca taşınabilir. Karantina gibi bir sorun olmadığından birbirlerinden uzak ülkelerde de deneyler ve uygulamalar aynı şartlarda yapılabilir.
- Araştırma ya da uygulamaya yönelik doku kültürü laboratuvarlarının kuruluşu pahalı olmakla birlikte hayvan deneyleriyle karşılaştırıldığında bazı test sistemleri için hücre kültürleri çok daha ekonomiktir (61).

Dezavantajları;

Hücre kültürü çalışmaları ile kimyasal maddelerin davranışlar üzerine olan karmaşık etkileri incelenemez.

- Tek başına doku kültürlerinin yeterli bilgi sağlaması mümkün değildir (in vivo ve in vitro).

- Manipulasyon hataları sonuçları ciddi biçimde etkiler.
- Hücreleri uzun süre dondurmak, biyokimyasal ve genetik değişikliklere sebep olabilir. Ayrıca normal dokulardan elde edilen hücre soyları yavaş yavaş çoğalma potansiyellerini kaybederler.
- Belli bir uzmanlık ve deneyim gerektiren bir iştir.
- Hücreler kendilerini koruyacak bir immun sistemden yoksun olduklarından çok titiz ve steril bir laboratuvar çalışması gerektirir (39).

2.2.2. Hücre Kültürü Uygulamaları

Hücre kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1885'te Roux embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. 1952'de Gey ve arkadaşları bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli (continuous) serisini ortaya koymuşlardır ki, bu bugün iyi bilinen HeLa hücre serisi olmuştur. Dünya genelinde süregelen çalışmaların devamında 1986'da Martin ve Evans ile arkadaşları fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini izole ederek kültürünü yapmışlar ve 1998'de de Thomson ve Gearhart ile yardımcıları insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır (39,61). Hücre kültürü çalışmaları bu tarihsel gelişimi boyunca avantajlarından dolayı modern bilimin birçok dalına olduğu dibi dişhekimliği ve ortodonti alanında da yapılan bazı araştırmalarda kullanılmıştır.

2.2.2.1. Dişhekimliğinde Hücre Kültürü Uygulamaları

Dişhekimliğinde hücre kültürü çalışmaları kendisine bir çok uygulama alanı bulmasına rağmen literatürler incelendiğinde hücre kültürü daha fazla olarak dental materyallerin biyolojik uyumlarının tespitinde sıklıkla başvuru kaynağı olmuştur. Dişhekimliği alanında yapılan hücre kültürü çalışmalarından örnekler vermek gerekirse;

Dişhekimliğinde tanı amaçlı kullanılan iyonize radyasyonun osteoblast çoğalması ve farklılaşması üzerine olan etkileri Dare ve arkadaşları (29) tarafından araştırma konusu yapılmıştır. Bu amaçla yeni doğmuş rat kafatasların'dan elde edilen osteoblast benzeri hücreler ve kolanal osteoblastik hücre hattı kullanılmış ve değişik dozlarda iyonize radyasyon bu hücreler üzerine in vitro uygulanmıştır. Sonuçta Dare ve arkadaşları (29) tanı amaçlı olarak kullanılan iyonize radyasyon da dahil olmak üzere düşük doz iyonize radyasyonun bu hücreler üzerine ve dolaylı olarak da kemik şekillenmesi ve iyileşmesi üzerine minimal düzeyde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Messer ve ark. (93) yaptıkları çalışmada beş farklı dental seramik materyalin (Vita Omega, Duceragold, Stylepress, Empress 1, Empress 2), Balb/c 3T3 fare fibroblastları üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmiş, tüm seramik test gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve seramik gruplar içerisinde en toksik olan materyalin lityum disilikat içerikli Empress 2 olduğunu bildirmişlerdir

Gioka ve arkadaşlarının (52) ışıkla sertleşen ve kimyasal adeziv rezinler üzerinde yaptıkları çalışmalarında, kimyasal kür ve ışıklı kürün DC'nin (kür derecesi), standart bağlanma proseslerinden önemli oranda farklı olmadığını, ve her iki adezivden de yayılan monomer miktarının eşit olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca çalışmalarında iki adezivinde insan PDL fibroblastlarında akut sitotoksositeye neden olmadıklarını ve iki adezivinde ilgili etkilerinin gücü arasında fark olmadığını tespit etmişlerdir.

Sipahi, Özen ve Ural (134) tarafından GATA'da yapılan bir çalışmada beş farklı protez kaide materyalinin gingival fibroblastlar üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bu amaçla ışıkla sertleşen, ısıyla sertleşen, kimyasal olarak sertleşen, mikrodalga ile sertleşen ve enjeksiyonla sertleşen akrillerden oluşan test örnekleri, gingival fibroblast hücre kültüründe test edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre bütün test örnekleri değişik derecelerde toksik

olarak bulunmuş olup test örnekleri arasında en toksik etkiyi, kimyasal olarak sertleşen kaide materyali göstermiştir.

Arısu (6) tarafından Nd: YAG lazerlerin farklı frekans ve güçlerde uygulanmasının insan osteoblast hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği tez çalışmasında Saos-2 osteoblast hücre hattı kullanılmış, çalışmada hücresel artış ve canlılık MTT metoduyla, hücresel aktivite ise ALP ve osteokalsin ölçümleriyle değerlendirilmiştir, ayrıca hücresel mineralizasyonu değerlendirmek için ALP ve kalsiyum boyamaları da yapılmıştır. Çalışmanın bulguları değerlendirildiğinde ise eğer atım enerji miktarı ve enerji çıkışı amaçlanan tedavi için yeterliyse lazer uygulamalarında en düşük ayarları seçmenin doğru yöntem olacağı kanaatine varılmıştır.

Antiepileptik bir ilaç olan fenitoinin uzun süreli kullanımı ile ortaya çıkan gingival hiperplazi ve konnektif doku artışı şeklindeki yan etkisinin, bazı araştırmacılar tarafından, yara iyileşmesini hızlandırıcı bir ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. İn vitro insan dişeti fibroblast hücre kültürü kullanıldığı Er ve arkadaşları (42) tarafından yapılan bir çalışmada, fenitoin-sodyumun fibroblast formasyonu ve proliferasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. 5 ugr/ml konsantrasyonda, dişeti dokularında fibroblast formasyonu ve proliferasyonunun hızlandığı ve hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Protetik restorasyon materyali olarak kullanılan farklı alaşımların, alaşımı oluşturan bazı elementlerin ve seramiğin toksisite ve IL-1 β salınımına olan etkilerinin üç boyutlu hücre kültürü ortamında incelendiği Özen (105) tarafından yapılan doktora tezinde, altının seramiğe, Pontostarın ve seramiğin Remanyum CS'ye göre periodontal dokular için daha uyumlu olduğu, bununla birlikte seramikle Pontosların benzer toksisite ve IL-1 β salınımı gösterdikleri ve metal iyonlarının düşük toksisitede veya toksik olmayan düzeyde iltihap öncesi aktivitede yer alabilecekleri görülmüştür.

Bir araştırmada, Demirel (35) tarafından ülkemizde kullanılan beş farklı cam iyonomer yapıştırma simanının Agar Overlay ve Cromium release hücre

kültürü test yöntemleri ile toksisitelerinin belirlenmeleri için yapılmış çalışma sonucunda; Agar Overlay yönteminde. Ceramchem ve Aquameron örneklerinde toksisite saptanmamıştır. Logocem WM ve Logocem örneklerinde hafif toksisite belirlenmiştir. Materyaller içinde en yüksek toksisite değerini Medicem örnekleri vermiştir. Cromium Release yönteminde ise genel değerlendirmede tüm örnekler toksik etki göstermiştir. 4 saatlik test örneklerinin tümünde, yüksek toksisite belirlenmiştir. 24 saatlik deneylerde ise Ceramchem ve Aquameron örnekleri negatif kontrol örnekleri ile eş değer sonuç vermişlerdir, Logocem WM örnekleri. Logocem örneklerine göre daha yüksek toksisite göstermiştir. 24 saatlik deneylerde, test şartlarında en yüksek toksik etkiyi Medicem örnekleri göstermiştir.

2.2.2.2. Ortodontide Hücre Kültürü Uygulamaları

Düzenli elektromanyetik alanların osteoblastlar üzerindeki artan etkileri gösterilmiş olmasına rağmen statik manyetik alanların (SMA) etkileri tam olarak açıklanamamıştır. Yamamoto ve arkadaşları (152) mıknatısların çeşitli ortodontik tedavilerde kuvvet kaynağı olduğunun klinik olarak gösterilmesinden yola çıkarak yaptıkları hücre kültürü çalışmasında osteoblastik farklılaşmada, çoğalma ve kemik nodül oluşumundaki (fare calvaria hücre kültüründe) SMA etkilerini ele almışlar ve 20 günlük kültür boyunca SMA'nın varlığında yüksek düzeyde kemik nodül boyutları, sayıları ve total alanlarında çeşitlilik gözlemişler, matriks gelişimindeki ve mineralizasyon evrelerinde iki osteoblastik fenotip markırının (alkalen fosfataz ve osteoklasin), ayrıca matriksteki kalsiyum içeriğinde önemli ölçüde artış olduğunu tespit etmişleridir. Bu bulgular, osteoblastik farklılaşma ve/veya aktivasyonundaki artışın SMA ile stimule olduğunu desteklemiştir.

Yamaguchi ve arkadaşları (151) tarafından 6 sağlıklı genç gönüllüden alınan dental pulpa hücreleri ile yapılan bir çalışmada gösterilmiştir ki ortodontik diş hareketi sırasında pulpa fibroblastları pulpa dokusundaki enflamasyonun artışı içinde bulunabilir ve nöropeptit stimülasyonunu takiben yüksek oranda IL-1 β , IL-6 ve tümör nekrozis faktör alfa üretebilirler.

Takılıp çıkartılabilen apareyler birçok ortodontik tedavinin temelini oluşturmaktadır ve her yeni çıkan akrilik aparey materyali ile birlikte bunların oral kavitedeki fiziksel mekanik ve biyolojik etkileri merak uyandırmaktadır. Rose ve arkadaşları tarafından (118) yapılan bir çalışmada 2 ortodontik soğuk akrilik Orthocryl® ve Forestacryl®, 4 ortodontik fotokür akrilik Triad®, Will-O-Dont®, Otontolux® ve Lux-A-Tech® araştırılmış ve 2 prostetik akrilik materyal (soğuk Palapress®, sıcak Paladon®) ile fibroblast kültüründe karşılaştırılmıştır. Protez soğuk akriliği Palapress, ortodontik soğuk akriliklerden çok daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Sitokinler çeşitli ajanlarca stimulasyon sonucu immün sistem hücrelerince salgılanan lokal mediatörlerdir. Bu polipeptitler kemik hücreleri ile direkt veya indirekt etkileşir. Saito ve arkadaşları (120) tarafından yapılan bir çalışmada in vivo dişlere mekanik güç uygulanımından sonra periodontal ligamentlerde PGE ve IL-1 β tespiti ve insan periodontal ligament fibroblastlarınca kemik rezorbsiyonu ve PGE sentezi ve/veya IL-1 β sentezi veya mekanik stresin etkileri belirlenmiş ve sonuçlar göstermiştir ki kuvvet uygulamaya yanıt olarak periodontal ligament hücrelerinde PGE üretimi artmış ve bu da IL-1 β düzeyini arttırmıştır.

Ortodontik tedavinin amacı çenede anormal diş pozisyonlarını düzeltmektedir. Bu amaçla uygulanan kuvvet periodontal ligament, kemik ve gingivada uyarılmaya neden olur. Redlich ve arkadaşları (113) tarafından yapılan bir çalışmada insan PDL fibroblastlarında kollojen tip-1 ve mariks metalloproteinaz-1 (MMP-1) in moleküler düzeylerinde, uygulanan direkt kuvvetin etkisi araştırılmış ve sonuçlar göstermiştir ki ortodontik kuvvet uygulanımını izleyen PDL değişiklikleri ışığında, fibroblastlarda MMP-1 geni üzerinde kuvvetin direkt tesiri kısmen etkili olabilir.

Ortodontik bonding rezinlerin polimerizasyonu esnasında atmosferik oksijen ile temas sonucu O₂ inhibisyon tabakası olarak bilinen düşük moleküler ağırlıklı kimyasal grupların tabakasında artış gözlenir. Tang ve arkadaşlarının (137) yaptığı bir çalışmada insan oral fibroblastlarının primer

kültürlerinde bu tabakanın sitotoksik etkileri %99'luk asetonla yıkanılarak bu tabaka ortadan kaldırılmış gruplarla karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve bu O₂ inhibe tabaka önemli düzeyde sitotoksik bulunmuştur.

Dhopatkar ve arkadaşları tarafından (37) ortodontik kuvvetin dentin-pulpa kompleksi üzerine etkileri yeni geliştirilmiş mandibuler kesit organ kültür modeli ile araştırılmış ve kontrol grubu farelerde bir fark yokken test örneklerinin pulpa fibroblastlarında %20-27 oranında artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bu etki kuvvetin doğası ile ilgili bulunmamıştır (Çekme, gerilme, vb.)

Yine Schendel ve arkadaşları (125) tarafından yapılan bir çalışmada piyasada kullanılan 18 farklı adeziv ve Orthocryl ve Wil-O-Dont kullanılarak fare fibroblastları ve insan keratinositleri hücre kültürü ile toksisite testi yapılmış ve üründen ürüne değişmekle birlikte adezivlerde PBS ile 30 gün yıkama sonrası toksisite gözlenmemiş. Rengine bakmaksızın Orthocryl toksik bulunmamış ancak Wil-O-Dont'un olası toksisitesinin problem teşkil edeceği düşünülmüştür.

Ortodontik tedavi esnasında değersiz metaller ya da titanyum içerikli birçok malzeme senelerce oral kavitede kalır. Bu süre boyunca ortodontik malzeme oral mukozaya direkt veya indirekt olarak temas eder. Tomakidi ve arkadaşları (139) tarafından yapılan bir araştırmada bu aygıtların (araştırmada nikel içermeyen ark teli, Uk-1 bond, nikel içeren veya içermeyen braket, titanyum ekspansiyon vidası kullanılmış) korozyonu sonucu olabilecek hücre hasar olasılığı gingiva keratinosit kültürü kullanılarak araştırılmış ve hiç DNA hasarı tespit edilmemekle birlikte değişik derecelerde hücre hasarları bildirilmiştir.

David ve Lobner (30) tarafından yapılan bir araştırmada ise murine kortikal hücre kültürleri ile ortodontik metalik ark tellerinin in vitro nörotoksitesini araştırılmıştır. Çalışmada 0.016 inc NiTi, bakır NiTi, Ti-molibdenum, Elgiloy ve paslanmaz çelik ark telleri kullanılmıştır. Hepsinin standart boyları kültür içine konmuş ve 24 saat sonra laktat dehidrogenaz

salınım analizi yöntemi ile sinir ölümü tespit edilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki NiTi, bakır NiTi, ve Ti-molibdenum arklar nörotoksik değil ancak paslanmaz çelik ve Elgiloy önemli derecede toksik bulunmuştur. Ayrıca sinir ölümünün serbest radikaller aracılığı ile olduğu da tespit edilmiştir.

Bumann ve arkadaşları (16) tarafından yapılan bir çalışmada değişik ortodontik kuvvet uygulanımında (çeneler arası box elastikler aracılığı ile hem çekme hem germe kuvveti) PDL hücrelerinin reaksiyonu dinamik değişik yöntemlerle incenmiş ve genellikle kollegen tip I, III, V, VI, XII ve XIV'de azalma ve sentez gözlenmiştir.

Nikele karşı duyarlı ve duyarsız 35 hasta üzerinde Marigo ve arkadaşlarının (90) yaptıkları çalışmada Nikel içeren sabit ortodontik aygıtlarla 24 aydan fazla tedavi gören hastalarda değişik hücre proliferasyon indeksi bulgusu bu hastalarda nikel duyarlılığının azalarak oral tolerans gelişebileceğini göstermiştir.

Hanson ve Lobner (59) murine serebral kortikal hücre kültürlerinde 3 lateks ve 3 nonlateks ortodontik materyalin toksisitesini araştırmışlardır. Çalışmada her materyal (Amerikan, Masel ve GAC yapımı) standart boyutta kültür edilmiş sonuçta hücrelerde olumsuz fizyolojik değişiklikler saptanmıştır. Nonlateks materyaller hücrelerde önemli nöronal ölümlere neden olmazken her lateks materyal bu hücre ölümlerine neden olmuştur. Latekslerdeki bu sitotoksik imalat sırasında kullanılan çinko içeren bileşiklerden kaynaklı çinkoya bağlıdır.

Yine Locci ve arkadaşları tarafından (87) yapılan bir çalışmada çeşitli ortodontik alaşımların biyoyararlanımları hücre kültürü testleri ile değerlendirilmiş ve çalışma sonucuna göre 304-316 paslanmaz çelikler iyi bir biyoyararlılık gösterirken lehim alaşımlar hücre fonksiyonlarında bazı sitotoksik etkiler göstermiştir.

2.2.2.3. NSAİİ ile yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları

Literatürler incelendiğinde NSAİİ ilaçlarla yapılan bir çok hücre kültürü çalışmasına rastlanmaktadır. Ancak burada bizim çalışmamıza benzer birkaç çalışmadan örnekler verilirse;

Matziolis ve arkadaşları (92). kemik kırıklarında yaygın olarak kullanılan analjezik ilaçların yara iyileşmesini nasıl etkileyeceği konusunda yaptıkları araştırmalarında, T6ramadol ve diclofenac analjezik etken maddeleri ile yaptıkları osteoblast kültüründe bu ilaçların hücreler üzerine sitotoksik etkisini araştırmışlar ve her iki ilacın da osteoblastların proliferasyonunu baskıladığını tespit etmişlerdir.

Kaspar ve arkadaşları (73), çok sıklıkla kullanılan NSAİİ'lerden olan voltarenin etken maddesi diclofenac ile yaptıkları osteoblast kültürü çalışmasında, bu etken maddenin sitotoksik etkisini MTT test yöntemi ile değerlendirmişler ve diclofenac'ın osteoblastların metabolik aktivitesini azalttığını belirlemişlerdir.,

Kyrkanides ve arkadaşlarının (83) yaptıkları geniş kapsamlı bir araştırmada ortodontik diş hareketleri sırasındaki moleküler mekanizmalar üzerine nonsteroid anti enflamatuvar ilaçların etkileri incelenmiş ve ekstrasellüler matriks komponentlerini yeniden şekillendirmek için endotelyal hücreleri artıran siklooksigenaz aktivitesinin inhibisyonunu ortaya çıkarmışlardır. Kyrkanides ve arkadaşları (83) ortodontik diş hareketleri esnasında ağrı kesici alımının tedavi etkinliğine tesir ettiğini ve klinik ortodontik tedaviye etki etmeyen yeni ağrı kesicilerin bulunması gerektiğini söylemişlerdir.

Etcheverry ve arkadaşları (45) tarafından yapılan bir çalışmada NSAİİ içeren üç yeni vanadyl kompleksin biyoaktivitesini MC3T3-E1 ve UMR106 hücre kültürlerinde incelemişler ve sonuçta bu komplekslerin hücre tipine ve konsantrasyona bağlı olarak inhibe edici etkiler gösterdiğini belirlemişlerdir.

Kellinsalmi ve arkadaşları (78) tarafından COX-2 inhibitörü ilaçlar üzerine yapılan bir çalışmada da insan mezenşimal kök hücresinden köken alan osteoblast kültürü ve fare kemik iliği kültürü kullanılmış ve bu tür NSAİ'ların osteoblast ve osteoklast farklılaşmasını değişik oranlarda inhibe ettiğini bulmuşlardır.

2.2.3. Başlıca Hücre Kültür Tipleri

Birincil (Primer) Kültürler: Primer hücre kültürleri, orijinal dokudan yeni ayrılan ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücreleri içerir. Bu hücreler, genotipik ve fenotipik yönden orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içerir ve dokunun fizyolojik durumunun ifadesidir. Normal hayvan dokusundan doğrudan elde edilir ve ayrı bir ortamda ek hücre süspansiyonunda ayrışana kadar enzimatik sindirime tabi tutulurlar. Bu tip kültürler heterojendir ve fibroblastlar tarafından etkinleştirilirler. Bu kültürlerin oluşturulması emek gerektirir ve kısıtlı zaman içinde sadece in vitro koşullarda saklanabilirler. Bu elde edilen hücreler, in vivo ortamdaki hücrelerden farklı karakteristikler göstermektedir.

Primer hücre kültürleri, üretim aşamasındaki zorluklar, hassas hücreler olmaları nedeniyle çalışma esnasında ortaya çıkabilecek problemler ve bunların kontrolünün son derece güç olmasına karşın, orijinal fizyolojik durumun ifadesi olmaları nedeniyle pek çok çalışmada örnek sistem oluşturmaktadırlar (14).

Sürekli Kültürler: Sürekli kültürler, hedef kültüre seri olarak dönüştürülen ya da kısıtlı bölünme sayısına izin verilen, tek hücre tipinden oluşmaktadır. Kısıtlı ömürlü hücre toplulukları diploiddir ve kısmen farklılaşmayı da barındırabilirler. Gerçekte bu tip hücre toplulukları, 30 ya da daha fazla bölünme tekrarı sonrasında da, farklı ve uzun süre saklanma yöntemlerini içeren bir sistem ile saklanmalıdır.

Sürekli hücre toplulukları, spontan gelişim ile çoğalabilirler ve kontamine hücre oluşturma ihtimalleri de vardır. Değiştirilmiş hücreler sınırsız

ulaşılabilirliğe sahiptirler, ancak bunun yanında in vivo karakteristiklerinin çok azını göstermektedirler (142).

Morfolojik zellikler Bazında Farklılaşmış Kültürler: Morfolojik olarak hücre kültürleri sıvı ortamda ve katı ortamda olmak üzere iki şekilde korunabilir. Hücre kültür kabının yüzeyinde, zar, kabuk vb. tabaka şeklinde gelişmiş olabilir. Hücrenin formu, hücrenin alınarak türetildiği köken dokunun özelliklerini gösterir. Kandan alınan hücreler süspansiyonda, katı dokudan alınan hücreler ise, yüzeyde tabaka halinde (zar kültür vb.) yetiştirilir (142).

2.2.4. Hücre Kültürü Aşamaları

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücreler kültür süresince inokülasyon, pasajlama ve kültür fazları gibi birtakım aşamalardan geçer.

2.2.4.1. Hücre Ekimi (Inoklasyon)

Değişik kaynaklardan izole edilen örneğin diş pulpası için enfekte olmayan bir dişten alınan pulpa dokusu, periodontal ligament kültürü için aynı şekilde enfekte olmayan sağlıklı bir çekilmiş dişten (ortodontik ya da yirmi yaş dişi çekimi) alınan periodontal doku, ya da fare calvariasından alınan kemik parçalarından elde edilen ya da bir kültür bankasından alınan hücreler için kültür, hücrelerin steril bir besiyerinde ekim işlemi ile başlatılır. Optimum bir büyüme oranı elde etmek için hücre tipine bağlı olarak ortalama ml'de 10^4 - 10^5 hücre ekimi yapılmalıdır. Bu yoğunlukta hücre ekim işlemi, yaklaşık 3-4 gün içerisinde kültür kabında ml'de 10^6 hücre oluşmasını sağlamaktadır. Ankraj bağımlı hücreler (rn: osteoblast hücreleri) ekim işlemini takip eden 3-4 saat içerisinde büyüme yüzeyine yaşımaktadır. Bu yaşıma periyodu hücrelerin kendi karakteristik şekillerine göre yassılaşmasını, yayılmasını içermektedir. Ankraj bağımlı hücrelerde büyüme periyodu, beslenme yetersizliği, besiyerinde toksik metabolitlerin birikimi ve büyüme yüzeyinin yetersizliği gibi faktörlerle durmaktadır. Bu nedenle ekim işlemini takip eden 2-3 gün içerisinde besiyerinin kısmen ya da tamamen yenilenmesi gerekmektedir (39,71,142).

2.2.4.2. Pasajlama

Hücreler bulundukları kabı tamamen doldurduğunda ve büyüüp çoğalması durduğunda, yapıştıkları yerden ayrılarak başka yerlere aktarılabilen ve böylelikle yeni kültürler oluşturulabilmektedir. Mevcut hücre sayısını arttırmak ve aynı tür hücreleri karakterize etmek için yapılan bu işlem pasajlama olarak adlandırılır ve kültür devamlılığını sağlamak amacıyla yapılmaktadır. İlk pasajdan sonra devam eden kültürler cell line olarak tanımlanır. İki alt kültürden sonra sekonder kültürler, bundan sonra da tersiyer kültürler ve diğerleri elde edilir. Her alt kültür elde edilmesi sırasında da pasajlama yapılır. Meydana getirilen yeni kültürde hücrelerin yaşamasının sağlanabilmesi için maksimum yoğunlukta hücre ekimi yapılması gerekmektedir. Gingival fibroblast ve osteoblast hücreleri gibi ankraj bağımlı hücreler için en çok pasajlama sayısı 40 olarak bildirilmektedir. Pasajlama işlemi için ilk önce hücrelerin üzerindeki vasat dökülür ve serumun etkisini ortadan kaldırmak için hücreler az miktarda serumun yüzeye doldurulup boşaltılması suretiyle yıkanılır. Ardından hücrelerin üzerine çok az miktarda tripsin konularak yüzeyden kalkmaları için normal etüve kaldırılırlar. Burada CO₂'li etüv kullanılmamasının nedeni CO₂'nin tripsinin etkisini engellemesinden ve tripsinizasyon işleminin uzun süre almasından kaynaklanır. Tripsinin etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra, ortama bir miktar serum ya da serumlu vasat ilave edilerek tripsinin etkisi durdurulur, hücreler santrifüj ile yıkanarak tripsin uzaklaştırılır. Ardından hücreler, vasat ile süspanse edilip yeni bir kültür kabında inkübasyona kaldırılırlar (71,107).

2.2.4.3. Kültüre Hücrelerin Yaşam Fazları

Pasajlanıp ekimi yapılan hücreler kültürde yaşamları boyunca bir kaç fazdan geçerler. Bunlardan ilki olan başlangıç fazı (lag phase), hücre yoğunluğunda artış olmayan en erken safhadır. Bu faz hücre büyümesi meydana gelmeden önce kritik bir konsantrasyona ulaşması gereken büyüme faktörlerinin hücresel sentezi ile ilgilidir. Şayet ekimi yapılan hücrelerin canlılığı düşük düzeyde ise başlangıç fazının süresi uzamaktadır.

Bu durum genellikle pasajlama işleminin geciktirilmesi nedeniyle olmaktadır. Hücre canlılığının yüksek seviyede olduğu durumlarda ise bu safha gözlenmeyebilir. Transformasyon geçirmiş hücreler, büyüme faktörü gereksiniminin düşük olması nedeniyle, çok düşük konsantrasyonlarda ekim yapılsa bile, sıklıkla başlangıç fazı göstermezler. Başlangıç fazını takip eden büyüme fazında (growth phase) hücreler hücre siklusuna girerler. Bu fazdan sonraki istasyon fazında (stationary phase) artık hücre konsantrasyonunda bir değişiklik olmamaktadır. İstasyon fazı genellikle besiyerindeki besinlerin azalmasını, metabolik artık ürünlerin besiyerinde birikerek büyümeyi inhibe etmesini ve hücrelerin büyüme yüzeyini tamamen kapladığını (%100 konfluentlik) ifade etmektedir. Bu fazda hücre ölüm oranı, büyüme oranına eşittir. Bu fazda büyüme olmasa bile hücreler metabolik olarak aktif olabilirler. Son faz olan azalma fazı (decline phase) ise hücre ölümünün bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Bu faz hücre canlılığının en düşük düzeyde olduğu kültür fazıdır. Ölçülen canlı hücre konsantrasyonu, hücreler lizise uğradıkça ve hücre içi metabolitleri besiyeri solusyonuna salındıkça azalmaktadır. Kültürde hücre ölümünün apoptoz ve nekroz olmak üzere iki olası mekanizması vardır. Apoptoz, invivo ya da invitro olarak normal fizyolojik şartlar altında meydana gelen hücrenin bir kendini öldürme mekanizmasıdır. Bu süreçte görülen bir anormallik tümöröenez ile ilişkilendirilmektedir. Hücre ölümünün alternatif mekanizması olan nekroz ise, hücrelerin ani ve şiddetli bir stresle karşı karşıya kalması durumunda normal olarak meydana gelen pasif bir süreçtir. Bu süreç hücrelerin şişmesine ve sonuç olarak hücrelerin parçalanmasına neden olan plazma membran bütünlüğünün bozulması ile karakterizedir (39, 71,107).

2.2.5. In Vitro Sitotoksisite Testleri

Seçilen materyalin ya da maddenin sitotoksisite değerlendirmesi uygun hücre kültürlerinde negatif ve pozitif kontrol örnekleri kullanılarak, hücre büyüme oranı, membran devamlılığı, biosentez, enzim aktivitesi ya da hücrenin genetik materyaline bakılarak yapılır. In Vitro Sitotoksisite Testleri, hücre metabolizmasının spesifik fonksiyonlarını ölçmesi, fazla sayıdaki

örnekleri hızlı ve ucuz bir şekilde taraması, sayılabilir sonuçlar vermesi, toksik materyallere karşı kullanım testlerinden daha hassas olmaları ve test metodları standartizasyonuna sahip olmaları nedeniyle avantajlarıdır. Dezavantajları ise belli bir zamanda sadece tek hücre tipinin test edilebilir olması, hücre kültüründe diğer doku koruyucu mekanizmaların olmaması ve test edilen hücre tipinin doku hücrelerini aynen yansıtmamasıdır (105). Mevcut yöntemler morfolojik, biyokimyasal ve genetik olarak üç gruba ayrılmaktadır.

2.2.5.1. Morfolojik Yöntemler

Deney materyali ya da metabolitin uygulandıkları bölgede, oluşturdukları hücre morfolojisi değişikliklerini, toksisitelerini göstermektedir. Sitotoksik hücresel değişikliklerin tipik karakteristiği; hücre çekirdeğinde küçülme, sitoplazmanın parçalanması, granülasyon oluşumu, hücrelerin yuvarlaklaşması ve ayrışmasıdır (71,135).

