

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**KEMİK GREFT MATERYALİN VE OKSİDATİF STRESİN
İN VİTRO MODELDE FİBROBLASTLAR ÜZERİNDEKİ
ETKİSİ VE RESVERATROLÜN KORUYUCU ROLÜ**

BELİSA KALECİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. MERAL KOYUTÜRK**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora öğrencisi Belisa KALECI tarafından Prof.Dr.Meral KOYUTÜRK'ün danışmanlığında hazırlanan “Kemik Greft Materyalin ve Oksidatif Stresin İn Vitro Modelde Fibroblastlar Üzerindeki Etkisi ve Resveratrolün Koruyucu Rolü” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 05/07/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Meral KOYUTÜRK (Anabilim Dalı Başkanı)
İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji AD.

**Jüri-Danışman**

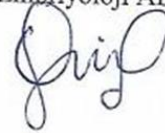
Prof.Dr.İsmail SEÇKİN
İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji AD.

**Jüri**

Prof.Dr.Şule ÇETİNEL
Marmara Üniv. Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji AD.

**Jüri**

Prof.Dr.E.Elif Güzel MEYDANLI
İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji AD.

**Jüri**

Prof.Dr.Canan HÜRDAĞ
İstanbul Bilim Üniv.Tıp Fak.
Histoloji ve Embriyoloji AD.



BEYAN

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


BELİSA KALECİ



İTHAF

Her zaman ve her durumda yanımda olan Aileme, Eşime ve özellikle motivasyonumu artıran Oğlum Jeart'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora tez eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında akademik ve manevi desteğini esirgemeyen, bilimsel katkı ve önerileri ile bana yol gösteren, çalışmamı yürütme ve sonuçlandırma konusunda olumlu eleştirileri ile özellikle hücre kültüründeki ilk adımları öğreterek akademik hayatım için yeni bir yol çizmemi sağlayan ve her türlü problemimde yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarımız; Sayın Prof. Dr. İsmail SEÇKİN'e, Sayın Prof. Dr. E. Elif GÜZEL MEYDANLI'ya ve Sayın. Doç. Dr. Gözde ERKANLI ŞENTÜRK'e doktora eğitimim ve tezimin başlangıç aşamasından itibaren gösterdikleri bilimsel katkı, öneri, ilgi ve sabırları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. Sibel Özyazgan'a tezimin başlangıç aşamasından itibaren gösterdiği bilimsel katkı, öneri ve ilgi için özel teşekkürlerimi sunarım.

Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. Gamze KÖSE'ye 3T3 hücre hattını hediye ettiği için özel teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na ve Bio. Msc. Ebru Karabulut Akyön'e elektron mikroskopunu kullanma imkanı sağladıkları için özel teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hocaları Sayın Doç. Dr. Gamze TANRIVERDİ'ye, Sayın Doç. Dr. Pelin S. Ertürküner Ergüven'e ve Sayın Uzm. Dr. Emine MAMAL'a teknik ve manevi yardımları, anlayış ve her türlü destekleri için özel teşekkürlerimi sunarım.

Manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen anabilim dalı asistanları Dok. Öğr. Sibel DEMİRCİ DELİPİNAR'a, Araş. Gör. Halil İbrahim SAYGI'ya, Araş. Gör. Tuba EKİZ YILMAZ'a, Araş. Gör. Serbay ÖZKAN'a, Araş. Gör. Başak İŞILDAR'a ve Dok. Öğr. Zehra SEZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca manevi desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Msc. Mediha ESER'e, elektron mikroskobu laboratuvarındaki yardımları için Sayın Azize GÜMÜŞYAZICI'ya ve Sayın Ercüment BOZTAŞ'a ve tüm anabilim dalı personeline teşekkürlerimi sunarım.

Doktoram boyunca manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen yol arkadaşlarım Dr. Burcu BİLTEKİN'e ve Dr. Aslı GÜMÜŞEL EMİNCİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, varlıklarını ve desteklerini her koşulda hissettiğim, bana tüm eğitim hayatım boyunca her imkânı sunan sevgili anneme, babama, ağabeyime, hayat arkadaşım Ermal Kaleci'ye ve özellikle hayatıma renk ve anlam katan oğlum Jeart Kaleci'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21032

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XVİİ
ABSTRACT.....	XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemik Greftleri	4
2.1.1. İdeal Kemik Greft Materyali	5
2.1.2. Greft Sınıflandırması	7
2.1.3. Ototreftler	7
2.1.4. Allogreftler	8
2.1.5. Sentetik Kemik Greftleri	9
2.1.6. Ksenogreftler	10
2.1.6.1. Ti-oss® Greft	11
2.2. Oksidatif Stres	13
2.2.1. Serbest Radikaller.....	15
2.3. Resveratrol	17
2.3.1. Resveratrolün Yapısı	18
2.3.2. Resveratrolün Terapötik Kullanımı	19
2.3.3. Resveratrolün Antioksidan Aktivitesi	20
2.3.4. Resveratrolün Etki Mekanizması	20
2.4. Oral Mukozanın Yapısı	21
2.4.1. Oral Mukozada Yaşla İlgili Değişikler.....	24
2.4.2. Maksiller Sinüs ve Maksiller Sinüsün Mukozası	24

2.4.3.	Oral Kavitenin Bağ Dokusu	26
2.4.3.1.	Periyodontal Ligament.....	27
2.4.3.2.	Oral Fibroblastlar	29
2.5.	Kolajen	29
2.5.1.	Kolajenin Yapısı	29
2.5.2.	Kolajen Fibrillerinin Biyosentezi	30
2.5.3.	Kolajen Fibrillerinin Parçalanması.....	31
2.6.	Yara İyileşmesi.....	31
2.6.1.	Yara Kavramı	31
2.6.2.	İnflamasyon	34
2.6.3.	Proliferatif Faz.....	35
2.6.4.	Fibroblastlar ve Kolajen Sentezi	35
2.6.5.	Reepitelizasyon.....	35
2.6.6.	Anjiyogenez.....	36
2.6.7.	Matürasyon Aşaması	36
2.7.	3T3 Swiss Albino Hücre Soyu ve Üç boyutlu Sferoit Kültürü	37
2.7.1.	3T3 Swiss Albino Hücre Soyu	37
2.7.2.	Üç Boyutlu Sferoit Kültürü	38
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1.	Gereçler	40
3.1.1.	Alet ve Teçizatlar	40
3.1.2.	Cihazlar.....	41
3.1.3.	Kullanılan Kimyasallar.....	42
3.2.	Yöntemler.....	43
3.2.1.	Hücre Kültürü Yöntemi	43
3.2.1.1.	Pasajlama Yöntemi	44
3.2.1.2.	Hücre Dondurma Yöntemi.....	44
3.2.2.	Doz ve Zaman Belirleme Deneyleri	44
3.2.2.1.	H ₂ O ₂ Doz ve Zaman Belirleme Deneyleri	44
3.2.2.2.	Resveratrol Doz ve Zaman Belirleme Deneyleri	45
3.2.2.3.	Greft Materyal Deneyleri	46
3.2.3.	İmmünositokimya Yöntemleri.....	46
3.2.4.	Popülasyon İklenme Zaman (PDT) Hesaplamaları.....	48

3.2.5.	RT-PCR (Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	48
3.2.5.1.	RNA İzolasyon Yöntemi	48
3.2.5.2.	cDNA Sentezi	49
3.2.5.3.	cDNA Reaksiyonu	50
3.2.5.4.	RT-PCR Reaksiyonu.....	50
3.2.6.	Oksidatif Stres Değerlendirme Tekniği	51
3.2.7.	Hücre Migrasyon Test Yöntemi	52
3.2.8.	Elektron Mikroskop Analizi	53
3.2.8.1.	Sferoit Oluşumu	53
3.2.9.	İstatistiksel Değerlendirmeler	55
4.	BULGULAR.....	56
4.1.	Doz Belirleme Deneylerinin Bulguları	56
4.1.1.	H ₂ O ₂ Bulguları	56
4.1.2.	Kemik Greft Bulguları	58
4.1.3.	Kemik Greft Gruplarında BrdU İmmünoaktivitesi.....	60
4.1.4.	Kemik Greft için Oksidatif Stres Bulguları	62
4.1.5.	Resveratrol Bulguları	64
4.1.6.	Resveratrol Gruplarında BrdU İmmünoaktivitesi.....	66
4.1.7.	Resveratrol için Oksidatif Stres Bulguları	69
4.2.	Final Deney Gruplarına Ait Bulgular	72
4.2.1.	PDT Bulguları	72
4.2.2.	BrdU İmmünoaktivitesi	74
4.2.3.	Oksidatif Stres Bulguları.....	77
4.2.4.	Migrasyon Bulguları	80
4.2.5.	RT-PCR Bulguları.....	83
4.2.6.	İnvert Mikroskop Bulguları	84
4.2.7.	Transmisyon Elektron Mikroskop Bulguları	86
5.	TARTIŞMA	103
	KAYNAKLAR	120
	İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	141
	ÖZGEÇMİŞ	142

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2- 1: İnsan ve sığır kemiği içeriklerinin karşılaştırılması	11
Tablo 3- 1: cDNA sentez işlemi için örnek içerikleri.....	50
Tablo 3- 2: Real Time PCR işlemi için örnek içerikleri.....	51
Tablo 4- 1: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda H ₂ O ₂ (10µM, 25µM, 50µM, 100µM, 250 µM ve 500µM) gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları.....	57
Tablo 4- 2: 3T3 hücrelerinin farklı oranlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4 mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan grupların PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları.....	59
Tablo 4- 3: Farklı dozlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan gruplarda 3T3 hücrelerinin BrdU pozitif immünoreaktivite (%) sonuçları. .	60
Tablo 4- 4: 3T3 hücrelerinin farklı oranlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan gruplarında oksidatif stres immünoreaktivite (%) sonuçları.	62
Tablo 4- 5: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H ₂ O ₂ uygulanan gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları.....	65
Tablo 4- 6: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H ₂ O ₂ uygulanan gruplarında BrdU immünoreaktivite (%) sonuçları.	67
Tablo 4- 7: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H ₂ O ₂ uygulanan gruplarında ROT immünoreaktivite (%) sonuçları.....	70
Tablo 4- 8: 500µM H ₂ O ₂ , 1µM resveratrol (R) ve 1mg/ml Ti-oss® grefti (G) uygulanan final deney gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları.....	73
Tablo 4- 9: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında BrdU proliferasyon (%) sonuçları	74
Tablo 4- 10: Final deney gruplarında ROT immünoreaktivite (%) sonuçları.	77
Tablo 4- 11: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında migrasyon (µm) sonuçları	80
Tablo 4- 12: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında COL1A2 mRNA RT-PCR sonuçları (2 ^{-ΔΔCt})	83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2- 1: Greftleme modelinin komşu dokularla ilişkisini gösteren şema	6
Şekil 2- 2: Ti-oss® por yapısı	12
Şekil 2- 3: Oksidatif stres oluşum mekanizması	13
Şekil 2- 4: (A) trans-resveratrol; (B) cis-resveratrol.....	19
Şekil 2- 5: Keratinleşmemiş çok katlı yassı epitel, lamina propriya ve submukoza	23
Şekil 2- 6: Oral mukoza ve oral mukoperiyosteumun tabakaları	27
Şekil 2- 7: Yara iyileşmesi evreleri	33
Şekil 3- 1: 3T3 hücre sferoitleri.....	53
Şekil 4- 1: 3T3 hücrelerinin A, A1) kontrol grubunda ve B, B1) belirlenen 500 µM dozunda H ₂ O ₂ grubunda 24 ve 48 saatlik invert mikroskop fotomikrografları, X10.	57
Şekil 4- 2: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda H ₂ O ₂ (10µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM ve 500µM) gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları grafiği.....	58
Şekil 4- 3: Farklı oranlarda greft (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml ve 8 mg/ml G) uygulanan gruplarda 3T3 hücrelerinin PDT (%) sonuçları grafiği.....	59
Şekil 4- 4: Farklı oranlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan 3T3 hücre deney gruplarında BrdU immünoreaktivite (%) sonuçları.	60
Şekil 4- 5: Farklı oranlarda greft uygulanan 3T3 hücre gruplarında, kırmızı renk reaksiyonu veren BrdU pozitif hücre fotomikrografları	61
Şekil 4- 6: 3T3 hücrelerinin farklı oranlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan gruplarında oksidatif stres reaktivitesi (%)......	62
Şekil 4- 7: Farklı oranlarda greft A: Kontrol, B: 0,5mg/ml, C: 1mg/ml, D: 2mg/ml, E: 4mg/ml ve F: 8mg/ml G uygulanan deney gruplarında oksidatif strese sahip hücreler floresan mikroskopta ROT oksidasyonu ile parlak yeşil reaktivite göstermektedir, X20.	63
Şekil 4- 8: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H ₂ O ₂ gruplarında PDT (%) sonuçları grafiği.	65
Şekil 4- 9: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5 µM ve 10µM R) ve 500µM H ₂ O ₂ uygulanan gruplarında BrdU immünoreaktivitesi.....	67

Şekil 4- 10: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H ₂ O ₂ uygulanan gruplarında BrdU immünoreaktivitesi gösteren hücre nükleusları kırmızı renkte boyanmış olarak izlenmekte.	68
Şekil 4- 11: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H ₂ O ₂ uygulanan gruplarında ROT reaktivitesi (%).	70
Şekil 4- 12: 3T3 hücrelerinin A: Kontrol, B: 500µM H ₂ O ₂ farklı dozlarda resveratrol, C: 1µM R, D: 5µM R, E: 10µM R, F: 500µM H ₂ O ₂ +1µM R, G: 500µM H ₂ O ₂ +5µM R, H: 500µM H ₂ O ₂ +10µM R gruplarında ROT reaktivite görüntüleri, X20.	71
Şekil 4- 13: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) grafiği.	73
Şekil 4- 14: Final deney gruplarına ait BrdU proliferasyon (%) indeks grafiği.	75
Şekil 4- 15: 3T3 hücrelerinin 500µM H ₂ O ₂ , 1mg/ml greft ve 1µM resveratrol dozlarında BrdU immünoreaktivite işaretlenmeleri, X20.	76
Şekil 4- 16: Final deney gruplarında 3T3 hücrelerinin ROT reaktivitesi (%) grafiği. ...	78
Şekil 4- 17: 3T3 hücrelerinin 500µM H ₂ O ₂ , 1mg/ml greft ve 1µM resveratrol dozlarında floresan mikroskopta ROT reaktivitesi gösteren görüntüleri, X20.	79
Şekil 4- 18: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında migrasyon (µm) grafiği.	81
Şekil 4- 19: 3T3 hücrelerinin 500µM H ₂ O ₂ , 1mg/ml G ve 1µM resveratrol dozlarında invert mikroskopta 0. saat (T0) ve 24. saat (T24) migrasyon ölçümleri gösteren görüntüleri X10.	82
Şekil 4- 20: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında COL1A2 mRNA ekspresyon (2 ^{-ΔΔCt}) grafiği.	83
Şekil 4- 21: 3T3 hücrelerinden elde edilen sferoitler. 500µM H ₂ O ₂ , 1mg/ml G ve 1µM resveratrol dozlarında invert mikroskop görüntüleri X100.	85
Şekil 4- 22: Kontrol grubu sferoitlerini oluşturan 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000, küçük resim: X60 000.	86
Şekil 4- 23: Kontrol grubu TEM görüntüsü, X30 000.	87
Şekil 4- 24: Kontrol grubu TEM görüntüsü, X25 000.	87
Şekil 4- 25: H ₂ O ₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X12 000.	89
Şekil 4- 26: H ₂ O ₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X5 000.	88
Şekil 4- 27: H ₂ O ₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X12 000, küçük resim: X25000.	89

Şekil 4- 28: H ₂ O ₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X25 000.	90
Şekil 4- 29: H ₂ O ₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X15 000.	90
Şekil 4- 30: G grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X7500, küçük resim: X12 000.....	91
Şekil 4- 31: Greft grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X12 000, küçük resim: X25000.....	92
Şekil 4- 32: Greft grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X6000, küçük resim: X40 000.....	92
Şekil 4- 33: Resveratrol grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X5000, küçük resim: X10 000.....	93
Şekil 4- 34: Resveratrol grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X10 000.....	94
Şekil 4- 35: Resveratrol grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X20 000.....	94
Şekil 4- 36: G+R grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000, küçük resim: X20 000.....	95
Şekil 4- 37: G+R grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X10 000..	96
Şekil 4- 38: G+R grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X10 000, küçük resim: X20 000.....	96
Şekil 4- 39: H ₂ O ₂ +Greft grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X5000, küçük resim: X15 000.....	97
Şekil 4- 40: H ₂ O ₂ +Greft grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X25 000.....	98
Şekil 4- 41: H ₂ O ₂ +Greft grubu 3T3 hücrelerinin TEM görüntüsü, X10 000.....	98
Şekil 4- 42: H ₂ O ₂ +Res grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X7500, küçük resim: X40 000.....	99
Şekil 4- 43: H ₂ O ₂ +RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X7500, küçük resim: X40 000.....	100
Şekil 4- 44: H ₂ O ₂ +RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X40 000.....	100
Şekil 4- 45: H ₂ O ₂ +Greft+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000, küçük resim: X60 000.....	101