Tripan mavisi gibi canlı hücrelerden elde edilen belirli boyalar boyama testlerinde (dye exclusion test) kullanılır. Bu methodta bir hücre grubunda tripan ile boyanan hücreler cansız olarak kabul edilir. Ancak bu yöntem her zaman kesin sonuç vermez. Bazı durumlarda boya, serum proteinleri tarafından bağlanarak hasar görmüş ya da ölü hücrelerin karıştırılmasına neden olabilir.

Bundan başka vital boyama testleri, canlı hücrelerin boyanma kapasitesine dayanır. Örneğin nötral kırmızı (neutral red) boyası canlı hücreler tarafından endositoza uğrar. Hücre membran hasarı varlığında nötral kırmızı boyası lizozomlar içinde dağılır. Bu yöntem membran bütünlüğünün değerlendirilmesini sağlar. Ortaya çıkan boyanma spektrofotometre ile ölçülür ve hücre sayımı için standart bir eğri ile karşılaştırılır (27,71).

Boya maddelerinin kullanımı, hücre morfolojisi ve canlılığının değerlendirilmesine ilaveten, hücrelerin adezyon davranışları hakkında da fikir edinilmesini sağlar. Böyle testlerde sonuçların analizi ayrı bir önem

taşımaktadır. Hücre adezyonu, toksik etki ve hücre ölümleri birbirinden iyi ayırt edilmelidir (71).

2.2.5.2. Biyokimyasal Yöntemler

Sitotoksisite değerlendirmede en çok kullanılan metodlar arasında hücre membran bütünlüğü testleri yer alır, bu test sağlam bir hücre membranının selektif bir bariyer fonksiyonu görme esasına dayanır. Bazı testlerde bazı substratlar sağlam hücreler tarafından metabolize edilir. Bu yöntemler hücre proliferasyonunu ölçme yöntemleri olarak düşünülür. Büyüme eğrisi ekim sonrası farklı zaman aralıklarında kültürdeki hücrelerin sayılması ile hesaplanır.

Sitotoksik ajanların görüntülenmesi, hücre proliferasyon testleri, büyüme faktörleri, sitokinler, medyum komponentleri, lenfosit aktivasyonu ve bunun gibi hücre biyolojisi ile ilgili çalışmalarda tüm dünya da yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler, laboratuvar aşamalarını kolaylaştırmak ve çalışma sırasındaki olası hataları kontrol altına almak için 96 kuyucuklu flasklarda (96-well plates/mikroplate) çalışılabilecek şekilde tasarlanmıştır. Bu minyatürizasyon çok fazla sayıdaki örneğin hem hızlı hem de eş zamanlı olarak çalışılabilmesine olanak sağlamış ve kültür şartlarının standart olarak sürdürülebilmesine katkıda bulunmuştur. Bununla birlikte steril plastik flaskların kullanımı kadar, çalışmalarda kullanılacak hücre ve kültür medyum miktarının azaltılması ile maliyeti de önemli ölçüde azaltmıştır. Bu yöntemlerden kolorimetrik olanları sonuçların doğrudan doğruya bir ELİSA flask okuyucu ile ölçülebilmesini mümkün kılmaktadır (11).

İnvitro ve invivo olarak hücre popülasyonlarında proliferasyonunun ve canlılığın ölçülmesinde kullanılan yöntemler Reprodüktif, Permeabilite, Metabolik Aktivite ve Direkt Proliferasyon yöntemleri olarak dört gruba ayrılmaktadır. Aralarında en yaygın kullanım alanı bulan Metabolik Aktivite Testleridir (71,107).

Metabolik Aktivite Testleri; Hücresel hasar oluşması, hücrelerin metabolik hücre fonksiyonunu ve büyümesini sürdürmek için gereken enerjiyi sağlama ve canlılığını sürdürme kapasitelerinin kaybı ile sonuçlanmaktadır. Metabolik aktivite testleri bu esasa dayanarak ortaya çıkarılmış yöntemlerdir ve genellikle mitokondrial aktiviteyi ölçerler. Bu yöntemlerde hücreler birer kolorimetrik substrat olan XTT, MTT ve WST-1 gibi tetrazolyum tuzları ile inkübe edilmektedir. Tetrazolyum tuzlarından, hücre proliferasyonu ve sitotoksikite tetkikleri, enzim tetkikleri, histokimyasal prosedürler ve bakteriyolojik değerlendirme gibi geniş bir yelpazede yararlanılmaktadır. Tüm yöntemlerde tetrazolyum tuzları, metabolik olarak, formazan olarak isimlendirilen yüksek renkli son ürünlere indirgenmektedir. Bu tuzların biyolojik olarak indirgenmesinin doğası henüz tam olarak anlaşılamamakla birlikte uzun yıllardır histokimyasal değerlendirmelerde başvurulan primer yöntemlerdir. Bu testlerden MTT, 1950'li yıllarda tanıtılmış ve canlı hücrelerin tetrazolyum tuzlarını indirgeyerek renkli formazan bileşiğine dönüştürme esasına dayandırılmıştır. Bu biyokimyasal prosedür hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktif hale geçen aktif mitokondri enzimlerinin aktivitesi ile gerçekleştirilmektedir. MTT yöntemi ile suda çözünmeyen bir formazan bileşiği oluşurken XTT kullanımı ile suda çözünen bir boya meydana getirilmiştir. Bu sayede XTT, proliferasyon ölçme yöntemini büyük ölçüde kolaylaştırmış ve çeşitli nedenlerle hücre ölümüne ve varyasyonlara neden olan radyoaktif izotoplar kullanılmaksızın hücre canlılığını belirlemede ve hücre sayımında mükemmel bir çözüm olmuştur. WST-1 yönteminin de en büyük avantajı XTT gibi suda çözünen formazan ürünü kullanılması ve bu sayede prosedürü zorlaştıran yıkama ve tripsinize etme gibi aşamaları gerektirmeden, çalışmanın veri analizlerinin aynı mikropate'de yapılabilmesidir (11,71).

MTT Testi: Bu test ile hücre proliferasyonunun ölçülmesi için 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tetrazolyum tuzu'nun kullanıldığı hassas bir metoddur. Bu metot da trophik faktörler, büyüme inhibitörleri, apoptozis inhibitörleri tarafından değişikliğe uğratılan hücrelerin proliferatif aktiviteleri MTT kiti kullanılarak sayılabilmektedir. MTT,

metabolik aktivite ile ilgili mitokondrial enzimler tarafından suda çözünmeyen formazan boyaya indirgenmektedir. MTT'nin indirgenmesi primer olarak hücre içerisindeki glikolitik aktivite ile ilgili olmakla birlikte NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) ve NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) varlığına bağlıdır. Hücre proliferasyonunun belirlenmesinde membran bütünlüğünün ve nükleotid etkileşiminin değerlendirildiği BrdU ve 3H-timidin gibi yöntemlerin aksine, fazla sayıda materyalin inceleneyeceği çalışmalarda, tehlikeli kimyasallara temasın engellendiği hızlı ve çok yönlü bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Proliferasyondaki değişikliklerin ölçüldüğü bu test de aktif olarak prolifere olan hücrelerde MTT dönüşümündeki artış ELİSA-Reader cihazı ile sayılabilmektedir. Elde edilen verilerin materyalle muamele edilmemiş negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması ile hücrelerdeki proliferatif aktivitedeki kısmi artış belirlenir. Aksi durumda ise hücrelerin apoptozise uğraması MTT indirgenmesinde azalmaya neden olarak hücre canlılığındaki azalmayı yansıtır. Bu yöntem genellikle hücre proliferasyonunun tespitinde, sitotoksiste analizlerinde ve apoptozisin görüntülenmesinde kullanılmaktadır (12,71).

XTT Testi: XTT içeren tetrazolyum tuzlarının kullanımı, radyoaktivitenin engellenmesi, hızlı ve hassas bir yöntem olması, tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi ve pratik bir yöntem olması nedeniyle, sitotoksitenin değerlendirilmesi için birçok araştırma merkezinde yararlanılmaktadır. Tetrazolyum tuzlarının formazana dönüşümü metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz sistemi aracılığıyla meydana gelmektedir. Reaksiyon temel olarak mitokondrial enzimler ve elektron taşıyıcılar tarafından yönlendirilmektedir. Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan XTT, reaksiyon sonrası suda çözünebilen turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşür ve elde edilen sonuçlar 450-490 nm'de ELİSA-Reader'da değerlendirilir. XTT'nin etkin bir şekilde indirgenmesi ve doğru, pratik bir değerlendirme yapılabilmesi için bir elektron transfer ajanı gereklidir. MTT gibi çözünme safhaları içermeyen bu

test, günümüzde hücre proliferasyon ve canlılığının belirlenmesinde ve sitotoksosite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (12,71).

2.2.5.3. Genetik Yöntemler

Kanser araştırmalarının ve potansiyel karsinojenlerin risk değerlendirilmesinde, genotoksosite testleri sıklıkla kullanılmaktadır. Yaklaşık yirmi yıl önce invitro mutajenite testleri toksikoloji biliminde ilk invitro metodlar olarak benimsenmiştir ve farmasötik, kimyasal bir bileşiğin lisansını almak için kromozom anomalilerini de içeren invitro genotoksosite testleri son nokta olarak kabul edilmiştir (84).

Saf kimyasalların toksisitesinin belirlenmesinde genotoksosite testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak günümüzde biyomateryallerin organizmada oluşturdukları spesifik mutasyon reaksiyonlarının kanser oluşumuyla ilgili olduğunun gösterilmesi ve bu materyaller canlı organizmaya uygulandıklarında bir takım olumsuz etkilerin tespit edilmesi nedeniyle, mevcut ve olası biyomateryallerin toksisitesinin belirlenmesinde artan bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (84, 71).

Biyomateryallerin organizmaya uygulama şekline ve uygulama alanına bağlı olarak yapılabilecek testlerin standart prosedürlerini ISO 10993 belirlemiştir. Standartlar, kemik, dentin dokusu ve mukoza ile temas halinde kullanılan tüm materyaller için öngörülmüştür. Bu prosedürlere göre materyal teması 30 günü aşacaksa ya da implante bir materyal 24 saat'ten daha uzun süre sağlam organizmada kalacaksa genotoksosite testlerine tabi tutulmalıdır.

Diğer test yöntemleri ile materyallerin kısa dönem etkileri incelenirken, genotoksosite testleri ile uzun dönem etkileri de incelenebilmektedir. Son yıllarda biyomateryallerin toksisite araştırmalarında da ana odak genotoksosite üzerinde yoğunlaşmıştır (71).

2.2.6. Kültürel Sayım Teknikleri

Hücrel gelişme hızını ölçmek için; hücrelerin ya da bunların kümeleşerek oluşturdukları formlarının "koloni" sayısını ya da yoğunluğunu belirlemek gerekmektedir. Hücrel kültür yoğunluğunun ifadesi olarak kullanılan kültürel sayım teknikleri; mikrobiyolojik, teknolojik ve sitolojik açıdan çok önemlidir. Hücrel kültürler optimal koşullarını bulduklarında, yoğun ve hızlı üreme gösterdiklerinden, belirli bir hücre birimi halindeki (koloni) sayımları, seyreltim ve buna bağlı hesaplama yoluyla gerçekleştirilebilir. Sonuçların eksponansiyel sayılar olarak verilmesi (5×10^2 gibi) daha bilimsel değerler ya da ifadeler olduğu için tercih edilmektedir (142). Hücrel sayım teknikleri olarak kullanılan yöntemler aşağıda özetlenmiştir;

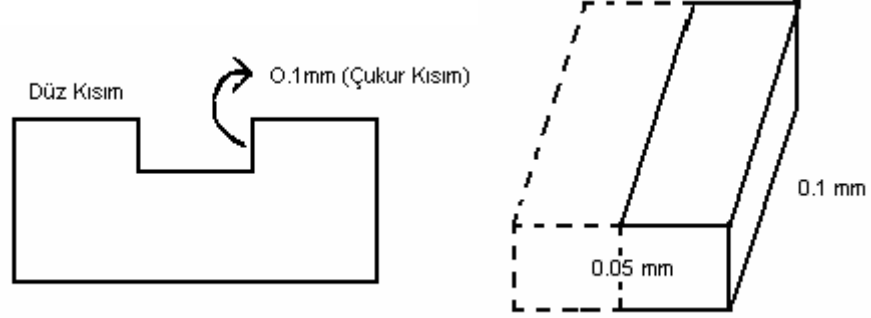
- Kültürel Sayım (Plak Kültür Sayım) Yöntemi,
- Direkt Mikroskopik Sayım Yöntemi (Toplam Hücre Mikroskopik Sayım Yöntemi)
- Bulanıklık Ölçüm Yöntemi (Optik Yoğunluk Ölçüm Yöntemi)

Plak kültür sayım yöntemi; Kültür konsantrasyonunun nicel olarak, karakterini belirlemek üzere kullanılan bir tekniktir. Direkt Mikroskopik sayım yöntemi ise toplam canlı ve ölü organizma hücreleri bir arada sayılmaktadır. Kısa sürede sonuç vermesi, analiz maliyetinin düşük, uygulamanın kolay, hazırlanan preparatın uzun sürede saklanabilir nitelikte ve mikrobiyal hücrelerin morfolojik durumu hakkında (çubuk, kok, vb.) bilgi edinilebilir özellikte olması, vb. bakımlardan önemli avantajlara sahiptir. Ancak bazı koşullar için en önemli dezavantaj, ölü ve canlı organizmaların birarada sayılma durumlarıdır. Bu yöntemde özel lamalar kullanılabilir (142).

Thoma Lamı ile Mikroskopta Direkt Sayım

Mikroorganizma (özellikle maya) ya da tıpta kan, sperm gibi hücrelerin sayımı amaçlı kullanılmaktadır. Thoma lamı; yüzeyde 16 büyük, 25 küçük

kare olmak üzere toplam 400 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 2.4). Derinlikleri 0,1 (1/10) mm. olan kare prizma şeklindeki bu bölüntülerin lamelle kapatılıp, oluşturdukları kapalı hacimde hücrelerin sayılması mümkün olmaktadır (10).



Şekil 2.2. Thoma Lamına Ait Kesit Görüntüsü (142)

1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = $0,05\text{mm.} \times 0,05\text{mm.} \times 0,1 \text{ mm.} = 0,00025 \text{ mm}^3 = 1/4000 \text{ mm}^3$ 'dür. Bu sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğundan; $0,00025 \text{ mm}^3 \times 400 = 0,1 \text{ mm}^3$ dür.

Thoma lamında sayım sonucu; "A x SF x 10 000" formülü ile hesaplanır ki, burada diğer kısaltmalar yukarıda verildiği gibidir. 10 000 ise, $0,1 \text{ mm}^3$ deki sayım sonucunu 1ml.'ye dönüştürmek üzere kullanılan sabit değerdir:

$$1\text{ml} = 1\text{cc} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3 = 10\,000 \times 0,1 \text{ mm}^3$$

Mikroskobik incelemeyle; Thoma lamında 1 görüş sahası içinde en az 1 büyük kareyi sığdırmak amacı ile, x10, ya da x20 büyütme güçlü objektifler kullanılabilir. Sayım büyük kare hesabı esası üzerinden yapılır. Genellikle çaprazlama (köşegen hizasında) 8 büyük kare sayılıp, sonuç 2 ile çarpılarak $0,1 \text{ mm}^3$ örnekteki hücre yükü değeri bulunur.

Thoma lamındaki büyük karelerin sınırları, ara çizgi ile belirtilmiştir. Uygulamada çoğu kere karıştırıldığı gibi, ara çizgi büyük karelerin sınırları

değil, büyük karelerin sınırlarını belirleyen yardımcı çizgidir. Thoma lamında büyük karelerin sınırı üzerinde olan hücrelerin nasıl sayılacağı çoğu kez tartışılan bir durumdur. Bu gibi hallerde değerlendirme için, hücrenin ne kadarının büyük kare içinde olduğuna dikkat edilir (10,142).

Direk mikroskopik sayım yöntemlerinde canlı ve ölü hücrelerin beraberce sayılması sakıncalıdır. Bununla beraber bazı basit, ancak etkin yöntemlerle canlı ve ölü hücreler ayrılabilir. Bu konuda en iyi örnek, özel boyalar ile hücrelerin boyanması, daha sonra direk sayım lamlarına alınmasıdır. Bu amaçla hücrelerinin bulunduğu tüpe bir kaç damla boya damlatılabilir. Ölü hücreler boyanır, ancak canlı olanlar boyanmaz. Bu şekilde sadece boyanmış hücreler sayılarak, canlı hücre sayısı elde edilir. Boyanmamış mikroorganizmaların, basit ışık mikroskoplarıyla görülebilmesi ve dolayısıyla bunların sayılabilmesi, özellikle deneyimsizler için çoğu kere sorun çıkarabilmektedir. İyi bir ışık ayarı ile bu sorun önemli ölçüde giderilmekle beraber, yine bazı özel boyaların kullanılması ile, sıvı kültürde mikroorganizmaların boyanması sağlanabilir (10).

2.2.7. Kültürde Kalsiyum ve Alkalen Fosfataz Boyaması

Hücre kültürü çalışmalarında hücreler tarafından sentezlenen kalsiyum depozitlerinin tespitinde en çok kullanılan yöntemler alizarin ve von Kossa boyama metodlarıdır. Kökboya daki (*Rubia tinctorum*) etkin boyarmadde olan alizarin 1831'de saf kristaller biçiminde izole edilmiş ve bunun bir naftalin türevi olduğu ileri sürülmüştür. Daha sonraları ise alizarinin kimyasal yapısının 1,2-dihidroksiantrakinon olduğu bulunmuştur.

Alizarinin Fiziksel Özellikleri:

Formülü: $C_{14}H_8O_4$

Molekül Ağırlığı: 240,20 g

Erime Noktası: 289-290 derece

Kaynama Noktası: 430 derece

Görünümü: Kırmızı trimetrik iğneler veya prizma kristalleri ile sarımsı ve kahverengi toz şeklindedir.

Alizarin sülfolandırılmasıyla elde edilen alizarin red s ise (alizarin-3-sülfonik asit) suda çözülebilir. Alizarin red s'in kapalı formülü $C_{14}H_7NaO_7S$ ve molekül ağırlığı ise 342.26 g/mol'dür. Alizarin sentezinden sonra piyasa çıkarılan anthracene brown ve alizarin orange'ın sudaki çözünürlüğü ise çok azdır. Bunlarla yapılan boyamanın mekanizmasının çözünenlerle aynı olduğu muhtemeldir (9).

Von Kossa metodunda ise ana boyar madde olarak gümüş nitrat kullanılır. Gümüş nitrat ($AgNO_3$) en önemli gümüş tuzudur. Renksiz ağır kristaller teşkil eder. Tıpta koterizasyon amacıyla kullanılır. Siğil tedavisinde çok iyidir. Ayrıca deriyi ve organik maddeleri karartmada tercih edilir. Deriyi kararttığından "cehennem taşı" ismini almıştır. Suda ve alkolde kolayca çözündüğünden, birçok gümüş bileşiklerinin elde edilmesinde ilkel madde olarak kullanılır. Tıp dışında en çok kullanıldığı yerler; fotoğrafçılık, mürekkepler, saç boyası yapımı ve gümüş kaplamacılığıdır (65).

Alkalen fosfotaz enziminin histokimyasal olarak kültürde tespitinde ise farklı boya tipleri mevcut olmakla birlikte genel olarak bu boyalarda yöntem gereği değişik fosfat tuzları ile uygun boya kullanılır (fast blue, fast red, fast blue rr, fast violet gibi). Bunlar arasında kapalı formülü $C_{10}H_7OP(O)(OH)(ONa) \cdot H_2O$ ve molekül ağırlığı 264.15 g/mol olan sodyum 1-naphthyl phosphate monohydrate ile kapalı formülü $C_{15}H_{14}ClN_3O_3 \cdot 1/2 ZnCl_2$, molekül ağırlığı 387.89 g/mol olan fast blue RR salt (4-Benzoylamino-2,5-dimethoxybenzenediazonium chloride hemi (zinc chloride) salt) alkalen fosfatazın boyanmasında sıklıkla kullanılan kimyasal bileşiklerdendir. Bu boyamada alkalen fosfataz yoğunluğuna göre değişik yeşil-sarı tonlarında renk verir.

2.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

İlk kez 1985'de bilim dünyasına sunulduğundan itibaren polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir çıkış açmıştır. Metot basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. Bu buluşundan dolayı K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülüne hak kazanmıştır.

PCR, bir çeşit "in vitro klonlama"dir. PCR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını; daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını; sonra zincirin uzamasını (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım bir PCR siklusunu oluşturur (1).

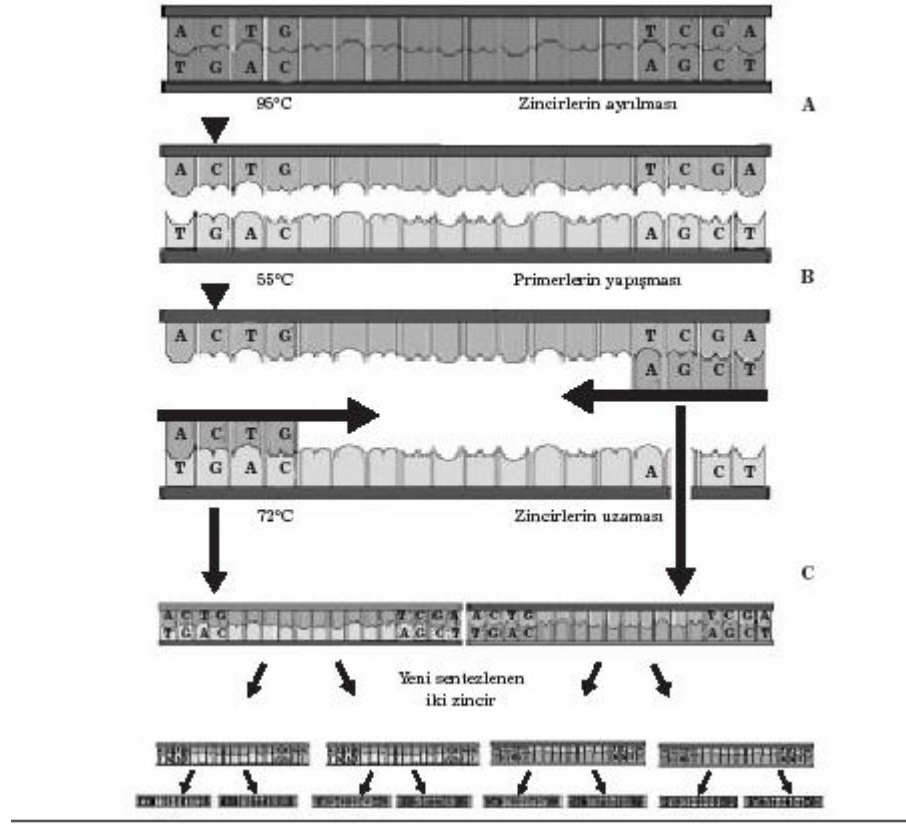
Bu teknikle; bir DNA hedefini 10^6 - 10^{12} arasında çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

PCR tekniği, çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR tekniği ile laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış; bir çok durumda radyoaktivite kullanımını gereksiz hale gelmiştir. PCR Teknolojisi için:

- 1) DNA örneği, genelde genomik DNA,
- 2) Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer,
- 3) dNTP'ler (A,T,C,G),
- 4) Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi,
- 5) Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı gereklidir (1).

2.3.1. PCR'ın Basamakları

- A. Denatürasyon: Bu basamakta PCR reaksiyonu içinde yer alan çift zincirli kalıp DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanır. Genelde 94-95°C'de 0.5-2 dakika denatürasyon yeterlidir. Alternatif olarak denatürasyonu kolaylaştırmak için reaksiyona gliserol, dimetil-sülfoksit (DMSO) ve formamid gibi kimyasallar eklenebilir.
- B. Primerlerin yapışması (annealing): Bu basamakta birbirinden ayrılmış DNA zincirlerine primerlerin 55-60°C'de bağlanması gerçekleştirilir. Optimal "annealing" sıcaklığı T_m (melting temperature) derecesinden 5°C daha düşüktür. 0.5-2 dakika "annealing" için yeterlidir. Eğer spesifik olmayan PCR ürünleri elde ediliyorsa her defasında "annealing" derecesi 1-2°C artırılarak optimize edilebilir.
- C. Zincir uzaması-polimerizasyon (extension): Zincir uzaması taq polimerazın aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75°C arasında gerçekleştirilir. 2 kb'a kadar olan PCR ürünlerinin oluşturulması için bir dakika süre yeterlidir. Daha uzun DNA fragmanlarının çoğaltılabilmesi için bu süreye her kb için bir dakika eklenmelidir (13).



Şekil 2.3. PCR Reaksiyonunun şematik gösterimi (13).

Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçası çoğaltılarak iki katına çıkarılmış olur (Şekil 2.5). Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu DNA parçaları da geometrik olarak artar.

Kısaca bir PCR reaksiyonunun temel bileşenleri

- 1- Çoğaltılacak DNA bölgesini içeren DNA kalıbı,
- 2- Çoğaltılacak bölgenin başını ve sonunu belirleyen iki primer,
- 3- Çoğaltılacak bölgeyi kopyalayacak olan DNA polimeraz enzimi,
- 4- Yeni zincirin yapımında kullanılacak olan nükleotid trifosfatlar,

5- DNA polimeraz enzimi için gerekli olan kimyasal ortamı sağlayan tampon sistemi olarak maddelenebilir.

İşlemde kullanılan değişkenler ise:

++Mg: Mg iyonu, primer ile DNA arasındaki bağlanmayı ve DNA polimerazın kalıp-primer kompleksi ile birleşerek oluşturduğu replikasyon kompleksini stabilize eder. Önerilen konsantrasyon aralığı 1-4 mM'dır.

Kalıp DNA miktarı: PCR oldukça etkili bir teknik olduğu için çok küçük DNA miktarları yeterlidir. Genellikle 50 µL reaksiyon karışımı için 0.1-1 µg genomik DNA kullanılır.

Enzim: Taq polimeraz enziminin hata yapma oranı oldukça yüksektir. Çünkü bu enzimin 3'-5'hata tamiri (proofreading) aktivitesi yoktur. Eğer yüksek oranda doğruluk gerekiyorsa "proofreading" aktivitesi olan enzimler tercih edilmelidir. Kullanılan enzim miktarının artırılması PCR etkinliğini artırır. 50 µL reaksiyon karışımı için 1-1.5 U taq polimeraz kullanılır.

dNTP: Reaksiyon karışımında her bir dNTP'nin konsantrasyonu genelde 200 µM'dır. Reaksiyon karışımında her bir dNTP'den eşit miktarda bulunması oldukça önemlidir. Büyük PCR fragmanlarının amplifikasyonu için daha fazla dNTP kullanılması gerekir.

Primerler: Primerlerin konsantrasyonu 3 µM'a kadar artırılabilir. Ancak yüksek primer/kalıp oranı spesifik olmayan amplifikasyonlara ve primer dimerlerinin oluşumuna neden olur (13).

2.3.2. PCR'ın Kullanım Alanları

Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında, prenatal tanıda, klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında, onkogenesinin araştırılmasında, gen ekspresyon araştırmalarında, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında, bilinmeyen dizilerin belirlenmesinde, geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında,

Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) Analizinde, Invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması, DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir (143).

Ayrıca;

1. İnsan genom projesindeki araştırmalarda,
2. Genetik hastalıkların teşhisinde,
3. DNA parmak izi analizinde,
4. Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde,
5. Allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde,
6. Tarımda (tohum saflığının belirlenmesi),
7. Sistemik ve evrim çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde),
8. Klonlama deneylerinde,
9. Mutagenез çalışmalarında,
10. Fosil DNA çalışmalarında,
11. Gen ifadelerinin karşılaştırılmasında kullanılmaktadır (143).

2.3.3 PCR'ın Tipleri

2.3.3.1.ReverseTranscription(RT)-PCR:

mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır. Bu PCR çeşidinde bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. DNA primeri genellikle dT oligonükleotidi içerir (sadece hexamer yapıda thymidine nükleotidi) ya da bir spesifik primerdir.dT messenger RNA'nın poli A kuyruğuna bağlanır (5'ucunda). dT hexameri tüm RNA çeşitlerinde bulunmakla birlikte dezavantajı 25°C de hibridize olması ve ortamda RNase inhibitörü bulunmaz ise çabuk bozunmasıdır. Reverse

transcription ve PCR amplifikasyonu bir veya iki aşamada uygulanabilir. Ayrı ayrı iki aşama halinde uygulanan RT-PCR daha hassas; tek aşamalı ise daha az kontaminasyon riski taşır (çünkü tüp transkripsiyondan sonra açılmamaktadır). Hangi yöntemin kullanılacağına belirlenmesi bizim hassasiyet mi yoksa kontaminasyondan kaçınmak mı istediğimize bağlıdır. RT-PCR için birkaç çeşit reverse transcriptase enzimi vardır. Bir veya iki aşamalı reaksiyon seçimi ve daha sonraki aplikasyonlara göre enzim karakteristiği seçilir. Bu seçimde RNase aktivitesinin olup olmaması, iyon gerekliliği, dUTP ekleyebilme yeteneği ve optimum çalışma ısı gibi etmenlerde önemlidir (69).

2.3.3.2 Múltipleks PCR

Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) teknolojisinin bir versiyonu olan múltipleks PCR yöntemi, birçok enfeksiyonun tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemle; amplifikasyon tüpü içerisine klinik örnekte bulunabilecek her mikroorganizma ya da aynı bakteri geni üzerindeki farklı hedef bölgeler için özgül olan primerler kullanılarak, çok sayıda hedef aynı zamanda çoğaltılabilmektedir. Her bir primer çiftine özgül, farklı büyüklükteki amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde gözlenmesi ile klinik örnekte mikroorganizmaların varlığı ve identifikasyonu aynı anda yapılabilmektedir (62).

2.3.3.3. Nested ve Semi-Nested PCR

İki aşamalı amplifikasyon yöntemleridir. “Nested” PCR’da, ilk aşamada iki adet dış (outer) primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılmaktadır (15-30siklus). Sonra bu amplifikasyon tüpünden alınan örnekteki DNA’nın daha kısa bir bölümü iç (inner) primerlerle çoğaltılmaktadır (15-30 siklus). “Inner” primer, “outer” primerlerin bağlanma yerlerinin iç kısmında kalan, kendilerine özgül yerlerine tutunmaktadırlar.

“Semi-nested PCR’da ise ikinci aşamada kullanılan primerlerden biri içerden (inner), diğeri “outer” primerle aynı yerden başlamaktadır (44).

2.3.3.4. In Situ PCR

PCR ile ilgili çalışmalarda diğerk önemli bir aşama, lam üzerine tespit edilen enfekte hücrede bulunan mikroorganizmaya ait hedef DNA'nın amplifikasyonu ve sonucun “in situ” hibridizasyon ile gösterilmesidir. Bu yöntemin en önemli avantajı, amplifikasyon hücre içinde gerçekleştiğı için amplikonlara bağılı kontaminasyon olmamasıdır (8).

2.3.3.5. Real-Time PCR

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar LightCycler(Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır.

Real-time PCR kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiğı için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren proplar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (86, 99).

2.3.3.6. Hot-Start PCR

Normal PCR protokolünde amplifikasyon karışımı hazırlanırken hedef DNA ve primerler arasında özgül olmayan bağlanmalar olabilmekte, bu bağlanmaların polimeraz enzimi ile uzatılması sonucunda çok sayıda istenmeyen bant ortaya çıkabilmektedir. Bunu önlemek için geliştirilmiş olan “hot-start” PCR tekniğinde temel maddelerden (Polimeraz, nükleotitler, Mg^{2+} ya da primerler) biri başlangıçta amplifikasyon tüpüne konulmamaktadır (44).

2.3.3.7. Touchdown PCR

“Touchdown” PCR, optimal primer bağlanma derecesini saptamak amacıyla geliştirilen bu yöntemde, bağlanma sıcaklığı, sikluslar arasında, 1-

2°C düşürülerek uygun derece belirlenmekte ve bu sıcaklıkta kalan amplifikasyon siklusları tamamlanmaktadır. Amplifikasyonun ilk siklusunda, bağlanma derecesi olarak, hesaplanan T_m derecesinin yaklaşık 15°C üzerinden başlanmakta, takip eden sikluslar esnasında 1-2 derece düşürülerek T_m derecesinin takriben 5°C üzerine kadar gelinmektedir. Böylece hedef bölgeye özgü amplikonlar elde edilmektedir (38,40).

2.4. NON STEROİDAL ANTİENFLAMATUVAR İLAÇLAR VE BENZİDAMİN HCl

2.4.1. Non Steroidal Antienflamatuvar İlaçlar

Ağrı, Dünya daki en büyük tıp teşkilatlarından birisi olan Uluslararası Ağrı Araştırmaları Teşkilâtı tarafından 1974 yılında " Vücudun herhangi bir yerinden kaynaklanan, organik bir nedene bağlı olan veya olmayan insanın geçmişteki tüm deneyimlerini kapsayan, hoş olmayan özel bir duyudur" şeklinde tanımlanmıştır Gerçekte ağrı sadece algılanan bir deneyim değil aynı zamanda yorumlanan bir deneyimdir. Bu nedenle kişiden kişiye farklılık gösterir. Ağrı kısa süreli (akut) ya da uzun süreli (kronik) olarak iki biçimde ele alınabilir. Akut ağrı bir alarmdır, bir uyarı sistemi olarak çalışır. Ağrı, akut durumlarda bir alarm olarak karşımıza çıkarken, kronik ağrı ise tam tersine bir hastalıktır. Ağrı sadece kişinin fiziksel gücünü değil, sosyal yaşamını, çalışma kapasitesini ve psikolojisini olumsuz yönde etkilemektedir. Ağrıyı durdurmak için en basit yol ağrıyı tetikleyen faktörün ortadan kaldırılmasıdır. Ne yazık ki bu her zaman mümkün olmayabilir. Günlük yaşantıda sıkça karşılaşılan ve başka bir rahatsızlığa bağlı olarak ortaya çıkmayan baş ağrısı, diş ağrısı, kas-eklem ağrıları, adet sancıları gibi akut ağrılarda ağrı kesici ilaçlar ile çözüm bulunabilir.

Ağrı tedavisinde kullanılan sistemik analjezikler; non-opioidler ve opioidler olarak iki gruba ayrılır. Non steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), non-opioidler içerisinde yer alır. NSAİİ'lar tüm dünya da en çok

satılan ilaç gruplarından biridir ve kullanımları gün geçtikçe artmaktadır. Kullanımlarının gün geçtikçe artmasının temel nedeni ortalama yaşam süresinin uzaması ile birlikte romatizmal hastalıkların sıklığının artması ve bu ilaçların bir çok yeni klinik durumlarda giderek daha yaygın olarak kullanılmaya başlamalarıdır (112). Narkotik olmayan analjeziklere bu grup ilaçların farmakolojik etki profiline daha uygun düşen bir adla steroid olmayan antienflamatuvar ilaçlar ya da kısaca antienflamatuvar analjezikler de denilir. Diğer bir ad opioid olmayan (non-opioid) analjezikler adıdır. Daha çok analjezik, antipiretik, antienflamatuvar ilaçlar olarak anılırlar (75,89,106).

NSAİİ, genellikle enfeksiyona ya da zedelenme yaratıcı etkene karşı, dokunun kendini savunma amacıyla gösterdiği reaksiyon, enfeksiyon, harabiyete karşı dokuda ağrı, kızarıklık, şişkinlik ve ısı artışı ile meydana gelen tablo olarak isimlendirilen enflamasyona bağlı özellikle artrit, osteoartrit ve benzeri romatizmal hastalıklarda çok faydalıdır (75). Ayrıca uzun süre ilaç verilmesi durumunda diğer grup ilaçlara göre bağımlılık yapmamaları sebebiyle de tercih edilirler. NSAİİ'ların büyük bir kısmı analjezik, antipiretik ve antienflamatuvar etki yaparlar. Bazılarında ise sadece analjezik ve antipiretik etki vardır (89). NSAİİ'lar genel özellikleri, etki mekanizmaları, klinik kullanım alanları ve yan etkileri açısından birbirine çok benzemekle beraber tüm NSAİİ'lar aynı özelliğe sahip değildir ve aralarında bazı farklar vardır. Bu bölümde yukarıda belirtilen analjezik, antipiretik ve antienflamatuvar etki mekanizmaları, farmakokinetik özellikleri, genel klinik kullanımları, genel yan etkileri, ilaç etkileşimleri ve aralarındaki farklılıklar gözden geçirilecektir (106).

2.4.1.1. NSAİİ'ların Temel Etkileri ve Etki Mekanizmaları

NSAİİ'ların temel etkileri analjezik etki (periferik ve/ya da santral), antipiretik etki ve antienflamatuvar etki olarak sayılabilir. Bu etkiler hemen her NSAİİ'da bulunmakla birlikte her bir etki açısından NSAİİ'lar arasında farklılıklar vardır. Bazı NSAİİ'ların analjezik, bazılarının antienflamatuvar, bazılarının ise antipiretik etkileri daha belirgindir (75,112).

NSAİİ'ların en önemli etki mekanizmaları siklooksijenaz enzimini inhibe ederek prostaglandin (PG)'lerin sentezini baskılamalarıdır. Siklooksijenazın inhibisyonu yoluyla PG sentezinin baskılanması NSAİİ'ların en önemli etki mekanizmaları olmakla beraber tek mekanizma değildir. Siklooksijenazı zayıf olarak inhibe eden ilaçların da potent olarak inhibe eden ilaçlar kadar güçlü antienflamatuvar etki gösterdikleri saptanmıştır. Son yıllarda NSAİİ'ların etkileriyle ilgili olarak bir çok yeni mekanizma gündeme gelmiştir. Bu mekanizmaların başlıcaları şunlardır (75,96);

1. Siklooksijenaz enziminin inhibisyonu ile PG sentezinin azaltılması
2. Lipooksijenaz enziminin inhibisyonu ile lökotrien sentezinin azaltılması
3. Süperoksit üretiminin baskılanması
4. Lizozom enzim salımının baskılanması
5. Hidrojen peroksit yapımının baskılanması
6. Membranda fosfalipaz C aktivitesinin baskılanması
7. Kıkırdak metabolizması üzerine olan etkileri
8. Lenfosit fonksiyonları üzerine olan etkileri
9. Santral analjezik etki
10. Bradikinine bağlı enflamatuvar olaylarının baskılanması

İn vitro çalışmalarda ve hayvan deneylerinde birçok NSAİİ'ların değişik derecelerde olmak üzere lipooksijenaz enzimini de inhibe ettikleri saptanmıştır. Romatoid artritli hastalarda sinovyal sıvıda PGE_1 ve PGE_2 oluşumunun arttığı ve aspirin tedavisi ile bunların düzeyinin sıfıra düşürüldüğü bulunmuştur; ancak hastalığın klinik seyri ve sinovyal PG düzeyi arasında bir ilişki bulunamamıştır (75, 106).

2.4.1.2. NSAİİ'ların Farmakokinetik Özellikleri

NSAİİ'ların çoğunda ortak olan bazı farmakokinetik özellikler vardır. Bu ilaçlar gastrointestinal sistemden iyi emilirler, yüksek oranda albumine bağlanırlar, çoğunun dağılım volümleri düşüktür. Bazı NSAİİ'ların sinovyal sıvıda toplanma özellikleri vardır. Bir ilacın sinovyal dokularda toplanması o ilacın artritli hastalıklardaki etkinliğini arttıran bir faktördür. Bazı NSAİİ'ların (ibuprofen ve ketoprofen gibi) R ve S olmak üzere iki optik izomeri (enantiomeri) vardır. Bu enantiomerlerden S enantiomeri siklooksijenazı güçlü bir şekilde inhibe ederken R enantiomeri in vitro deneysel modellerde siklooksijenazı inhibe etmez. Günümüzde R enantiomerlerinin eskiden kabul edildiği gibi inaktif olmadıkları ve periferik dokulardan çok santral sinir sisteminde etkili olarak analjezik etki gösterdikleri anlaşılmıştır (89).

2.4.2. Benzidamin Hidroklorür (BN)

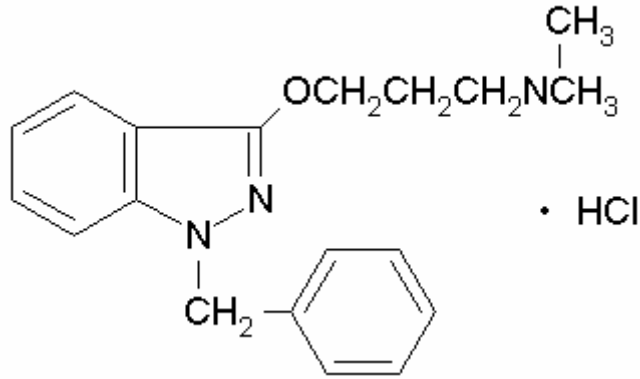
2.4.2.1. Benzidamin Hidroklorür'ün Kimyasal Yapısı Ve Fiziksel Özellikleri

BN kokusuz, beyaz, kristalimsi toz şeklinde bir etken maddedir. Oda sıcaklığında sudaki çözünürlüğü 1'e 1 dir, etanol ve kloroformda çözünür, eter'de çözünmez . Erime derecesi ise 157-159 °C dir. Sudaki %10'luk çözeltisinin pH'sı 4.0 –5.0 arasındadır (23).

Kimyasal yapısı;

3-(1-Benzil-1H-indazol-3-iloksi)-N N-dimetilpropilamin hidroklorür

olup kapalı formülü $C_{19}H_{23}N_3O.HCl$ ve molekül ağırlığı 309.4 dür (23).



Şekil 2.4. Benzidamin HCl'ün yapısı (106)

2.4.2.2. Benzidamin Hidroklorür'ün Farmakolojik Özellikleri

Benzidamin hidroklorür; antienflamatuvar, analjezik, antipiretik ve lokal anestezik etki gösteren, sistemik ve lokal olarak uygulanabilen indazol türevi (119) bir non steroidal antienflamatuvar ilaç (NSAİİ)'dir. Benzidamin hidroklorürün antihelmintik özelliğe ve bir dereceye kadar antibakteriyel ve antifungal aktiviteye de sahip olduğu bildirilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı dişhekimliğinde cerrahi işlemlerden sonra oluşan ağrı ve inflamasyonun azaltılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, aftöz ülserler ve gingivitis gibi iltihapsal olayların semptomatik tedavisinde de etkili olabilmektedir. Sabit ortodontik aygıtlar nedeniyle oluşan ülserasyonlar (110), KBB'de tonsillit, sinüzit ve ameliyatlarında, ortopedi ve travmatoloji'de doku zedelenmesi ve/ya da iltihaplı doku ameliyatlarında ayrıca üroloji ve jinekoloji ameliyatlarında kullanılır (18).

Benzidamin hidroklorür her ne kadar bir NSAİİ ise de bilinen NSAİİ'lardan farklı bir yapıya sahiptir. Diğer asidik NSAİİ'lardan farklı olarak alkalik pH'ya sahiptir. Bu alkali tabiatı sistemik dolaşıma geçmesini takiben iltihaplı dokularda yoğunlaşmasını sağlar. Sağlıklı dokularda yoğunluğu ise azdır. Plaketalet agregasyonunu siklooksijenaz inhibisyonundan bağımsız olarak inhibe eder (106).

2.4.2.3. Benzidamin Hidroklorür'ün Yan Etkileri

Benzidamin Hidroklorür'ün diğer NSAİ'lara oranla mide-barsak kanalı yan etkisi çok düşüktür. Ancak hastaların küçük bir kısmında epigastrik ciddi olmayan ve geçici yan etkilerle karşılaşmıştır. Gargara tipi preparatında ağızda çok hafif bir tat almada duyarsızlık saptanmıştır. Buna rağmen yan etkileri önemsenmeyecek kadar az denilebilir (100,138).

2.4.2.4. Benzidamin Hidroklorür'ün Farmakokinetik Özellikleri

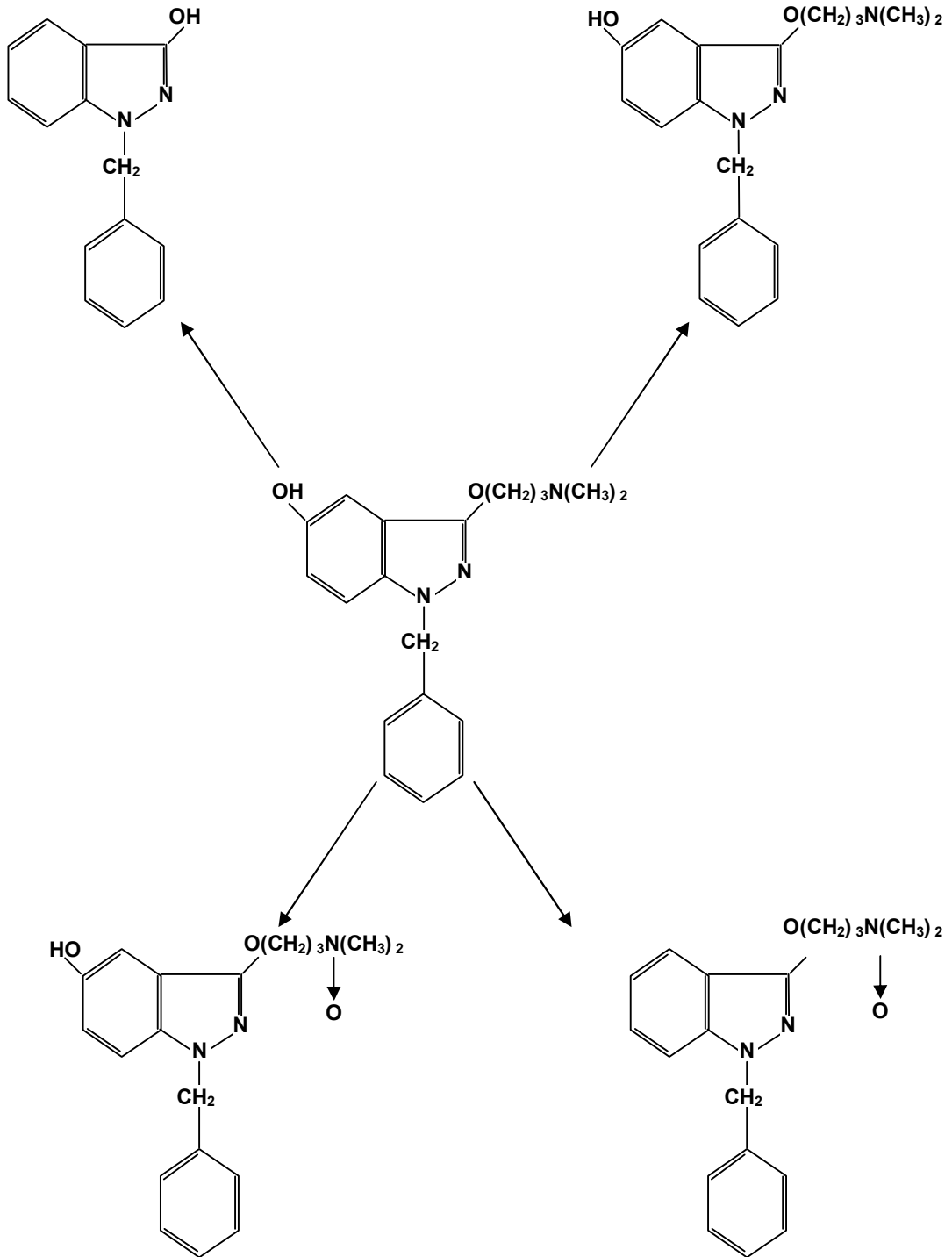
BN, farklı bazik kimyasal yapısından dolayı özel bir farmakokinetiğe sahiptir. Sistemik ve topikal uygulamadan sonra ilacın kanda ve normal dokulardaki konsantrasyonu düşük, iltihaplı dokularda konsantrasyonu yüksektir. 1-10 µg/ml gibi in vivo olarak kolayca erişilebilen doku konsantrasyonlarında nötrofillerden granüler enzimlerin salımını ve trombosit agregasyonunu inhibe etmekte, asetokolin, histamin ve serotonin gibi vazoaktif aminleri antogonize etmekte, lizozom ve hücre membranı stabilizasyonu sağlamaktadır. 35-100 µg/ml gibi yüksek doku konsantrasyonlarına ilacın topikal olarak uygulanması suretiyle ulaşılabilen ve bu konsantrasyonlarda makrofajların süperoksit anyonu üretimi ve aynı zamanda tromboksan sentezi inhibe edilmektedir. 200-400 µg/ml'lik konsantrasyonlar ise in vitro olarak prostaglandin sentezini ve araziidonik asit lipooksijenasyonunu inhibe etmektedir. Ancak bu yüksek doku konsantrasyonlarına ilacın topikal olarak uygulanmasıyla dahi ulaşamadığı bildirilmiştir. Benzidamin HCl'ün genellikle 1-10 µg/ml'lik doku konsantrasyonlarına ulaştığı ve bu sınırlar içerisinde etki gösterdiği düşünülmektedir. Ancak, söz konusu doku konsantrasyonunda nötrofillerin granüler enzimlerinin salınımının inhibe olması şeklinde görülen etkinin fenilbutazon ve bufekzamat gibi ilaçlara göre 10 kat daha az bir doku konsantrasyonuyla sağlanabildiği belirtilmektedir. Bu farklılığın in vivo ortamda daha da belirgin olabileceği bildirilmektedir. Benzidamin hidroklorür asidik NSAİ'lardan farklı olarak biyolojik proteinlere daha az bağlanmaktadır, dolayısıyla ilacın hücreler tarafından kullanımı artmaktadır (21,127).

BN, prostoglandin sentezini inhibe ederek etki gösteren bir çok NSAİİ'nin aksine PGF2 α , PGE2 ve PGD2 sentezini ancak çok yüksek dozlarda inhibe edebilmektedir. Fakat sistemik uygulamayla ulaşılamayan bu yüksek dozlara topikal uygulamayla kısmen ulaşılabileceği de belirtilmektedir. Bununla birlikte, PGD2 ve PGF2 α 'nın inhibe edildiği konsantrasyonlarda PGE2 üretimi artmaktadır (127).

BN'nin PGF2 α , PGE2 ve PGD2 sentezi üzerindeki farklı etkisinin bu ilacın antienflamatuvar aktivitesi üzerinde nasıl bir rol oynadığı bilinmemektedir. Ancak PGE2 sentezini artırması ve prostaglandin sentezi üzerindeki etkisinin az olması nedeniyle oral yolla verildiğinde ülserojenik ve gastrik lezyonlara yol açmadığı düşünülmektedir. Benzidamin HCl, hücre membranlarını stabilize ederek araşidonik aside dönüşebilen membran fosfolipidlerinin salınımını inhibe etmek suretiyle antienflamatuvar bir etki sağlayabilmektedir. Bu durumda BN'nin prostoglandinlerin, tromboksan A2'nin ve lipooksijenaz ürünlerinin üretimini dolaylı olarak azaltabileceği düşünülmektedir (106).

2.4.2.5. Benzidamin Hidroklorür'ün Eliminasyonu

Benzidamin hidroklorür, vücuttan idrar yoluyla, Benzidamin, 5-hidroksibenzidamin, 1-benzil-3 hidroksi -1H-indazol, Benzidamin N-oksit, 5-hidroksibenzidamin N-oksit ve glukuronik asit bağları şeklinde dört ayrı forma dönüşerek atılmaktadır. Benzidamin HCl metabolizasyonu (Şekil 2.3)'dedir.



Şekil 2.5. Benzidamin HCl'ün metabolizasyonu (106)

2.4.2.6. Benzidamin Hidroklorür'ün Piyasa İsimleri ve Formları

Benzidamin HCl'ün piyasada değişik firmalar tarafından üretilen jel, gargara, sprey ve tablet formları mevcuttur Tablo(2.1).

Tablo 2.1. Benzidamin HCl'ün Piyasa İsimleri (104).

<u>İsim</u>	<u>Firma</u>	<u>Preparat Formu</u>	<u>Doz</u>
Benzidan	Deva	Gargara	180mg
Benzidan	Deva	Jel	5g
Benzidan	Deva	Film tablet	50 mg
Farengil	Eczacıbaşı	Gargara	%0.15
Farengil	Eczacıbaşı	Oral sprey	%0.15
Farthex	Santa Farma	Oral sprey	%0.15
Farthex	Santa Farma	Gargara	%0.15
Kloraben	Drogsan	Gargara	%0.15
Kloraben	Drogsan	Oral sprey	%0.15
Andorex	Delta vital	Sprey	0.045g
Orohex Plus	Abdi İbrahim	Oral sprey	%0.15
Tanflex	Abdi İbrahim	Draje	50 mg
Tanflex	Abdi İbrahim	Sprey	0.045 mg
Tanflex Verde	Abdi İbrahim	Gargara	%0.15
Tantum	Santa Farma	Draje	50 mg
Tantum Verde	Santa Farma	Gargara	%0.15
Tantum Verde	Santa Farma	Sprey	0.045g
Tantum	Santa Farma	Jel	%5
Ternex	Tripharma	Jel	%5
Ternex	Tripharma	Gargara	%0.015
Ternex	Tripharma	Oral Sprey	%0.015

Tez çalışmamızda ağrı kontrolünde kullanılan analjezik ilaçlar arasında yer alan Benzidamin HCl'ün ortodontik diş hareketleri esnasında meydana gelen kemik yapımı ve dolaylı yollardan yıkımdan sorumlu

osteoblast hücreleri üzerine etkilerinin in vitro olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada mouse calvaria pre osteblast hücreleri (MC3T3-E1 subclone 14) kullanılmış olup ilacın hücreler üzerine olan etkisini belirleyebilmek için alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi ve boyaması, alizarin ve van Kossa boyamaları, sitotoksikite testi (XTT), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), hücre sayımı ve hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi gibi bir dizi deney planlanmıştır.

ALP aktivitesi ve boyamasında sırasıyla biyokimyasal ve histokimyasal olarak osteoblastlardan salgılanan bir enzim olan alkalen fosfatazın tespiti,

Alizarin ve van Kossa boyamaları ile sağlıklı osteoblastlar tarafından oluşturulan mineral birikimleri ve kemik nodüllerinin görüntülenmesi,

XTT, hücre sayımı ve görüntülenmesi ile Benzidamin HCl'ün hücreler üzerine olabilecek sitotoksik etkilerinin belirlenmesi,

PCR ile de bilinen osteoblastik enzimlerin belirli gen dizilerinden yola çıkarak osteoblastların kemik oluşturmak maksadı ile bu genleri sentezleyip sentezlemediğini dolayısıyla kemik oluşturmak gibi bir faaliyet gösterip göstermediklerinin tespiti amaçlanmıştır.

Bulgularımız Benzidamin HCl'ün osteoblastlar üzerine olumsuz etkilerinin olmadığını ya da olumlu etkileri olduğunu gösterirse klinisyen tarafından ortodontik tedaviler esnasında ağrı kesici olarak önerilebileceği düşünülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

05 Şubat 2007 gün ve AR-2007/11 no'lu projemiz, GATA (Gülhane Askeri Tıp Akademisi) Araştırma Bilimsel Kurulu'nca incelenerek 04 Mayıs 2007 gün ve 03 sayılı toplantısında onaylandı. Araştırmamız GATA Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Ortodonti Anabilim Dalı, Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kanseri Araştırma Kısmı, Biyokimya ve Kl. Biyokimya Anabilim Dalı, Eczacılık Bilimleri Merkez Başkanlığı, Mikrobiyoloji ve Kl. Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yürütüldü.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI

Hücre kültürü çalışmalarının tümü steril laminar air-flow kabinde (Laminar Flow Cabinet Biolab/İtalya) gerçekleştirildi.

Çalışmamızda; Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kanseri Araştırma Kısmında sıvı azot tankında %90 serum ve %10 DMSO (Dimethyl sulfoxide) içeren tüpler içinde -196 derecede donmuş halde saklanan mouse calvaria (fare kafatası) pre osteblast hücre hattı (MC3T3-E1 subclone 14) kullanıldı.

Hücre kültür vasatı olarak; % 10 FCS (Fetal Calf Serum) (Biological Industries, Israel Beit Haemek LTD/Israel), %1 L-glutamin (Sigma G6392/US), %6 Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, Israel Beit Haemek LTD/Israel), eklenmiş MEM-ALPHA (α -MEM) (alpha-modified minimal essential medium) (Biological Industries, Israel Beit Haemek LTD/Israel) kullanıldı. 50µg/ml L-Ascorbic acid (Sigma A8960), 10^{-8} M dexamethasone (Sigma D4902/US)/UK , 10mM β -glycerolphosphate (Sigma G9891/US) hücrelerin maturasyonu için ayrıca ilave edildi (4,25,51).

Hücre içeren donmuş tüpler azot tankından çıkarılıp 36°C lik su banyosu içinde çözüldükten sonra, içlerine 5cc PBS (Phosphate Buffer

Saline) (Biological Industries,Israel Beit Haemek LTD/Israel) konuldu ve santrifüj cihazında (Hermle Z383K/Germany) 7 dakika boyunca 800 rpm'de santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki süpernatant kısımlar atıldıktan sonra tüpün tabanına çökelen hücreler 2 ml taze vasatla birkaç kez pipetlenerek, 25 cm²'lik hücre kültür kabına 5ml taze vasatla yerleştirildi. Hücre kültür kabının kapağı 1 diğ gevşetilerek 37°C'de %5 CO₂'li etüvde (İnkübatör Sanyo/Japan) inkübe edildi. Hücreler hücre kültür kabının tabanını yaklaşık 72 saat sonra tamamen kaplayıp tek tabaka oluşturdıklarında, hücre kültür kabının içindeki vasat dökülerek atıldı ve hücre kültür kabının içine Tripsin-EDTA (Biological Industries,Israel Beit Haemek LTD) ilave edildi. Hücre kültür kabı birkaç kez aşağı yukarı hareket ettirildikten sonra, tripsin hücrelerin tutunduğu yüzeyin tersinden dökülerek uzaklaştırdı. Daha sonra hücre kültür kabına 5ml daha tripsin ilave edildi ve aynı işlem tekrarlandı. Hücre kültür kabının içinde, yaklaşık 0.5 ml kadar tripsin bırakıldı. Kalan bu tripsinle hücre kültür kabı 37°C'lik etüvde hücreler tamamen tutundukları yüzeyden kalkıncaya kadar bekletildi. Hücrelerin yüzeyden kalktığı makroskobik (hücre kültür kabının tabanından akmaya başladıkları) ve mikroskobik olarak (hücreler yuvarlaklaşıp yüzeyde hareket etmeye başladıkları) gözlemlendi. Sonra toksik olan tripsinden hücreleri uzaklaştırmak için 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve bu hücreler 5'er ml taze vasatla 25 cm²'lik 4 ayrı hücre kültür kabına taksim edilip, hücre kültür kaplarının kapakları 1 diğ gevşetilerek 37°C %5'lik CO₂'li etüve yerleştirildi, bu şekilde subkültüre edildi (6).

Bu kültür kaplarının vasatları 3 günde 1 değiştirilerek hücrelerin çoğalması beklenildi. 7 gün sonra invert mikroskopta (Nikon Eclipse TS100, Japan) hücrelerin tabanı kapladığı gözlemlendikten sonra hücreler tripsinize edilip kaldırıldı kendi vasatıyla dilüe edildi ve thoma lamında (Merck/Germany) mikroskop altında incelenip sayıldı.

Bu şekilde hücre kültürleri subkültüre edilip çoğaltıldıktan ve hücre sayıları belirlendikten sonra, istenilen hücre yoğunluğunda dilüsyon elde etmek için toplanmış hücrelerin içerisine ne kadar daha taze vasat konulması gerektiği hesap edildi.

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILACAK İLAÇ DOZU TESPİTİ

Daha önce NSAİİ ilaçlarla ve Benzidamin HCl ile yapılan çalışmalarda (130,20) yaklaşık olarak 10^{-5} , 10^{-6} M'lık konsantrasyonların kullanılmasından yola çıkarak 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M konsantrasyonda ilacın sitotoksiteleri 24, 48 ve 72. saatler için spektroskopik olarak yapılan MTT (3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile belirlendi ve çıkan sonuçlara göre kullanılan hücre hattı için IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) konsantrasyonları hesaplanıp çalışmada kullanılacak doz tespiti yapıldı.