- Şekil 4- 46: H_2O_2 +Graft+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000, küçük resim: X20 000. 102
- Şekil 4- 47: H_2O_2 +Graft+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000. 102



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- 2D:** İki Boyutlu
- 2-ME:** 2-Merkaptaetanol
- 3D:** Üç Boyutlu
- AMPK:** Adenozin Monofosfat-Aktive Protein Kinaz
- BrdU:** Bromodeoksiuridin
- CAT:** Katalaz
- COL:** Kolajen
- COX:** Siklooksijenaz
- DFDBA:** Demineralize Taze Dehidrate Kemik Allogrefti (Demineralized Fresh Dehydrated Bone Allograft)
- DM:** Diyabet Mellitus (Diabetes Mellitus)
- DMEM F12:** Dulbeco'nun Modifiye Edilmiş Eagle F12 medyumunu
- DMSO:** Dimetil Sülfoksit
- ECM:** Ekstraselüler Matriks
- EGF:** Epidermal Büyüme Faktörü
- FDBA:** Taze Dehidrate Kemik Allogrefti (Fresh Dehydrated Bone Allograft)
- FFB:** Taze Dondurulmuş Kemik (Fresh Frozen Bone)
- FGF:** Fibroblast Büyüme Faktörü
- G:** Ti-oss® Greft
- GER:** Granüllü Endoplazmik Retikulum
- GF:** Gingival Fibroblastlar
- GSH-Px:** Glutasyon Peroksidaz
- H₂O₂:** Hidrojen Peroksit
- HA:** Hidroksiapatit
- HC:** Hepatit C virüsü
- HGF:** İnsan Gingival Fibroblastları
- IFN:** İnterferon
- IgG:** İmmünoglobülin G
- IL:** İnterlökin
- IL-1:** İnterlökin-1
- LOX:** 5-lipooksijenaz

- KGF:** Keratinosit Büyüme Faktörü
- LPS:** Lipopolisakkaritler
- MAPK:** Mitojen ile Aktive Protein Kinaz
- NF- κ B:** Nuklear Faktör κ B
- NO:** Nitrik Oksit
- OS:** Oksidatif Stres
- PDGF:** Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
- PDLF:** Periyodontal Ligament Fibroblastları
- PDT:** Popülasyon İkenme Zamanı
- PI3K:** Fosfatidilinositol 3-kinaz
- PKC:** Protein Kinaz C
- PKD:** Protein Kinaz D
- R:** Resveratrol (Tablo ve şekillerde RES'in kısaltması)
- RES:** Resveratrol
- ROT:** Reaktif Oksijen Türevleri
- RT-PCR:** Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction)
- SOD:** Süperoksit Dismutaz
- TGF:** Dönüştürücü Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
- TEM:** Transmisyon Elektron Mikroskobu
- TNF:** Tümör Nekroz Faktörü (Tumor Necrosis Factor)
- mTOR:** Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi (Mammalian Target of Rapamycin)
- UNG:** Urasil-N-Glikozilaz
- VEGF:** Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Kaleci. Kemik Greft Materyalin ve Oksidatif Stresin İn Vitro Modelde Fibroblastlar Üzerindeki Etkisi ve Resveratrolün Koruyucu Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.

Yeni kemik oluşumunu desteklemek için özellikle diş hekimliğinde, ortopedi ve rekonstrüktif cerrahide kemik grefti çok tercih edilen bir materyaldir. Ti-oss® greft- (G) son yıllarda kullanılmaya başlanmış bir ksenogrefttir. İn-vitro iyileşme modelinde G ve ortamdaki oksidatif stresin-(OS), 3T3 fibroblast hücreleri üzerindeki etkisinin ve resveratrolün-(RES) potansiyel koruyucu rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. G, H₂O₂, ve RES için doz ve zaman belirleme deneyleri yapıldı. Proliferasyon değerlendirilmesi popülasyon katlanma zamanı-(PDT) ve bromodeoksiuridin-(BrdU) işaretlemesiyle yapıldı. OS seviyesi floresan işaretlemeyle, Image-J programında değerlendirildi. Denemeler sonucunda 1mg/ml G, 500µM H₂O₂ ve 1µM RES dozlarıyla deney grupları oluşturuldu, 48 saat sürelerde PDT, BrdU ve OS aktiviteleri değerlendirildi. H₂O₂ ile inkübasyon sonucunda PDT indekslerinin yükseldiği görüldü, RES'le kombine edilince azalmalar kaydedildi. BrdU immünoreaktivitesi 1µM-RES ve 1mg/ml-G gruplarında en yüksek orandaydı. H₂O₂ gruplarında proliferasyon düşüşü izlendi ancak RES uygulamasıyla dengelendiği gösterildi. G, RES ve G+RES gruplarında herhangi bir OS artışına rastlanmadı üstelik RES'in OS düzeylerini azalttığı görüldü. Ayrıca deney gruplarında RT-PCR ile kolajenin COL1A2 tipinin ekspresyonu ve hücre migrasyonu (24saat) incelendi. En yüksek COL1A2 ekspresyonu H₂O₂+G+RES grubunda görüldü. H₂O₂ grubu migrasyon açısından karşılaştırıldığında, H₂O₂ G dışındaki tüm grupların hareketleri anlamlı derecede yüksek bulundu. 3T3-hücrelerinden elde edilen sferoitler transmisyon elektron mikroskopunda-TEM ultrastrüktürel olarak incelendi. G grubunda normal strüktüre sahip hücreler izlenirken, H₂O₂ uygulanan hücrelerde hasar tespit edildi, RES uygulamasıyla H₂O₂ tarafından oluşturulan ultrastrüktürel değişikliklerde düzelmeler izlendi. Ti-oss® greft materyalin fibroblastlar ile biyouyumlu olduğu, OS'te RES ile kombine uygulanmasının OS'i azalttığı, proliferasyon, migrasyon ve kolajen sentezini ise artırarak iyileşme sonuçlarını olumlu yönde etkilediği sonuçlarına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kemik grefti, Oksidatif stres, Resveratrol, Fibroblast, İn-Vitro

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21032

ABSTRACT

Kaleci B. Effects of Bone Graft Material and Oxidative Stress on in vitro Model of Fibroblasts and Protective Role of Resveratrol. Istanbul University Institute of Health Science, Department of Histolog and Embryology. PhD Thesis. Istanbul. 2018.

Bone grafts are preferable materials in dentistry, orthopedics and reconstructive surgery to support new bone formation. Ti-oss®-graft-(G) as xenograft has been used in recent years. We aimed to investigate the effects of G and oxidative stress-(OS) on 3T3-fibroblasts and potential protective role of resveratrol-(RES) in an in-vitro healing model. Dosage and time assays were performed for G, H₂O₂ and RES. Proliferation was assessed by population doubling time-(PDT) and bromodeoxyuridine-(BrdU) staining. OS levels was evaluated by fluorescence staining and calculated in Image-J program. Experimental groups were established as 1mg/ml-G, 500µM-H₂O₂ and 1µM-RES doses. After 48-hour application, PDT, BrdU and OS activities were determined. PDT index increased in H₂O₂ incubation and decreased whith RES combination. The highest levels of BrdU-immunoreactivity were observed in 1µM-RES and 1mg/ml-G groups. H₂O₂ weakened proliferation index were stabilized whith RES application. There was no increase in OS levels of any groups of G, RES and G+RES combination. RES application decreased OS levels. In addition, the expression of COL1A2-collagen, was evaluated by RT-PCR and 24 hour-cell migration was calculated in experimental groups. H₂O₂+G+RES group indicated the highest COL1A2 expression. All groups showed good migration quality except H₂O₂ and H₂O₂+G groups. Spheroids of all experimental groups were evaluated ultrastructurally in TEM. G-group had normal ultrastructure while cells treated with H₂O₂ were damaged which was improved by RES. We concluded that Ti-oss® graft is biocompatible with fibroblasts; combination with RES decreases OS levels and improves the healing process increasing proliferation index, migration and collagen synthesis.

Keywords: Bone graft, Oxidative stress, Resveratrol, Fibroblast, In-vitro

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 21032

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral kavitede yer alan kemiklerde fizyolojik ya da patolojik nedenlerden dolayı kemik kaybı, bununla birlikte fonksiyon ve estetik olarak bozulma çok sık rastlanan bir durumdur. En sık rastlanan oral kemik kaybı nedenleri; osteoporoz (1), konjenital bozuklar (2), agresif periodontis (3, 4), diş çekimi (5, 6), kemik içi kistler (7), tümörler (8) ve travmadır (ortodontik aparatlar, implantlar, fraktürler). Böyle durumlarda, kemik fonksiyonunu ve estetiğini yerine getirebilmek için kemik greftleri uygulanmaktadır.

Vücutta kan transfüzyonundan sonra en sık transplantasyonu yapılan ikinci doku kemiktir (9). Dünya çapında yılda yaklaşık üç milyondan fazla kemik greft uygulaması gerçekleştirilmektedir (10). Greft uygulamaları ortopedi, kraniyofasiyal, rekonstrüktif plastik ve fasiyal cerrahide, implantoloji ve periodontolojide yaygın şekilde kullanılan cerrahi işlemlerdir. Yeni kemik oluşumunu destekleyebilmek için kemik grefti çok tercih edilen bir materyaldir (11). Özellikle diş hekimliği alanında kistektomide, apikal rezeksiyonda, implant uygulamalarında, periodontitisde, alveolo plastide (soket doldurma), travmada, sinüs liftingde, ortognatik cerrahide, konjenital ve odontojen tümör defektlerinde kullanılmaktadır (12).

Kemik greftleri esasen dört önemli biyolojik özelliği kapsayan mekanik destek ve osteo-rejenerasyonun kombine fonksiyonlarını yerine getirir: Osteointegrasyon, (kemiğin yüzeyine bağlanma yeteneğidir) osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteogenez. Osteokondüksiyon osteoblast ve osteoprojenitör hücrelerin greftin üç boyutlu yapısına ataçmanını destekleme ve bu hücrelerin greftin içerisinde migrasyonunu ve büyümesini sağlama yeteneği olarak ifade edilir. Osteoindüksiyon, greftin primitif, farklılaşmamış ve pluripotent hücrelerin kemik oluşturan hücre soyuna farklılaşmasını stimüle ederek osteogenezi indükleyebilmesi olarak tanımlanır. Osteogenez ise mevcut hücrelerden veya greftlerden kaynaklanan donör hücrelerle yeni kemik oluşumu anlamına gelmektedir (12, 13, 14).

Yeni kemik oluşumunu destekleyebilmek için kullanılmakta olan greft çeşitleri; otojen greftler, allojen greftler, izojen greftler, ksenojen greftler, alloplastik (sentetik) ve kompozit greft materyallerdir (11). Son yıllarda defektler yaygın olarak çeşitli sentetik ve ksenojen greft materyallerle tedavi edilmektedirler (15, 16). Ksenogreftlerin uygulanabilir miktarlarında sınır daha geniştir ve ikinci bir cerrahi prosedür gerekmeden

elde edilmektedirler. Bu tip greftler diğer greftlerle karşılaştırıldıklarında biyo-uyumlu, immün yanıt vermeyen, toksik olmayan, rezorbe olabilen ve inflamatuvar reaksiyon oluşturmeyen materyaller olarak kabul edilmektedir (17-19).

Greft materyalleri uygulandıktan sonra yara bölgesi gingiva dokusu ile kapatılmakta, greft ve gingival bağ dokusuna ait fibroblastlar arasında direkt bir temas oluşmaktadır (20, 21). Ayrıca greft materyalleriyle tedavinin ardından yara iyileşmesi iki bölümde: mukozal (yumuşak) doku ve kemik (sert) doku olarak incelenmektedir. Yumuşak doku yara iyileşmesinde fibroblastlar anahtar bir rol oynamaktadır (22). Literatürde ksenogreftlerin mukoza üzerine etkileri alanında herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için çalışmamızda ksenogreft materyalin fibroblastlar üzerindeki etkisini in vitro olarak incelemeyi önemli bulduk.

Kemik defektlerinde uygulanan greftler oral kavitenin ortamından ve çevresel faktörlerden izole edilemez, böylece belirli durumlarda OS maruz kalırlar. Metabolik bir durum olan oksidatif strese, reaktif oksijen türevleri (ROT) fizyolojik seviyelerin üzerine çıkmakta ve bu artış fizyolojik mekanizmalarla dengelenememektedir. Birçok kimyasal (alkol, nikotin), radyoaktivite, inflamatuvar reaksiyonlar, yüksek glikoz konsantrasyonları (23, 24) ve bakteriler vücudun belirli organlarında ROT üretimini arttırabilir (25). Diş beyazlatmak için kullanılan maddeler hidrojen peroksit (H_2O_2) içermektedir. H_2O_2 serbest radikalleri oluşturmaya çok yatkın bir maddedir, böylece ağız içinde stres ortamı oluşturabilmektedir (26-28). OS hücre fonksiyonuyla birlikte morfolojisine direkt olarak etki etmektedir. Ayrıca hücrenin DNA, RNA, lipit ve proteinlerini etkileyerek kardiyovasküler, nörodejenaratif ve periyodontal hastalıklar gibi pek çok hastalığın patogeneze yol açtığı gösterilmiştir (25). Oral ve dental hastalıklarda OS'in hem patogeneze hem de etyolojide önemli bir kofaktör olduğu ispat edilmiştir (29-31). Hücre yaşlanmasına neden olduğu, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve dental implant kaybı gibi durumlara sebep olabildiği doğrulanmıştır (32-34).

Periyodontal hastalıklar, inflamatuvar reaksiyonlar, sigara, alkol, radyoaktivite, diş beyazlatma gibi durumlar sonucunda; oral mukoza, çevre dokuları ve uygulanan kemik grefti direk oksidatif stres etkisi altında kalmaktadır. Literatürde greft materyalleri ve etrafında bulunan dokulara ait hücrelere OS'in etkisini inceleyen in vitro çalışmaya rastlamadık. Bu sebeple oluşturduğumuz modelde greft materyalinin ve

OS'in fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerini inceledik. Yara iyileşmesi sırasında greft kaybına da yol açabilen OS modelini oluştururken diş beyazlatma işlemlerinde kullanılan H_2O_2 uyguladık.

Resveratrol (3,5,4'-Trihidroksistilben) (RES) karbon iskeletli küçük bir bitki polifenolü ve doğal bir antioksidandır. RES bazı intrasellüler ROT'ları uzaklaştırabilmektedir (35, 36). RES'in diş hekimliğinin klinik kullanımlarında önemli bir rol alabileceğini düşünmekteyiz. Diş hekimliğinde çeşitli sebeplere bağlı olarak kemik kaybına oksidatif stres eşlik etmektedir. Bu durumda tedavi amaçlı kemik ksenogreftleri uygulanmakta ve uygulanan kemik greft materyalleri iyileşme bölgesini etkilemekte ve etkilenmektedirler.

Çalışmamızın amacı, 3T3 fibroblast hücre soyu kullanılarak oluşturulmuş in-vitro modelde Ti-oss® kemik greft materyali ve H_2O_2 'e bağlı oluşturulan oksidatif stresin etkilerini ve RES'nin antioksidan olarak potansiyel profilaktik ve terapötik rolünü immünohistokimyasal, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve ultrastrüktürel yöntemlerle incelemektir. Klinikte iyileşme bölgesindeki fibroblastların yaygın olarak karşılaşılan bu etkenlerden nasıl etkilendiklerinin anlaşılmasının ve RES'in greft uygulanan bölgede potansiyel profilaktik ve terapötik etkilerinin tanımlanmasının klinikopatolojik olarak literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Greftleri

İnsanda çeşitli nedenlerden dolayı kemik kaybı sık rastlanan bir durumdur. Bu vakalarda, kemik fonksiyonunu ve estetiğini yerine getirebilmek ve yeni kemik oluşumunu sağlayabilmek için kemik greftlemesi kullanılmaktadır.

Kemik grefti yerleştirme (greftleme) hastanın kayıp kemiğinin yerine, kendi vücudundan alınan dokuyu ya da sentetik veya doğal bir maddeyi koyan cerrahi bir prosedürdür.

Kemik grefti kemik iyileşmesini tek başına veya farklı bir madde ile kombine şekilde destekleyen herhangi bir implant materyal olarak tanımlanır.