Doz tespit çalışmasının başlangıcında istenilen konsantrasyonda ilaç hazırlamak için aşağıdaki hesaplamalar yapıldı;

$M = \text{Molekül Ağırlığı} / \text{Hacim}$ formülüne göre 0.1 gr etken madde kullanıp 1 Molarlık solüsyon elde etmek için formülde Benzidamin HCl'ün molekül ağırlığı yerine koyuldu ve $345.9 / 1000\text{ml} = 0.1/x$ şeklinde orantı kuruldu ve 0.29 ml bulundu (1 M'lık ilaç solüsyonu elde etmek için 0.29 cc'de 0.1 gr madde çözmek gerekli).

Stok solüsyonu hazırlamak için;

$1M = 0.1\text{gr}/0.29\text{cc} = 0.1\text{gr} / 290\mu\text{l} \rightarrow 1\text{mM}=0.1\text{gr}/290\text{cc} \rightarrow 10\text{mM}=0.1\text{gr}/290 \text{ cc (stok solüsyonu)}$ elde edilmiş olur. Bu oranta stok solüsyonu çalışmalarda gerekli olduğu anda kullanılmak üzere hazırlanıp -20°C saklandı. Örnek olarak stoktan doz çalışmasının yapılacağı 24, 48 ve 72. saatler için 10^{-4} Molar konsantrasyonda solüsyon hazırlamak için ise aşağıdaki işlemler yapıldı;

Toplam 3 adet (24, 48 ve 72.saatler için) 96 gözlü plağımızda ve her plakta 2 sıra ve 6 kuyucuk olduğu gözününe alındığında

$$2 (\text{sıra}) \times 6 (\text{kuyucuk}) = 12 \times 100\mu\text{l} = 1200 \times 3 \text{ plate} = 3600 \sim 4000\mu\text{l}$$

(Yaklaşık olarak 4000 μl solüsyon hazırlanması gerekliliği belirlendi)

$m1.V1=m2.V2$ formülüne göre

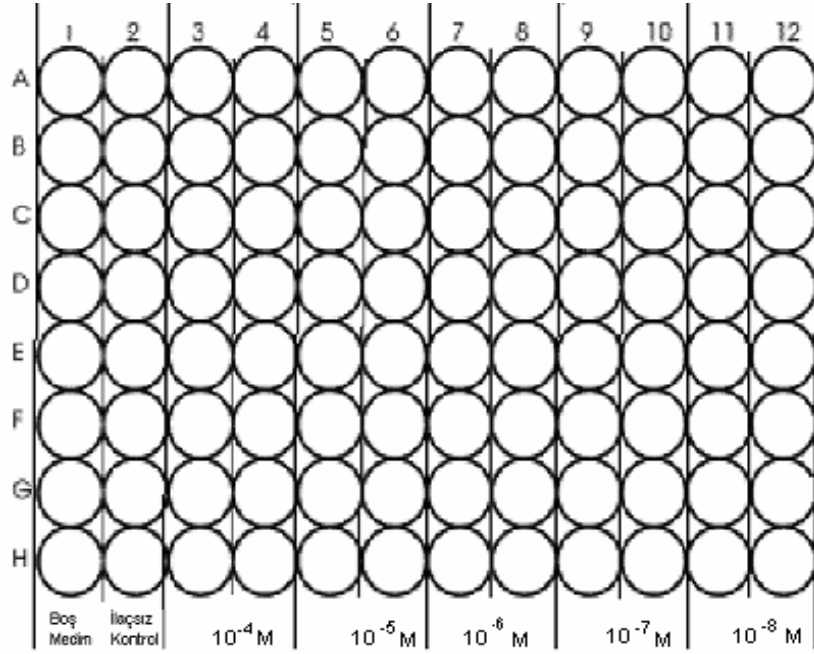
10^{-2} (stok). $V1=10^{-4}$.4000 şeklinde değerler yerine konulduğunda;

$V1= 40\mu\text{l}$ bulundu ve kuyucukta daha önceden $100\mu\text{l}$ hücre solüsyonu olduğu için bu dilue olmasın diye bu değer iki katı yani $80\mu\text{l}$ alındı.

Sonuçta stoktan $80\mu\text{l}$ alınıp vasat ile $4000\mu\text{l}$ 'ye tamamlandığında bütün deney gözlerine yetecek miktarda 10^{-4} M konsatrasyonda ilaçlı vasat elde edilmiş oldu. Aynı hesaplama 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M konsatrasyonlar içinde yapıldı.

Daha sonra;

Hücreler yukarıda anlatılan şekilde pasajlanıp hücre sayıları 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde seyreltildikten sonra 96 gözlü (96-well plate Corning/USA) hücre kültür plaklarına her gözede $100 \mu\text{l}$ olacak şekilde taksim edildi. 24, 48 ve 72. saatler için 3 ayrı plak kullanıldı ve her plak aynı olmak üzere 96 gözlü plakların dikey ilk sırasına boş vasat, dikey ikinci sırasına ilaçsız kontrol, 3. ve 4. sıralara 10^{-4} Molar, 5. ve 6. sıralara 10^{-5} Molar, 7. ve 8. sıralara 10^{-6} Molar, 9. ve 10 sıralara 10^{-7} Molar, 11. ve 12. sıralarada 10^{-8} Molar ilaç süspansiyonu konuldu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 96'lık plate yerleşimi

Değerlendirmenin yapılacağı saatlerde (24,48,72), o saate ait plate alınıp içlerindeki vasat boşaltıldı ve yerine 100µl/göz taze vasat ilave edildi. Daha sonra 12,5 pl/göz MTT solüsyonu (Cat. No:5655, Sigma, USA) ilave edilip karanlık ortamda 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde 4 saat bekletildi. Mikroskopta renkli formazan kristallerinin oluşumu izlendikten sonra bu gözlerdeki karışım döküldü ve 100 pl/göz DMSO ve 12,5 pl/göz Glycin tampon çözeltisi (pH: 10.30) ilave edilip oluşan bu formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Daha sonra bu gözlerdeki renk yoğunluğu optik okuyucuda (ELx800, Bio-Tek Instruments, INC,USA) 570 nm'de okundu.

Çıkan sonuçlara göre kontrol gözünün ve her konsatrasyondaki gözün ortalaması alındı medianın etkisini ortadan kaldırmak için boş media ortalaması bu değerlerden çıkarıldı.

Sonra ilaçsız kontrol gözündeki hücrelerin hepsi yaşamış kabul edilip

Kontrol gözlerinin ortalaması ↗ 1(Tamamı yaşamış düşünülüyor)

İlaçlı gözlerin ortalaması ↘ X

Şeklinde orantı kurulup 100 ile çarpılarak yüzde cinsinden hücrelerin ilgili molar konsantrasyon ilaçla muamelesi sonucu yaşam yüzdeleri elde edildi.

24,48 ve 72. saatler için bütün ilaç konsantrasyonlarında bu işlemler yapıldı ve elde edilen değerlere göre en anlamlı bulunan 72.saat için IC50 hesaplanmasına karar verildi (72,148,20).

MTT sonuçlarına göre 72. saat için hesaplanan hücrelerin yaşam yüzdeleri;

$$10^{-4} \rightarrow \%12.9$$

$$10^{-5} \rightarrow \%63.8$$

$$10^{-6} \rightarrow \%63.8$$

$$10^{-7} \rightarrow \%68.3$$

$$10^{-8} \rightarrow \%71.8 \text{ şeklinde yukarıdaki şekilde hesaplanarak bulunmuştu.}$$

Bu sonuçlara göre hücrelerin %50'sinin yaşadığı aralık 10^{-4} ile 10^{-5} (10^{-4} %12.9- 10^{-5} %63.8, %50 bu iki değer arasında olduğu için bu konsantrasyonlar kullanılır) aralığı hesaplama için alındı,

10^{-4} ve 10^{-5} M hesaplama kolaylığı açısından μM 'a çevrildi

100 μM ilaç için yaşam yüzdesi %12.9

10 μM ilaç için yaşam yüzdesi %63.8 ve

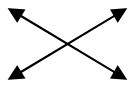
$$100 \mu\text{M} - 10 \mu\text{M} = 90 \mu\text{M}$$

%63.8 - %12.9 = %50.9 (90 μM ilaç hücrelerin yaşam yüzdesini %50.9 düşürüyor) Buna göre orantı kurulursa,

90 μM ilaç hücrelerin yaşam yüzdesini	$\nwarrow$	$\nearrow$	%50.9 düşürüyorsa
x μM ilaç hücrelerin yaşam yüzdesini	$\swarrow$	$\searrow$	%1 düşürür.

$x=1.768 \mu\text{M}$ (Yani her 1.768'lik fark hücrelerin yaşam yüzdesini %1 düşürüyor) %50'yi bulmak için ise,

$$\%63.8 - \%50 = \%13.8$$

1.768 μM ilaç hücrelerin yaşam yüzdesini		%1 düşürüyor
x μM ilaç		%13.8 düşürür

Buna göre $?=24.3 \mu\text{M}$

Sonuçta IC50 konsantrasyonu;

$24.3 \mu\text{M} + 10 \mu\text{M} = 34.3 \mu\text{M}$ şeklinde bulunmuş oldu.

3.3. XTT TESTİ

XTT testi ile Benzidamin HCl'ün MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki toksik etkisini direk temas yöntemi ile farklı zaman aralıklarında ölçmek amaçlandı (71).

Her deney günü için 7 kontrol ve 7 ilaçlı olmak üzere 1., 4., 7., 14. ve 21. günler için toplam 70 tane 35 mm'lik plaklara hücreler, sayıları 1.5×10^4 hücre/ml olacak şekilde yukarıda anlatıldığı gibi seyreltilip pasajlandı.

Deney günlerinde çalışılacak kültür kapları inkübatörden çıkarıldı ve yüzeye tutunmaları, şekil ve canlılık açısından hücreler mikroskopta değerlendirildi. Bu esnada test işleminde kullanılacak olan XTT hücre proliferasyon kiti (Şekil 3.2), kullanılmadan hemen önce, bekletildiği -20°C 'lik depodan 37°C 'lik su banyosuna konularak çözündürme işlemi uygulandı.



Şekil 3.2. XTT Hücre Proliferasyon Kiti

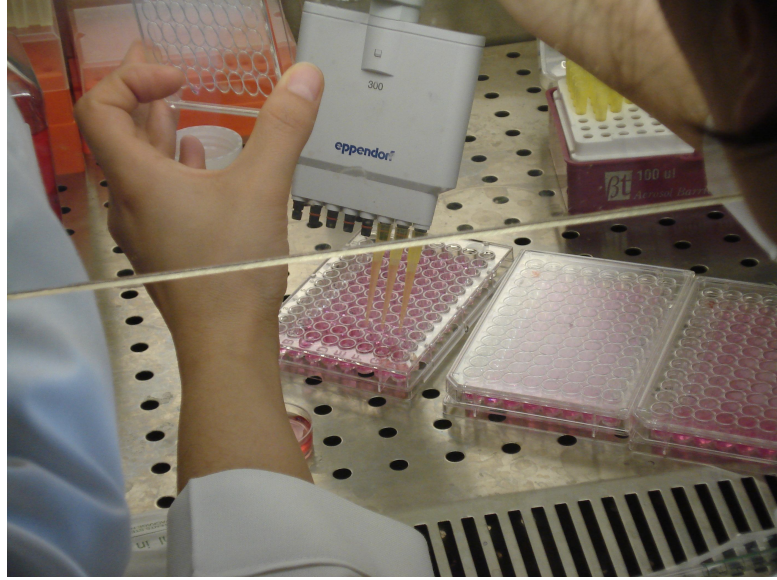
Çözülen XTT solusyonu ve aktivasyon ajanı berrak bir görünüm alıncaya kadar nazik bir biçimde çalkalandı.

XTT kiti içerisindeki 5 ml.'lik XTT solusyonuna 0.1 ml. aktivasyon ajanı karıştırılarak elde edilen karışım, otomatik mikropipetle kültür kaplarındaki her kuyucuğa 1 ml olacak şekilde ilave edildi.

İlave edilen XTT karışımının kuyucuklarda homojen olarak dağılmasını sağlamak için kültür kapları nazikçe çalkalandı.

Kültür kapları tekrar 3 saat inkübatöre yerleştirildi.

3 saatlik süre sonunda inkübatörden çıkarılan kültür kaplarının kuyucuklarında reaksiyon sonucu ortaya çıkan turuncu renkli vasatlar otomatik mikropipetle 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hücre kültür vasatlarının 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılması

96 kuyucuklu kültür kaplarının ELİSA reader (Bio-Tek/USA) cihazında, 450 nanometre’de analizleri yapıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Elisa reader cihazına yerleştirilmiş 96 kuyucuklu kültür kabının görünümü

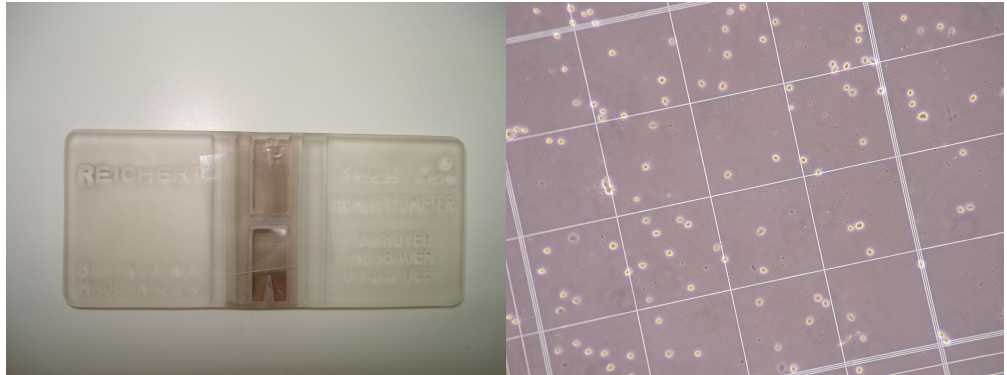
Aynı işlemler 4., 7., 14. ve 21. günlerde de analizleri yapılacak kültür kapları için kontrol ve ilaçlı gruplar içinde ayrı ayrı uygulandı.

3.4. HÜCRE SAYIMI VE MORFOLOJİK İNCELEME (142).

Hücre Sayımı ve Morfolojik İnceleme 6 gözlü plaklarda (35 mm) yapıldı. Hücreler 1.5×10^4 hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi. Çalışmada 1., 4., 7., 14. ve 21. günler için 7 kontrol ve 7 ilaçlı olmak üzere 70 tane 35 mm'lik göz kullanıldı.

Gözler inkübasyon döneminin sonuna kadar gün aşırı mikroskopta kontrol edildi ve mediumları 3 günde bir değiştirildi.

İnkübasyonun 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerinde mikroskopta çeşitli büyütmelerde yapılan incelemeler fotoğraf makinesi ile görüntülendi ve hücreler yukarıda anlatıldığı gibi tripsinize edilip thoma lamında sayıldı (Şekil 3.5.)



Şekil 3.5. Thoma lamı ve hücrelerin bu lamda mikroskop görüntüsü

3.5. ALKALEN FOSFATAZIN BİYOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Alkalen fosfatazin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi 6 gözlü plaklarda (35 mm) yapıldı. Hücreler 1.5×10^4 hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi. Çalışmada 1., 4., 7., 14.ve 21. günler için 7 kontrol ve 7 ilaçlı olmak üzere 70 tane 35 mm'lik göz kullanıldı.

Plaklar inkübasyon dönemi boyunca 37 °C'de ve %5 CO₂'li etüvde bekletildi ve gün aşırı mikroskopta kontrol edilip, mediumları 3 günde bir değiştirildi.

Örneklerdeki Allalen fosfataz (ALP) aktivitesinin ölçümünde International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) önerilerine uygun uyarlamaları yapılmış olan Bessey, Lowry-Brock kolorimetrik yöntemi kullanıldı (98).

Özetle:

ALP, Mg²

p-Nitrofenilfosfat+H₂O

Fosfat + p-nitrofenil

Magnezyum ve çinko iyonlarının ortamda bulunması koşuluyla p-nitrofenilfosfat (PNPP), fosfatazlarla hidroliz edilerek fosfat ve p-nitrofenilfosfat meydana getirilir. Bu işlemde AMP (amino-2 methyle-2 propanol) geçici fosfat alıcısı olarak işlev görür. Sonuçta salınan renkli ürün olan p-nitrofenol miktarı fotometrik olarak ölçülür ve elde edilen bu değer ALP aktivitesi miktarıyla doğru orantılıdır.

Reaktifler: AMP Tampon (pH:10.9); MgSO₄, PNPP

Analiz İşlemi:

Deney gününde hücre kültür kapları 1 dakika 37°C da ultrasonik karıştırıcıda tutulduktan sonra üst fazları alınarak 3.000 rpm de santrifüj edildikten sonra supernatan kısmından 25 µL alınarak 250 µL reaktifle karıştırıldı, 37°C su banyosunda inkube edildi; örneklerin 0-15 ve 30'ncu dakikalardaki absorbans değişimleri (Δ abs) 405nm. de fotometrik olarak ölçüldü.

Hazırlanan seri standartlar ile oluşturulmuş olan grafik çizelgesi doğrultusunda örneklerin aktivitesi belirlendi.

3.6. MİNERAL BİRİKİMLERİNİN HİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Kemik nodüllerinin ve mineral birikimlerinin histokimyasal olarak değerlendirilmesi için alizarin red s ve von-Kossa boyamaları yapıldı. Tüm boyamalar 6 gözlü plaklarda (35 mm) yapıldı. Hücreler 1.5×10^4 hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi. Her boyama için çalışmada 1., 4., 7., 14. ve 21. günler için 3 kontrol ve 3 ilaçlı olmak üzere 60 tane 35 mm'lik göz kullanıldı.

Gözler inkübasyon dönemi boyunca 37 °C'de ve %5 CO₂'li etüvde bekletildi ve gün aşırı mikroskopta kontrol edilip, mediumları 3 günde bir değiştirildi.

Alizarin red s Boyaması: NH₄OH (A-6899, Sigma, USA) distile su ile seyreltilerek %0,028'lik NH₄OH solüsyonu elde edildi. Distile su ile S alizarin sodyum sülfanat (Merc, Almanya) vortekslenerek (Nüve,TR) %1'lik S alizarin sodyum sultanat solüsyonu elde edildi. Daha sonra %0.028'lik NH₄OH damlatılarak %1'lik S alizarin sodyum sülfanat solüsyonunun pH'sı 6.36-6.4'e eşitlendi. Bu işlem için pH metre (Orion 920, USA) kullanıldı (51).

Deney günü kültür kapları inkübatörden alındı.

İçlerindeki medium döküldü

PBS (ph 7.4) ile yıkandı (2 Kere)

%10 formalin ile 4 °C'de 10 dakika fikse edildi.

Formalin dökülüp birkaç kez distile su ile yıkandı.

Yukarıdaki gibi hazırlanan Alizarin red s solüsyonu yüzeyi örtecek kadar kültür kabına dökülüp 5 dakika beklendi.

5 dakika sonunda boya dökülüp distile su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı ve reaksiyon sonlandırılıp kurumaya bırakıldı

Çeşitli büyültmelerde mikroskoba bağlı fotoğraf makinasıyla ve negatoskop üzerinde makroskopik olarak fotoğraflandı.

von-Kossa Boyaması: Deney günü boyama işlemi için aşağıdaki protokol uygulandı.

İçlerindeki medium döküldü

PBS (ph 7.4) ile yıkandı.(2 Kere)

%95 EtOH (ethanol) ile 15 dakika fikse edildi

İki kere sadece distile su ile yıkandı

10 ml distile su içinde 500mg AgNO₃ çözülerek taze gümüş nitrat solüsyonu hazırlandı.

Gözlere yüzeyi örtecek kadar konulup karanlık ortamda 37 derecede 1 saat inkübe edildi.

1 saat sonunda gözlerdeki içerik boşaltılıp birkaç defa distile su ile yıkandı.

Gözlerin kurumaması için içlerinde biraz distile su bırakılarak 30 dakika boyunca florasan ışık altında bekletildi.

Çeşitli büyültmelerde mikroskoba bağlı fotoğraf makinasıyla ve negatoskop üzerinde makroskopik olarak fotoğraflandı.

3.7. ALKALEN FOSFATAZIN HİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Alkalen fosfatazın histokimyasal olarak değerlendirilmesi 6 gözlü plaklarda (35 mm) yapıldı. Hücreler 1.5x10⁴ hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi. Tüm boyamalar 6 gözlü plaklarda (35 mm) yapıldı. Her boyama için

Çalışmada 1., 4., 7., 14. ve 21. günler için 3 kontrol ve 3 ilaçlı olmak üzere 30 tane 35 mm'lik göz kullanıldı.

Gözler inkübasyon dönemi boyunca 37  C'de ve %5 CO₂'li etüvde bekletildi ve gün aşırı mikroskopta kontrol edilip, mediumları 3 günde bir değiştirildi.

Boyanın hazırlanması: 2mg/ml Na- -naftil fosfat (N7G00,Sigma, USA) ve 2mg/ ml Fast blue RR tuzu (44680, Fluka) distile suyla otomatik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra solüsyonun pH'sı tris tamponu damlatılarak 10'a eşittendi.

Deney günü boyama işlemi için aşağıdaki protokol uygulandı.

İçlerindeki medium döküldü

PBS (ph 7.4) ile yıkandı. (2 Kere)

%10 formalin ile 4  C'de 10 dakika fıkse edildi.

Formalin dökülüp birkaç kez distile su ile yıkandı.

Yukarıdaki gibi hazırlanan boya yüzeyi örtecek kadar kültür kabına dökülüp karanlık ortamda 1 saat beklendi.

1 saat sonunda boya dökülüp distile su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı ve reaksiyon sonlandırılıp kurumaya bırakıldı.

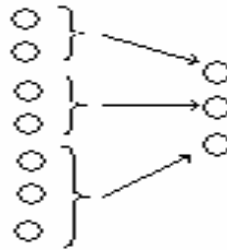
Çeşitli byltmelerde mikroskoba bağlı fotoğraf makinasıyla ve negatoskop üzerinde makroskobik olarak fotoğraflandı (6.94).

3.8 RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION) (57,154).

RT-PCR çalışması 6 gözlü plaklarda (35 mm) yapıldı. Hücre sayıları 1.5×10^4 hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi. Çalışmada 1., 4., 7., 14. ve 21. günler için 7 kontrol ve 7 ilaçlı olmak üzere 70 tane 35 mm'lik göz kullanıldı.

Gözler inkübasyon dönemi boyunca 37 °C'de ve %5 CO₂'li etüvde bekletildi ve gün aşırı mikroskopta kontrol edilip, mediumları 3 günde bir değiştirildi.

Çalışmanın yapılacağı güne ait örnekler mesela 1.gün için 7 ilaçlı göze ait hücreler kaldırıldıktan sonra rastgele 2-2-3 şeklinde birleştirilerek üç örneğe havuzlandı (Şekil 3.6) ve RT-PCR işlemi bu üç örneğe uygulandı. Aynı havuzlama işlemi tüm deney günlerine ait tüm ilaçlı ve kontrol gruplarına uygulandı.



Şekil 3.6. PCR Örneklerinin Havuzlanması

Örnekler transport medium içerisinde soğuk zincir ortamında laboratuara getirildi. Örnekler çalışılacağı güne kadar -80°C'de saklandı.

RT-PCR'da kullanılan gereçler ve reaktifler:

Gereçler:

Elektroforez tankı ve güç kaynağı(Mini Sub Cell G System-BioRad/US)

Hassas terazi (Precisa 125 A SCS/İsveç)

Jel Görüntüleme Sistemi (GelDoc/BioRad/ABD)

Muhtelif Mikropipetler (Biohit Proline Pipette/Finlandiya)

Santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R/Almanya)

Thermal cycler cihazı (Primus 96 plus thermocycler,MWG-Biotech, England)

Reaktifler:

2-propanol (Riedel-dehaen/Almanya)

10XTBE: Tris (Sigma/Almanya) 108 gr/lt

Borik asid (Sigma/Almanya) 55 gr/lt

EDTA (Sigma/Almanya) 20 ml/lt [0,5 M (pH: 8,0)]

Agaroz (Genaxis/Almanya)

Etidyum Bromid (Boehringer Mannheim/Almanya): 10 mg/ml (steril distile su içinde)

EZ-RNA Total RNA izolasyon Kit: (Biological industries/İsrail)

Mineral oil (Sigma/Almanya)

M-MuLV reverstranskriptaz (Epicentre /ABD): Tamponu ile birlikte alınmıştır.

Primerler (Alpha DNA Montreal, Canada)(126, 91)

mOC

Fw: 5'-CAAGTCCCACACAGCAGCTT-3'

Rv: 5'-AAAGCCGAGCTGCCAGAGTT-3'; 371bp

mOP

Fw: 5'-ACACTTTCCTCAATCGTCC-3',

Rv: 5'-TGCCCTTTCGTTGTTGTCC-3'; 240bp

ma1lCol

Fw: 5'-TCTCCACTCTTCTAGTTCCT-3',

Rv: 5'-TTGGGTCATTTCCACATGC-3'; 269bp

mALP

Fw: 5'-GCCCTCTCCAAGACATATA-3'

Rv: 5'-CCATGATCACGTCGATATCC-3' 372bp

mCbfa1

Fw: 5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3'

Rv: 5'-CGCTCCGGCCCAAAATCTC-3' 289bp

mGAPDH

Fw: 5'-CACCATGGAGAAGGCCGGGG-3'

Rv: 5'-GACGGACACATTGGGGGTAG-3' 418bp

PCR Ölçü Birimi (Ambresco/ABD): 50-2000 kb arası 8 band

Thermus aquaticus (Taq) DNA Polimeraz (Fermentas/Almanya):
10XPCR buffer ile MgCl₂ içermektedir.

Yükleme tamponu:

%40 Sukroz (Sigma/Almanya): %40 (distile su içinde, w/v)

Orange-G (Sigma/Almanya): %0.25

cDNA kanşımı:

dNTP (Sigma/Almanya)	2 µl(10mM)
5XRTbuffer	4 µl
RT enzimi	0,1 µl (50 U)
Rv primer	0,5 µl (50 pmol)

PCR karışımı:

dNTP (Sigma/Almanya)	2 µl(10mM)
Distile su	32 µl
10XPCR buffer	5 µl
MgCl ₂	5 µl (2.5mM)
PrimerFw	0,5 µl (50 pmol)
PrimerRv	0,5 µl (50 pmol)
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0,3 µl (50 U)

(PCR karışımı her primer için ayrı ayrı hazırlanmıştır)

RT-PCR çalışmasında yöntem 1)RNA Ekstraksiyonu 2) cDNA sentezi 3) Amplifikasyon 4) Amplifiye ürünlerin gösterilmesi olmak üzere dört aşamada gerçekleştirildi (57,154).

1) RNA Ekstraksiyonu

Solüsyonlar oda ısısına getirildikten ve 30 dk. bekletildikten sonra çalışmaya başlandı. PCR, sonucu pek çok faktörden etkilenmektedir. Başlangıç materyaline ait küçük farklılıklar, amplifikasyon ürünüde katlanarak hatalı sonuç elde edilmesine sebep olabilir. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda sorun oluşturmaktadır. Bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek ve elde edilen sonucun normalizasyonu bu yüzden çok önemlidir. İdeal bir referans gen farklı doku ve organizmalarda belli bir biçimde anlatıma girmeli ve terapilerden etkilenmemelidir. Bu amaçla kullanılan çok çeşitli 'housekeeping' gen'ler bulunmakla birlikte en ünlüleri GAPDH, beta-actin ve rRNA'dırlar. Bunlar genel olarak her bir reaksiyondaki farklı hedef mRNA'ların kuantifikasyonu için değişmeyen bir endojen kontroldürler bu amaçla çalışmada pozitif kontrol olarak mGAPDH (mouse GAPDH (glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase), negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

Eppendorf tüplerine 500 µl guanidyum tiosiyanat solüsyonu ve 100 µl hücre örneği konarak, pipetaj işlemi uygulanarak karıştırıldı ve 5 dk oda ısısında bekletildi.

Eppendorf tüplerinin üzerine 500 µl fenol ve kloroform solüsyonu konulup vortekslenerek oda ısısında 10 dk bekletildi ve 12.000 rpm'de +4 °C'de 15 dk. santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası tüplerdeki iki faza ayrılan karışımın üstteki renksiz kısmı dikkatlice alınarak yeni bir eppendorf tüpü içerisine konuldu.

Eppendorf tüplerinin üzerlerine 500 µl 2-propanol (isopropil alkol) koyulup vortekslenerek oda ısısında 10 dk beklenildi ve 12.000 rpm'de +4° C'de 8 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı döküldü ve üzerine 500 µl %70'lik etil alkol konulup vortekslenerek 7.500 rpm'de +4° C'de 5 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı döküldü ve kalan pellet 37-42 °C'de 15 dk'yı geçmeyecek şekilde kurutuldu.

Kurutma işleminden sonra tüplerin üzerine 45 µl steril distile su konuldu ve 10 dk. 37 °C'de bekletilerek cDNA sentezi aşamasına geçildi.

2) cDNA sentezi

RNA'nın komplementer DNA'ya çevrilmesi amacıyla yapıldı.

Elde edilen 6.6 µl cDNA karışımı ile 13.4 µl RNA karıştırılarak toplam 20 µl'lik karışım elde edildi.

"Thermal cycler" cihazında 42 °C'de 40 dk ve 95 °C'de 5 dk tutuldu.

3) Amplifikasyon

Örneklerin çevreden ve kros kontaminasyonlardan korunması için gerek ekstraksiyon aşamasında gerekse amplifikasyon aşamasında gerekli hassasiyet gösterildi ve örneklerin ekstraksiyonu ile amplifikasyonu ayrı ayrı odalarda yapıldı.

Her tüpte 45 µl PCR karışımı olacak şekilde hazırlanarak tüplere dağıtıldı.

Elde edilen 45 µl karışım ile 5 µl cDNA karıştırılarak üzerlerine iki damla mineral oil konuldu ve amplifikasyon işlemine geçildi.

Amplifikasyon, "Thermal cycler" cihazında aşağıdaki şekilde programlanarak gerçekleştirildi (Şekil 3.7).