Kemik grefti yerleştirme çok eski bir cerrahi prosedürdür. İlk kemik grefti prosedürünün kaydı, Amsterdam'da bir cerrah olan Job Janszoo van Meekeren tarafından 1682 yılında yayınlanan bir kitapta yer almıştır. Bu kaynağa göre 1668'de Rus bir adamın kraniyal defektini tamir etmek üzere köpek kemiği kullanılmıştır (37).

Günümüzde kemik vücutta en çok transplantasyonu yapılan dokudur (9). Her yıl yaklaşık 3,5 milyon kemik grefti prosedürü gerçekleştirilmektedir (12). Travma, tümörler, enfeksiyonlar ve konjenital defektlerin neden olduğu büyük kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için ve ayrıca rejenerasyon gerektiren vakalarda (osteoporoz, nekroz ve atrofik kırıklar) büyük miktarlarda kemik greftlerine ihtiyaç duyulmaktadır (12). Bütün bu gerçekler büyük kemik defektlerinin maksillofasiyal cerrahlar için hala sorun oluşturduğuna dikkat çekmektedir.

Ortopedik ve kraniyofasiyal cerrahide, implantoloji ve periodontolojide yaygın şekilde kullanılan kemik greftleri çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Örneğin kırıkların gecikmiş kaynaması veya kaynamaması, psödoartroz ve artrozda kaynamayı sağlamak için, kistler, tümörler, travma, enfeksiyon veya periyodontal sert doku rejenerasyonu ve konjenital defektler (alveolar yarık ve yarık damak) gibi diğer sebeplerden ortaya çıkan boşlukları veya hataları kapatmak için kullanılmaktadır (12, 38, 39). Ayrıca kemik rejenerasyonunun kötüleştiği (osteoporoz, nekroz ve atrofik kaynamama) vakalarda da uygulanmaktadır (40). Kemik greftleri kraniyoplastide, rekonstrüktif plastik ve fasiyal cerrahide de kullanılmaktadır (37). Özellikle diş

hekimliğinde kistektomi, apikal rezeksiyon, kemik oluşumu, implant öncesi kemik oluşumu, periodontitis, alveolo plasti (soket doldurumu), travma, sinüs lifting, ortognatik cerrahi, konjenital ve odontojen tümör defektlerinde kullanılmaktadır (12).

2.1.1. İdeal Kemik Greft Materyali

Kemiğin yerine kullanılan ideal bir malzeme biyo-uyumlu olmalıdır; iyi tolere edilebilmeli, antijenik, teratojenik veya karsinojenik karakteri olmamalı; biyoaktif, kullanışlı, steril veya steril edilebilir ve hidrofilik olmalıdır, ayrıca iyi mekanik ve kimyasal özelliklere sahip olmalıdır. İstenmeyen lokal veya sistemik etkiler göstermemelidir. Sınırsız miktarda karşılanabilmeli ve düşük maliyetli olmalıdır (41-43). İdeal bir kemik greft materyalinde bulunması gereken dört özellik vardır (40, 44): Osteointegrasyon, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon, osteogenezdir.

Osteointegrasyon: Fibröz dokunun dahiliyeti olmaksızın kemiğin yüzeyine kimyasal olarak bağlanma yeteneğidir (40, 44).

Osteoindüksiyon: Kemik rejenerasyonunda organizma tarafından üretilen büyüme faktörleri anahtar bir rol oynar. Büyüme faktörleri alıcı bölgesinde bulunan veya kan yoluyla aktarılan hücresel elemanlar tarafından lokal olarak salınan çok sayıda moleküldür ve hasarın periferinden göç eden ve osteoblastik hücre soyuna farklılaşacak mezenkimal hücreleri stimüle ederler. Bu sürece osteoindüksiyon adı verilir. Dolayısıyla osteoindüksiyon çevre dokudaki pluripotent kök hücrelerin osteoblastik fenotipe farklılaşmayı destekleme ve indüklenme yeteneğidir (45).

Osteokondüksiyon: İskelet kemik yerine greft olarak yerleştirilmiş malzemedен oluşur. Fonksiyonu kan damarları da dahil olmak üzere hücre ve dokuları korumak ve mekanik olarak desteklemek üzere üç boyutlu bir uzamsal yapıyı tekrar meydana getirmek ve iyileşme safhalarında greft biyomateryali kolonize etmektir. Bu özelliğe osteokondüksiyon adı verilir (45).

Osteogenez: Kemik büyüme bölgelerinde osteoblast öncülleri ve büyüme faktörlerinin varlığı veya göçü kemik rejenerasyonu için ihtiyaçtır. Osteoblast öncülleri greft materyalinden (spongiyoz otojen greftler) veya alıcı yatağından sağlanabilir. Büyüme faktörleri greftten, alıcı yatağı ve damar yapısından gelebilir. Alıcı yataklarının kemik iliğine penetrasyonunun, kemiğin rejenere olduğu bölgelerde hücresel ve büyüme

Otogreftler tüm bu özellikleri taşımakta olup hala altın standart olarak görülmektedirler (43).

2.1.2. Greft Sınıflandırması

Oral ve maksillofasiyal cerrahide kemiğin yerine kullanılan malzemeler iki ana gruba ayrılabilir (40, 41, 42):

1. Biyolojik (doğal transplantlar)
 - a) İnsan kemik kaynakları (Otogreftler, Allogreftler)
 - b) İnsandan olmayan doğal kaynaklar (Ksenogreftler)
2. Sentetik materyaller
 - a) Biyoaktif camlar
 - b) Kalsiyum fosfatlar
 - Hidroksiapatit (HA)
 - Trikalsiyum fosfat
 - Diğer kalsiyum fosfatlar (bruşit, monetit, kalsiyum polifosfatlar /CPP).
 - c) Kalsiyum Sülfat (40).

2.1.3. Otogreftler

Otogreftler aynı bireyden alınan greft materyalleridir ve tarihsel olarak altın standarta sahip olduğu düşünülür. Otogreft kemik alıcının vücudunun farklı bir kısmından nakledilir. Bu tür kemik greftleri intraoral veya ekstraoral alanlardan elde edilebilir ve yapısında birçok osteoprojenitör hücre içerir (48).

Oral otojen kemik grefti intraoral kaynakları arasında tüber çıkıntısı, ekzostozlar, torus bölgeleri, ramusun ön yüzü, simfizis bölgesi yer alır.

Ekstraoral otojen kemik greft kaynakları arasında kaburgalar, iliak kemik ve tibial kemik bulunur. Yapısal olarak kortikal kemik (revaskülarizasyon çok daha yavaştır), spongiyoz kemik, kortiko-spongiyoz kemikten oluşabilir.

Otolog kemikte erken revaskülarizasyon gerçekleşir. Çok sayıda osteojenik hücre içerir ve osteojenik potansiyele sahiptir. Osteoindüktif potansiyeli vardır ve immün yanıt oluşturmamaktadır. Böylece hala altın standart olarak görülür fakat donör bölgesinde fazladan acı, potansiyel morbidite ve komplikasyonlara (yara enfeksiyon riski, kan kaybı) yol açabilen ikinci bir cerrahi prosedüre ihtiyaç doğurur. Ayrıca

uzayan anestezi süresi, prosedürün maliyeti, sınırlı miktarda greft eldesi, yaş sınırı ve hızlı rezorpsiyon problemi gözlenmektedir; bu faktörler de yaklaşımın uygulanmasında kısıtlamalar ortaya koymaktadır. Ek olarak osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerin teorik avantajı, transplantasyon süreciyle ve greftin içindeki hücrelerin 2 saatten daha uzun süre yaşayamayacağı gerçeği ile uzlaşabilmektedir. Bu da araştırmacıların kemik yerine otolog olmayan kaynakları aramalarının sebebinin oluşturmaktadır (49-51).

2.1.4. Allogreftler

Allogreftler otogreftlere önemli bir alternatiftir. Çeşitli partikül büyüklüklerine sahip spongiyoz ve kortikal allogreftler kemik rejenerasyon prosedürleri için düzenli olarak kullanılmaktadır. Kemik allogreftleri dünya çapında 300 000 kez implante edilmiştir; bu da böbrek transplantasyonlarının 25 katından ve kalp transplantasyonlarının 100 katından daha fazladır (51). Otogreftin kısıtlaması, allogreft kullanımı ile aşılabılır. Bu amaçla canlı donörler, multiorgan donörler ve post-mortem-donörler kullanılabilir. Post-mortem-donörlerin izlenmesi mümkün olmadığı için hastalık bulaştırma riski daha yüksektir (52).

Bilinen çeşitli tipleri şöyledir:

- Çıkarılan ve sonra düşük sıcaklıkla muamele edilerek antijenite ve enfeksiyon riski azaltılan taze donmuş doku (Fresh frozen bone-FFB)
- Dehidratasyon ve dondurma uygulanmış ve demineralize edilmemiş, dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti (Fresh dehydrated bone allograft-FDBA); bu tip allogreft için sadece osteokondüktif etki tanımlanmıştır.
- Osteokondüktif ve indüktif potansiyeli olan demineralize, taze ve dehidrate kemik allogreft (Demineralized fresh dehydrated bone allograft-DFDBA)

Allogreftin avantajları çeşitli şekil ve büyüklüklerde hazır olması, host yapıların sakrifiye edilmeye ihtiyaç duyulmaması ve donör bölgesi morbidite problemleri olmamasıdır. DFDBA'nın osteokondüktif ve osteoindüktif potansiyeli vardır. Dezavantajları ise allogreftlerin vücutta reddedilme riski (immün atılım), hızlı rezorpsiyon problemleri, çapraz enfeksiyon ve hastalıkların bulaşma riskidir. İnsan immünyetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus-HIV) ve hepatit C virüsü (HC) enfeksiyonları olasılığı, bakteriyel kontaminasyon olasılığı ve bilinmeyen virüslerle olası enfeksiyonlar da hala tartışılmaktadır (11). Yıllarca viral enfeksiyon

risklerinden ötürü kullanımı tartışılmıştır. Ancak donörlerin dikkatli seçimi ile viral hastalıkların bulaşma riski en aza indirilebilir (1 000 000'da 1'den daha az) (53, 54).

DFDBA, etilen oksit veya gamma ışını ile sterilize edilir. Gamma ışınlarının kullanımı hala ihtilaflıdır, radyasyonun yüksek dozları ise güvenli görülmektedir ama kemik oluşumu sürecini engelledikleri bildirilmiştir. Ayrıca gama ışınlarının dozu arttıkça kemik allogreftin dayanıklılığı azalmaktadır, kırılabilirliği artmaktadır. Yeni sterilizasyon prosedürleriyle birlikte hastalık bulaşma riski minimal düzeye inmiştir (55). Ancak doku kontaminasyonu olasılığı ve belirlenmemiş patojenler ile hastalık bulaştırma riskleri taşımaktadırlar ve bunların güncel donör tarama ve doku işleme metotları aracılığıyla da elenemeyebileceği bildirilmiştir (40, 50).

2.1.5. Sentetik Kemik Greftleri

Diğer bir alternatif kemik grefti, hücre büyümesini ve sonrasında kemik dokusu oluşumunu destekleyebilen üç boyutlu iskele olarak kullanılabilen sentetik biyomateryallerdir. Alloplastik kemik greftleri kimyasal olarak çok çeşitli sentetik kalsiyum bazlı biyomateryallerin geniş ve heterojen bir grubunu temsil eder. Bunların arasında kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat, biyoaktif camlar ve polimerler yer alır (40, 56). Bu biyomateryaller yapısal destek sağlar veya önemli kemik defektlerinin iyileşmesini kolaylaştırırlar.

Sentetik kemik greftleri ideal bir kemik greft materyalinin dört özelliğinden sadece ikisini barındırır: osteointegrasyon ve osteokondüksiyon. Kemik defektlerinin, özellikle de kraniyofasiyal alanın tamiri için çok sayıda sentetik kemik grefti geliştirilmiştir. Bunların çoğu insan kemiğinde bulunan doğal minerale benzer hidroksiapatit (HA) veya diğer kalsiyum fosfat mineralleridir (57).

Materyal olarak genelde biyouyumludurlar. Fiziksel özellikler olarak; poröz (mikro veya makro) ve poröz olmayan formları yer almaktadır. Vasküler infiltrasyonda kemik büyümesi için 250-350 µm'lik por çapı ideal olarak kabul edilmiştir. Porözite artışı ile dayanıklılık azalmaktadır ve büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. Avantaj olarak çapraz enfeksiyon riskini ortadan kaldırması, kolay elde edilebilmesi ve saklanabilmesi özellikleri mevcuttur.

Klinik koşullarda diğer dezavantajları arasında düşük veya öngörülemez rezorpsiyon, kullanım zorluğu (mercandan elde edilen HA), yer yer inflamatuvar yabancı

madde reaksiyonuyla birlikte (çözünebilen polimerler) zayıf klinik sonuçlar yer alır. Osteoindüktif özelliği yoktur ve bu özellikleri sağlaması için sentetik greftlerin tercihen otojen kemik greftleri veya allogreftler ile kombine kullanılması önerilmektedir. Özel seramikler gibi daha yeni modifiye materyallerin, bu komplikasyonları ortadan kaldırması muhtemeldir (44, 58).

2.1.6. Ksenogreftler

Ksenogreftler insan olmayan doğal kaynaklardan alındığında heterojen olarak adlandırılır ve diğer türlerden alınan kaynaklar arasında sığır HA, domuz kemiği-at kemiği ve mercan kalsiyum karbonatı yer alır (40). Genellikle sınırlı rezorptif potansiyelleriyle osteokondüktiftirler. Ksenogreft olarak en yaygın şekilde deproteinize sığır kemik minerali kullanılır. Sığır kemiği morfolojik ve yapısal olarak insan kemiğine oldukça benzer yapıdadır. Isıl ve kimyasal işlemlerden sonra sığır kemiğinin inorganik komponenti başlıca gözenekli yapıyı koruyan HA'dan oluşur. Büyük miktarda greft elde edilebilmesi büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Farklı partikül büyüklüklerinde veya blok grefti olarak hem kortikal hem de spongiyoz kemik greftleri bulunmaktadır. Antijeniteyi azalttığı için sığır (ksenogenik) greftler biyouyumluluk gösterir ve sterilizasyon sağlarken oda sıcaklığında da depolanabilirler. Ksenogenik greftlerin özellikle sığır kaynaklı olanları genellikle diş hekimliğinde ve ortopedik cerrahilerde kullanılmaktadır çünkü hazırlaması kolay, ulaşılabilir ve insana benzerdir. Sığır kemiği Tablo 2-1'de de açıkça görüleceği üzere insana benzer kimyasal bileşime, poroziteye, büyüklüğe, şekle ve biyolojik davranışlara sahiptir (59).

Tablo 2- 1: İnsan ve sığır kemiği içeriklerinin karşılaştırılması (59).

İçerik	İnsan (%)	Sığır (%)
Su	7,93	7,75
Yağ	0,06	0,1
Nitrojen	4,3	4,3
Proteinler	27,5	27,2
Fosfor	11,9	11,9
Total P₂O₅	27,1	27,2
Kalsiyum	24,6	23,7
Ca/P	2,06	1,99
Total Sodyum	0,57	0,46
Klor	1,3	1,3

Ksenogreftlerin dental implant çevresindeki kemik defektlerinde kullanımına ilişkin pek çok başarılı sonuç rapor edilmiştir. Köpek mandibulasında yapılan çalışmada 3-7 aylık süre içinde implant çevresindeki kemik defektinin tamamen dolduğu rapor edilmiştir (60). Ek olarak türler arasında apatit yapısı benzer olduğu için sığır spongiyoz kemiğin doğal kemik HA türevleri, sentetik kemik greftinden daha iyi bir alternatif olabilmektedir (61, 62).