95°C	5dk.	1döngü
95°C	15sn	} 35 döngü
59°C	30sn	
72°C	30sn	



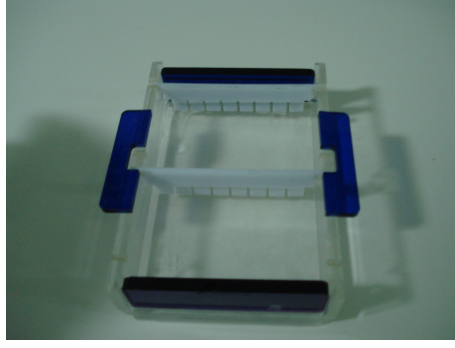
Şekil 3.7. Thermal cycler cihazına örneklerin yerleştirilmesi

4) Amplifiye Ürünlerin Gösterilmesi

20 ml TBE buffer içerisine 400 mg agaroz dökülerek kaynatılarak

%2'lik Jel hazırlandı.

Jel içerisine 5 µl (10mg/ml) etidyum bromid konularak ve 0.5x8x10 cm boyutlarındaki tarak yerleştirilmiş elektroforez tankına döküldü ve jelin donması için 15 dk beklenildi (Şekil 3.7).

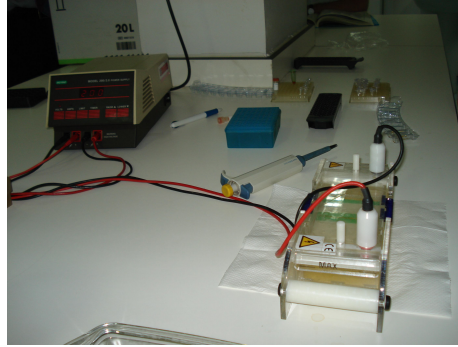


Şekil 3.8. Yeni Dökülmüş Jel

20 μ l PCR ürünü alınarak 2-3 μ l yükleme solüsyonu ile pipetaj yapıldıktan sonra alınarak kuyucuklara yüklendi ve elektroforez işlemine başlandı.

İlk kuyucuğa PCR ölçü birimi koyuldu.

Elektroforez işlemi, 100 voltta 20 dk süreyle 0,5X TBE tampon solüsyonu içeren elektroforez tankına konularak yürütüldü (Şekil 3.8).



Şekil 3.9. Elektroforez

Elektroforez tamamlandıktan sonra band görüntüleri UV altında GelDoc görüntüleme sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı.

Oluşan bant görüntüleri PCR ölçü birimi ve pozitif kontrol ile birlikte

karşılaştırıldı.

Özetle yukarıda anlatıldığı gibi üretilip pasajlanan mouse calvaria pre osteblast (MC3T3-E1 subclone 14) hücreleri üzerinde yine yukarıda anlatılan protokoller uygulanarak 7 farklı araştırma yapıldı. Bunlardan XTT testi ve hücre sayımı ile sitoksisite ve proliferasyon, alkalen Fosfataz aktivitesi ile ALP enziminin spektrofotometrik olarak aktivitesinin değerlendirilmesi, ALP, alizarin ve von-Kossa boyamaları ile ALP enziminin, kalsiyumun ve kemik nodüllerinin histokimyasal olarak belirlenmesi ve PCR işlemi ile kemik oluşumu esnasında osteoblastlarca sentezlendiği bilinen bazı enzimlerin varlığının tespit edilmesi amaçlandı ve deneylerin tamamlanmasından sonra tüm veriler toplanıp sonuçların değerlendirilmesi aşamasına geçildi.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

XTT abzorbars, ALP aktivitesi ve hücre sayıları bilgisayar ortamında SPSS 15 programın'da Mann-Whitney testi ile $p=0.05$ seviyesinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda mouse calvaria pre osteblast hücreleri (MC3T3-E1 subclone 14) kullanılıp, Benzidamin HCl'ün bu hücreler üzerine olan etkisini belirleyebilmek için alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi ve boyaması, alizarin ve van Kossa boyamaları, XTT testi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), hücre sayımı ve hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi gibi bir dizi deney planlandı.

Histokimyasal testlerden ALP, von-Kossa, alizarin boyamaları ile kemik nodülleri, mineral birikimleri ve alkalen fosfataz enzimi göz ile makroskopik olarak ve mikroskopik olarak değerlendirildi.

PCR ile osteoblastlarca kemik formasyonu esnasında sentezlenen bazı genlerin varlığı jel görüntüleri üzerinde değerlendirildi.

XTT testi ile Benzidamin HCl'ün osteoblastlar üzerindeki sitotoksik etkisi, ALP aktivitesinin biyokimyasal araştırmasında bu enzimin aktivitesi ve hücre sayısı ile Benzidamin HCl'ün kültüre osteoblastların çoğalması üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirilip karşılaştırıldı.

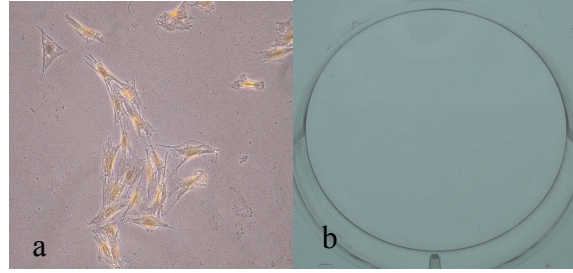
4.1. HİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRMELER

4.1.1. Alkalen Fosfotaz Boyaması (Şekil 4.1- 4.10)

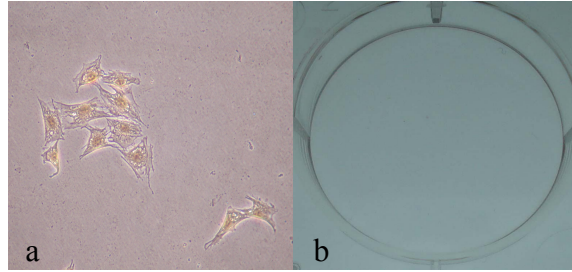
1., 4., 7., 14. ve 21. günlerde ALP boyamaları sonucunda mikroskopik olarak ALP pozitif hücrelerin sitoplazmalarında değişik kahverengi tonlarında, extrasellüler alanlarda değişik kahverengi, yeşil tonlarında, makroskopik olarak ise de hücre yoğunluğuna bağlı olarak yine değişik kahverengi, yeşil tonlarında boyamalar olduğu gözlemlenmiştir.

1. ve 4. günler için yapılan histokimyasal boyamalarda ALP tespit edilemez iken diğer günlerde yapılan ALP boyamaları sonuçları 14. günde artış gösterip 21.günde 14. güne benzer yoğunlukta boyamalar gözlemlenmiştir.

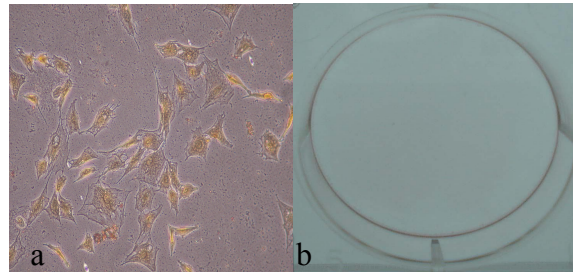
İlaçlı ve kontrol grupları arasında bir karşılaştırma yapıldığında ise belirgin şekilde deney gruplarında boyama yoğunluğunun kontrol gruplarına göre az olduğu tespit edilmiştir.



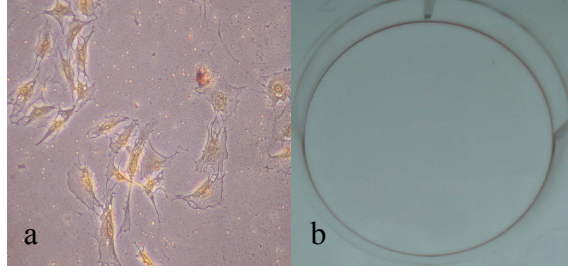
Şekil 4.1. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 1. gün kontrol grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



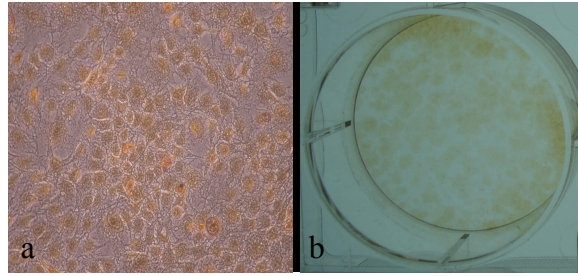
Şekil 4.2. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 1. gün deney grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



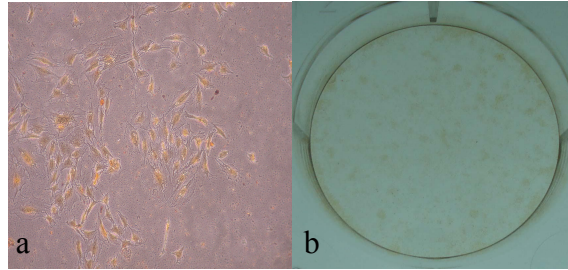
Şekil 4.3. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 4. gün kontrol grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



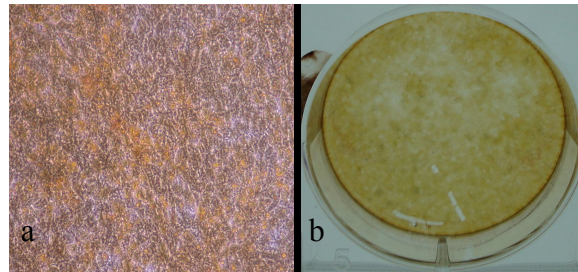
Şekil 4.4. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 4. gün deney grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



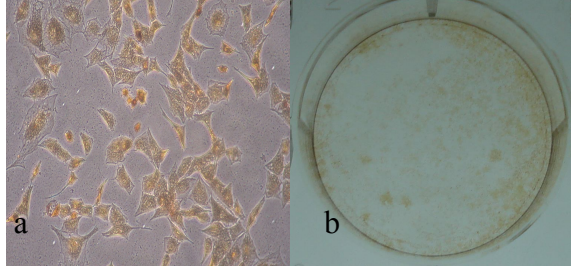
Şekil 4.5. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 7. gün kontrol grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



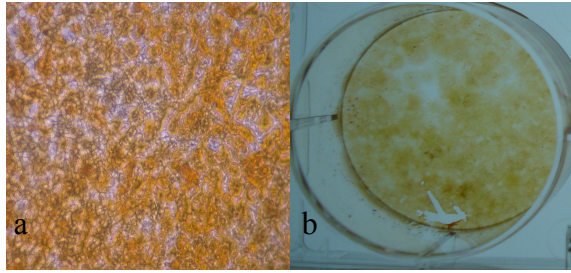
Şekil 4.6. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 7. gün deney grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



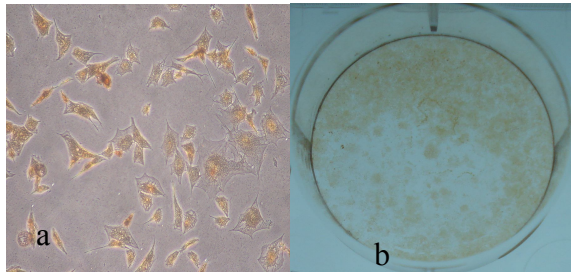
Şekil 4.7. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 14. gün kontrol grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



Şekil 4.8. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 14. gün deney grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



Şekil 4.9. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 21. gün kontrol grubuna ait ALP boyamasına bir örnek



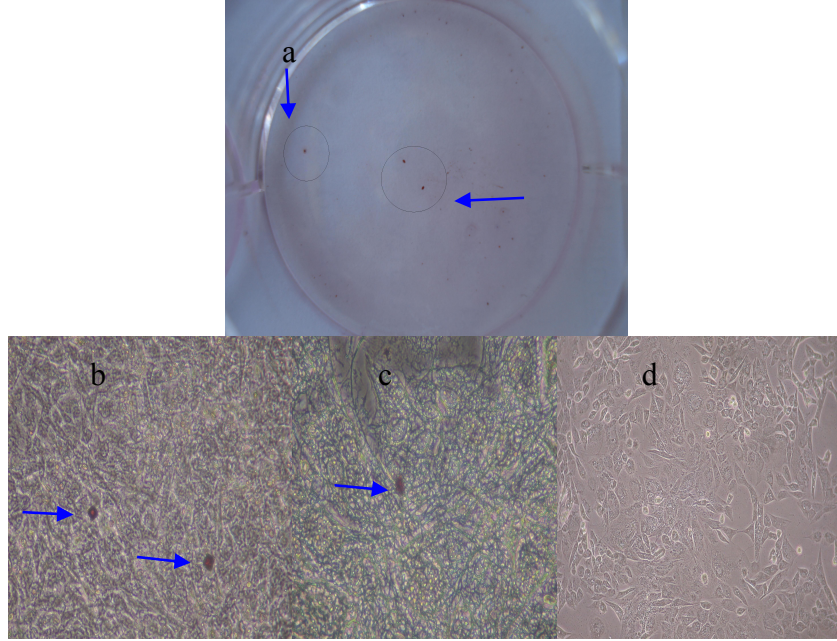
Şekil 4.10. Mikroskopik (a) ve makroskopik (b) olarak 21. gün deney grubuna ait ALP boyamasına bir örnek

4.1.2. Mineral Birikimlerinin Histokimyasal Olarak Değerlendirilmesi (Şekil 4.13 - 4.15)

Kemik nodüllerinin ve mineral birikimlerinin histokimyasal olarak değerlendirilmesi için yapılan alizarin red s ve von-Kossa boyamaları sonucu iki boyama türünde de benzer bulgular elde edilmek ile beraber pozitif alanlar kırmızı-kahverengi renkte izlendi.

Bu konuda kontrol gruplarında 1., 4. ve 7. deney günlerinde herhangi bir kemik nodülü ve mineral birikimine rastlanmazken 14. günden 21. güne doğru giderek artan pozitif sahalara tespit edilmiştir.

Deney gruplarında ise tüm deney günlerinde herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir.

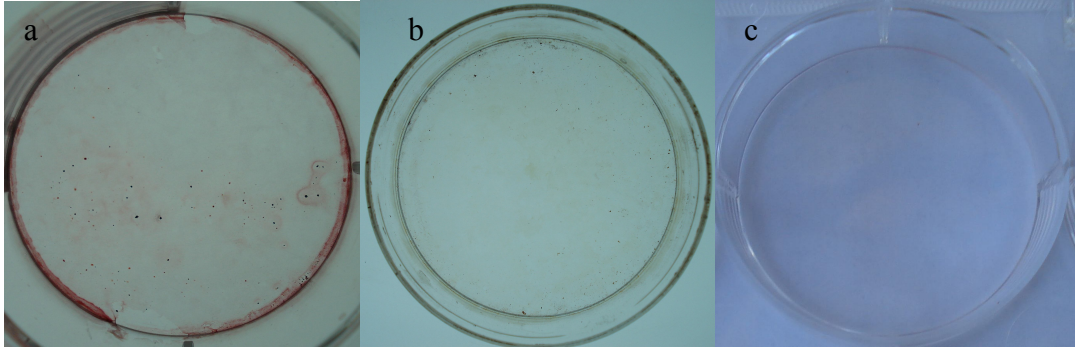


Şekil 4.11. a. 14. gün kontrol grubu alizarin boyaması makroskobik görünüme ait bir örnek

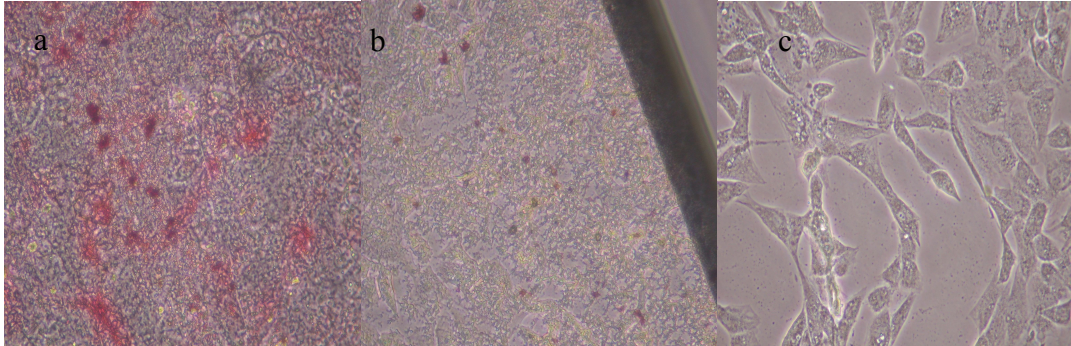
b. 14. gün kontrol grubu alizarin boyaması mikroskobik görünüme ait bir örnek

c. 14. gün kontrol grubu von-Kossa boyaması mikroskobik görünüme ait bir örnek

d. 14. gün deney grubu iki boyama türü de negatif sonuç



Şekil 4.12. a. 21.gün kontrol grubu alizarin boyaması makroskopik görünümüne ait bir örnek
b. 21.gün kontrol grubu von-Kossa boyaması makroskopik görünümüne ait bir örnek
c. 21. gün deney grubu negatif sonuç



Şekil 4.13. a. 21.gün kontrol grubu alizarin boyaması mikroskopik görünümüne ait bir örnek
b. 21.gün kontrol grubu von-Kossa boyaması mikroskopik görünümüne ait bir örnek
c. 21.gün ilaçlı grup negatif sonuç

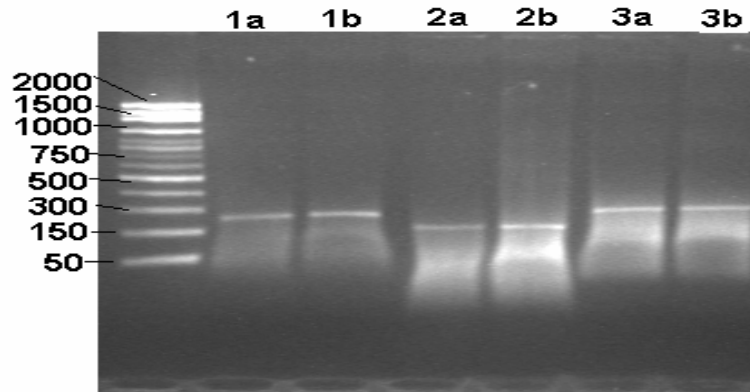
4.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Çalışmada PCR değerlendirmesi agaroz jel elektroforeze tabi tutulan PCR ürünlerinin oluşturduğu bantların GelDoc görüntüleme sistemi yardımıyla UV altında görüntülenip bilgisayar ortamına aktarılmasıyla yapıldı.

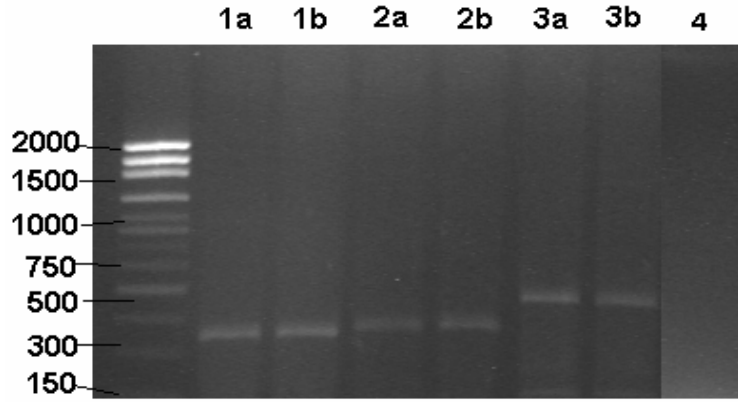
Pozitif kontrol olarak kullanılan mGAPDH (mouse glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase) tüm örnekler için pozitif çıkarak örneklerde RNA varlığını ispat etti. Yine aynı şekilde negatif kontrol olarak kullanılan distile su'da PCR işlemine tabi tutulup yürütüldüğü zaman herhangi bir görüntü vermeyerek sistemin çalıştığını ve herhangi bir kontaminasyonun olmadığını göstermiş oldu.

Kontrol gruplarında 14. ve 21. günlere ait örnekler tüm genler için pozitif sonuç verirken (mOC, mOP, $\alpha 1$ Col, mALP, mCbfa1), deney gruplarında ise tüm günler ve tüm genler için herhangi bir pozitif sonuç değerlendirilmedi.

Pozitif çıkan örnekler toplu halde ayrı bir jelde yeniden yürütülerek tek bir jel görüntüsü elde edildi (Şekil 4.18, 4.19).



Şekil.4.14. 1a. 14.Gün Kontrol Grubu $\alpha 1$ Col (mouse Alpha-1 Collagenase)(269 bp)
1b. 21.Gün Kontrol Grubu $\alpha 1$ Col (mouse Alpha-1 Collagenase)(269 bp)
2a. 14.Gün Kontrol Grubu mOP (mouse osteopontin) (240 bp)
2b. 21.Gün Kontrol Grubu mOP (mouse osteopontin) (240 bp)
3a. 14.Gün Kontrol Grubu mCbfa1 (Core binding factor alpha 1) (289 bp)
3b. 21.Gün Kontrol Grubu mCbfa1 (Core binding factor alpha 1) (289 bp)



Şekil.4.15. 1a. 14.Gün Kontrol Grubu mOC (mouse osteocalcin) (371 bp)
1b. 21.Gün Kontrol Grubu mOC (mouse osteocalcin) (371 bp)
2a. 14.Gün Kontrol Grubu mALP (mouse Alkaline phosphatase) (372 bp)
2b. 21.Gün Kontrol Grubu mALP (mouse Alkaline phosphatase) (372 bp)
3a. Tüm günler kontrol grupları mGAPDH (glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase) (418 bp) (pozitif kontrol)
3b. Tüm günler ilaçlı gruplar mGAPDH (glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase) (418 bp) (pozitif kontrol)
4.Negatif kontrol

4.3. HÜCRE SAYISI DEĞERLENDİRMELERİ

Hem deney hem de kontrol gruplarına ait hücreler inkübasyon döneminin 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerinde tripsinize edilip thoma lamında sayıldı, hücreler sayılıp sonuçlar kaydedildikten sonra, deney ve kontrol grubuna ait örnekler istatistiksel değerlendirme yapabilmek için alt gruplara ayrıldı (Tablo 4.1.);

Tablo 4.1.: Çalışmamızda kullanılan deney ve kontrol grupları

	DENEY GRUBU	KONTROL GRUBU
1.Gün	Grup1	Grup2
4.Gün	Grup3	Grup4
7.Gün	Grup5	Grup6
14.Gün	Grup7	Grup8
21.Gün	Grup9	Grup10

Daha sonra istatistiksel değerlendirmeye geçilip deney ve kontrol grupları kendi içinde ve aynı güne ait deney ve kontrol grupları da birbirleri ile karşılaştırıldı.

Deney gruplarının kendi içinde karşılaştırılması (Tablo 4.2);

Hücre sayısı 1. grupta $16.000,00 \pm 1.154,701$, 3. grupta $28.571,43 \pm 5.563,486$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 1. grupta $16.000,00 \pm 1.154,701$, 5. grupta $40.714,29 \pm 6.725,927$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 1. grupta $16.000,00 \pm 1.154,701$, 7. grupta $55.714,29 \pm 6.074,929$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 1. grupta $16.000,00 \pm 1.154,701$, 9. grupta $75.000,00 \pm 5.773,503$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 3. grupta $28.571,43 \pm 5.563,486$, 5. grupta $40.714,29 \pm 6.725,927$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 3. grupta $28.571,43 \pm 5.563,486$, 7. grupta $55.714,29 \pm 6.074,929$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 3. grupta $28.571,43 \pm 5.563,486$, 9. grupta $75.000,00 \pm 5.773,503$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ise anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 5. grupta $40.714,29 \pm 6.725,927$, 7. grupta $55.714,29 \pm 6.074,929$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 5. grupta $40.714,29 \pm 6.725,927$, 9. grupta $75.000,00 \pm 5.773,503$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 7. grupta $55.714,29 \pm 6.074,929$, 9. grupta $75.000,00 \pm 5.773,503$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Tablo 4.2. Deney gruplarının kendi içinde karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup1 / Grup3	16.000,00	1.154,701	28.571,43	5.563,486	0.001	***
Grup1 / Grup5	16.000,00	1.154,701	40.714,29	6.725,927	0.001	***
Grup1 / Grup7	16.000,00	1.154,701	55.714,29	6.074,929	0.001	***
Grup1 / Grup9	16.000,00	1.154,701	75.000,00	5.773,503	0.001	***
Grup3 / Grup5	28.571,43	5.563,486	40.714,29	6.725,927	0.001	***
Grup3 / Grup7	28.571,43	5.563,486	55.714,29	6.074,929	0.001	***
Grup3 / Grup9	28.571,43	5.563,486	75.000,00	5.773,503	0.001	***
Grup5 / Grup7	40.714,29	6.725,927	55.714,29	6.074,929	0.001	***
Grup5 / Grup9	40.714,29	6.725,927	75.000,00	5.773,503	0.001	***
Grup7 / Grup9	55.714,29	6.074,929	75.000,00	5.773,503	0.001	***

Kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması (Tablo 4.3);

Hücre sayısı 2.grupta 16.000,00±1.154,701, 4.grupta 34.285,71±5.345,225 bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.001$).

Hücre sayısı 2. grupta $16.000,00 \pm 1.154,701$, 6. grupta $607.142,86 \pm 88.640,526$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 2. grupta $16.000,00 \pm 1.154,701$, 8. grupta $1.985.714,29 \pm 157.359,15$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 2. grupta $16.000,00 \pm 1.154,701$, 10. grupta $2.328.571,43 \pm 319.970,237$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 4.grupta $34.285,71 \pm 5.345,225$, 6. grupta $607.142,86 \pm 88.640,526$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 4. grupta $34.285,71 \pm 5.345,225$, 8. grupta $1.985.714,29 \pm 157.359,15$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 4.grupta $34.285,71 \pm 5.345,225$, 10. grupta $2.328.571,43 \pm 319.970,237$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ise anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 6.grupta $607.142,86 \pm 88.640,526$, 8. grupta $1.985.714,29 \pm 157.359,15$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 6.grupta $607.142,86 \pm 88.640,526$, 10. grupta $2.328.571,43 \pm 319.970,237$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 8.grupta $1.985.714,29 \pm 157.359,15$, 10.grupta $2.328.571,43 \pm 319.970,237$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

Tablo 4.3. Kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup2 / Grup4	16.000,00	1.154,701	34.285,71	5.345,225	0.001	***
Grup2 / Grup6	16.000,00	1.154,701	607.142,86	88.640,526	0.001	***
Grup2 / Grup8	16.000,00	1.154,701	1.985.714,29	157.359,158	0.001	***
Grup2 / Grup10	16.000,00	1.154,701	2.328.571,43	319.970,237	0.001	***
Grup4 / Grup6	34.285,71	5.345,225	607.142,86	88.640,526	0.001	***
Grup4 / Grup8	34.285,71	5.345,225	1.985.714,29	157.359,158	0.001	***
Grup4 / Grup10	34.285,71	5.345,225	2.328.571,43	319.970,237	0.001	***
Grup6 / Grup8	607.142,86	88.640,526	1.985.714,29	157.359,158	0.001	***
Grup6 / Grup10	607.142,86	88.640,526	2.328.571,43	319.970,237	0.001	***
Grup8 / Grup10	1.985.714,29	157.359,158	2.328.571,43	319.970,237	0.073	

Deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması (Tablo 4.4);

Hücre sayısı 1.grupta 16.000,00±1.154,701, 2.grupta 16.000,00±1.154,701 bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında fark tespit edilememiştir.

Hücre sayısı 3. grupta $28.571,43 \pm 5.563,486$, 4. grupta $34.285,71 \pm 5.345,225$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

Hücre sayısı 5. grupta $40.714,29 \pm 6.725,927$, 6. grupta $607.142,86 \pm 88.640,526$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 7. grupta $55.714,29 \pm 6.074,929$, 8. grupta $1.985.714,29 \pm 157.359,15$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Hücre sayısı 9. grupta $75.000,00 \pm 5.773,503$, 10. grupta $2.328.571,43 \pm 319.970,237$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Tablo 4.4. Aynı deney gününde deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup1						
Grup2	16.000,00	1.154,701	16.000,00	1.154,701	1.000	
Grup3						
Grup4	28.571,43	5.563,486	34.285,71	5.345,225	0.097	
Grup5						
Grup6	40.714,29	6.725,927	607.142,86	88.640,526	0.001	***
Grup7						
Grup8	55.714,29	6.074,929	1.985.714,29	157.359,158	0.001	***
Grup9						
Grup10	75.000,00	5.773,503	2.328.571,43	319.970,237	0.001	***

4.4. XTT DEĞERLENDİRMELERİ

Benzidamin HCl'ün MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki toksik etkisini direk temas yöntemi ile farklı zaman aralıklarında ölçme amacı ile yapılan XTT(2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5carboxanilide) testinde deneylerin tamamlanmasından sonra sonuçlar toparlanıp, deney ve kontrol grubuna ait örnekler istatistiksel değerlendirme yapabilmek için alt gruplara ayrıldı (Tablo 4.1);

Daha sonra istatistiksel değerlendirmeye geçilip deney ve kontrol grupları kendi içinde ve aynı güne ait deney ve kontrol grupları da birbirleri ile karşılaştırıldı.

Deney gruplarının kendi içinde karşılaştırılması (Tablo 4.5);

XTT sonucu 1. grupta $0,22418 \pm 0,020255$, 3. grupta $0,08549 \pm 0,066852$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 1. grupta $0,22418 \pm 0,020255$, 5. grupta $0,14261 \pm 0,007935$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

XTT sonucu 1. grupta $0,22418 \pm 0,020255$, 7. grupta $0,36690 \pm 0,100795$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.01$).