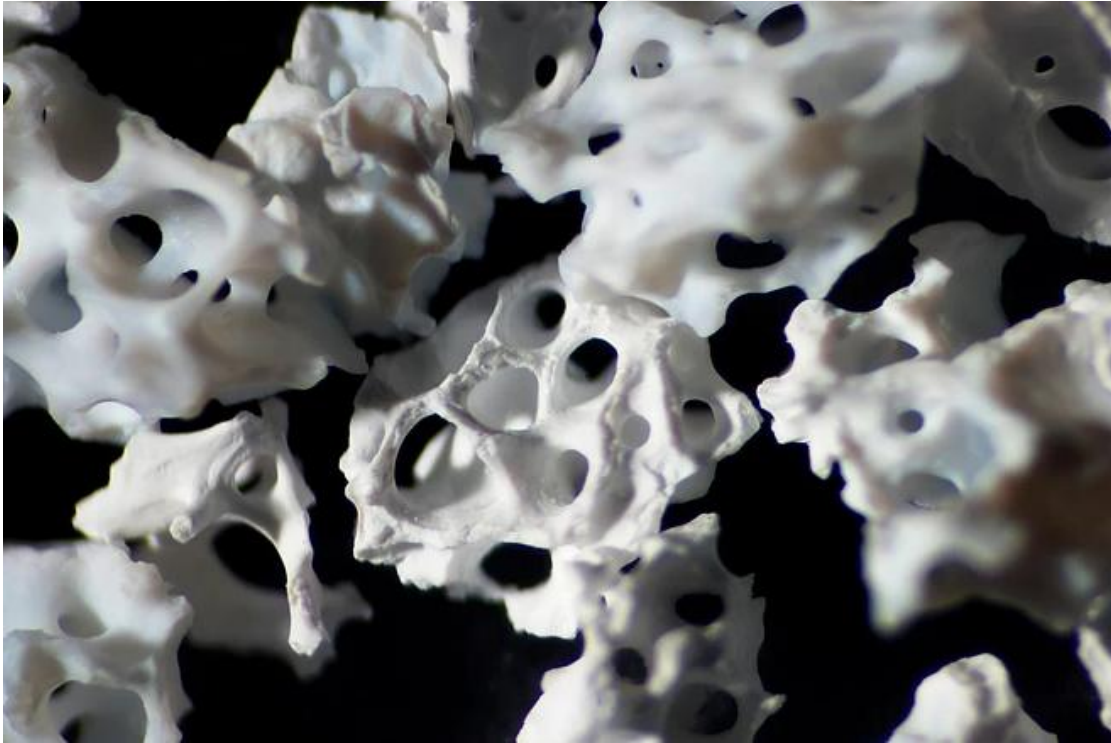
Ksenogreftlerin ana limitasyonu osteojenik ve osteoindüktif olmamalarıdır. Sığır greftleri ancak yapısal destekle birlikte osteokondüksiyon sağlar ve yeni oluşan kemik dokusu için önemli faktörler olan yüksek kalsiyum ve fosfor içeriğine sahiptirler. Diğer önemli bir avantajları ise greft yönetimi standartlarına göre oda sıcaklığında depolanabilmeleridir (63).

2.1.6.1. Ti-oss® Greft

Ti-oss® Amerika, Avrupa, Uzakdoğu'da Kore ve Türkiye'de son yıllarda geniş çapta kullanılan bir sığır ksenogreftidir. Bu ürün bovin spongiform ensefalopatiden (BSE) arındırılmış Avusturalya sığır kemiğinden yapılmaktadır. Organik kısmı (yağ, protein, vs); çok basamaklı hassas işlemlerle, temizleme ve sterilizasyonda ek kimyasallar kullanmadan gamma ışınlarıyla sterilizasyon yapılarak tamamen ortadan kaldırılır.

Ti-oss® kortikal kısmı olmadan %100 spongiyoz kemikten yapılır. Yenilikçi pülverizasyon tekniğiyle, kan damarı büyümesini maksimuma çıkaracak multiporoz yapı meydana getirilir. Ortalama bir Ti-oss® delik büyüklüğü, dünyanın önde gelen diğer ürünlerinden üç kat daha fazladır. Bu ileri üretim tekniği, bloğa hızlı kan akışını sağlar. Düşük sıcaklıkta işleme tekniği de insan kemiğindeki gibi, osteoblast aktivitesini stimüle edebilecek ideal, doğal yüzey topografisi sağlar. Yüksek sıcaklıkta bir işlemin neden olduğu vitrifikasyon sorunu tamamen kontrol edilebilmektedir. Pre HA yapısı, oktakalsiyum fosfat kristali, Ti-oss®'un yüzeyinde bulunur ve hızlı kemik oluşumu sağlar. Yüzde yüz multiporoz spongiyoz doğası, diğer nonporöz ürünlere kıyasla birim gram başına daha fazla miktarda kitle-hacmi sağlar. Bu da daha az materyal maliyetine yol açar (64).

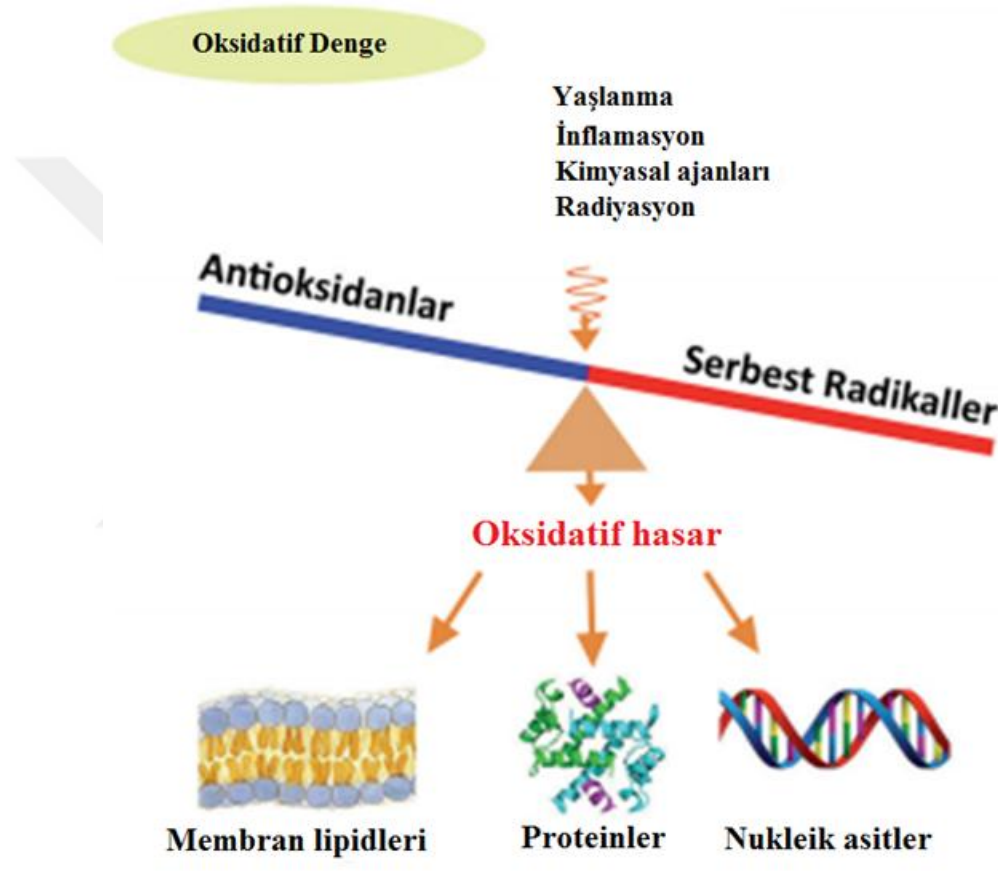
Osteokondüksiyon etkisinin yanı sıra güvenilirliği ve biyouyumluluğu, kemik defektlerini doldurmak için potansiyel bir materyal sunmaktadır fakat bu yeni materyal ile yapılan çalışmalar henüz çok az sayıdadır (65), (Şekil 2-2).



Şekil 2- 2: Ti-oss® por yapısı (64).

2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres (OS) temel bilimlerde ve klinik araştırmalarda giderek artan derecede ilgi çeken bir alan olmaya devam etmektedir. OS kavramsal olarak oksidanların üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Aerobik metabolizmanın kaçınılmaz bir sonucu, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimidir (66). Metabolik bir durum olan OS'de, ROT fizyolojik seviyelerinin üzerine çıkmakta ve bu artış fizyolojik mekanizmalarla dengelenememektedir (Şekil 2-3).



Şekil 2- 3: Oksidatif stres oluşum mekanizması (66).

Günümüzde kullanılan greftler, oral kavitenin ortamından organizmadan ve çevresel faktörlerden izole edilemez, böylece belirli durumlarda OS'e maruz kalırlar. ROT kaynakları arasında ksenobiyotikler (etanol, sigara dumanı, nikotin, ilaçlar), gıdalar (yüksek yağ içerikli diyet, yüksek protein içerikli diyet, akrolein), dental tedavi (ozon, termal olmayan plazma, lazer ışını, ultraviyole ışın), diş beyazlatmak için kullanılan H_2O_2 içeren maddeler, dental materyaller (fluoritler, dental kompozitler ve ortodontik apareyler), radyoaktivite, periyodontal inflamasyon, diabetes mellitus ve

bakteriler yer almaktadır (25, 67). Lipopolisakkaritler (LPS) periyodontal hastalığa neden olan inflamasyon ve OS'de rol alırlar (68). Fazla ROT üretiminin oral kavitede oksidatif stresi arttırdığı ve hücrese DNA, lipitler ve proteinlerde oksidatif hasara yol açarak birçok oral ve sistemik hastalığa neden olduğu gösterilmiştir

Diyabet genel kronik bir hastalıktır. İnsülin salınımı, insülin etkisi veya her ikisine bağlı olan hiperglisemiyle karakterize olan metabolik bozukluk hastalığıdır. Diabetes mellitus (DM) terimi, kanda artan glikoz düzeyleri, yağ ve protein metabolizmalarındaki anomalilerle karakterizedir. Diyabet ile periyodontal hastalıklar arasındaki ilişkinin iki yönlü olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Yani diyabet, periodontitisin ortaya çıkış ve ilerlemesiyle ilişkili iken periyodontal enfeksiyon da diyabetli hastalarda zayıf glisemik kontrolle ilişkilidir. Diyabetli hastalarda periyodontal enfeksiyonun tedavisi oral sağlığın korunmasında önemli bir bileşen iken, glisemik kontrolün sağlanması ve korunmasında da önemli bir rolü olabilir (69).

Periodontitis; sement, periyodontal ligament ve alveolar kemik gibi diş destekleyen dokuların inflamatuvar yıkımı ile karakterizedir. Bu dokuların rezorpsiyonu diş kaybına yol açabilmektedir. Periodontitisin diyabetli bireylerin altıncı majör komplikasyonu olduğu kaydedilmiştir (70). Çok sayıda epidemiyolojik çalışma her iki tip diyabet türünde, zayıf şekilde veya yetersiz kontrol edildiklerinde periyodontal hastalık insidansında veya ilerlemesinde artışı gösteren prediktörler olduğunu ortaya koymuştur (69, 71).

Bu durumlarda patolojiye kemik kaybıyla birlikte oksidatif stres eşlik eder (72). Hiperglisemi dokuda ROT düzeylerinin ve inflamasyonun artışına neden olurken, periyodontal hastalığın etiyogenezi artan ROT düzeyleriyle ilişkilendirilmektedir (73). Rejeneratif periyodontal terapide, kaybolan periyodontal dokunun rejenerasyonunu arttırmak için farklı tipte kemik greftleri kullanılmaktadır (72).

Periyodontal yapılar iyi kontrol edilmeyen diyabetiklerde normal hastalara kıyasla daha hızlı bozulmakta ve geleneksel tedavilere cevap vermemektedir. Dolayısıyla hastaların metabolik kontrolü prognozu belirlemede önemlidir. Başlangıçtaki tedaviye iyi cevap vermeyen hastalar için mikrobiyal test sonuçlarına göre geleneksel tedavi ile birlikte antibiyotik başlamak uygun olabilir (66, 68, 75). Geleneksel tedavinin antioksidanlarla kombine edilmesinin sonuçların başarısını arttırabileceği düşünülmektedir.

2.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikal, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren ve bağımsız var olabilen (dolayısıyla serbest adı verilen) tür anlamı taşımaktadır. Radikaller çeşitli mekanizmalarla oluşabilirler. Başlıca üç yolla meydana geldiği bilinmektedir (67):

- Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi; $X : Y \rightarrow X\cdot + Y\cdot$
- Molekülün bir elektron kaybına uğraması; $A - e^- \rightarrow A\cdot + e^-$
- Moleküle tek bir elektronun eklenmesi; $A + e^- \rightarrow A\cdot^-$

Yaşayan sistemlerde çok çeşitli ve çok sayıda serbest radikal bulunur. Merkezi atomlarına göre dört ana kategoriye ayrılırlar: Spesifik ROT, reaktif nitrojen türleri (RNT), reaktif sülfür türleri ve reaktif klor türleri (76, 77). Bunlar sırasıyla oksijen, nitrojen, sülfür ve klordan kaynaklanır fakat biz oksijen radikalleri üzerine odaklanacağız. ROT kısmi kimyasal redüksiyonlarla moleküler oksijenden (O_2) üretilen reaktif türlerin ana kategorisidir.

Eşleşmemiş elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Kararlı hale geçebilmek için elektron eşleştirmesi gerekmektedir. Serbest radikaller oldukça aktif moleküllerdir. ROT genellikle O_2 elektronlarının mitokondri ve plazma membranlarının elektron transport aktivitelerinden, kaçınılmaz şekilde sızmasıyla veya farklı hücrel bölümlerde bulunan çeşitli metabolik yolların yan ürünü olarak meydana getirilir (66).

Serbest radikaller, dengeli bir şekilde normal bir metabolizmada devamlı olarak üretilmektedir. OS, hücrel metabolizma sırasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi ROT artışı ile onları detoksifiye eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır. Tüm oksijen radikalleri ROT'tur fakat tüm ROT'lar oksijen radikali değildir (77, 78).

Başlıca ROT türleri (78, 79):

- **Oksijen radikalleri**
 - Süperoksit radikali ($O_2\cdot^-$)
 - Hidroksil radikali ($OH\cdot$)
 - Peroksil radikali ($RO_2\cdot$)
 - Alkoksil radikali ($RO\cdot$)

- Hidroperoksil radikali ($\text{HO}_2 \bullet$)
- $\text{CO}_2 \bullet^-$
- Tekli $\text{O}_2^1\Sigma_g^+$

- **Radikal olmayanlar**

- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- Hipobromous asit, HOBr
- Hipoklorous asit, HOCl
- Ozon, O_3
- Tekli oksijen ($\text{O}_2^1\Delta_g$)
- Organik peroksitler, ROOH
- Peroksinitrit, ONOO^-
- Peroksinitrat, O_2NOO^-
- Peroksinitröz asit, ONOOH
- Peroksomonokarbonat, HOOCO^{2-}

H_2O_2 , prooksidandır ve hidroksil radikallerini oluşturarak şiddetli hücre hasarına neden olur. Özellikle Fe ve Cu iyonlarının varlığında hidroksil radikallerin oluşumunda önemli rol oynar.

ROT'ların düşük dozda bakterisidal etkili olduğu, hücre sinyal iletiminde rol oynadığı, yara iyileşmesinin granülasyon ve vaskülarizasyon fazlarında hücre uyarımını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (80).

Serbest radikallerin membran lipitlerine, hücre içi proteinlere, nükleik asitlerin yapı ve fonksiyonları üzerinde değişikliklere yol açtığı ve hücre hasar meydana getirdiği bilinmektedir. Mitokondri iç membranı, oksidatif fosforilasyon gerçekleştiği için ROT'un en fazla üretildiği yerdir, bu nedenle görülen hasar hücresel düzeye göre daha fazladır (77). Oksidatif reaksiyonlar akışkanlık, iyon transportu, enzim aktivitesinin kaybı, protein çapraz bağlanması, protein sentezinin inhibisyonu, DNA hasarı gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirebilir ve sonunda hücre ölümüne yol açabilirler (66). ROT oluşumunun artışı malignitelerin gelişmesine de yol açabilir ve ROT üretimi yaşlılıkta kanser gelişim riskinin artmasından sorumlu olabilir (81). OS yaşlılıkta ve yaşlanan insan derisinde de görülür. OS'nin tüm hücrelerin yaşlanma süreçleriyle ilişkili olmasının yanı sıra ana bir rol oynadığı artık neredeyse evrensel olarak kabul edilmiştir (82).

Embriyo kültürleri ve hayvan modellerindeki in vivo çalışmalar, ROT'un yapısal doğum defektleri ve nörogelişimsel eksiklikler gibi problemlere ve postnatal yaşamda kansere yol açtığını göstermiştir (83). OS yaşlanma, kanser, kalp hastalıkları, diyabet ve diyabetin komplikasyonları başta olmak üzere pek çok patolojik tablonun ve yaşlanmanın patogenezi ile yakın ilişkidir (73, 74, 82).

Normal fizyolojik koşullarda ROT ve antioksidanlar arasında bir denge vardır. OS sadece antioksidan savunma sisteminin artan ROT üretimini nötralize edemediği durumlarda meydana gelir (79). Antioksidanlar fonksiyonlarına göre iki kategoride sınıflandırılabilirler (84). İlk kategori süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (Px), glutatyon redüktaz gibi enzimatik antioksidanları içeren koruyucu antioksidanları, DNA tamir enzimlerini ve albümin gibi bazı metal iyon şelatörlerini içerirler. İkinci kategoride askorbik asit (C vitamini), karotenoid (retinol-vitamin A içeren), ürik asit, α -tokoferol (E vitamini), redükte glutatyon ve polifenoller (flavonoidler) gibi temizleyici antioksidanlar veya zincir kırıcı antioksidanlar yer alır (85).