XTT sonucu 1. grupta $0,22418 \pm 0,020255$, 9. grupta $0,21867 \pm 0,344814$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 3. grupta $0,08549 \pm 0,066852$, 5. grupta $0,14261 \pm 0,007935$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 3. grupta $0,08549 \pm 0,066852$, 7. grupta $0,36690 \pm 0,100795$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

XTT sonucu 3. grupta $0,08549 \pm 0,066852$, 9. grupta $0,21867 \pm 0,344814$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ise anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 5. grupta $0,14261 \pm 0,007935$, 7. grupta $0,36690 \pm 0,100795$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

XTT sonucu 5. grupta $0,14261 \pm 0,007935$, 9. grupta $0,21867 \pm 0,344814$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 7. grupta $0,36690 \pm 0,100795$, 9. grupta $0,21867 \pm 0,34481$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Tablo 4.5. Deney gruplarının kendi içinde karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup1 / Grup3	0,22418	0,020255	0,08549	0,066852	0.017	*
Grup1 / Grup5	0,22418	0,020255	0,14261	0,007935	0.001	***
Grup1 / Grup7	0,22418	0,020255	0,36690	0,100795	0.007	**
Grup1 / Grup9	0,22418	0,020255	0,21867	0,344814	0.026	*
Grup3 / Grup5	0,08549	0,066852	0,14261	0,007935	0.026	*
Grup3 / Grup7	0,08549	0,066852	0,36690	0,100795	0.001	***
Grup3 / Grup9	0,08549	0,066852	0,21867	0,344814	0.026	*
Grup5 / Grup7	0,14261	0,007935	0,36690	0,100795	0.001	***
Grup5 / Grup9	0,14261	0,007935	0,21867	0,344814	0.026	*
Grup7 / Grup9	0,36690	0,100795	0,21867	0,344814	0.026	*

Kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması (Tablo 4.6);

XTT sonucu 2. grupta $0,22576 \pm 0,012837$, 4. grupta $0,16872 \pm 0,028547$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

XTT sonucu 2. grupta $0,22576 \pm 0,012837$, 6. grupta $2,26891 \pm 0,198013$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

XTT sonucu 2. grupta $0,22576 \pm 0,012837$, 8. grupta $2,14063 \pm 0,957879$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 2. grupta $0,22576 \pm 0,012837$, 10. grupta $2,16844 \pm 0,959084$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 4. grupta $0,16872 \pm 0,028547$, 6. grupta $2,26891 \pm 0,198013$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

XTT sonucu 4. grupta $0,16872 \pm 0,028547$, 8. grupta $2,14063 \pm 0,957879$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 4. grupta $0,16872 \pm 0,028547$, 10. grupta $2,16844 \pm 0,959084$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ise anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 6. grupta $2,26891 \pm 0,198013$, 8. grupta $2,14063 \pm 0,957879$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

XTT sonucu 6. grupta $2,26891 \pm 0,198013$, 10. grupta $2,16844 \pm 0,959084$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

XTT sonucu 8. grupta $2,14063 \pm 0,957879$, 10. grupta $2,16844 \pm 0,959084$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

Tablo 4.6. Kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup2						
Grup4	0,22576	0,012837	0,16872	0,028547	0.001	***
Grup2						
Grup6	0,22576	0,012837	2,26891	0,198013	0.001	***
Grup2						
Grup8	0,22576	0,012837	2,14063	0,957879	0.026	*
Grup2						
Grup10	0,22576	0,012837	2,16844	0,959084	0.026	*
Grup4						
Grup6	0,16872	0,028547	2,26891	0,198013	0.001	***
Grup4						
Grup8	0,16872	0,028547	2,14063	0,957879	0.026	*
Grup4						
Grup10	0,16872	0,028547	2,16844	0,959084	0.026	*
Grup6						
Grup8	2,26891	0,198013	2,14063	0,957879	0.209	
Grup6						
Grup10	2,26891	0,198013	2,16844	0,959084	0.073	
Grup8						
Grup10	2,14063	0,957879	2,16844	0,959084	1.000	

Deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması (Tablo 4.7);

XTT sonucu 1.grupta $0,22418 \pm 0,020255$, 2.grupta $0,22576 \pm 0,012837$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında fark tespit edilememiştir.

XTT sonucu 3. grupta $0,08549 \pm 0,066852$, 4. grupta $0,16872 \pm 0,028547$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 5. grupta $0,14261 \pm 0,007935$, 6. grupta $2,26891 \pm 0,198013$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

XTT sonucu 7. grupta $0,36690 \pm 0,100795$, 8. grupta $2,14063 \pm 0,957879$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

XTT sonucu 9. grupta $0,21867 \pm 0,344814$, 10. grupta $2,16844 \pm 0,959084$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Tablo 4.7. Aynı deney gününde deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup1						
Grup2	0,22418	0,020255	0,22576	0,012837	0.710	
Grup3						*
Grup4	0,08549	0,066852	0,16872	0,028547	0.026	
Grup5						***
Grup6	0,14261	0,007935	2,26891	0,198013	0.001	
Grup7						*
Grup8	0,36690	0,100795	2,14063	0,957879	0.026	
Grup9						*
Grup10	0,21867	0,344814	2,16844	0,959084	0.026	

4.5. ALP AKTİVİTESİ DEĞERLENDİRİLMESİ

İnkübasyon döneminin 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerinde biyokimyasal olarak osteoblastlardan salgılanan bir enzim olan alkalen fosfatazın aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edildi ve deneylerin tamamlanmasından sonra sonuçlar toparlanıp, deney ve kontrol grubuna ait örnekler istatistiksel değerlendirme yapabilmek için alt gruplara ayrıldı (Tablo 4.1.);

Daha sonra istatistiksel değerlendirmeye geçilip deney ve kontrol grupları kendi içinde ve aynı güne ait deney ve kontrol grupları da birbirleri ile karşılaştırıldı.

Deney gruplarının kendi içinde karşılaştırılması (Tablo 4.8);

ALP aktivitesi sonucu 1. grupta $3,09514 \pm 0,734958$, 3. grupta $3,67771 \pm 0,858139$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

ALP aktivitesi sonucu 1. grupta $3,09514 \pm 0,734958$, 5. grupta $4,72971 \pm 1,260810$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.01$).

ALP aktivitesi sonucu 1. grupta $3,09514 \pm 0,734958$, 7. grupta $18,16300 \pm 4,806803$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 1. grupta $3,09514 \pm 0,734958$, 9. grupta $16,73729 \pm 6,021225$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 3. grupta $3,67771 \pm 0,858139$, 5. grupta $4,72971 \pm 1,260810$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

ALP aktivitesi sonucu 3. grupta $3,67771 \pm 0,858139$, 7. grupta $18,16300 \pm 4,806803$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 3. grupta $3,67771 \pm 0,858139$, 9. grupta $16,73729 \pm 6,021225$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ise anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 5. grupta $4,72971 \pm 1,260810$, 7. grupta $18,16300 \pm 4,806803$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 5. grupta $4,72971 \pm 1,260810$, 9. grupta $16,73729 \pm 6,021225$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 7. grupta $18,16300 \pm 4,806803$, 9. grupta $16,73729 \pm 6,021225$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

Tablo 4.8. Deney gruplarının kendi içinde karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup1 / Grup3	3,09514	0,734958	3,67771	0,858139	0.017	*
Grup1 / Grup5	3,09514	0,734958	4,72971	1,260810	0.007	**
Grup1 / Grup7	3,09514	0,734958	18,16300	4,806803	0.001	***
Grup1 / Grup9	3,09514	0,734958	16,73729	6,021225	0.001	***
Grup3 / Grup5	3,67771	0,858139	4,72971	1,260810	0.097	
Grup3 / Grup7	3,67771	0,858139	18,16300	4,806803	0.001	***
Grup3 / Grup9	3,67771	0,858139	16,73729	6,021225	0.001	***
Grup5 / Grup7	4,72971	1,260810	18,16300	4,806803	0.001	***
Grup5 / Grup9	4,72971	1,260810	16,73729	6,021225	0.001	***
Grup7 / Grup9	18,16300	4,806803	16,73729	6,021225	0.805	

Kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması (Tablo 4.9);

ALP aktivitesi sonucu 2. grupta $6,72614 \pm 0,743031$, 4. grupta $7,85086 \pm 1,689283$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

ALP aktivitesi sonucu 2. grupta $6,72614 \pm 0,743031$, 6. grupta $9,10586 \pm 0,957237$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 2. grupta $6,72614 \pm 0,743031$, 8. grupta $22,65029 \pm 1,626677$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 2. grupta $6,72614 \pm 0,743031$, 10. grupta $21,24971 \pm 4,698152$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 4. grupta $7,85086 \pm 1,689283$, 6. grupta $9,10586 \pm 0,957237$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

ALP aktivitesi sonucu 4. grupta $7,85086 \pm 1,689283$, 8. grupta $22,65029 \pm 1,626677$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 4. grupta $7,85086 \pm 1,689283$, 10. grupta $21,24971 \pm 4,698152$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 6. grupta $9,10586 \pm 0,957237$, 8. grupta $22,65029 \pm 1,626677$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 6. grupta $9,10586 \pm 0,957237$, 10. grupta $21,24971 \pm 4,698152$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 8. grupta $22,65029 \pm 1,626677$, 10. grupta $21,24971 \pm 4,698152$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

Tablo 4.9. Kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup2						
Grup4	6,72614	0,743031	7,85086	1,689283	0.165	
Grup2						***
Grup6	6,72614	0,743031	9,10586	0,957237	0.001	
Grup2						***
Grup8	6,72614	0,743031	22,65029	1,626677	0.001	
Grup2						***
Grup10	6,72614	0,743031	21,24971	4,698152	0.001	
Grup4						
Grup6	7,85086	1,689283	9,10586	0,957237	0.128	
Grup4						***
Grup8	7,85086	1,689283	22,65029	1,626677	0.001	
Grup4						***
Grup10	7,85086	1,689283	21,24971	4,698152	0.001	
Grup6						***
Grup8	9,10586	0,957237	22,65029	1,626677	0.001	
Grup6						***
Grup10	9,10586	0,957237	21,24971	4,698152	0.001	
Grup8						
Grup10	22,65029	1,626677	21,24971	4,698152	0.535	

Deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması (Tablo 4.10);

ALP aktivitesi sonucu 1. grupta $3,09514 \pm 0,734958$, 2. grupta $06,72614 \pm 0,743031$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında fark tespit edilememiştir.

ALP aktivitesi sonucu 3. grupta $3,67771 \pm 0,858139$, 4. grupta $7,85086 \pm 1,689283$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

ALP aktivitesi sonucu 5. grupta $4,72971 \pm 1,260810$, 6. grupta $9,10586 \pm 0,957237$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

ALP aktivitesi sonucu 7. grupta $18,16300 \pm 4,806803$, 8. grupta $22,65029 \pm 1,626677$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

ALP aktivitesi sonucu 9. grupta $16,73729 \pm 6,021225$, 10. grupta $21,24971 \pm 4,698152$ bulunup bu iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Tablo 4.10. Aynı deney gününde deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırılması

GRUPLAR	X	SD	X	SD	p	
Grup1						
Grup2	3,09514	0,734958	6,72614	0,743031	0.001	***
Grup3						
Grup4	3,67771	0,858139	7,85086	1,689283	0.001	***
Grup5						
Grup6	4,72971	1,260810	9,10586	0,957237	0.001	***
Grup7						
Grup8	18,16300	4,806803	22,65029	1,626677	0.209	
Grup9						
Grup10	16,73729	6,021225	21,24971	4,698152	0.073	

5. TARTIŞMA

“Bir diş ya da diş grubu kendisine etki eden kuvvetlerin sonucu hareket eder” prensibi ortodontik tedavilerin tarihsel gelişimi boyunca göz önünde tutulmuştur. Bir çok araştırmacı yaptığı çalışmalarda ortodontik kuvvetlerin etkisiyle dişe ait periodontal membran hücrelerinin fonksiyon ve organizasyonunda değişiklikler yaparak, kemiğin yeniden şekillenmesiyle ortodontik diş hareketinin gerçekleştiğini göstermiştir (83, 114,132).

Bu tez çalışmasında; genel tıp ve dişhekimliği alanında sıklıkla kullanılan bir ağrı kesici, antienflamatuar etken maddesi olan Benzydamin HCl’ün, ortodontik diş hareketlerinin gerçekleşmesi için gerekli kemik yapım ve yıkım faaliyetlerinde başrol oynayan osteoblast hücrelerinin gelişim ve fenotipleri üzerine tesirleri sonucu ortodontik diş hareketlerinin normal sürecini değiştirebilecek olumlu ya da olumsuz etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Ortodontik kuvvet uygulandıktan ve ortodontik diş hareketi başladıktan hemen sonra hastadan hastaya ağrıyı algılama düzeyine göre değişen şiddetlerde ağrı hissi oluşmaktadır ayrıca bu ağrıya hemen her zaman periodontal vazodilatasyonla karakterize, bir akut enflamatuar cevapta eşlik etmektedir. Davidovitch ve arkadaşları (31) ortodontik diş hareketinin periodontal vazodilatasyon ve ağrı ile karakterize bir enflamasyon olduğunu göstermişlerdir.

Klinikte enflamatuar ağrılı olgularda sıklıkla kullanılan ilaç türü NSAİİ ilaç şemsiyesi altında yer alan ilaçlardır. Günümüze kadar yapılan bir çok çalışmada ortodontik diş hareketi sırasında meydana gelen ağrı şikayetlerinin azaltılması için aspirin, indometazin ibuprofen, gibi NSAİİ’lerin kullanıldığı gösterilmiştir (32, 76, 85, 123, 147, 153). Ancak ortodontik tedavi gören hastalarda NSAİİ’lerin kullanılmasının diş hareketini azalttığı düşünüldüğünden, son yıllarda araştırmalar ortodontik tedavi süresini en az

etkileyecek analjezik antienflamatuar ilaçlar üzerinde yoğunlaşmıştır (7, 22, 55, 76, 95, 101, 117, 121, 124, 145, 149).

De Carlos ve arkadaşları (32) çalışmalarında ortodontik tedavide kullanılan ağrı kesici ilaçların diş hareketini yavaşlatması nedeniyle konvansiyonel NSAİİ'lara alternatif olabilecek ilaçların dental harekete olan etkisine ratlar üzerinde bakmışlar çalışmanın sonucunda celecoxib ve parecoxibin diş hareketine etkisi değerlendirildiğinde ağrı için kullanılabileceği bildirmişlerdir. Arias ve Marquez-Orozco (7) yaptığı çalışmada asetil salisilik asit, ibuprofen ve asetaminofen'in etkilerini, bu analjeziklerin uygulandığı ratlarda kemik rezorbsiyonlarının histolojik değerlendirmeleri ile yorumlanmış ve aspirin, ibuprofen gibi NSAİİ'ların muhtemelen prostaglandin salımını inhibe etmesinden dolayı diş hareketini azalttığı, buna karşın asetaminofenin diş hareketini etkilemediği ve ağrı kesici olarak seçilebileceği belirtilmiştir. De Carlos ve arkadaşları (33) yaptığı bir başka çalışmada konvansiyonel NSAİİ'lara model olarak diklofenak seçilmiş ve spesifik COX-2 inhibitörü olan rofecoxip'in ratlar üzerinde diş hareketleri incelenmiş sonuçta çok belirgin bir farklılık gözlememişlerdir. Sarı, Ölmez ve Gürton (124) yaptıkları çalışmada 2 farklı antienflamatuvar ilacın gingival sıvı hacmi ve prostaglandin E seviyelerine bakılarak ortodontik diş hareketine etkisini araştırmışlar, ilaçlar kıyaslandığında aspirine göre rofecoxibin ortodontik tedavi sırasında kullanılabileceği bildirmişlerdir. Kehoe ve arkadaşları (76) yaptıkları çalışmada asetaminofen, ibuprofen ve misoprostol'ün PGE2 sentezine ve ortodontik diş hareketine olan etkilerini karşılaştırılmışlar çalışmanın sonucunda asetaminofen'nin ortodontik tedavide kullanılabileceği gösterilmişlerdir. Chumbley ve Tuncay (22) yaptıkları bir çalışmada ise aspirin benzer etki gösteren indometazin'in diş hareketine olan etkisini araştırmışlar sonuç olarak ortodontik tedavi gören hastalara tedavi süresini uzatacağı için aspirin benzeri ilaçların önerilmemesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Ortodontik tedavilerin bir çok olguda yıl ile ifade edilecek düzeyde uzun sürdüğü ve hastada oral hijyen sorunları ve periodontal problemlere neden olduğu düşünülürse bu konu hem hasta hem de klinisyen için son

derece önemlidir. Bizim araştırmamızda günümüze kadar kemik metabolizması üzerine etkileri pek fazla irdelenmemiş olan Benzidamin HCl'ün osteoblastlar üzerine etkisi incelenmiştir.

Bir çok NSAİİ ilaç genel olarak siklooksijenaz yolağının iki enzimi olan COX-1 ve COX-2'yi inhibe ederek prostaglandin salınımını baskırlar. Prostaglandinler araşıdonik asitten üretilerek, komşu hücrelerin reseptörlerini uyarıp, intraselüler cAMP artışıını sağlar böylece osteoklastlar, monositlerden farklılaşarak kemik yıkımında rol alırlar. Ortodontik diş hareketleri esnasında kemik yapımı ve yıkımı birbirinden ayrılamaz olgular olsa da ağrı oluşumunun kemik yıkımı esnasında olduğu düşünölmektedir. Ngan ve arkadaşları (101), Ferreira ve arkadaşları (47) alışmalarında nörolojik sistemde prostaglandinlerin ağrı iletimini artırdığını, histamin, bradikinin, serotonin gibi bir çok mediatörün zararlı etkilerini artırarak algılanan ağrının yoğunluğunda artışa neden olduklarını göstermişlerdir.

Benzidamin HCl her ne kadar bir NSAİİ ise de bilinen NSAİİ'lerden farklı bir yapıya sahiptir. Diğer asidik NSAİİ'lerden farklı olarak alkalik Ph'ya sahiptir. Bu alkali tabiatı sistemik dolaşıma geçmesini takiben enflamatuvar dokularda yoğunlaşmasını sağlar (106). Benzidamin HCl'ün farmakolojisi konusunda yapılan araştırmalar birbirleriyle uyum göstermemektedir. Örneğin Segre ve Hammarstrom'un (127) yaptıkları çalışmada Benzidamin HCl'ün, prostaglandin biosentezini normal sistemik kullanımda etkilemediği bildirilmişken, Moder ve Lindberg (95), Benzidamin HCl'ün PGE2 ve 6-keto-PGF1 alfanın bazal üretimini önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Yine Tomazzoli ve arkadaşları (141) bir çalışmalarında daha önce yapılan in vitro sonuçların tersine PGE2'nin Benzidamin HCl'ün diğer biyokimyasal etkilerine maruz kalarak indirekt olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Bu indirekt etki ise Goppelt-Strube ve arkadaşları (55) yapılan bir çalışmada PGE1 ve PGE2 sentezinin lysophosphatide aclytranferase enziminin araşıdonik asidin serbestleştirdiği fosfolipaz A2 ile membran fosfolipitleri ile etkileşmesi ve bu artan araşıdonik asidin siklooksijenaz ile metabolize olarak prostonoidlere dönüştüğu şeklinde açıklanmıştır. Benzidamin HCl'ün etki mekanizması

konusundaki bu karanlık noktalar araştırmamızda bu ilacı seçmemizde ayrıca etkili olmuştur.

Dişlerin içinde hareket ettiği, dişleri çevreleyen kemik dokusu vücudun iskeletini oluşturan mineralize olmuş bir bağ dokusudur. Vücudun kemik dokusu, yapısal olarak, kemik kas hareketleri için bir çatı oluşturup, iç organları ve kemik iliğini korur ve fiziksel stres değişikliklerine uyum sağlar. Metabolik olarak ise, bir depo ve hemostatik tamponlayıcı bir sistem olarak görev görür. Organizma için son derece önemli olan kemiğin ana hücreleri ise osteoblastlar ve osteoklastlardır. Osteoblastlar genel olarak kemik yapımından, osteoklastlar ise kemik yıkımından sorumlu hücrelerdir (66, 67,108,144).

Osteoblast ve osteoklast hücreleri her zaman ilişki içindedirler. Dolayısıyla kemik yapımı ve yıkımı arasında güçlü bir ilişki vardır. Osteoblastlar matriks proteinleri yığarken, TGF- β (Transforming Growth Factor), IGF-I (Insulinlike Growth Factor), IGF-II, FGF (Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) ve BMP'ler (Bone Morphogenic Protein) gibi osteoblastlar tarafından üretilen büyüme faktörleri yapısal matriks proteinlerine katılırlar. Bu büyüme faktörleri, kemik rezorpsiyonu sırasında matriksten salınırlar ve osteoklastik rezorpsiyonla matriks oluşumunun entegrasyonunu sağlayan bir mekanizma oluştururlar (108,144).

Kemik kitlesi de yapım ve yıkım arasındaki dengeye bağlı olarak değişir. Temel çok hücreli birim tarafından yönlendirilen bu süreç; sistemik hormonal etkilerin yanı sıra, yerel olarak üretilen (parakrin) maddelerin kontrolündedir. Osteoblastik aktivite rezorpsiyonu; rezorpsiyon, osteoblastik aktiviteyi uyarır. Bu etkileşim'coupling'olarak adlandırılır (150). PTH arttığında osteoblastlar uyanmakta ve kemik yapımı artmakta, osteoblastların salgıladığı maddeler aynı zamanda osteoklastik aktiviteyi, yani kemik rezorpsiyonunu uyarmaktadır. Osteoblast-osteoklast ilişkisini sağlayan, osteoblastlardan salgılanan iki proteindir: Osteoklast farklılaşma

faktörü (ODF, RANKL) ve osteoprotegerin (OPG). Periferik uyarılar kemik yenilenmesinin artmasını gerektiriyorsa RANKL salgılanır, azalmasını gerektiriyorsa RANKL salgısı azalır, OPG salgısı artar. RANKL, osteoklastlar üzerindeki reseptörleri yolu ile yeni osteoklast proliferasyonunu artırır. OPG ise RANKL'ı bağlayarak, bir yalancı reseptör gibi hareket eder ve RANKL etkisini azaltır (43,150). Sandy (122) osteoblastların, osteoklastların oluşumu ve fonksiyonunu düzenlediğini tespit etmiştir. Bu nedenlerle biz de çalışmamızı hem kemik yapımı hem de dolaylı yoldan yıkımını yönlendiren osteoblast hücreleri üzerinde in vitro olarak yapmaya karar verdik.

Günümüzde in vitro hücre kültürü çalışmaları, bir çok alanda hayvan deneylerinin yerini almakta ve birçok hayvan çalışmasını gereksiz kılmaktadır. Örneğin yalnızca İngiltere'de bir yıl içinde 2.570.000 hayvan çeşitli deneylerde kullanılmıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde ise bir yılda deney amacıyla öldürülen hayvanların sayısı 18-22 milyon arasında değişmiş olmakla beraber, bu rakama 50.000 kedi, 61.000 maymun, 180.000 köpek ve 554.000 tavşan da dahildir. Hayvan hakları savunucuları, hayvan deneylerinin birçoğunun gereksiz yapıldığı yönündeki düşüncelerini, bu deneylerden çıkan sonuçların güvenilemeyecek kadar değişken olmasına ya da hayvanların acı çektirilerek öldürülmelerine değmeyecek kadar önemsiz oldukları savlarına dayandırmaktadırlar. Hücre kültürü çalışmalarının faydası burada ortaya çıkmaktadır. Direkt hayvan deneyi yapmak yerine, günümüzde büyük gelişmeler göstermekte olan moleküler biyolojik tekniklerle yapılmış hücre kültürü çalışmalarından elde edilen bulgulara göre gerekli olduğu durumlarda hayvan deneyi yapılmasıyla hem çok sayıda hayvanın öldürülmesi engellenmiş olmakta hem de standart bir deney ortamının sağlanıp yalnızca denenen maddeye veya yönteme hücrenin verdiği cevabın ölçülebilmesi avantajını sağlamaktadır. (2, 6, 140)

Ayrıca hücre kültürü test yöntemlerinin kontrol edilebilme olanakları yüksektir ve tekrarlanabilme özellikleri vardır. Sonuçlar daha kısa sürede alınabilmektedir. Hücreler üzerindeki etki doğrudan doğruya gözlenir. Kimyasal maddelerin etkileri her cins doku ya da hücrelerde ayrı ayrı

araştırılabilir. Etkiler doğrudan doğruya olduğundan süratlidir. İstatistiksel olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılamayacak kadar fazla hücre kullanılabilir. Organizmadaki karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan ya da bu nedenle şüpheli sonuçlar elde edilen araştırmalar hücre kültürlerinde daha sağlıklı yapılabilir (80). Ortodontide ve başka bilim dallarında birçok araştırmacı günümüzde hücre kültürü yöntemini biyomateryallerin ve ilaç etken maddelerinin test edilmesinde kullanmıştır (14, 15, 49, 51, 71, 81, 105, 158). Bizde bu nedenlerle araştırmamızı osteoblast hücre kültürü üzerinde yapmaya karar verdik

Temel olarak primer ve devamlı (sekonder) olmak üzere iki farklı hücre kültürü tipi vardır. Biyomateryaller ve ilaçlarla çalışılırken seçilen hücre zincirinin özellikleri ve devamlı hücre hattı mı yoksa primer hücrelerle çalışmanın mı daha güvenilir ve anlamlı olacağı şuan bile tartışma konusudur. Primer osteoblast hücreleri kıkırdak, kemik, kemik iliği gibi pek çok farklı kaynaktan elde edilebilir. Fare kemik hücreleri, insan osteoblastları, civciv embriyonik hücreleri, fetal sığır osteoblastları, diploid kromozoma sahiptir ve primer osteoblast hücreleri olarak kabul edilir. Primer kültürler çok yavaş üreme gösterirler, elde edilmeleri nispeten zordur, belirli bir yaşam süresine sahiptirler ve her zaman sağlıklı bir şekilde çoğaltılmaları mümkün olmamaktadır (6, 36). Buna karşılık devamlı hücre hatları hızlı ürerler, laboratuvar kurallarına uyulduğu zaman bir çok defa pasajlanıp uzun süre yaşatılabilirler. Elde edilmeleri primer olanlara göre son derece kolaydır. Bütün pasajlama işlemleri sonucunda bile uzun süre hücrelerin fenotipik özelliklerinde bir kayıp olmaz. Ayrıca devamlı hücre hatları ile çalışmak primer hücre kültürlerine göre daha hızlı sonuçlar verir (36). Tüm bu nedenler bizi çalışmamızda devamlı bir osteoblast hücre hattı olan mouse calvaria (fare kafatası) pre osteoblast hücre hattını (MC3T3-E1 subclone 14) kullanmaya yöneltti. Benzer şekilde birçok araştırmacı çalışmalarında kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında rezorpsiyon ve appozisyon fazlarını taklit edebildikleri, kolay üretilen ve osteoblastik fenotip gösteren MC3T3-E1 pre osteoblast hücre hattını kullanmışlardır (25,51,53,159).

Çalışmamızda; Benzidamin HCl'un osteoblast hücreleri üzerine etkilerinin araştırılması için bir dizi deney planlanmıştır;

- Alizarin red s ve von-Kossa boyamaları ile kemik nodülleri ve mineral birikimlerinin tespiti,
- ALP boyaması ile alkalen fosfotaz enziminin histokimyasal tespiti,
- Spektrofotometrik yöntemlerle ALP aktivitesinin biyokimyasal tespiti
- RT-PCR ile kemik formasyonu sırasında osteoblastlar tarafından sentezlenmesi gereken bazı genlerin (OC, OP, α 1Col, ALP, Cbfa1) tespiti,
- XTT testi ve hücre sayımı ile Benzidamin HCl'un osteoblastlar üzerine olası sitotoksik etkilerinin tespiti.

Bir çok çalışmada da, farklı ilaç ve biyomateriyallerin MC3T3-E1 hücre hattına etkilerini değerlendirmek için ALP aktivitesi, PCR, Alizarin ve von-Kossa boyaması, XTT testi ve hücre sayımı yöntemlerini kullanmışlardır (4,81,116).

Çalışmamızda kullandığımız Benzidamin HCl'ün dozunu tespit etmek için daha önce NSAİİ ilaçlarla ve Benzidamin HCl ile yapılan çalışmalardan yola çıkarak (20,130) değişik dozlar için spektrofotometrik olarak MTT (3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi yapıp, çıkan sonuçlara göre MC3T3-E1 hücre hattı için IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) konsatrasyonları hesaplanarak deneylerde kullanacağımız 34.3 μ M doz tespit edildi (20,72,148).

Sağlık alanında, ortodontide, ilaç etken maddeleri ve çeşitli biyomateriyaller, büyüme faktörleri, sitokinler, medyum komponentleri, lenfosit aktivasyonu ve sitotoksik ajanların görüntülenmesi gibi hücre biyolojisi ile ilgili çalışmalarda tüm dünya da yaygın olarak kullanılan hücre proliferasyon

testlerinden, 1950'li yıllarda tanıtılan kantitatif kolorometrik bir metot olan MTT test yöntemi kullanılmıştır (26,46,64,146,160). Ancak son yıllarda, MTT testinin uygulama aşamasında besiyeri değiştirme zorunluluğu, yıkama ve uzun test süresi gibi hücre ölümüne neden olabilecek işlemleri saf dışı eden bir tetrazolyum tuzu ile formazan yoğunluğunun optik olarak değerlendirildiği bir metabolik aktivite test yöntemi olan XTT geliştirilmiş ve çalışmamızda da sitotoksite tayininde bu yöntemin kullanılması tercih edilmiştir. XTT metodunda reaksiyon; tetrazolyum tuzlarının, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz sistemi aracılığıyla formazana dönüşümü ile meydana gelmektedir. Bu işlem temel olarak mitokondrial enzimler ve elektron taşıyıcılar tarafından yönlendirilmektedir. Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan XTT, reaksiyon sonrası suda çözünebilen turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşür ve elde edilen sonuçlar ELİSA-Reader'da değerlendirilir (12, 71).

Benzidamin HCl'ün osteoblast hücreleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla deneyin 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerinde karşılaştırmaları gerçekleştirmek için deney ve kontrol grupları oluşturulmuştur (Tablo 4.1.).

XTT testi ile Benzidamin HCl'ün osteoblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelendiğinde;

Deney gruplarının kendi içinde XTT değeri yönünden karşılaştırılmalarında;

1.gün deney (Grup 1) ve 4. gün deney (Grup 3) grupları karşılaştırıldığında; 3.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

1.gün deney (Grup 1) ve 7. gün deney (Grup 5) grupları karşılaştırıldığında; 5.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün deney (Grup 1) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.01$).