2.3. Resveratrol

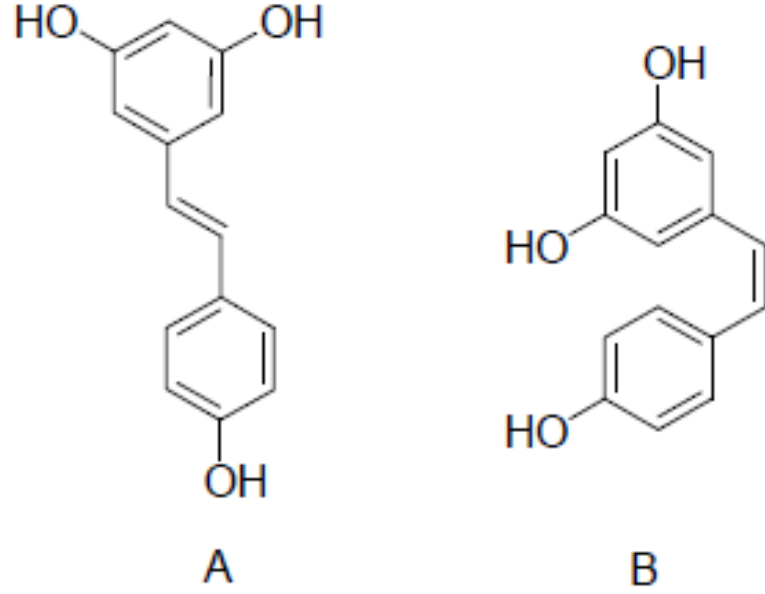
Resveratrol (3,5,4'-Trihidroksistilben) (RES) çeşitli bitkilerde ultraviyole ve radyasyona maruz kalma sonucu, hasar sonrası, mantar veya bakteriyel enfeksiyonlara cevaben üretilen doğal bir fitoaleksindir (86). İlk kez 1940 yılında dokuztepelili bitkisinin kökünde keşfedilmiştir. RES daha sonra Japon madımak bitkisinin (*Polygonum cuspidatum*) kökünde de büyük miktarlarda bulunmuştur ve 1990'ların başında Fransız Paradoksu olarak tanımlanmıştır (87). Bu olgu Fransızlarda ateroskleroz ve koroner kalp hastalıkları için iyi bilinen risk faktörleri olan doymuş yağ asitlerinden oldukça zengin beslenmelerine rağmen koroner kalp hastalıklarının insidansının düşük olmasını açıklamaktadır (88, 89). Bilhassa kırmızı şarabın yaygın tüketiminin koroner hastalık insidansının düşmesinde etkili olabileceği öne sürülmüştür. Dolayısıyla kırmızı şarabın kimyasal içeriği fazlaca çalışılmış ve RES'ce zengin bir kaynak olduğu bulunmuştur (6-8mg/L'e kadar) (89). Ancak RES sadece kırmızı şarapta değil çok çeşitli doğal gıdalarda da bulunur; Japon madımağı, üzüm, asma, farklı türde meyveler (yaban mersini, ahududu, dut, kırmızı yaban mersini, çay üzümü, kamburüzüm), yer fıstığı, baklagiller ve çimen, İskoçya sarıçamı, çam, okalıptus, Rheum rhaponticum, artocarpus heterophyllus, syzygium cumini, veratrum grandiflorum ve sinameki de dahil en az 72

çeşit bitki türünde bulunmaktadır ve her kaynaktaki RES'in tam miktarı oldukça farklılık göstermektedir (90).

Üzüm kabuğu RES'in ana kaynağıdır. Japon madımak bitkisinin, trans-resveratrol glukozid formunda yüksek konsantrasyonlarda stilben içerdiği kanıtlanmıştır. Özellikle genç köklerde 497µg/g konsantrasyonda bulunmuştur (89). Hindistan cevizi ve kakaonun da RES kaynağı olduğu yeni kanıtlanmıştır (90). Üzümlerdeki RES içeriği 0,16 ile 3,54mg/g arasında değişmektedir; kuru üzüm kabuğunda 24mg/g bulunur (90). RES diğer üzüm ve fındık çeşitlerinde de bulunur. Örneğin turna yemişi ham suyu 0,2mg/L içerir. Diğer doğal gıdalarda RES konsantrasyonu mg/g (yer fıstığı, antep fıstığı) ile ng/g (yaban mersini, çay üzümü) arasında değişir. Kırmızı şarabın çeşitli türlerinde 0,1 ile 14,3mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda RES bulunur (91).

2.3.1. Resveratrolün Yapısı

RES, 228 g/mol moleküler ağırlığında ve 14 karbon iskeletli küçük bir bitki polifenolüdür. Polifenoller çok sayıda fenol biriminin bulunmasıyla karakterize doğal kimyasallardır. Adı eski Yunan kelimesi olan poli, "çok, fazla" anlamına gelir ve fenol kelimesi aromatik bir benzenoid (fenil) çemberi ve alkollerde bulunan bir hidroksil (-OH) grubundan meydana gelen kimyasal bir yapıyı işaret eder (Şekil 2-4). Fitokimyasalların büyük bir grubunu meydana getirirler. Bu bileşenler kimyasal olarak iki gruba ayrılır: flavonoidler (flavonoller, flavonlar, flavan-3-oller, proantosiyanidler, antosiyanidler ve izoflavonlar) ve flavonoid olmayanlar (hidroksisinnamik asitler, ellagitanninler, gallotanninler ve stilbenler) (92).



Şekil 2- 4: (A) trans-resveratrol; (B) cis-resveratrol.

Ancak cis-resveratrol izomeri kararsızdır ve ışıkla bir reaksiyon meydana geldiğinde kolayca trans-formuna geçebilir (93). RES'in hidroksil grupları metoksi grupları ile değiştirildiğinde sitotoksik aktivitesini önemli derecede arttırmış ve stilben yapısının 4 ve 40. pozisyonlarındaki trans konformasyonunda bulunan hidroksil grubunun, RES'in antiproliferatif etkisi için gerekli olduğu rapor edilmiştir. Halojen grupların girişi RES'e antibakteriyal aktivite de kazandırabilir (86).

2.3.2. Resveratrolün Terapötik Kullanımı

RES'in geniş ölçüde terapötik kullanımı ve sağlığa yararları in vitro ve in vivo olarak belgelenmiştir. Birçok çalışma RES'in kardiyovasküler koruyucu etkisi olduğunu, trombosit agregasyonunu inhibe ettiğini, kan glikozunu düşürdüğünü, anti-diyabetik etkileri olduğunu ve kanser gibi birçok hastalığın semptomlarını azaltmada önemli rolü olduğunu göstermiştir (94, 95). RES'in intrinsik anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkileriyle Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı nöroprotektif etkileri olduğu da gösterilmiştir (91, 92). Yakın zamanda yayınlanan veriler RES'in postmenapozal kadınlarda meme kanseri riskini arttırmadan (74) osteoporozun yönetilmesinde etkili olduğunu göstermiştir (91). Klinik ve deneysel çalışmalar RES'in OS'nin yol açtığı hasarı azaltarak kemik kaybını önlediğini

göstermiştir. RES, GSH-PX, heme oksijenaz ve SOD gibi ana hücrel antioksidan enzimlerin üretimini indükleyerek OS'i önemli ölçüde azaltabilmektedir. Daha önemlisi RES'in vasküler yapılarda ROS'un mitokondriyal üretimini engelleyebildiği de gösterilmiştir. Ayrıca bir sıçan periodontit modelinde, RES kullanımının alveolar kemik rezorpsiyonunu ve sistemik oksidatif stresin artışı iyileştirdiği gösterilmiştir (74).

2.3.3. Resveratrolün Antioksidan Aktivitesi

RES doğal bir antioksidandır; bazı intraselüler ROT'ları uzaklaştırabilir. Kayda değer H-transferi kapasitesine sahip üç fenol grubu ve çift bağlı transizomerinin antioksidan aktivitesinden sorumlu olduğu son yıllarda kesinleşmiştir. RES'in in vivo antioksidan özelliğinin antioksidan olarak davranan nitrik oksit (NO) sentezini artırma yeteneğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (96).

2.3.4. Resveratrolün Etki Mekanizması

RES'in farmakolojik bir ajan olarak geniş spektrumlu hedeflere sahip olduğu bilinmektedir. RES'in biyolojik yanıtları dolayısıyla çoklu moleküler hedeflerde eş zamanlı aktivitelere bağımlı gelişebilir (97).

RES, inflamasyona ve enfeksiyona karşı immün cevabı düzenleyen nuklear faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolağını etkiler. Kinazlar, RES tarafından azaltılan diğer bir enzim ailesidir. RES'in tirozin kinaz (p56lck) ve serin/threonin kinaz (PKC) enzimlerini inhibe edebildiği bilinmektedir. RES hem protein kinaz C'yi (PKC'i) hem de protein kinaz D'yi (PKD) inhibe edebilir. RES tarafından PKC izoformlarının inhibisyonu, büyüme inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu ile ilişkilidir. RES'in diğer ana hedefi mitojen ile aktive protein kinaz (MAPK) ailesidir, bu aile ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinazlar (Erk1/2), stres ile aktive kinazlar JNK1/2 ve p38'den oluşur (98).

Ayrıca RES'in fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolağını inhibe edebildiği ve bu yolla hücre farklılaşması, büyümesi, proliferasyonu ve diğer çeşitli aktiviteleri düzenleyebildiği bildirilmiştir. Birçok çalışma RES'in PI3K/Akt yolağında etkili olduğu çeşitli mekanizmaları ortaya koymuştur. RES'in birçok kanser hücresinde PI3K/Akt/mTOR (Mammalian Target of Rapamycin-Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) üzerinden Akt sinyalini inhibe ettiği ve dolayısıyla diğer PI3K/Akt/mTOR inhibitörleri ile birlikte kombine kullanıldığında tedaviye destek sağlayabileceği düşünülmektedir (99).

RES, araşidonic asidi prostaglandinlere çevirmekle sorumlu siklooksigenazları (COX) da inhibe eder. Bu yolağın baskılanması inflamasyonu azaltır ve RES'in inflamatuvar durumlarda tedavide kullanılma olasılığını akla getirir. Farklı çalışmalar RES'in 5-lipooksigenaz (LOX) ve siklooksigenaz enzimlerini inhibe edebildiğini göstermiştir. Proinflamatuvar moleküllerin COX ve LOX tarafından üretimi, tümörögenезin başlatılması için önemli bir basamaktır ve RES'in COX/LOX katalitik aktiviteleri üzerindeki inhibitör etkisi, kansere karşı kemo-koruyuculukla ilişkilidir (100).

Dahası güncel bir raporda C2C12 miyotüplerde RES'in adenozin monofosfat-aktif protein kinazı (AMPK) aktive ederek glikoz transportunu tetiklediğini gösterilmiştir (101). Sirtuin RES'in diğer bir potansiyel hedefidir. RES'in, yaşamı uzatan özelliklerden sorumlu Sirt1'i aktivelediğini bildirilmiştir (97).

2.4. Oral Mukozanın Yapısı

Müköz membran dış çevreyle temasta bulunan vücut kavitelelerini örten dokuyu tanımlamakta kullanılan bir terimdir. Oral kavite, nazal yollar, farinks, gastrointestinal kanal ve ürogenital bölgeler müköz membran ile örtülüdür. Oral kavitede bu duvara oral müköz membran veya oral mukoza adı verilir (102, 103). Yapısal olarak oral mukoza, bazı açılardan deriye benzer ayrıca özefagus, serviks ve vajinanın müköz membranları ile de benzerlik gösterir ancak gastrointestinal mukozadan tamamıyla farklıdır (104). Oral mukozanın genel organizasyonu, epitel, lamina propriya ve submukoza tabakalarından oluşur ancak bazı bölgelerde submukoza bulunmaz ve çevre dokulara lamina propriya komşuluk eder (Şekil 2-6).

Oral mukoza çeşitli fonksiyonlara sahiptir: altında bulunan dokuyu korumakta, özelleşmiş epitel sayesinde duysal algı dışında tat duyusunu gerçekleştirmekte, mukozada yer alan bezler sayesinde sentez ve sekresyon yapmakta ve dudakta bulunan mukokütanöz bağlantı ile estetik bir rol oynamaktadır. Besinleri kavrama, ısırma ve çiğneme gibi normal aktiviteler oral yumuşak dokuların mekanik güçlere maruz kalmasına neden olur. Dolayısıyla oral mukozanın yapısı çeşitli fonksiyonel adaptasyonlara sahiptir. Oral kavite çok katlı yassı epitelle döşelidir, ağzın farklı bölgelerinde fonksiyona göre yapısı önemli derecede değişmektedir fakat başlıca üç tipe ayrılabilir (105-107):

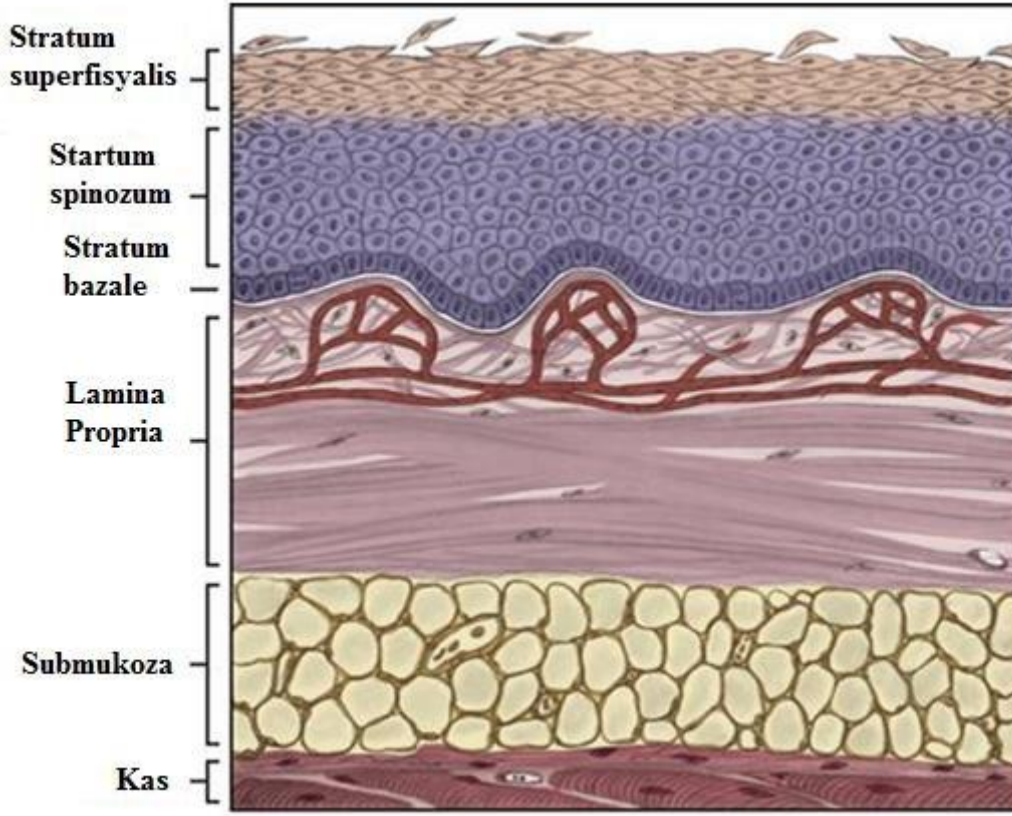
- Örtü mukozası
- Çiğneme mukozası
- Özelleşmiş mukoza

Örtü mukozası çiğneme ve konuşma gibi hareketlerle esneyebilen, elastik ve biçim değiştirebilen yüzey sağlar. Dudakları, yanakları, alveollerin mukozal yüzeyini, ağzın tavanını ve tabanını, dilin ventral yüzeyini ve yumuşak damağı kaplar. Çiğnemede fonksiyon göstermez ve dolayısıyla aşınması azdır. Örtü mukozasının bağ dokusu çiğneme mukozasındaki bağ dokudan daha elastik ve esnektir.

Çiğneme mukozasının (gingiva ve sert damak) çiğneme ile ilişkili mekanik güçlere maruz kalan bölgelerinde deriyi saran epidermisin keratinine benzeyen veya parakeratinizasyon gösteren epitel alanları bulunur. Çiğneme mukozasında epitel, altındaki dokulara kolajenöz bir lamina propriya ile sıkıca bağlanır.

Özelleşmiş mukoza dilin yüzeyini örter. Dilin dorsum ve lateral bölgeleri keratinize ve keratinleşmemiş epitelin bir mozaiginden oluşan özelleşmiş bir epitel ile örtülür. Bu epitel dilin kaslarına sıkıca bağlanır (23, 108). Ek olarak epitelin kalınlığında ve minör tükürük bezlerinin varlığı ya da yokluğu gibi submukozanın bileşenlerinde farklılıklar bulunur.