1.gün deney (Grup 1) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

4.gün deney (Grup 3) ve 7. gün deney (Grup 5) grupları karşılaştırıldığında; 5.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

4.gün deney (Grup 3) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün deney (Grup 3) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

7.gün deney (Grup 5) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün deney (Grup 5) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

14.gün deney (Grup 7) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Kontrol gruplarının kendi içinde XTT değeri yönünden karşılaştırılmalarında;

1.gün kontrol (Grup 2) ve 4. gün kontrol (Grup 4) grupları karşılaştırıldığında; 4.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 7. gün kontrol (Grup 6) grupları karşılaştırıldığında; 6.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; 8.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; 10.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 7. gün kontrol (Grup 6) grupları karşılaştırıldığında; 6.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; 8.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; 10.grup XTT değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

7.gün kontrol (Grup 6) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

7.gün kontrol (Grup 6) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

14.gün kontrol (Grup 8) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Deney ve kontrol grupları XTT değeri yönünden karşılaştırıldığında;

1.gün deney (Grup 1) ve kontrol grupları (Grup 2) karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.gün deney (Grup 3) ve kontrol grupları (Grup 4) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre XTT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

7.gün deney (Grup 5) ve kontrol grupları (Grup 6) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre XTT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

14.gün deney (Grup 7) ve kontrol grupları (Grup 8) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre XTT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

21.gün deney (Grup 9) ve kontrol grupları (Grup 10) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre XTT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

XTT değerlendirmelerinde; Deney grupları kendi içinde karşılaştırıldığında tüm deney günlerinde istatistiksel olarak farklar olmasına rağmen ortalama olarak başlangıça göre hücrelerin proliferasyon düzeylerinin hemen hemen aynı kaldığı kontrol gruplarının kendi içinde karşılaştırılmasında ise 1. deney gününden 21. deney gününe doğru artan şekilde hücrelerin

proliferasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırması bu proliferasyon seviyesini daha net ortaya koymuş kontrol gruplarına ait hücreler 4. deney gününden itibaren çok anlamlı şekilde deney gruplarına kıyasla hücresel canlılık ve proliferasyon göstermişlerdir. Kültürde hücrelerin normal şartlar altında düzenli olarak çoğalma eğiliminde oldukları düşünülürse XTT testi sonuçları Benzidamin HCl'ün MC3T3-E1 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri olduğu göstermiştir.

Çalışmamızın XTT testi bulguları bu yönde olmasına rağmen Benzidamin HCl'ün osteoblast çoğalması üzerine olan etkilerinin incelenmesi için ayrıca tüm deney günlerinde hücre sayımı da yapılmıştır.

Deney grupları hücre sayısı yönünden kendi içinde karşılaştırıldığında;

1.gün deney (Grup 1) ve 4. gün deney (Grup 3) grupları karşılaştırıldığında; 3.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün deney (Grup 1) ve 7. gün deney (Grup 5) grupları karşılaştırıldığında; 5.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün deney (Grup 1) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün deney (Grup 1) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir($p<0.001$).

4.gün deney (Grup 3) ve 7. gün deney (Grup 5) grupları karşılaştırıldığında; 5.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün deney (Grup 3) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün deney (Grup 3) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün deney (Grup 5) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün deney (Grup 5) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

14.gün deney (Grup 7) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

Kontrol grupları hücre sayısı yönünden kendi içinde karşılaştırıldığında;

1.gün kontrol (Grup 2) ve 4. gün kontrol (Grup 4) grupları karşılaştırıldığında; 4.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir($p<0.001$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 7. gün kontrol (Grup 6) grupları karşılaştırıldığında; 6.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; 8.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; 10.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 7. gün kontrol (Grup 6) grupları karşılaştırıldığında; 6.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; 8.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; 10.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün kontrol (Grup 6) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün kontrol (Grup 6) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

14.gün kontrol (Grup 8) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Deney ve kontrol grupları hücre sayısı yönünden karşılaştırıldığında;

1.gün deney (Grup 1) ve kontrol grupları (Grup 2) karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.gün deney (Grup 3) ve kontrol grupları (Grup 4) karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

7.gün deney (Grup 5) ve kontrol grupları (Grup 6) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

14.gün deney (Grup 7) ve kontrol grupları (Grup 8) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

21.gün deney (Grup 9) ve kontrol grupları (Grup 10) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Hücre sayısı değerlendirmelerinde; Hem deney hem de kontrol gruplarında hücre sayısının 1. günden 21. güne doğru giderek artmış olduğu ancak bu artışın deneyin ilk günü ve son günü kıyaslandığında deney gruplarında ortalama 5 kat, kontrol gruplarında ise ortalama 145 kat olduğu tespit edilmiştir. Deney ve kontrol gruplarının birbirleri ile karşılaştırmasında ise 4. günden itibaren kontrol gruplarında hücre sayısının deney gruplarına göre anlamlı şekilde fazla olduğu değerlendirilmiştir.

Sonuçta hücre sayıları ve XTT testi birbirleri ile uyumlu olarak Benzydamin HCl'ün osteoblastlar üzerine sitotoksik olduğunu ve proliferasyonlarını sınırladığını göstermiştir. NSAİİ yapılan benzer çalışmalarda da bizim bulgumuzu destekler nitelikte NSAİİ'lerin hücre üremesini baskıladığı tespit edilmiştir (5, 54,58,109,111,133,157).

Ho ve arkadaşları (63), yaptıkları çalışmada da NSAİİ (nonsteroid antienflamatuarlar) ilaçların zamana ve efektif konsantrasyona bağlı olarak değişik derecelerde osteoblast proliferasyonunu inhibe edip üremeleri üzerine baskılayıcı bir etki oluşturduklarını tespit etmişlerdir.

Indomethacin, aspirin, ibuprofen gibi NSAİİ ilaçların kemik büyümesini, tamirini ve yeniden şekillenmesini baskıladığını gösteren çalışmalar mevcuttur (77,102)

Matziolis ve arkadaşları (92). kemik kırıklarında yaygın olarak kullanılan analjezik ilaçların yara iyileşmesini nasıl etkileyeceği konusunda yaptıkları araştırmalarında, T6ramadol ve diclofenac analjezik etken maddeleri ile yaptıkları osteoblast kültüründe bu ilaçların hücreler üzerine sitotoksik etkisini XTT testi yaparak araştırmışlar ve her iki ilacın da bizimki ile benzer biçimde osteoblastların proliferasyonunu baskıladığını tespit etmişlerdir.

Kaspar ve arkadaşları (73), çok sıklıkla kullanılan NSAİİ'lardan olan voltarenin etken maddesi diclofenac ile yaptıkları osteoblast kültürü çalışmasında, bu etken maddenin sitotoksik etkisini MTT test yöntemi ile değerlendirmişler ve diclofenac'ın osteoblastların metabolik aktivitesini yine bizimki ile benzer şekilde azalttığını belirlemişlerdir.

Osteoblast hücrelerinin diferansiyasyonlarının gösterilmesinde en sıklıkla kullanılan belirteçlerden biri de, alkalen fosfataz aktivitesidir. İskelet alkalen fosfatazı osteoblast membranında bulunur ve kemik oluşumu esnasında kana salınır, kemik yapımının ölçütüdür. ALP hücre membranlarının ekstrasellüler yüzeyindeki glukozil-fosfatidilinozitol kalıntılarına sıkıca bağlanan bir glukoproteindir. Genellikle, matriksi mineralize olmayan fibroblast gibi hücrelere göre, osteoblastlar yüksek alkalen fosfataz seviyeleri gösterirler. Osteoblastlar için alkalen fosfataz rölatif olarak erken bir diferansiyasyon belirtecidir (6, 60).

İskelet alkalen fosfatazı direkt olarak osteoblast diferansiyasyonu ve kemik metabolizması ile bağlantılıdır. Alkalen fosfataz bütün dünya da kabul görmüş bir matriks enzimidir ve başlamış osteogenezin analizi için sıklıkla kullanılmaktadır. Osteoblast diferansiyasyonu ve osteojenik özelliğin belirlenmesinde en sık kullanılan parametredir (24,103). Bizim çalışmamızda

hücrel karakterizasyonu belirlemek için alkalen fosfataz aktivite testi yapılmıştır.

Çalışmamızın ALP testi sonuçlarına göre;

Deney grupları ALP aktivitesi yönünden kendi içinde karşılaştırıldığında;

1.gün deney (Grup 1) ve 4. gün deney (Grup 3) grupları karşılaştırıldığında; 3.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

1.gün deney (Grup 1) ve 7. gün deney (Grup 5) grupları karşılaştırıldığında; 5.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.01$).

1.gün deney (Grup 1) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün deney (Grup 1) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir($p<0.001$).

4.gün deney (Grup 3) ve 7. gün deney (Grup 5) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.gün deney (Grup 3) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün deney (Grup 3) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün deney (Grup 5) ve 14. gün deney (Grup 7) grupları karşılaştırıldığında; 7.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün deney (Grup 5) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; 9.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

14.gün deney (Grup 7) ve 21. gün deney (Grup 9) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Kontrol grupları ALP aktivitesi yönünden kendi içinde karşılaştırıldığında;

1.gün kontrol (Grup 2) ve 4. gün kontrol (Grup 4) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 7. gün kontrol (Grup 6) grupları karşılaştırıldığında; 6.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; 8.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

1.gün kontrol (Grup 2) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; 10.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 7. gün kontrol (Grup 6) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; 8.grup hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.gün kontrol (Grup 4) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; 10.grup ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün kontrol (Grup 6) ve 14. gün kontrol (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7.gün kontrol (Grup 6) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

14.gün kontrol (Grup 8) ve 21.gün kontrol (Grup 10) grupları karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Deney ve kontrol grupları ALP aktivitesi yönünden karşılaştırıldığında;

1.gün deney (Grup 1) ve kontrol grupları (Grup 2) karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.gün deney (Grup 3) ve kontrol grupları (Grup 4) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

7.gün deney (Grup 5) ve kontrol grupları (Grup 6) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

14.gün deney (Grup 7) ve kontrol grupları (Grup 8) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

21.gün deney (Grup 9) ve kontrol grupları (Grup 10) karşılaştırıldığında; kontrol grubunda deney grubuna göre ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Özetle, hem Benzidamin HCl içeren deney gruplarında hem de kontrol gruplarında 1. deney gününden 14. deney gününe doğru giderek artan ve 21. günde 14. güne kıyasla biraz azalan şekilde ALP aktivitesi değerleri elde edilmiş, ancak kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında deney gruplarına ait ALP aktivitesi değerleri kontrol gruplarına oranla daha az bulunmuştur. Artan ALP aktivitesi osteoblastların maturasyonlarının bir göstergesi olduğuna göre, bu sonuçlar bize Benzidamin HCl'ün ALP aktivitesini azalttığını düşündürmüştür.

Nonsteroidal anti enflamatuar ilaçlar genellikle siklooksijenaz enzimini (COX) inhibe ederler ve yaygın olarak kas iskelet sisteminin post travmatik ağrılarında kullanılırlar. Çeşitli hayvan deneyleri NSAİİ'lerin, ilaca bağlı olarak osteoblastların yaralı bölgeye toplanması ve farklılaşmasını inhibe ederek kırık iyileşmesinde gecikme ve kırık kenarlarının birleşmemesi problemlerine neden olduğunu göstermiştir. Kellinsalmi ve arkadaşları (79) yaptıkları çalışmalarında COX-1 inhibitörü olan indometazin ile COX-2 inhibitörü parecoxib ve NS398 ilaç etken maddelerinin hücresel düzeyde osteoklast ve osteoblastların farklılaşmaları üzerine etkilerini araştırmışlar ve bu ilaçların doza bağlı olarak ALP aktivitesini arttırdığını belirlemişlerdir.

Literatürde MC3T3-E1 hücre hattı üzerinde Benzidamin HCl ile ilgili olarak bizim çalışmamıza benzer çalışmalar olmamasına rağmen, diğer bazı

NSAİİ ilaçlarla yapılan osteoblast kültürü çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde; Bazı araştırmacılar indomethazin, ASA (acetyl salicylic acid) ve diclofenac NSAİİ etken maddelerinin ALP aktivitesini bizim sonuçlarımızın tersine arttırdığını bulmuşlarken (50, 129), yine bazı araştırmacılar bizimle uyumlu olarak; flurbiprofen, piroxicam diclofenac, ketorolac, naproxen sodium gibi NSAİİ etken maddelerinin ALP aktivitesini baskıladığını ya da azalttığını tespit etmişlerdir (50, 63, 19, 73).

Frediani ve arkadaşları (49) MC3T3-E1 hücreleri üzerinde neridronate etken maddesini inceledikleri çalışmalarında, %10 FCS kullanılan mediumda ALP aktivitesinin 4. günden 10. güne arttığı, 20. günde azaldığını tespit etmişler. Zhau ve arkadaşları (159), 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada MC3T3-E1 osteoblast hücre hattını kullanarak 3-hydroxybutyrate'ın bu hücrelerin farklılaşması üzerine etkilerini incelemişler ve 1. deney gününden itibaren giderek artan sonra belli bir seviyeden itibaren düşen bir ALP aktivitesi değerleri elde etmişlerdir.

Morais ve arkadaşları (97), primer tavşan osteoblast hücresi kullandıkları çalışmalarında kontrol grubundaki osteoblastların deney süresince prolifer oldıklarını ve 21 günlük inkübasyon döneminden sonra durgunluk fazına girdiklerini tespit etmişlerdir. Osteoblast hücreleri yüksek seviyelerde ALP aktivitesi göstermişler ve en yüksek seviyelerine 14. gün civarında ulaşmışlardır. Bundan sonra enzim seviyesi belirgin olarak düşmüştür. Mineral depolarının oluşumu, en yüksek ALP aktivitesini takip edecek şekilde 3. haftada meydana gelmiştir. Bu çalışmada osteoblast diferansiyasyonunu belirginleştirmek için askorbik asit, 3-gliserofosfat ve dekzametazon kullanmışlar, bizim yaptığımız çalışmada bu maddeler kullanılmakla beraber, aldığımız sonuçlar benzerdir.

Osteojenik hücre sistemleri üzerinde yapılan çalışmalar, osteoprogenitor hücrelerin, preosteoblastlara, olgun osteoblastlara ve daha sonra osteosit hücrelerine diferansiye olduğu yönündeki bilgileri desteklemektedir. ALP aktivitesi, hücreler osteoblastlara dönüştüğünde

mevcuttur ve kemik hücre popülasyonunda spesifik ALP aktivitesi arttığında hücrelerin daha diferansiye bir konuma geçtiği genel olarak kabul edilmektedir. ALP matriks mineralizasyonunun başlatılmasında kritik bir rol oynamaktadır ve bundan sonra enzim seviyesi düşmektedir. Sonuçlarımız genel kabul gören bu bilgilerle de aynı doğrultudadır.

Hücrelerde farklılaşma, osteogenezis ve hücre büyüme ve gelişimi gibi bütün faaliyetlerde bunlarla ilgili her genin ekspresyonu (ifadesi) için o gene özgü doğru zaman ve koşulların oluşması gerekmektedir. Organizmanın kemik oluşturma sürecinde de kemikle ilgili genlerin doğru zaman ve şartlarda ekspresyonunun sağlanması gerekmekte olup, bu süreç organizmanın sıkı kontrolü altındadır (136).

Biz de çalışmamızda osteoblastların gelişimi ve kemik oluşumu ile ilgili bazı genlerin [mOC -mouse osteocalcin (fare osteokalsin), mOP-mouse osteopontin (fare osteopontin), $\alpha 1$ Col -mouse alpha 1 collagenase (fare kollajenaz), mALP- mouse alkaline phosphatase (fare alkalin Fosfataz), mCbfa1- mouse core binding factor alpha 1(fare çekirdek bağlayıcı faktör alfa 1)] (94, 155) varlığını RT-PCR (reverse transkriptaz polimerase chain reaction) yöntemiyle araştırdık. Böylece Benzidamin HCl uygulanmış deney grupları ile ilaç verilmemiş kontrol grubuna ait osteoblast hücrelerinin göstermiş oldukları osteogenezis ve diferansiyasyonu değerlendirilerek Benzidamin HCl'ün osteoblastlar üzerine bu yönde olan etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), moleküler biyoloji alanında devrim niteliği taşıyan bir yöntemdir. Bizim yaptığımız RT-PCR'da ise RNA molekülü PCR ile çoğaltılamadığından PCR aşamasından önce RNA reverse transcriptase enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilir. Ardından DNA, PCR ile çoğaltılmaktadır (70). mRNA analiz yöntemi olarak norhern blot (tek gen analizi) RT-PCR dışında kullanılan yöntemler arasında başta gelmektedir. Northern blot analizinde mRNA'lar boylarına göre jelde

yürürler, naylon membrana transfer edilirler ve radyoaktif işaretli DNA problemleri ile hibridize edilir işlem hacmi düşük olan bu teknikte eş zamanlı RT-PCR'a göre hassa değildir, radyoaktif izotoplar kullanıldığından özel izin gerektirir ve fazla miktarda RNA gerektirir (17, 115).

PCR çalışmamızda özetle hücreden RNA izolasyonu, reverse transcriptase ile cDNA eldesi, cDNA'nın PCR ile çoğaltılması, artık primerlerin, bağlanmamış dNTP'lerin PCR ürününden uzaklaştırılması ve agaroz jelinden PCR ürünlerin elde edilmesi işlemleri sırası ile uygulandı. Çalışmamızda yalancı pozitif sonuçları önlemeye yönelik olarak ekstraksiyon, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve elektroforez işlemleri farklı odalarda yapıldı ve bu işlemlerin herbiri için farklı pipet ve steril mikropipetler kullanıldı. Pozitif kontrol (mGAPDH) ve çalışılan örneklerin arasına negatif kontroller konuldu. Gerek ekstraksiyon, gerek amplifikasyon aşamalarında tüplerin açılmasına azami özen gösterildi ve her aşamada eldiven değiştirildi. PCR aşamalarında ürünlerin eklenmesi sırasında kullanılan malzemeler UV sterilizasyonuna tabi tutuldu.

Pozitif kontrol olarak mGAPDH seçildi çünkü bu genin canlı organizmada çeşitli görevleri vardır ve bunlardan bir tanesi D-gliseraldehit-3-fosfat'ı 1,3-bisfosfagliseraldehite çeviren glikolitik fonksiyondur. Bunun dışında memeli hücrelerinde membran kaynaşması, mikrotübüllerin bir araya getirilmesi, fosfotransferaz aktivitesi, çekirdekten RNA transferi, DNA çoğalması ve tamiri gibi hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarında görevli olup son derece stabildir dolayısıyla her zaman mevcuttur ve pozitif kontrol olarak kullanılabilir (68).

Deney ve kontrol gruplarına ait PCR bulguları;

Çalışmamızda Benzidamin HCl içeren deney gruplarının hiç birinde ve kontrol gruplarının 1., 4. ve 7. günlere ait örneklerde yukarıdaki genler saptanamazken, kontrol grubunda ait 14. ve 21. gün örneklerinde bütün bu genler tespit edilmiştir. Deney gruplarında bu genlerin belirlenememesinde en kuvvetli nedenler MC3T3-E1 hücrelerinin kültürde Benzidamin HCl'ün

negatif etkisiyle osteoblastik faaliyet gösterebilmeleri için gerekli bir yoğunluğa ulaşamamaları ve osteoblastik diferansiyasyonlarını tamamlayamamalarıdır. Pozitiflik bulunan kontrol grubuna ait 14. ve 21 günlerde osteoblast hücreleri milyonla ifade edilecek sayılara ulaşmış ve mature osteoblastlara farklılaşmışlardır. Sonuçta RT-PCR bulgularımız değerlendirildiğinde Benzidamin HCl'ün osteoblastik diferansiyasyonu baskıladığı ve osteogeneze engel olduğu düşünülmektedir.

Literatürde MC3T3-E1 hücre hattı üzerinde Benzidamin HCl ile ilgili olarak bizim çalışmamıza benzer çalışmalar olmamasına rağmen, bize en yakın çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde; Mizumo ve arkadaşları (94) kemik iliği hücrelerinin tip 1 kollajen varlığında osteoblastlara farklılaştığını araştırdıkları çalışmalarında, osteoblastlarla ilişkili genler olan osteopontin, osteokalsin, kemik sialoprotein, cbfa-1, alkalen fosfataz'ı araştırmışlar, bu amaçla 1. 2. 3. haftalarda PCR yapmışlardır. Bizim çalışmamızla ortak olan genlerden alkalen fosfataz, osteokalsin ve osteopontin için kontrol gruplarında elde ettikleri sonuçlar çalışmamızı destekler nitelikte bu genlerin varlığının zamanla arttığı yönünde olmuştur ancak cbfa-1 için bizden farklı olarak deneyin ilk haftasında da bir pozitiflik tespit etmişlerdir. Bu farklılığın mediumda bizden daha fazla oranda kullandıkları %15 fcs ve kullandıkları kemik iliği hücrelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Zhao ve arkadaşları (159), çalışmalarında MC3T3-E1 osteoblast hücre hattını kullanarak doku rejenerasyonunu uyaran bir madde olan 3-hydroxybutyrate (3 HB)'ın osteoblast farklılaşmasının geç dönem belirteçlerinden olan osteokalsini RT-PCR ile araştırmışlar. 3 HB 21 gün sonunda osteokalsin ekspresyonunu önemli ölçüde artırmıştır. Bizim çalışmamızda da kontrol grubunun geç dönemlerinde osteokalsin tespit edilmiştir.

Jalled ve arkadaşları (4), transglutaminaz aktivitesinin osteoblast farklılaşma ve matriks mineralizasyonu üzerine yaptıkları çalışmalarında, PCR yöntemi ile MC3T3-E1 pre osteoblast hücre kültüründe osteokalsin,

BSP, osteopontin ve kollojenaz 1 gen ekspresyonlarını bakmışlar. 12 günlük deney periyodunun ilk gününde kollejenaz 1 hiç görülmezken, osteokalsin, osteopontin ve BSP eser miktarlarda bulunmuş sonra bu az pozitiflik ilerleyen deney günlerinde artmıştır. Biz çalışmamızın kontrol grubunda 14. günden itibaren bu genleri tespit etmiştik. Aramızdaki bu farklılığın en olası nedeni bizce hücre sayısıydı çünkü bizim deneyimiz 21. güne kadar süreceği için çalışmada cm^2 'ye yaklaşık 2000 hücre gelecek şekilde deneye başlarken Jalled ve arkadaşları (4) ilk olarak 50.000 hücreyle çalışmaya başlamışlardır. Osteoblastik diferansiyasyon üzerinde kimyasal faktörler kadar hücre yoğunluğunun da etkisi büyüktür.

İn vitro osteoblast diferansiyasyonunun bir belirteci de mineralizasyondur. Mineralizasyon çeşitli şekillerde değerlendirilebilir bunlardan en önemlileri florasan kalsein bağlanması, alizarin red s ve von-Kossa boyamalarıdır (56). Bizde çalışmamızda Benzidamin HCl'ün osteoblast hücrelerinin mineral depozisyonu, dolayısıyla kemik formasyonu üzerine etkilerini değerlendirmek için alizarin red s ve von-Kossa boyamalarını tercih ettik. MC3T3-E1 pre osteoblast hücreleriyle yapılan in vitro kültür araştırmalarında 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic asid, 10mM β -glycerolphosphate bulunan besi ortamlarında bu hücrelerin mineralizasyon oluşturduğu gösterilmiştir (4,25,51) Bizim araştırmamızda da mineralizasyonu indükleyici olarak 10mM β -glycerolphosphate ve 50 $\mu\text{g/ml}$ L-Ascorbic acid, MC3T3-E1 hücrelerinin besi ortamında kullanılmıştır. Sonuç olarak kemik nodülleri ve mineral birikimleri Benzidamin HCl uygulanan deney gruplarında gözlenmezken, ilaç uygulanmayan kontrol gruplarında 14. günden itibaren 21. güne doğru giderek artan mineralize sahalar tespit edilmiştir. Kontrol gruplarına ait 14. ve 21. güne ait örneklerde elde edilen bu pozitif sonuç bu hücre hattına ait hücrelerin kültürde belli bir süreden sonra diferansiyasyonlarını tamamlayıp osteoblastik faaliyet gösterdiklerini, deney grubunda hiçbir günde MC3T3-E1 hücrelerin maturasyonlarını tamamlayamadıklarını düşündürmüştür. Boyamalardan elde ettiğimiz bulgular diğer deneylerden elde ettiğimiz sonuçları destekler nitelikte

Benzidamin HCl'ün MC3T3-E1 hücre hattı üzerine olumsuz etkileri olduğunu göstermiştir.

Chang ve arkadaşları (19) mezenşimal kemik iliği kök hücreleri ile yaptıkları bir çalışmalarında bazı NSAİİ ilaçların bu hücreler üzerine etkilerini incelemişler çalışmalarının von-Kossa boyamaları sonucuna göre kontrol grubunda mineral birikimlerinin 1. 2. ve 3. hafta değerlendirmelerinde bizim çalışmamıza benzer şekilde haftadan haftaya arttığını tespit etmişler ancak intometazin ve ketorolak içeren deney gruplarında mineral birikimlerinin azaldığını belirlemişlerdir. Diclofenak, piroxicam, celecoxib ilaç etken maddelerinin mineralizasyona etkisi olmamıştır.

Frediani ve arkadaşları(49), MC3T3-E1 hücreleri üzerinde neridronate etken maddesinin inceledikleri çalışmalarında 2.4.6.12. ve 20. inkübasyon günlerinde alizarin red s boyaması yapmışlar ve bizimkine benzer şekilde gitgide artan mineralize sahalar tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda genel tıpta ve dişhekimliğinde, analjezik ve antienflamatuar olarak reçete edilen bir ilaç etken maddesi olan Benzidamin HCl'ün kemik yapımı ile dolaylı yoldan yıkımı üzerinde sorumlu olan osteoblast hücreleri üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaç için MC3T3-E1 devamlı hücre hattı kullanılıp, ALP aktivitesi ve boyaması, alizarin boyaması, von-Kossa boyaması, hücre sayımı, XTT, RT-PCR gibi bir dizi deney planlanıp 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerde bu deneyler yapıldı ve Benzidamin HCl'ün yukarıda bahsedilen etkileri tespit edilmiş oldu. Araştırmamızda, elde edilen bu sonuçlar bize Benzidamin HCl'ün osteoblastlar üzerinde negatif etkileri olduğunu ve dolayısıyla da ortodontik diş hareketlerini de olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Benzidamin HCl'ün osteoblast hücreleri üzerindeki etkisi in vitro olarak araştırılmıştır. Bu amaçla, ALP aktivitesi, ALP boyaması, alizarin red s boyaması, von-Kossa boyaması, hücre sayımı, XTT ve RT-PCR olmak üzere 7 ayrı deney yapılmıştır, bu deneylerin sonuçları değerlendirildiğinde;

1. ALP aktivitesine göre; kontrol gruplarında 1. günden 14. güne doğru ALP aktivitesinin arttığı ve 21. günde 14. güne göre biraz düşüş gösterdiği, deney gruplarının da buna benzer bir eğri çizdiği fakat kontrol gruplarına göre daha düşük ALP aktivitesi değerlerine sahip olduğu,
2. ALP boyamasında; 1. ve 4. günler için yapılan boyamalarda ALP tespit edilemez iken diğer günlerde yapılan ALP boyamaları sonucunda ALP pozitif alanların 14. günde artış gösterip 21.günde 14. güne benzer yoğunlukta gözlemlendiği ve deney gruplarında yoğunluğunun kontrol gruplarına göre daha az olduğu,
3. Alizarin red s ve von-Kossa boyamalarında; deney gruplarında pozitiflik saptanmaz iken kontrol gruplarında 14. günden 21. güne doğru giderek artan kemik nodülleri ve mineral birikimleri belirlendiği,
4. Hücre sayıları ve XTT sonuçlarına göre; deney gruplarına ait hücrelerin kontrol gruplarına kıyasla belirgin şekilde kültürde üremediği ve canlılıklarını devam ettiremediği,
5. RT-PCR ile de osteoblast diferansiyasyonunu gösteren ve osteoblastlarca sentezlenen osteokalsin, osteopontin, alfa 1 kollogenaz, core binding factor alpha 1 ve alkalin fosfataz genlerinin sentezlenip sentezlenmediği araştırılıp deney gruplarının hiç birinde bu genler belirlenemeyip kontrol grubuna ait örneklerde 14. günden sonra bu genlerin varlığının tespit edildiği değerlendirilmiştir.

Elde edilen bu sonuçların, hepsi Benzidamin HCl'ün osteoblastlar üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu göstermiştir. Osteoblastların kemik yapımı ve dolaylı yoldan yıkımından sorumlu ana kemik hücresi olduğu düşünülürse bu ilacın ortodontik diş hareketlerini de geciktireceği söylenebilir.

Burada dikkat edilmesi gereken bir nokta da Benzidamin HCl'ün kültür vasatına direkt katılarak kültür ortamında bu hücrelerin üzerine doğrudan uygulanmasıydı. Biz her ne kadar bir dizi ön araştırma ile deneylerde kullanacağımız dozun tespitinde bu duruma uygun doz ayarlaması yapsak da ilacın hastanın kemik dokusunda ne yoğunlukta ortaya çıkacağı ve nasıl etki göstereceği in vitro taklit edilemez şekilde bir çok faktör tarafından kontrol edilmektedir. Ancak şu da bir gerçektir ki hücre kültürü çalışmaları ile Benzidamin HCl'ün osteoblast hücreleri üzerindeki etkisi bu yöntemle direkt olarak ölçülebilmekte ve bize dolaylı olarak diş hareketi üzerine olası etkileri konusunda da açık fikir vermektedir. Yinede ileride gerek görülürse in vivo koşullarda oluşabilecek gerçek etkilerin saptanabilmesi için hayvan çalışmaları ve klinik deneyler de yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. A.Ü Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik İnt. Sit. (http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?PgId=70)
2. Akbaba, G., Sunay, Ç., Hayvan Deneyleri Yararsız ve Acımasız Çalışmalar mı, Sağlığımız İçin Önemli Bir Gereksinim mi? Bilim ve Teknik, Mayıs 2000.
3. Al-Dehaimi, A.W., Blumsohn A., Eastell R., Serum galactosyl hydroxylysine as a biochemical marker of bone resorption. Clin Chim., 45(5), 676-81, 1999.
4. Al-Jallad, H.F., Nakano, Y., Chen J.L., Mcmillan, E., Lefebvre, C., Kaartinen M.T., Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures. Matrix biology, 25, 135-148, 2006.
5. Arber, N., Han, E.K., Sgambato, A., Piazza, G.A., Delohery, T.M., Begemann, M., Weghorst, C.M., Kim, N.H., Pamukcu, R., Ahnen, D.J., Reed, J.C., Weinstein, I.B., and Holt, P.R., A K-ras oncogene increases resistance to sulindac-induced apoptosis in rat enterocytes. Gastroenterology 113, 1892–1900, 1997.
6. Arısu, D.H., Nd YAG lazerlerin Farklı Frekans ve Güçlerde Uygulanmasının İnsan Osteoblast Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. Diş Hastalıklar ve Tedavisi Programı Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bil.Enstitüsü, Ankara, 2004.
7. Arias, O.R., Marquez-Orozco, M.C., Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen, their effects on orthodontic tooth movement. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop., 130(3), 364-70, 2006.

8. Bagasra, O., Seshamman, T., Pamerantz, R.J., Polymerase chain reaction in situ, Intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes. J Immunological Methods, 158, 131-45, 1993.
9. Baplı İ., Alizarin (1,2 Dihidroksi Antrakinon)'in Asit Sabitlerinin Tayinini ve koordinasyon bileşiklerinin oluşum koşullarının incelenmesi. Kimya AD. Analitik Kimya Programı Programı Yüksek Lisans Tezi, Marmara Ün. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.
10. Baysal K., Kumbasar A., İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Uygulamalı Eğitim Kursu. Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, 2005.
11. Berridge, M.V., Tan, A.S., Characterization of the cellular reduction of MTT, subcellular localisation, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Archiv. Biochem. Biophys., 303, 474-82, 1993.
12. Berridge, M.V., Tan, A.S., Kathy, D.M., The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochemica, 4, 14-19, 1996.
13. Birden, E., Polimeraz Zincir Reaksiyonu Laboratuvar Teknikleri. Astıma alerji immünoloji, 4,2,, 92-94, 2006.
14. Brauner, A., Kaden, P., Human gingival fibroblast cultures for biological intra-oral material testing. Z. Stomatol., 86(8), 533-8., 1989.
15. Browne, R.M., The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials does it have a role? Int. Endod. J.; 21(2), 50-8, 1988.
16. Bumann, A., Carvalho, R.S., Schwarzer, C.L., Yen, E.H., Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. Eur. J. Orthod.;19,1,29-37, 1997.

17. Carvalho, R.S., Scottb, J.E., Yen, E.H., The effects of mechanical stimulation on the distribution of $\beta 1$ integrin and expression of $\beta 1$ -integrin mRNA in TE-85 human osteosarcoma cells. Arch Oral Biol., 40,3, 257-64, 1995.
18. Catanese, B., Lagana, A., Curini, L., Bioequivalence Study of Two Liquid Formulations of Benzydamine. Biopharm Drug Disp., 9, 113-118, 1988.
19. Chang, J.K., Li, C.J., Wu, S.C., Yeh, C.H., Chen, C.H., Fu, Y.C., Wang, G.J., Ho, M.L., Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells. Biochem. Pharmacol., 4,9, 1371-82, 2007.
20. Chang, J.K., Wu, S.C., Wang, G.J., Cho, M.H., Ho, M.L., Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cell proliferation and death in cultured epiphyseal-articular chondrocytes of fetal rats. Toxicology, 228, 11-123, 2006.
21. Chasseaud, L.F., Catanese, B., Pharmacokinetics of Benzydamine. Int. J. Tiss. Reac., 7, 195-204, 1985.
22. Chumbley, A.B., Tuncay, O.C., The effect of indomethacin (an aspirin-like drug) on the rate of orthodontic tooth movement. Am. J. Orthod., 89,4,312-4, 1986.
23. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. Ed, E.S., Dreenfield, 533-534, 1986.
24. Cooper, L.F., Haris, C.T., Bruder, S.P., Kowalski, R., Kadiyala, S., Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis, J Dent Res. 80,1,314-20. 2001.
25. Cortizo, A.M., Sedlinsky, C., McCarthy, A.D., Blanco, A., Schurman, L., Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblast in culture. European J. Pharmacology., 536, 38-46, 2006.

26. Costa, M.T., Lenza, M.A., Gosch, C.S., Costa, I., Ribeiro-Dias, F., In vitro evaluation of corrosion and cytotoxicity of orthodontic brackets. *J. Den. Res.*, 86,5,441-5, 2007.
27. Cseke, L.J., Kaufman, P.B., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine. Second Edition.*, CRC press., Boca Raton., 2004.
28. Cui, B.C., Cooper, L.F., Yang, X., Karsenty, G., Aukhil, I., Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor Cbfa1 by TAZ. *Molecular and Cellular Biology.*, 23,3, 1004–1013, 2003.
29. Dare, A., Hachisu, R., Yamaguchi, A., Yokose, S., Yoshiki, S., Okanol, T., Effects of Ionizing Radiation on Proliferation and Differentiation of Osteoblast-like Cells. *J. Dent. Res.*, 76,2, 658-664, 1997.
30. David, A., Lobner, D., In vitro cytotoxicity of orthodontic archwires in cortical cell cultures. *Eur. J. Orthod.*, 26,4,421-6, 2004.
31. Davidovitch, Z., Nicolay, O.F., Ngan, P.W., Shanfeld, J.L., Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am.*, 32,3, 411-35, 1988.
32. De Carlos, F., Cobo, J., Perillan, C., Garcia, M.A., Arguelles, J., Vijande, M., Costales, M., Orthodontic tooth movement after different coxib therapies. *Eur. J. Orthod.*, 29,6,596-9., 2007.
33. De Carlos, F., Cobo, J., Díaz-Esnal, B., Arguelles, J., Vijande, M., Costales, M., Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 129,3,402-406, 2006.
34. Delmas, P.D., Eastel, R., Garnero, M.J., The use of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporosis International.*, 11,18,, 2000.

35. Demirel, F., Cam İyonomer Simanların Biyolojik Uyumunun İki Hücre Kültürü Test Yöntemi İle Değerlendirilmesi., Gazi Üni., Diş Hek. Fak., Doktora Tezi. Ankara 1992.
36. Devecioğlu, D., Allojenik ve alloplastik greft materyallerinin periodontal ligament fibroblastları ve MC3T3-E1 hücrelerinin biyolojik aktivitelerine olan etkilerinin in vitro incelenmesi. Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Periodontoloji Programı Doktora Tezi, H.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1996.
37. Dhopatkar, A.A., Sloan, A.J., Rock, W.P., Cooper, P.R., A novel in vitro culture model to investigate the reaction of the dentine-pulp complex to orthodontic force. J. Orthod., 32, 122-32, 2005.
38. Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S., Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res., 19, 4008, 1991.
39. Doyle, A., Griffiths, J.B., Cell and tissue culture laboratory procedures in biotechnology. John Wiley & Sons Ltd., England, 1998.
40. Durmaz R., Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. (<http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/035.pdf>)
41. Elçi, A., Postmenapozal Kadınlarda Serum Total Osteokalsin Ve Gamma Karboksi Glutamat Kalıntısı Taşımayan Osteokalsin Oranı ile Kemik Mineral Dansitesi Ölçümünün Karşılaştırılması. T.C.Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2004.
42. Er, N., Okur, H., Araz, K., Fenitoin-Sodyumun Fibroblastik Aktivitesinin İnsan Dişeti Fibroblast Hücre Kültürü ile İncelenmesi. H.Ü. Diş Hek. Fak. Dergisi., 24,1, 24-29, 2000.
43. Erdoğan, G., Temel ve Klinik Endokrinoloji. Özyurt matbaacılık, 2.baskı, Ankara, 2005.

44. Espy, M.J., Smith, T.F., Dependence of Polymerase Chain Reaction Product Inactivation Protocols on Amplicon Length and Sequence composition. *J. of Clinical Microbiology.*, 2361-2365, 1993.
45. Etcheverrya, S.B., Barrioa, D.A., Cortizoa, A.M., Williams P.A.M., Three new vanadyl(IV) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs (Ibuprofen, Naproxen and Tolmetin). Bioactivity on osteoblast-like cells in culture *Journal of Inorganic Biochemistry.*, 94–100., 88, 2002.
46. Fang, H.M., Mei, Q., Xu, J.M., Ma, W.J., 5-aminosalicylic acid in combination with nimesulide inhibits proliferation of colon carcinoma cells in vitro. *World J. Gastroenterol.*, 28,13,20,2872-7, 2007.
47. Ferreira, S.H., Nakamura, M., De Abreu Castro, M.S., The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins.*, 16,1,31-37, 1978.
48. Franz-Odenaal, T.A., Hall B.K., Witten P.E., How Osteoblasts Become Osteocytes. *Dev. Dyn.*, 235,1, 176-190, 2006.
49. Frediani, B, Spreafico, A, Capperucci, C, Chellini, F, Gambera, D, Ferrata, P, Baldi, F, Fasletti, P, Santucci, A, Bocchi, L, Marcolongo, R., Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone.*, 35,4, 859-869, 2004.
50. Fujimori, A., Tsutsumi, M., Fukase, M., Fujita, T., Cyclooxygenase inhibitors enhance cell growth in an osteoblastic cell line MC3T3-E1., *J. Bone Miner. Res.*, 4,5,697-704, 1989.
51. Ge, Y., Chen, D., XIE, L., Zhang, R., Enhancing Effect of Daidzein on the Differentiation and Mineralization in Mouse Osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *The pharmaceutical society of Japan.*, 126,8, 651-656, 2006.

52. Gioka, C., Bourauel, C., Hiskia, A., Kletsas, D., Eliades, T., Eliades, G., Light-cured or chemically cured orthodontic adhesive resins? A selection based on the degree of cure, monomer leaching, and cytotoxicity., *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*,127,4,413-9; quiz 516, 2005.
53. Godin, L.M., Suzuki, S., Jacobs, C.R., Donahue, H.J., Donahue, S.W., Mechanically induced intracellular calcium waves in osteoblasts demonstrate calcium fingerprints in bone cell mechanotransduction. *Biomechan. Model Mechanobiol.*, 6, 391-398, 2007.
54. Goldberg, Y., Nassif, II, Pittas, A., Tsai, L.L., Dynlacht, B.D., Rigas, B., and Shiff, S.J., The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells, alterations in tumor suppressor and cellcycle-regulatory proteins. *Oncogene.*, 12,893–901, 1996.
55. Goppelt-Strübe, M., Röbbcke, K., Golombek, M., Resch, K., The effect of benzydamine on prostaglandin synthesis in macrophages. *Arzneimittelforschung.*, 37,5A,621-623,1987.
56. Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A., Prockop, D.J., An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture, comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.*, 1,329,1,77-84, 2004.
57. Gümüş, İ., Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında PCR Yöntemi İle Enterovirüslerin Araştırılması, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara, 2002
58. Hanif, R., Pittas, A., Feng, Y., Koutsos, M.I., Qiao, L., Staiano-Coico, L., Shiff, S.I., and Rigas, B., Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem. Pharmacol.*,2,237-245,1996.

59. Hanson, M., Lobner, D., In vitro neuronal cytotoxicity of latex and nonlatex orthodontic elastics. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.,126,1,65-70,2004.
60. Haspolat, K., Söker, M., Kemiğe Ait Biyokimyasal değerler ve onkoloji. Dicle Tıp Dergisi., Diyarbakır, 2002.
61. Helfrich, M.H., Ralston, S.H., Bone research protocols, Humana Press Inc., Totowa, 2003.
62. Hendolin, P.H., Markanen, A., Ylikoski, J., Wahlfors, J.J., Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions, J Clin Microbiol, 35, 2854-8, 1997.
63. Ho, M.L., Chang, J.K., Chuang, L.Y., Hsu, H.K., Wang, G.J., Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. Biochem Pharmacol.,58,983–990,1999.
64. Hou, Y., Guo, T., Wu, C., He, X., Zhao, M., Effect of shikonin on human breast cancer cells proliferation and apoptosis in vitro. Yakugaku Zasshi.,126,12,1383-1386, 2006.
65. <http://tr.wikipedia.org/wiki/G%C3%BCm%C3%BC%C5%9F>
66. http://vimed.s.ktu.edu.tr/syayar/public_html/dersnotlari/kemik.pdf
67. <http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1219/unite07.pdf>
68. <http://www.chem.missouri.edu/TannerGroup/research/gapdh/gapdh.html>
69. http://www.genetiklab.com/altsayfa.php?giris_ID=1&tablo=tbl_yontemler
70. <http://www.refgen.com/rt-pcr.asp>
71. İlbars, N.,Yeni nesil metal desteksiz seramiklerin ve yapıştırılmasında kullanılan rezin simanların biyoyumluluğunun değerlendirilmesi, Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Protetik Diş Tedavisi Programı Doktora Tezi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007

72. Kang, Y., Role of CDC2/Cdk1, a known RLIP76/RalBP1 interacting protein, in Human Chronic Myelogenous Leukemia (K-562). The University of Texas at Arlington, 2006.
73. Kapsar, D., Hedrich, C.M., Schmidt, C., Liedert, A., Claes, L.E., Ignatius, A.A., Diclofenac inhibits proliferation and matrix formation of osteoblast cells. *Unfallchirurg.*, 108,1,18, 20-4, 2005.
74. Kavrut, F., Periodontal sağlıklı, gingivitisli, kronik periodontitisli, osteoporozlu bireylerin diş eti oluşu sıvısı alkale fosfat ve osteokalsin değerlerinin karşılaştırılması. Periodontoloji AD. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2006.
75. Kayaalp, O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt- 2, 1026-1057, Feryal Matbaacılık San. Tic. Ltd., Ankara, 1998.
76. Kehoe, M.J., Cohen, S.M., Zarrinnia, K., Cowan, A., The effect of acetaminophen, ibuprofen, and misoprostol on prostaglandin E2 synthesis and the degree and rate of orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.*, 66,5,339-49, 1996.
77. Kehoe, M.J., Cohen, S.M., Zarrinnia, K., Cowan, A., The effect of acetaminophen, ibuprofen, and misoprostol on prostaglandin E2 synthesis and the degree and rate of orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.*, 66,5,339-49, 1996.
78. Keller, J., Bunger, C., Andreassen, T.T., Bak, B., Lucht, U., Bone repair inhibited by indomethacin. Effects on bone metabolism and strength of rabbit osteotomies. *Acta Orthop. Scand.*, 58,379-383, 1987.
79. Kellinsalmi, M., Parikka, V., Risteli, J., Hentunen, T., Hannu-Ville, L., Kalervo Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates osteoclast and osteoblast differentiation and favours adipocyte formation in vitro. *European Journal of Pharmacology.*, 102-110, 572, 2007.

80. Koller, M.R., Palsson, B.O., Masters, J.R.W., Human Cell Culture. Volume IV, Kluwer Academic Publishers, New York, 2002.
81. Kurachi, T., Nagao, H., Nagura, H., Enomoto, S., Effect of a titanium surface on bone marrow-derived osteoblastic cells in vitro, Arch Oral Biol., 42,6, 465-468, 1997.
82. Kyrkanides, S., O'Banion, M.K., Subtelny, J.D., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement, metalloproteinase activity and collagen synthesis by endothelial cells. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop., 118,2, 203-9, 2000.
83. Lapatki, B.G., Bartholomeyczik, J., Ruther, P., Jonas, I.E., Paul, O., Smart Bracket for Multi-dimensional Force and Moment Measurement. J. Dent. Res., 86,1, 73-78, 2007.
84. Liebisch, M., Spielmann, H., Currently available in vitro methods used in regulatory toxicology. Toxicol. Lett., 127, 2002.
85. Liu, L., Igarashi, K., Kanzaki, H., Chiba, M., Shinoda, H., Mitani, H., Clodronate inhibits PGE(2) production in compressed periodontal ligament cells. J. Dent. Res., 85,8, 757-760, 2006.
86. Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl., 4, 357-362, 1995.
87. Locci, P., Marinucci, L., Lilli, Belcastro, S., Staffolani, N., Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. J. Biomed. Mater. Res., 51, 561-568, 2000.
88. Lowenstam, H. A., On Biomineralization, Biomineralization Processes, Oxford University Press, Incorporated, 1989.
(<http://site.ebrary.com/lib/hacettepe/Doc?id=10087158&ppg=36>)

89. MacPherson, R.D., The Pharmacological Basis of Contemporary Pain Management . Pharm. Ther., 88, 163-185, 2000.
90. Marigo, M., Nouer, D.F., Genelhu, M.C., Malaquias, L.C., Pizziolo, V.R., Costa, A.S., Martins-Filho, O.A., Alves-Oliveira, L.F., Evaluation of immunologic profile in patients with nickel sensitivity due to use of fixed orthodontic appliances. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop., 124, 1, 46-52, 2003
91. Marzia, M., Sims, N.A., Voit, S., Migliaccio, S., Taranta, A., Bernardini, S., Faraggiana, T., Yoneda, T., Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. J. Cell Biol., 16, 151, 2, 311-320, 2000.
92. Matziolis, G., Rau, H.M., Klever, P., Erli, H.J., Paar, O., Modification of human osteoblasts by various analgesics. Unfallchirurg., 105, 6, 527-531, 2002.
93. Messer, R.L.W., Lockwood, P.E., Wataha, J.C., Lewis, J.B., Norris, S., Bouillaguet, S., In vitro cytotoxicity of traditional versus contemporary dental ceramics. J. Prosthet. Dent., 90, 452-458, 2003.
94. Mizuno, M., Kuboki, Y., Osteoblast-Related Gene Expression of Bone Marrow Cells During The Osteoblastic Differentiation Induced by Type I Collagen., J. Biochem., 129, 133-138., 2001.
95. Mod  er, T., Yucel-Lindberg, T., Benzydramine reduces prostaglandin production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor alpha. Acta Odontol. Scand., 57, 1, 40-45, 1999.
96. Moore, R.A., Tramer, M.R., Carroll, D., Wiffen, P.J., Quantitative Systematic Review of Topically Applied Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. B.M.J., 316, 333-338, 1998.

97. Morais, S., Sousa, J.P., Fernandes, M.H., Carvalho G.S., In vitro biomineralization by osteoblast-like cells I. Retardation of tissue mineralization by metal salts, *Biomaterials*, 19(1-3), 13-21, 1998.
98. Morgenstern, S., Kessler, G., Auerbach, J., Flor, R.V., Klein, B., An Automated p-Nitrophenylphosphate Serum Alkaline Phosphatase Procedure for the AutoAnalyzer. *Clinical Chemistry.*, Vol. II, No. 9, 1965.
99. Morris, T., Robertson, B., Gallagher, M., Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2933-2936, 1996.
100. Nettis, E., Di Paola, R., Napoli, G., Ferrannini A., Benzydamine, An Alternative Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug in Patients with Nimesulide-Induced Urticaria. *Allergy.*, 57, 442-445, 2002.
101. Ngan, P., Wilson, S., Shanfeld, J., Amini, H., The effect of ibuprofen on the level of discomfort in patients undergoing orthodontic treatment. *Am.J.Orthod. Dentofacial Orthop.*, 106, 1, 88-95, 1994.
102. Nilsson, O.S., Bauer, H.C., Brosjö, O., Tornkvist, H., Influence of indomethacin on induced heterotopic bone formation in rats. Importance of length of treatment and of age. *Clin. Orthop.*, 207, 239–245, 1986.
103. Ohbayashi, E., Matsushima, K., Hosoya, S., ağabeyko, Y., Yamazaki, M., Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J. Endod.*, 25, 1, 30-33, 1999.
104. Ommaty, R., Vademecum modern ilaç rehberi, Feryal matbaası, Ankara, 2008.
105. Özen, J., Sabit Protetik Restorasyon Materyallerinin Periodontal dokular Üzerine Olan Etkilerinin İmmünolojik Yönden İncelenmesi, Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Protetik Diş Tedavisi Programı Doktora Tezi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2001.

106. Özkan, C.K., Sürekli Etkili Bir Preparat Geliştirilmesi, Eczacılık Bilimleri Merkezi Yüksek Lisans Tezi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003.
107. Öztürk, S.S., Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, CRC press, Boca Raton, 2006.
108. Özyiğit, A., Deneysel Olarak Oluşturulan Defektlerde Titanyum Partikülleri ve Değişik Greft Materyallerinin Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Programı Doktora Tezi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
109. Picariello, L., Brandi, M.L., Formigli, L., Orlandini, S.Z., Dolara, P., Caderni, G., Raimondi, L., and Tonelli, F., Apoptosis induced by sulindac sulfide in epithelial and mesenchymal cells from human abdominal neoplasms. Eur. J. Pharmacol., 360,105–112, 1998.
110. Pıkdöken L., Periodontal Ceplere Uygulanan Klorheksidin ve Benzidamin Hidroklorür'ün Etkilerinin Klinik, Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Olarak İncelenmesi, Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Periodontoloji Programı Doktora Tezi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1997.
111. Rahman, M.A., Dhar, D.K., Masunaga, R., Yamanoi, A., Kohno, H., and Nagasue, N., Sulindac and exisulind exhibit a significant antiproliferative effect and induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. Cancer Res. 60,2085–2089., 2000.
112. Rainsford, K.D., Profile and Mechanisms of Gastrointestinal and Other Side Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs(NSAIDs). Am J Med, 107, 27-35, 1999.

113. Redlich, M., Roos, H., Reichenberg, E., Zaks, B., the effects of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and β -actin in cultured human periodontal ligament fibroblast. J. Periodont Res. 39;27-32; 2004.
114. Ren, Y., Maltha, J.C., Kuijpers, A.N., The rat a model for orthodontic tooth-movement a critical review and a proposed solution. European J. Of orthodontics., 26, 483-490, 2004.
115. Reue, K., mRNA quantitation techniques, considerations for experimental design and application. J. Nutr., 128, 11, 2038-44, 1998.
116. Rhee, S.H., Hwang, M.H., Si, H.J., Choi, J.Y., Biological activities of osteoblasts on poly(methyl methacrylate)/silica hybrid containing calcium salt. Biomaterials., 24, 6, 901-906, 2003.
117. Roche, J.J., Cisneros, G.J., Acs, G., The effect of acetaminophen on tooth movement in rabbits. Angle Orthod., 67, 3, 231-236, 1997.
118. Rose, C.E., Bumann, J., Jonas, I.E., Contribution to the Biological Assessment of Orthodontic Acrylic Materials. J. Orofac. Orthop., 61, 246-257, 2000.
119. Runti, C., Baiocchi, L., The Chemistry of Benzydamine. Int J Tiss Reac, 7, 175-186, 1985
120. Saito, M., Saito, S., Ngan, P.W., Shanfeld, J., Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. AM. J. Orthod. Dentofac. Orthop., 99, 226-40, 1991.
121. Sandy, J.R., Haris, M., Prostaglandins and tooth movement. Eur. J. Orthod., 6, 3, 175-82, 1984.
122. Sandy, J.R., Tooth eruption and orthodontic movement. Br. Dent. J., 22, 172, 4, 141-9, 1992.

123. Sarı, E., Nimesulid ve Asetilsalisilik Asidin Ortodontik Diş Hareketleri Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması, Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Ortodonti Programı Doktora Tezi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1999
124. Sarı, E., Ölmez, H., Gürton, A.U., Comparison of some effects of acetylsalicylic acid and rofecoxib during orthodontic tooth movement. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.,125,3,310-315, 2004.
125. Schendel, K.U., Lenhardt, M., Fusenig, N.E., Komposch, G., The testing of the toxicity of the plastics used in orthodontics. Fortschr Kieferorthop.,53,5,263-272,1992 .
126. Schiller, P.C., D'Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B.A., Howard, G.A., Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture.Bone.,28,4,362-369, 2001.
127. Segre, G., Hammarstrom, S., Aspects of the mechanism of action of benzydamine,Int. J. Tissue React.,7,3, 187-193, 1985.
128. Seibel, M.J., Woitge, H.V., Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. J. Clin. Endocrinol Metab.,81,9, 3289-3294, 1996.
129. Sell, S., Teschner, M., Gaissmaier, C., Martini, F., Weidner, S.A., Küsswetter, W., Effect of diclofenac on human osteoblasts and their stromal precursors in vitro in relation to arthroplasty. Z. Rheumatol., 58,1,13-20, 1999.
130. Shakespeare, V., Shakespeare, P.G., Evans, B.T., Effects of proprietary oral rinses containing chlorhexidine, hexetidine and benzydamine on the proliferation of human buccal epithelial cells in culture. Arcs. Oral. Biol., 33,12, 881-885, 1998.

131. Shapiro, I. M., Indian Hedgehog and Retinoids Orchestrate Multiple Growth Plate Functions in Developing Long Bones, The Growth Plate as a Highly Interactive Structure The Growth Plate. NLD, IOS Press, Amsterdam, 2002.
(<http://site.ebrary.com/lib/hacettepe/Doc?id=10116445&ppg=12>)
132. Shellhart, W.C., Oesterle, L.J., Cailleteau, J.G., Effective orthodontics, achieving objectives avoiding misadventures. J. Am. Dent. Assoc., 128, 97-104, 1997.
133. Shiff, S.J., Koutsos, M.I., Qiao, L., and Rigas, B., Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells, effects on cell cycle and apoptosis. Exp. Cell Res., 222, 179–188, 1996.
134. Sipahi, C., Özen, J., Ural, A.U., Dalkız, M., Beydemir B., Beş farklı protez kaide materyalinin gingival fibroblastlar üzerine olan etkilerinin incelenmesi. Gülhane Tıp Dergisi., 47, 275-278, 2005.
135. Srivastava, S., Screening of in vitro cytotoxicity by the adhesive film test. Biomaterials., 11, 133-137, 1990.
136. Tan, Y.F., Hong, S.F., Wang, X.L., Lu, J., Wang, H., Zhang, X.D., Regulation of bone-related genes expression by bone-like apatite in MC3T3-E1 cells. J. Mater Sci. Mater. Med., 18, 11, 2237-41, 2007.
137. Tang, A.T.H., Liu, Y., Björkman, L., Ekstrand, J., In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblast. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop., 116, 132-8, 1999.
138. The Extra Pharmacopeia Martindale. 33 th. Edition., The Pharmac. Pres, London, 2003.

139. Tomakidi, P., Koke, U., Kern, R., Erdinger, L., Kruger, H., Kohl, A., Komposch, G., Assessment of acute cyto- and genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic materials using monolayer cultures of immortalized human gingival keratinocytes. J. Orofac. Orthop.,61,1,2-19,2000.
140. Tomas, H., Carvalho, G.S., Fernandes, M.H., Freire, A.P., Abrantes, L.M., The use of rat, rabbit or human bone marrow derived cells for cytocompatibility evaluation of metallic elements. J. Of Materials science, Materials in Medicine.,8, 233-238, 1997.
141. Tomazzoli, L., Bonora, A., Luparini, M.R., Durando, L., Ciarniello, M.G., Cioli, V., Bonomi, L., Effects of benzydamine eye drops on the rabbit's eye reaction to surgical, physical, and chemical stimuli. J. Ocul. Pharmacol.,5,1,71-80,1989.
142. Topal, Ş.R., Hücre kültür teknikleri-II Uygulamalar, Cemturan Ofset Matbaası, İstanbul, 2004.
143. Tubitak Bilim ve Teknik Dergisi İnt.Sit. (http://www.biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz/index.php?kategori_id=2&soru_id=4949)
144. Ulukaradağ, G., Tavşan Kalvaryumunda Mesenşimal Kök Hücre Transplantasyonu İle Yönlendirilmiş Kemik Ogmentasyonunda Elde Edilen Yeni Kemiğin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi, Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Programı Doktora Tezi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
145. Väänänen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., Hallen, J.M., The cell biology of osteoclast function. J. Cell Sci., 113, 377-381, 2000.
146. Vande, Vannet, B., Mohebbian, N., Wehrbein, H., Toxicity of used orthodontic archwires assessed by three-dimensional cell culture.Eur. J. Orthod.,28,5,426-32,2006.

147. Walker, JB, Buring, SM., NSAID impairment of orthodontic tooth movement. *Ann Pharmacother.*, 35,1, 113-115, 2001.
148. Weeks, J.L., Zoraghi, R., Beasley, A., Sekhar, K.R., Francis, S.H., Corbin, J.D., High biochemical selectivity of tadalafil, sildenafil and vardenafil for human phosphodiesterase 5A1 (PDE5) over PDE11A4 suggests the absence of PDE11A4 cross-reaction in patients. *Int. J. Impot. Res.*,17,1,5-9,2005.
149. Wong, A., Reynolds, E.C., West, V.C., The effect of acetylsalicylic acid on orthodontic tooth movement in the guinea pig. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*,102,4,360-365, 1992.
150. Woolf, A. D., Bone and Joint Futures, BMJ Publishing Group, 2002. (<http://site.ebrary.com/lib/hacettepe/Doc?id=10033007&ppg=3>)
151. Yamaguchi, M., Kojima, T., Kanekawa, M., Aihara, N., Neuropeptides stimulate production of interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in human dental pulp cells. *Inflamm.res.*,53,199-204,2004.
152. Yamamoto, Y., Ohsaki, Y., Goto, T., Nakasima, A., Lijima, T., Effects of Static Magnetic Fields on Bone Formation in Rat Osteoblast Cultures. *J. Dent. Res.*, 82,12,962-966, 2003.
153. Yamasaki, K., Miura, F., Suda, T., Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J Dent Res.*,59,10,1635-42,1980.
154. Yildirim, S., Yapar, M., Sermet, U., Sener, K., Kubar, A., The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*,105,1,113-20, 2008.
155. Yoon, K., Buenaga, R., Rodan, G.A., Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*,148, 1129-1136,1987.

156. You, J., Reilly, G.C., Zhen, X., Yellowley, E.C., Osteopontin Gene Regulation by Oscillatory Fluid Flow via Intracellular Calcium Mobilization and Activation of Mitogen-activated Protein Kinase in MC3T3–E1 Osteoblasts. 276,16, 13365–13371, 2001.
157. Zhang, G., Tu, C., Zhou, G., Zheng, W., Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. Leuk. Res., 24,385–392,2000.
158. Zhang, W.G., Wang, L.Z., Liu, Z., The effect of fluoride on bone extracellular matrix proteins expression in rat calvarial osteoblast in culture. Shanghai Kou Qiang Yi Xue.,7,2,94-8,1998.
159. Zhao, Y., Zou, B., Shi, Z., Wu, Q, Chen, G., The effect of 3-hydroxybutyrate on the in vitro differentiation of murine osteoblast MC3T-E1 and in vivo bone formation in ovariectomized rats. Biomaterials, 28, 3063-3073, 2007.
160. Zhu, X., Beuerman, R.W., Chan-Park, M.B., Cheng, Z., Ang, L.P., Tan, D.T., Enhancement of the mechanical and biological properties of a biomembrane for tissue engineering the ocular surface. Ann Acad. Med. Singapore.,35,3,210-214, 2006.