Collins ve Dawes tarafından yapılan ölçümlere göre oral duvarın total yüzey alanının yaklaşık %25'ini çiğneme mukozası, yaklaşık %15'ini özelleşmiş mukoza (dil dorsumu) ve yaklaşık %60'ını örtü mukozası oluşturmaktadır (109).



Şekil 2- 5: Keratinleşmemiş çok katlı yassı epitel, lamina propriya ve submukoza (110).

Örtü mukozası genelde keratinleşmemiş epitelten oluşur fakat bazı yerlerde parakeratinize ve keratinleşmiş epitele de rastlanır (Şekil 2-5). Altında lamina propriya yer almaktadır, papiller tabaka gevşek bağ dokusundan oluşur ve altında daha sıkı bir retiküler bağ dokusu yer alır (111). Epitel üç tabakalı bir organizasyon gösterir: **Stratum bazale** denilen kübik hücrelerden bir bazal tabakaya sahiptir. Sonraki hücre tabakası **stratum spinozumdur**. Bu tabakadaki hücreler poligonal ve hafifçe yassılaştırmış görünür. Üçüncü veya süperfisyal tabakaya **stratum süperfisyale** denir, hücreleri yassılaştırmıştır ve çoğunda küçük oval nukleuslar bulunur (111).

Örtü mukozası gevşek elastik bir bağ dokuyla altındaki yapılara bağlanır. Lamina propriya kan damarları ve epitelin bazal tabakasında sonlanan aksonları ileten sinirleri içerir. Dilin inferior yüzeyi dışında kalan bölgede lamina propriyanın altında submukoza tabakası yer alır. Bu tabaka mukozayı altındaki dokulara (kaslar) bağlayan kolajen ve elastik liflerin geniş demetlerini içerir. Ayrıca dudakların, dil ve yanakların salgı bezlerini de içerir. Yer yer kıl folikülleriyle ilişkili olmayan sebace bezleri de içerebilir (106).

Mukoza epitelinde keratinosit, Langerhans, melanosit ve Merkel hücreleri ile lenfositler gibi inflamatuvar hücreler bulunmaktadır böylece epidermis ile benzerlik gösterir (111).

Çiğneme mukozası alveolar uzantıyı ve sert damağı kaplar. Buradaki mukoza keratinleşmemiş mukozadan daha kalındır. Bazal hücreler bazal laminaya hemidezmozomlarla bağlanır. **Stratum bazalis** ve **stratum spinozum** tabakaları keratinleşmemiş epiteldekilerin aynısıdır. **Stratum granülozum** ve **stratum korneum** diğer iki tabakadır. Stratum bazalisdeki prizmatik hücreler, mitotik aktivitesi yüksek farklılaşmamış hücrelerdir. Bölünme özelliğini kaybettikten sonra farklılaşmaya uğrar ve üstteki epitel hücrelerini meydana getirirler (112). Stratum spinozum, yuvarlak nukleuslu kübik veya çok köşeli hücreler ile karakterize edilir. Stratum granülozum keratohiyalin granülleri içerir ve yüzey tabakası olan stratum korneum ince, yassılaştırmış nukleussuz hücreler ile karakterizedir. Bu hücrelerin sitoplazmaları yumuşak keratinle doludur (105-107, 113).

Oral epitelin histolojik kesitlerinde diğer epitel hücrelerinden farklı hücreler bulunur; bunların arasında hücre popülasyonunun %10'undan fazlasını oluşturabilen pigment üreten hücreler (melanositler), Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri ve lenfositler gibi inflamatuvar hücreler yer alır. Genelde topluca nonkeratinositler olarak adlandırılırlar (114).

2.4.1. Oral Mukozada Yaşla İlgili Değişikler

Deri yaşla birlikte yapısında ve fonksiyonunda iyi belirlenmiş değişimler gösterir. Bazı bölgelerde epitel hafif incelir ve beraberinde epitel-bağ doku ara yüzü yassılaştır. Bu da oral mukozanın daha yumuşak görünmesine neden olur. Minör tükürük bezlerinin kademeli atrofisi ve majör bezlerin daha az aktivitesi görülür. Hücresel aktivite azalır ve fibrozis artar. Ayrıca gingivanın ve periyodontal ligamentin lamina propriyasında kalsifikasyonlar izlenir. Tamir yeteneği azalır ve iyileşme süresi artar (115).

2.4.2. Maksiller Sinüs ve Maksiller Sinüsün Mukozası

Maksilla bir çift olup yüz kemiklerinin parçasıdır. Maksilla kemik bir gövde ile zigomatik, frontal, alveolar ve palatin çıkıntılardan meydana gelir, ağız tavanı, burun tabanı ile lateral duvarlarının ve göz kavitesi taban yapılarının oluşumuna katılır. İki

infratemporal ve pterigopalatin fossanın oluşumunu da destekler. Gövdesi piramidal şekildedir ve kenarında geniş bir kavite vardır ve maksiller sinüs ya da Highmore antrumu olarak adlandırılır (116). Maksiller sinüsler büyüklük ve şekil açısından bireyden bireye değişebilmektedir.

Paranasal sinüsler, üst solunum yollarının girişinde hava ile dolan dört boşluklu kompleks bir birimi meydana getirir. Kalıcı azı dişinin dökülmesiyle yetişkinlikte son pnömatisasyon gerçekleşir. Maksiller sinüs en geniş ve en sabit paranasal sinüslerdir. Maksiller sinüs prenatal hayatın 17. haftasında oluşmaya başlar fakat büyümenin çoğu doğumdan sonraki süreçte gerçekleşir. Uterusta ilk gelişen sinüstür. Doğumdan sonra iki aşamalı hızlı büyüme geçirir; ilki doğumdan sonraki 3 yılda ve ikincisi 7 ile 18 yaş arasında gerçekleşir (117, 118).

Maksiller sinüsün evrensel hacmi 15 ml'e ulaşabilir. Maksiller sinüslerin fonksiyonu üzerine birçok teori mevcuttur:

- Kafatasının ağırlığını azaltmak
- Sesin rezonansı
- Solunum sırasında sinüs içerisindeki hava basıncının düzenlenmesi aracılığıyla olfaktör ve respiratuar değişimler
- Solunan havanın koşullandırılması
- Mekanik travmaya karşı kraniyofasiyal koruma
- Nazal mukozanın bakteriyel enfeksiyona karşı korunmasında önemli olabilecek bakterisidal enzim (lizozim) üretimi

Sinüslerin respiratuar fonksiyonu ve tınlamayı desteklediğine inanılır fakat kafatası yapısına yardımcı olması veya henüz bilinmeyen amaçlarla kalıntı yapılar olabileceği göz ardı edilemez (117).

Anatomik olarak mediyal duvar herhangi bir kemik içermez; orta meatus mukozası, bağ dokusu ve sinüs mukozasından meydana gelir (118). Sinüs mukozası dahil olmak üzere tüm sinüsler respiratuar yalancı çok katlı epitelle döşelidir ve kemiğe direk bağlanan mukoperiyosteum olarak adlandırılan subepitelyal bağ dokusu tabakası olan lamina propriyası vardır (118, 119).

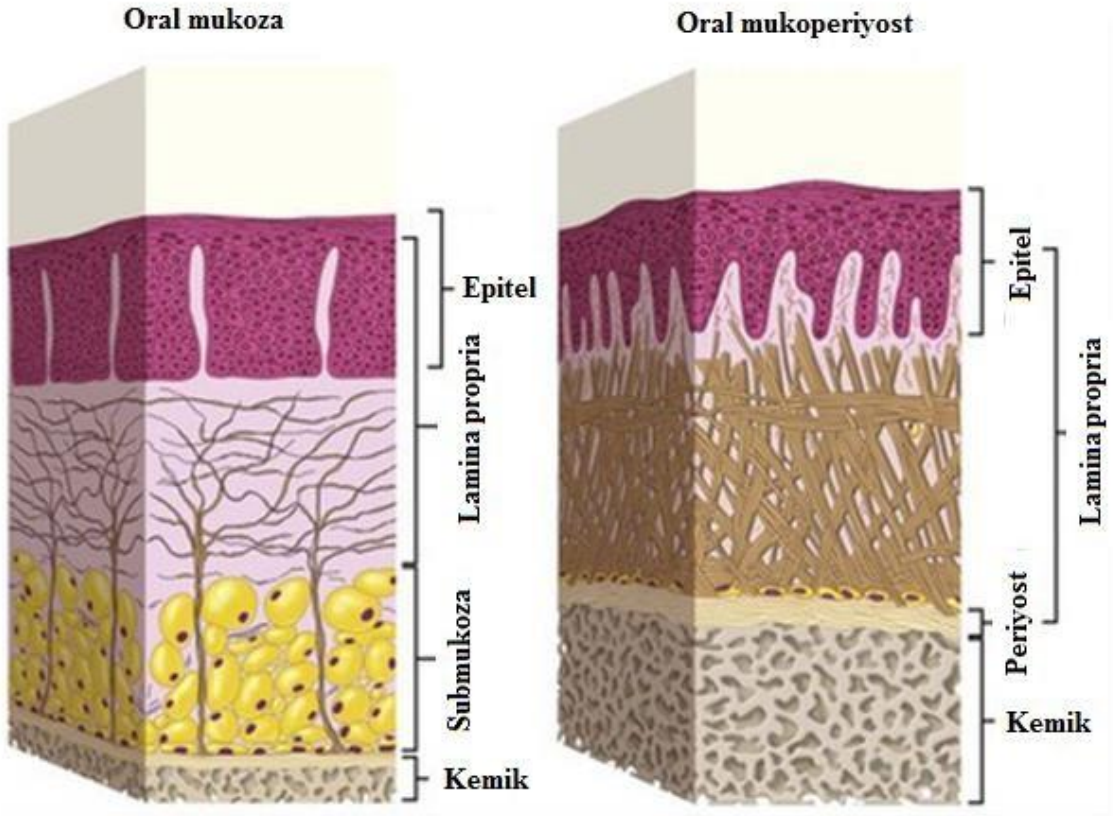
Maksiller sinüs respiratuar yalancı çok katlı epitel ile döşelidir. Epitel tabakası nazal kavitedekinden daha incedir. Normal bir insanın maksiller sinüs mukozasının kalınlığı 0,3 ile 0,8 mm arasında değişir (120).

Maksiller sinüsün subepitelyal bağ dokusu tabakası (lamina propriya) nazal mukozadan daha incedir. Bağ doku hücreleri, kolajen demetlerden interselüler madde ve çok az elastik liflerden oluşur. Orta düzeyde vaskülerdir. Lamina propriya seröz ve müköz asinuslar veya serömüköz asinuslar ile birlikte miyoepitelyal hücrelerden oluşan mikst bezlerden meydana gelen subepitelyal antral bezler içerir. Antral bezler ostiyum maksillare çevresindeki lamina propriyada daha yoğundur. Antral bezlerin mikst sekretuar ürünü, boşaltım kanalları aracılığıyla sinüs kavitesine ulaşır. Lamina propriya sinir ve vasküler yapıları içerir ve epitel ile organizma arasındaki değişimleri de organize eder (120).

2.4.3. Oral Kavitenin Bağ Dokusu

Oral epitelin altında yer alan bağ dokusu olan lamina propriya iki tabakaya ayrılır: süperfisyel papiller tabaka (epitelyal çıkıntılarla veya papillalarla ilişkili) ve derin retiküler tabaka. Retiküler terimi kolajen liflerin ağ şeklinde dizilişi anlamına gelir; bazal laminanın yanında yer alan retikülün lifleriyle ilişkili değildir. Bu iki tabaka arasındaki yapısal fark papiller tabakadadır. Kolajen lifleri ince ve gevşek dizilimlidir ve çok sayıda kapiller bulunur. Buna karşın retiküler tabakada kolajen lifler kalın demetler halinde dizilerek yüzeye paralel yerleşirler (103, 121).

Lamina propriya tip I kolajen liflerinden oluşan yoğun bir ağdan meydana gelir ve derin tabakaları bölgelere göre değişen miktarlarda tip II kolajen lifleri ve elastik lifler içerir. Gingiva ve sert damak (rafe palatina) kısımları gibi bölgelerde genelde oral mukoza altındaki kemiğin periyostuna submukoza olmadan kolajenöz bir bağ dokusu ile doğrudan sıkıca bağlanır. Bu doku mukoperiyostal doku olarak tanımlanır (Şekil 2-6). Bazı bölgelerde lamina propriya altında submukoza bulunur ve distalde yumuşak damağın gevşek bağ dokusu ile devam etmektedir. Submukoza adipöz dokusu anteriorda ve müköz bezler posteriora yer almaktadır. Bu düzenlemeye mukoperiyosteum denir, sıkı ve elastik olmayan bir bağlanma sağlar (104, 121).



Şekil 2- 6: Oral mukoza ve oral mukoperiyosteumun tabakaları (110)

2.4.3.1. Periyodontal Ligament

Periyodontal ligament; vücutta iki farklı sert dokuyu birbirine bağlayan tek ligamettir. Kemik kökünü alveolar kemiğin iç duvarına bağlayan fibröz, kompleks, yumuşak bir bağ dokudur. Çiğneme sırasında ortaya çıkan kuvvetlere karşı dişin dayanıklılığı ve diş desteği için fonksiyonel olarak önemlidir. Diğer önemli fonksiyonu alveolar kemik hacmini düzenlemek ve doku homeostazı ve rejenerasyonu için bir hücre deposu olarak görev almaktır (122). Periyodontal ligament çiğneme sırasında çenenin uygun pozisyonu için gereken duysal organ olarak da görev alır. Periyodontal ligament uygulanan kuvvetlerdeki hızlı değişimlere çok yüksek adaptasyon yeteneğine ve genişliğini koruma kapasitesine sahiptir. Bu yetenek periyodontal ligament homeostazında önemlidir. Alveolar kemik çiğneme sırasında açığa çıkan dişin mikrohareketindeki değişimlere cevaben daima tekrar modellenir (123).

Periyodontal ligament gerçek alveolar kemik ile kökü saran sementum arasında bulunan bir fibröz bağ dokudur. Bu ligament kemiğin kökünü sarar ve gingiva dokusu

ile bağlantı kurar, lifler, hücreler ve ara maddeden oluşur. Lifler kolajenden, esas madde ise su, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşur. Periyodontal ligamentin ekstraselüler matriksi kolajenöz ve nonkolajenöz proteinler içerir. Periyodontiyumdaki ana kolajen tipleri kolajen I ve III'tür. Diğer kolajenler arasında kolajen V, VI, XII ve XIV yer alır. Ligamentte yer alan fibroblast, sementoblast, osteoblast, osteoklast, Malassez epitelyal hücre artıkları, monositler, makrofajlar, endotelyal hücreler ve kök/projenitor hücreler gibi çeşitli hücre tipleri formatif, destekleyici ve rezorptif fonksiyonlara sahiptir. Aynı zamanda multiadeziv glikoproteinler (Fibrilin-1, Tenascin-c, vs) ve integrinler bulunmaktadır. Periyodontal ligamentte integrinlerin üç ana grubu yer alır: (i) I-alt birimi içeren kolajen bağlayan integrinler, (ii) I alt birimi olmayan, kolajene 'köprü' moleküller aracılığıyla bağlanan integrinler ve (iii) transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β)'yı aktive eden integrinler (123, 124).

Periyodontal ligamentin yaşlanması; hücre sayısı ve aktivitesi azalır. Yaşlanan sementum ve alveolar kemikte taraklaşma meydana gelir. Bazı lifler tüm yüzey yerine bu tarakların uçlarına bağlanır. Yaşlılarda bireyin genel sağlık durumuna ve oral hijyenine göre daha sağlıklı bir periyodontiyum görülebilir. Gingival ve periyodontal hastalıkla ilişkili gingival yüksekliğin kaybı, yıkıcı değişimleri destekler.

Oral yumuşak doku; gingiva, periyodontal ligament ve oral mukozadan oluşur. Oral mukoza bağ dokusunun ana hücresi fibroblasttır. Fibroblastlar liflerin ve esas maddenin üretimi ile yıkımından sorumludurlar. Vücudun farklı kısımlarında fibroblastlar farklı embriyonik orijinlerden kaynaklanırlar. Örneğin yüzdeki fibroblastlar nöral krestten kaynaklanır. Doku bütünlüğünün korunmasında anahtar rol oynarlar. Doku lokalizasyonuna göre iki tip fibroblast tanımlanmıştır. Gingival fibroblastlar (GF) alveolar kemiği saran yumuşak bağ dokuyu meydana getirir. Bu fibroblastlar dokunun bütünlüğünü sağlayan ekstraselüler bileşenleri üretir ve korurlar. Periyodontal ligament fibroblastları (PDLF), dişi alveolusa sıkıca sabitleyen bağ doku bağlantısını üretir ve korurlar (125). PDLF sementoblast ve osteoblastlara farklılaşma kapasitesi açısından eşsizdir. PDLF periyodontal ligamentte dominant hücre popülasyonudur. PDLF ektomezenkimal kranial nöral krest hücrelerinden kaynaklanır. Gingival fibroblastlar mezenkimal orijindir ve gingival bağ dokusunun gelişim, reorganizasyon ve rejenerasyonu açısından önemlidirler. Her iki fibroblast türü de oral kavitenin tamir ve rejenerasyonu açısından önemlidir (126). İnsan gingival

fibroblastlarının (İGF) doku mühendisliğinde mezenkimal kök hücre kaynağı olduğu henüz keşfedilmiştir ve İGF'nin kondrojenik farklılaşma potansiyeli bulunduğu bildirilmiştir (127, 128).

2.4.3.2. Oral Fibroblastlar

Oral fibroblastların, periyodontal hastalıkların patogeneğinde PGE2, IL-1 β , IL-6 veya IL-8 gibi proinflatuar mediyatörleri ve sitokinleri üretme rolleri olduğu gösterilmiştir. En önemli fonksiyonları oral yara iyileşmesinde proteoglikanlar, kolajenler gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin farklı miktarlarını üretmektir. Ayrıca güncel çalışmalar kolajenin tekrar modellenmesi ve kolajen sentezi aktivitelerinin de bulunduğunu göstermiştir (129, 130). Oral fibroblastların, yara iyileşmesinin hızlanmasını destekleyen farklı karakteristiklere sahip olduğu gösterilmiştir. Oral mukoza; deri yaraları ile benzer iyileşme aşamalarına sahiptir; hemostazis, inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu ve bağ doku matriksinin tekrar modellenmesi (131).

2.5. Kolajen

Kolajen insan vücudunda en çok bulunan proteindir kuru vücut maddesinin yaklaşık %30'u kolajenden oluşur. Yapısal desteğin çoğunu oluşturan bu doğal protein bağ dokunun ana maddesidir. Bu fibröz yapısal proteinler deri, tendonlar, kemikler ve kırıkdağın kolajen fibrillerini meydana getirirler (129). Esnektiler ve yüksek gerilme gücüne sahiptirler. Bağ doku lifleri, bağ dokunun yapısal ihtiyaçlarına veya fonksiyonuna bağlı olarak değişen miktarlarda mevcuttur. İnsan vücudunda en az 28 tip kolajen vardır ve en çok bulunan tipleri I, II ve III'tür (23).

2.5.1. Kolajenin Yapısı

Işık mikroskopunda kolajen fibriller, 1-12 mikron kalınlığında, dallanan ve yakın demetlerle anastomoz oluşturan demetler halinde görülür fakat bireysel fibriller dallanmaz. Elektron mikroskopunda kolajen fibriller, liflerdeki kolajen moleküllerinin düzenli dizilimlerine bağlı olarak karakteristik çapraz çizgilenmeler (koyu ve açık bantlar) gösterirler. Kolajen fibriller, kolajen liflerin ince, iplik benzeri alt birim demetleri olarak görülür. Çapları kısmen aynıdır fakat farklı yerlerde ve farklı gelişim aşamalarına göre değişebilirler. Gelişmekte olan veya olgunlaşmamış dokularda, fibrillerin çapı 15 veya 20 nm kadar küçük olabilir. Yoğun düzenli bağ dokuda çapları 300 nm'e kadar ölçülebilir (örneğin ağır baskıları destekleyen tendonlar veya diğer

dokular). Fibril uzunluğu boyunca her 68 nm'de tekrarlayan aralıklı enine bir dizi bant yer alır. Bu düzenli bantlaşma modeli, fibrili oluşturan moleküllerin organizasyon yapısının alt birimlerini yansıtır. Kolajen molekülü yaklaşık 1 nm kalınlığında ve 300 nm uzunluğundadır. Bu moleküller tropokolajen molekülleri olarak bilinmektedir ve üçlü heliks şeklinde organize edilmiş üç polipeptit zincirinden (α zincileri) oluşmaktadır (23, 120, 130).

2.5.2. Kolajen Fibrillerinin Biyosentezi

Kolajen üretimi ve fibril oluşumu intraselüler ve ekstraselüler aktiviteleri takip eden kompleks bir süreçtir. Bütün fibriler kolajenlerin sentezi benzerlik göstermektedir lakin en detaylı olarak tip I kolajen incelenmiştir.

İntraselüler aktivite: Bu süreç fibroblastlarda, granüllü endoplazmik retikulumda (GER) başlar ve Golgi'de devam eder. Prokolajen (kolajen öncülü, α zincirler) üretimi ile başlar. Sonra posttranslasyonel değişiklikleri GER sisternalarında gerçekleşir. Oluşan polipeptit zincirinin spesifik prolin ve lizin birimlerinin hidroksilasyonu meydana gelir. Bu süreçte askorbik asit kofaktör olarak gereklidir. GER içerisinde spesifik Hyl birimine şeker bağlanması da (glikozilasyon) gerçekleşir. Karboksi-terminalinde globüler yapılar oluşur ve disülfid bağlarıyla sabitlenir ve bu yapılar üçlü heliksin oluşumu sırasında üç α zincirinin doğru dizilimini sağlar. Prokolajen üçlü heliks şeklini alır ve oluşan molekül prokolajendir (129). Golgi kompleksinde oligosakkaritler eklenir ve zincirler tamamlanır. Hücre yüzeyine daha sonra salınmak üzere veziküllerde paketlenen Golgi cisimciğinde gerçekleşir. Prokolajen salınımı ekzositoz ile gerçekleşir. Prokolajenin salınımından sonraki fibril oluşum aşamaları hücrenin dışında gerçekleşir (132).

Ekstraselüler aktivite: Kolajen fibril oluşumu için salgıdan sonra aşağıdaki aşamalar ekstraselüler boşlukta meydana gelir: Enzimatik bir süreçle prokolajen peptidazlar prokolajenin heliks olmayan uçlarını ayırır ve olgun tropokolajen moleküllerinin oluşumu meydana gelir. Tropokolajen molekülleri kendiliğinden baş kuyruğa gelecek şekilde birleşirler. Fibriler yapının oluşumu ve korunması yakın tropokolajen moleküllerinin lizin ve hidroksilizin birimleri arasında oluşan kovalent bağlarla gerçekleşir (23, 132, 133).

Tip I kolajen en sık bulunan ve en çok çalışılmış kolajendir. Organik kemik ağırlığının %90'ından fazlasını oluşturur, tendon, deri, ligament, kornea ve birçok interstisyel bağ dokusunun ana kolajenidir. Kolajen tip I üçlü heliksi genellikle iki benzer $\alpha 1(I)$ -zinciri ve bir $\alpha 2(I)$ zinciri ile oluşan heterotrimerden meydana gelir (133).

2.5.3. Kolajen Fibrillerinin Parçalanması

Vücuttaki tüm proteinler sürekli olarak parçalanır ve tekrar yapılır. Bu süreçler dokuların büyümesini ve tekrar modellenmesini sağlar. Kolajen moleküllerin yarılanma ömrü günlerden birkaç yıla kadar değişmektedir. Kolajen lifler proteolitik veya fagositik yollarla parçalanır.

Proteolitik parçalanma; Kolajenin ilk fragmentasyonu mekanik aşınma ve serbest radikallerin etkisi ile meydana gelir. Daha ileri parçalanma proteinazlar olarak bilinen spesifik enzimler ile devam eder. Oluşan kolajen parçaları sonrasında hücreler tarafından fagosite edilir ve lizozomal enzimler tarafından parçalanır (23, 132).

Fagositik parçalanma; hücre içinde gerçekleşir ve ekstraselüler matriks bileşenlerini ortadan kaldıran makrofajlar da sürece dahil olur. Fibroblastlar da fagositoz yapabilir ve lizozomlarında kolajen fibrilleri parçalayabilirler (23, 132).

2.6. Yara İyileşmesi

2.6.1. Yara Kavramı

Anatomik yapıda, dokunun (cilt, mukozal yüzeyler veya organ dokuları) fonksiyonunda ve bütünlüğünde riskli hasar veya bozulmalar meydana gelebilir (134). Yaraların tedavisi ve iyileşmesi insanlık kadar eski bir sanattır. İnsan atalarında, *Australopithecus africanus*'da, meydana gelen bir yaranın ilk belgelenen kanıtı yaklaşık 5 milyon yıl öncesine dayanmaktadır (135).

Genel olarak yaralar deri bütünlüğünün bozulması sonrasında meydana gelir ve yanık, mikrobiyal hasarlar, diyabet, iskemi, travma ve cerrahi etkileşimlerden kaynaklanabilirler. Özellikle ağız yaraları, travma, yineleyen ülserler, inflamasyon, radyasyon ve konjenital veya patolojik lezyonların ekstraksiyonu için cerrahi operasyonlar sonucu meydana gelebilir. Düzgün tedavi edilmemişse, ağız içi yaralar ağrıya, enfeksiyona ve sonrasında istenmeyen skar ve adezyona, disfaji, dizartri gibi

fonksiyonel eksikliklere ve kötü bir yaşam kalitesine yol açabilir ki bu da dış hekimliği biliminde yara iyileşmesinin gözlem ve tedavisinin neden önemli olduğunu gösterir.

Yaralar için nihai iyileşme zamanı gibi farklı ölçütlere dayalı, farklı sınıflandırmalar mevcuttur. Hasarın şekline göre yara çeşitleri aşınma, ezik/morarmalar, yırtılmalar, oyulmuş/kesilmiş yaralanmalar, delinme ve ateşli silah yaralanmalarıdır. Aşınma yaralarında derinin dış tabakası kazınır. Ezik/morarmalarda derinin kan damarları ve iç organlar parçalanabilir. Yırtılmalarda deri, müköz membranlar, kas ve iç organlar ayrılır veya yırtılır (134).

Dış çevreye maruziyete göre kapalı ve açık yaralar meydana gelebilir. Kapalı yaralar alttaki doku travma geçirdiği fakat deride hasar görülmediğinde oluşan yaralardır. Açık yaralar alttaki dokuyla birlikte deri tabakasının da hasar gördüğü yaralardır. Yara seviyesine göre tüm deri ve altındaki dokular tamamen delinebilir, adipoz doku, kaslar, tendon ve kemiklere ulaşabilir veya sadece deride kalabilir (136). Yaranın kontaminasyon derecesine göre temiz, temiz kontamine, kontamine ve kirli enfekte yaralar oluşabilmektedir (137).

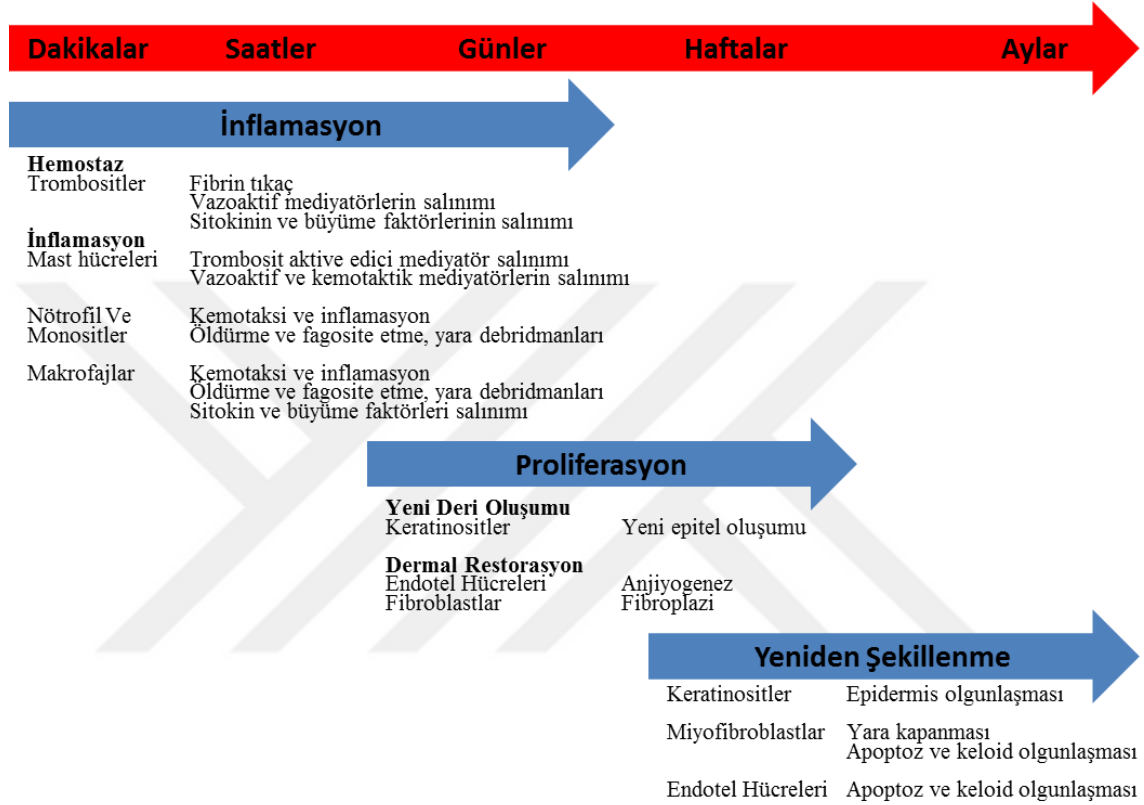
Yara iyileşmesi 3 kategoride sınıflandırılabilir: primer sekonder ve tersiyer yara iyileşmesi (16). Yara iyileşmesinde zaman önemli bir faktör olduğundan, yaralar klinik olarak akut ve kronik olarak sınıflandırılabilir. Akut yaralar genellikle travmatik doku kaybı veya cerrahi bir prosedürün sonucu olabilir. Sadece yumuşak dokuları içerebilir veya kemik kırıkları ile ilişkili olabilirler. Kendilerini tamir eden, zamanında ve düzgün bir iyileşme yolunu izleyerek hem işlevsel hem de anatomik restorasyon sonucuyla, normal şekilde ilerleyen yaralar ‘akut yaralar’ olarak sınıflandırılır. İyileşmenin zaman süreci genelde 5-10 gün arasında veya 30 gün içindedir. İlk yaralanmadan 6 hafta sonra gecikmiş iyileşme gösteren yaralara ‘kronik yaralar’ denir. Enfeksiyon, doku hipoksisi, nekroz, eksüdat ve aşırı inflamatuvar sitokin seviyeleri gibi çeşitli faktörler iyileşme sürecini uzatırlar (136, 138).

Yara iyileşmesi, birbirine bağlı biyokimyasal ve hücrel olayların iyi düzenlenmiş bir kaskadı tarafından kontrol edilen kompleks bir süreçtir. Çeşitli sitokinlerin, büyüme faktörlerinin keratinositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi hücre tiplerinin çapraz etkileşimiyle kontrol edilir ve yeni doku oluşumuyla sonuçlanır. Kutanöz ve mukozal yara iyileşmeleri dört temel evreden geçmektedir (139-141):

1. Hemostaz

2. İnflamasyon
3. Proliferasyon
4. Matürasyon ve yeniden şekillenme

Yara onarımının bu dört evresi basit doğrusal gelişen olaylar değildir, zamanlar birbirleriyle çakışır (Şekil 2-7), (142).



Şekil 2- 7: Yara iyileşmesi evreleri (142).

Yaralanma sonrasında vücutta hızlı bir tepki meydana gelir. Bu mekanizmaların ana amacı, devam eden kan ve sıvı kaybını önlemek, ikinci amacı ise iyileşmenin sonraki safhalarında ihtiyaç duyulan invaze hücreler için uzun vadeli bir matriks sağlamaktır (143). Endotel hücreleri, trombositler, pıhtılaşma ve fibrinoliz arasındaki dinamik denge hemostazı düzenler ve yara bölgesindeki fibrin miktarını belirler. Böylece onarım süreçlerinin ilerlemesini etkilerler. Yara oluşumu sırasında hasar gören kolajen pıhtılaşma kaskadı adı verilen bir dizi zincir reaksiyonunu aktifleştirir. Hasardan sonra hücre membranları etkin vazokonstriktör tromboksan A₂'i salgılar (144). Damarlar hızlı bir refleksle kasılmaya giderler. Küçük çaplı olan damarlar tamamen kapatılabilir. Tromboksan A₂'nin aktivasyonu ile bu trombositler geçici pıhtı oluşturarak başlangıçta

kanamayı azaltırlar. Daha sonraki aşamada trombositlerden salınan serotonin ve diğer vazokonstriktör ajanlarla vazokonstriksiyon gelişerek kanama azalır.

Pıhtılaşma trombositlerin fibrin bir ağda birikiminden meydana gelir. Fibrin ağ, homeostazı yeniden tesis etmeye ve mikroorganizmaların invazyonuna karşı bir bariyer oluşturmaya ek olarak hücre migrasyonu için gerekli geçici matriksi organize eder (145). Çözünmeyen bir fibrin tıkaçın oluşumu için hemostatik mekanizmalar uzun vadede tek başına yetersiz kalacaktır. Fibrin tıkaç nötrofiller, monositler, fibroblastlar ve endotel hücreler için iskele görevi görür. EGF (epidermal büyüme faktörü); FGF (fibroblast büyüme faktörü), IFN (interferon), IL (interlökin), KGF (keratinosit büyüme faktörü), PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü), TGF (dönüştürücü büyüme faktörü), TNF (tümör nekroz faktörü) gibi sitokin ve büyüme faktörlerini konsantre etmek üzere de görev alır (146, 147). Başlangıçta bu faktörlerle gelişen vazokonstriksiyon, prostaglandin ve kompleman sisteminin aktivasyonu, yerini yaygın vazodilatasyon ve inflamasyona bırakır. Vazodilatasyonla birlikte vasküler permeabilite de artar ve hücreler arasında inflamatuvar eksüda toplanır.

2.6.2. İnflamasyon

Doku hasarı ve vasküler aşamadaki pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu, prostaglandinler ve histamin gibi inflamatuvar mediyatörlerin, mast hücreleri gibi hücrelerden salınmasını stimüle eder. Bu mediyatörler hasarlı alana yakın kan damarlarının daha geçirgen olmasına ve vazodilatasyonuna sebep olur. İnflamatuvar cevap, bölgesel ısı, şişme, eritem, rahatsızlık ve fonksiyonel bozulmanın varlığıyla belirlenebilir (148).

İnflamatuvar aşamada amaç invaze mikroorganizmalara karşı bir immün bariyer oluşturmaktır. İnflamatuvar aşama, erken ve geç inflamatuvar faz olmak üzere iki ayrı evreye ayrılır. Erken inflamatuvar cevap birçok fonksiyona sahiptir. Kompleman kaskadını aktifleştirir ve moleküler olayları başlatır. Erken inflamatuvar aşamada nötrofiller ve monositler hasar bölgesindeki baskın hücrelerdir. Hasardan hemen sonra nötrofiller ve monositler, yaralı bölgedeki kapillerlere göç etmeye başlar. Nötrofiller bölgeye ilk ulaşan hücrelerdir ve çok sayıdadırlar. İnflamasyonda daha sonra nötrofil sayısı düşerken makrofajlar (doku kaynaklı monositler) hakim olur (142).

Nötrofiller yara bölgesine girerek invaze bakterileri ve hücresel artıkları temizlemeye başlar. Hasardan sonraki 48-72 saat sonra son inflamatuvar aşamada yarada

görülen hücreler lökositler ve makrofajlardır. Lezyon başladıktan 48 saat sonra komşu kan damarlarından monositler göç ederek lezyon alanına infiltre olur, yoğunlaşır ve yeni gen ekspresyon profillerini üreterek makrofajlara farklılaşırlar (145). Makrofaj yara iyileşmesi için gereklidir. Yarayı debride eden kolajenazlar, fibroblastları stimüle eden (kolajen üreten) ve anjiyogenezi destekleyen IL ve TNF ile keratinositleri stimüle eden TGF'nin de dahil olduğu çok sayıda enzim ve sitokinler, makrofajlar tarafından salgılanır.

Geç inflamatuvar fazda yaralı bölgeye son giren hücreler lenfositlerdir. Yaralanmadan 72 saat sonra interlökin-1 (IL-1), kompleman bileşenleri ve immünoglobülin G (IgG) parçalanma ürünleri ile lenfositler sahneye girerler. IL-1, daha sonra kolajenin yeniden şekillenmesi, ekstraselüler matriks bileşenlerinin üretilmesi ve parçalanması için gerekli olan kolajenaz regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (149).

2.6.3. Proliferatif Faz

Proliferatif faz yaralanmadan sonraki 3. günde başlar ve yaklaşık 24. güne kadar sürer (143). Fibroblast göçü ve yeni sentezlenen ekstraselüler matriksin birikimiyle karakterizedir. Matriks, fibrin ve fibronektinden oluşan geçici bir ağın yerini almak üzere görev alır. Bu aşamadaki ana süreçler: Fibroblast göçü ve proliferasyonu (fibroplazi), geçirgenlik bariyerinin oluşumu (reepitelizasyon), uygun kan desteğinin sağlanması (anjiyogenez) ve hasarlı dermal dokunun sağlamlaştırılmasıdır (149).

2.6.4. Fibroblastlar ve Kolajen Sentezi

Fibroblastlar ekstraselüler matriksin üretilmesinde ana hücrelerdir. Kolajen üretimine ek olarak fibronektin ve hyalüronik asit gibi ara madde bileşenlerini üretirler. Ekstraselüler matriksin üretimi klinik olarak granülasyon dokusunun oluşumu olarak görülür (150). Ekstraselüler birikimden sonra tamir sürecinde önemli bir olay olan yara büzülmesi, yara sınırlarını yaklaştırmayı sağlar. Bu görev de gerçekleştirildikten sonra ihtiyaç fazlası fibroblastlar apoptoz ile ortadan kaldırılır (149).

2.6.5. Reepitelizasyon

Epitelyal hücrelerin göçü yara oluşumunun ilk birkaç saati içerisinde yara sınırlarında başlar. Tek katlı hücre tabakası başlangıçta hasarın üzerinde oluşur ve

ardından yara sınırının etrafında epitelyal hücre mitotik aktivitesinde artış eşlik eder. İlerleyen epitelyal hücreler karşılaştığında göç durur ve bazal membran oluşmaya başlar (142, 143, 149).

2.6.6. Anjiyogenez

Anjiyogenez yara yakınında var olan damarların uzantılarıyla yeni damar büyümesi anlamına gelir. Yeni kan damarlarının şekillendirilmesi ve oluşturulması yara iyileşmesinde kritik önem taşır. Başlangıçta yara merkezinin damar kaynağı yoktur. Dolayısıyla hasarsız doku tarafından difüzyonla desteklenir. Çevreleyen kenarlardaki kapiller tomurcuklar, yara pıhtısının içine girer ve birkaç gün içinde yeni kapillerlerden oluşan bir mikrovasküler ağ oluşur (149). Hasara cevaben mikrovasküler endotelyal hücreler anjiyogenik süreçleri başlatır. Bu süreç endotelyal hücrelerin aktivasyonu, bazal membranın lokal yıkımı, yara tıkaçına doğru uzanma, tübül yapısı oluşumu, bazal membranın tekrar oluşturulması ve sonunda dokunun yeninden modellemesi için yeni oluşan damarlaşmanın kıvrılmasından oluşur (142).

Çeşitli maddeler üreten makrofaj aktivitesi anjiyogenezi stimüle eder. Bunlar arasında yeni doku ve kan damarları oluşumunu destekleyen TGF ve nekrotik dokunun parçalanmasını hızlandıran ve proliferasyonu stimüle eden TNF yer alır (148). Ayrıca yerleşik endotelyal hücreler FGF, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), PDGF, anjiyogenin gibi diğer anjiyogenik faktörlere karşı duyarlıdır. Anjiyostatin ve steroidler gibi inhibitör faktörlerin etkisiyle hassas denge korunmaktadır.

2.6.7. Matürasyon Aşaması

Yeniden şekillenme fazlarında ekstraselüler matriksin sentezi granülasyon dokusu gelişimiyle birlikte başlatılır ve birkaç ay sürer. Komplike vakalarda bu faz 1, 2 yıl veya daha fazla sürebilir (143, 149). Yara iyileşmesinin son aşaması olan yeniden modelleme aşaması yeni epitelin büyümesinden ve son skar doku oluşumundan sorumludur. Bu da sentez, birikme ve doku parçalanması arasındaki dengeyle sağlanır (151). Matürasyon ve yeniden modelleme aşamasında geçici ekstraselüler matriks aşamalı olarak olgun bir skara dönüştürülür. Bu süreçte granülasyon dokusunun tipik bileşeni olan tip III kolajen, normal insan dermisinin hakim bileşeni olan tip I kolajenle değiştirilir. Kolajen demetlerinin ilk birikimi fazlaca karmaşık iken yeni kolajen

matriksin matürasyonu sürecinde daha düzenli ve çapraz bağlı hale gelir. İyileşen doku 1 yıldan sonra orijinal gerilme gücünün %80'nini kazanır (142, 145, 150).

Yara iyileşmesini etkileyen çok sayıda lokal ve sistemik faktör vardır (144). Yara iyileşmesini büyük derecede etkileyebilen lokal faktörler: İskemik dokular, yabancı cisimli yaralanmalar, nekrotik dokular, enfeksiyon, kontaminasyon, radyoterapi, tütün tüketimi ve cerrahi tekniklerdir. Sistemik faktörler arasında yaş, anemi, beslenme, steroidler, sitotoksik ilaçlar, sepsis, diabetes mellitus, oksidatif stres (OS) gibi faktörler yer almaktadır (144).

2.7. 3T3 Swiss Albino Hücre Soyu ve Üç boyutlu Sferoit Kültürü

2.7.1. 3T3 Swiss Albino Hücre Soyu

Dental ajanların sitotoksik çalışmaları için kullanılan çok sayıda hücre tipi bulunmaktadır (152). Swiss Albino 3T3 fare fibroblastlarının farklı dental materyallerin toksik etkilerini test etmek ve sınıflandırmak için duyarlı ve kullanışlı olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (153-156). Dahası fare 3T3 hücrelerinde görülen sitotoksik etkilerin insan oral fibroblastlarıyla (pulpa kaynaklı fibroblastlar) benzer olduğu öne sürülmüştür. Dental adezifler gibi ajanların sitotoksitite testlerinde kullanılan 3T3 hücreleri, oral kavitede hedef hücrelerin spesifik fonksiyonlarının değerlendirilmesinin gerekmediği durumlarda kullanışlı bir model olarak kabul edilmektedir (152-155). 3T3 hücreleri kolayca çoğaltılarak çok sayıda elde edilebilir ve davranışları iyi bilinmektedir (152). Ayrıca bu hücre soyu uluslararası standartlara (ISO 7405) da uygundur (156).

3T3 hücre soyu 1962 yılında Todaro ve Green tarafından Swiss Albino fare embriyolarından alınarak üretilmiştir (157). Yapılan sitogenetik analize göre bu hipertriploit fare hücre soyunun kromozom sayısı hücrelerin %30'unda 68'dir. Hücreler kontak inhibisyon gösterebilir. Konflüent tek tabakalı hücre yoğunluğu 40.000 hücre/cm²'dir. Hücreler cam yüzeylerde değil plastik flasklarda büyütülmelidir. Satürasyon yoğunluğu yaklaşık 50.000 hücre/cm²'dir (158).

Primer hücreler kültürde önceden belirlenen ve sınırlı sayıda hücre bölünmesi geçirebilirken bu hücreler immortalize edildiği için süresiz olarak bölünebilecektir. Sınırlı popülasyon ikilemesinden (türler, hücre tipine ve kültür koşullarına göre değişebilen) sonra primer hücreler hücre döngüsünün durduğu bir evreye ulaşırlar. Bu duruma replikatif senesens denir (159). Hücreler yeterli yoğunlukta ekilerek sürekli

pasajlandığında, replikatif senesens, hücre morfolojisinde, gen ekspresyonunda ve metabolizmada farklı değişimlerle ortaya çıkar. İmmortal hücreler kültürlerde sürekli olarak bölünmeye devam ederler (157, 160).

2.7.2. Üç Boyutlu Sferoit Kültürü

Nanopartiküllerin, yeni dental materyallerin ve ilaçların inceleme çalışmaları temelde hala iki boyutlu (2D) hücre kültürlerine dayanmakta olup, genellikle sonraki aşamalarda in vivo deney hayvan modelleriyle devam edilmektedir. Geleneksel 2D hücre kültürü, ilaç incelemede in vitro test platformunda hala en yaygın tekniktir (161, 162). Üç boyutlu (3D) kültürlerde hücrelerin in vivo çevreyi, geleneksel 2D kültürlerle kıyasla daha iyi temsil ettiği bilinmektedir. Çok hücreli düzen, hücrelerin birbirleriyle ve ECM ile etkileşimine izin vererek hücrel kompleksitenin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. 3D hücre kültür metotları in vitro modellere yüksek derecede klinik ve biyolojik geçerlilik kazandırır. Bu durum özellikle, yabancı maddelerden arındırılarak küçük bir hücre agregatının büyütüldüğü sferoit kültürlerde geçerlidir. Sferoit kültürlerde hücreler buldukları alanda ekstraselüler matriks (ECM) salgılar ve asıl mikroçevrelerinden alınan hücrelerle iletişime geçebilirler (163).

Sferoit üretmek için farklı teknikler kullanılmaktadır. Kaydedilen en eski yöntem askıda damla metodudur. Hücre süspansiyonundan oluşturulan damlaları içeren kültür plağının ters çevrilmesinden sonra damlanın tabanına hücrelerin kendiliğinden çökmesiyle sferoitler oluşturulur. Diğer bir teknik olan statik sıvı kaplama tekniğinde hücre süspansiyonu aderent olmayan bir yüzeyde kültüre edilerek hücrelerin yüzey yerine birbirlerine yapışması sağlanarak hücre agregatı oluşturulur. Sferoitler santrifüjle de meydana getirilebilirler. Hücre agregatlarını oluşturmanın klasik metotları arasında, aderent olmayan örneğin agar jel kaplı plaklarda ve asılı damlada hücrelerin kültüre edilmeleri yer almaktadır (163).

Geleneksel 2D tek tabakalı kültürlerle kıyasla 3D kültür sistemleri, hücre-hücre etkileşimlerine ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşimlerine daha çok benzer bir model sağlar. Ancak mevcut sistemler oksijenizasyon, beslenme ve atık temizleme açısından in vivo dokuları destekleyen kompleks vasküler sistemlerden yoksundur. 3D kültürde büyüyen hücreler bu fonksiyonları sadece difüzyonla sağlayabilir. Küçük sferoitler için bu sistem problem oluşturmaz ancak daha büyük sferoitlerde zorluk çıkartabilir (161).

Küçük boyutlu sferoitler gerçek dokudaki kompleksliği göstermezken büyük sferoitler oksijen ve besinler için difüzyon limitasyonlarına sahiptir. Bu limitasyonlar sıklıkla nekrotik merkez oluşumunu indükler ve hücrelerin yaşama yeteneğini (viability) azaltır. Literatürde tavsiye edilen ideal sferoit büyüklüğü 100 ila 600 μm arasında değişmektedir (162-164).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3T3 hücre soyu kullanılarak oluşturulan in vitro deney modelinde ki çalışmamız İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doku Kültürü, Işık Mikroskopi, İmmünohistokimya ve Elektron Mikroskopi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereçler

3.1.1. Alet ve Teçhizatlar

7 numaralı kıvrık uçlu pens

11 ve 24 numaralı ince uçlu pensler

1-10 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

1-100 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

1-200 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

1-1000 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

0,5 - 10 µl şeffaf mikropipet uçları (Axygen Scientific: T-300)

200 µl sarı mikropipet uçları (CAPP Denmark Expell: 4130075)

100-1000 µl'lik mavi mikropipet uçları (Axygen Scientific: T-1000-B)

Steril transfer pipetleri (Cito Test: 31027003)

Otomatik pipetör (Ratiolab: Accupetta)

Steril serolojik pipetler 5ml (SPL Life Sciences)

Steril serolojik pipetler 10ml (SPL Life Sciences)

15 ml'lik, 17x120mm konik, steril polipropil santrifüj tüpleri (SPL Live Sciences: 50015)

50 ml'lik, 30x115mm, ucu konik, steril polipropil santrifüj tüpleri (SPL Live Sciences: 50050)

Polipropilen mikrosantrifüj tüpleri 1,5ml (Iso Lab)

Polipropilen kriyotüpleri 1,8ml (SPL Live Sciences: 43012)

6 kuyucuklu hücre kültür kapları (Biofil: TCP 011006)

24 kuyucuklu hücre kültür kapları (Biofil: TCP 011024)

25cm²'lik hücre kültür flaskları, 50 ml (Jet Biofil: TCF- 012-050)

75cm²'lik hücre kültür flaskları, 250 ml (Jet Biofil: TCF- 012-250)

25,4 x 76,2mm 1,0-1,2 mm kalın lamalar (IsoTherm)

Tek kullanımlık mikrofiltreler (Sartorius Stedim Biotech: 16534)
 15mm yuvarlak lamel (Marienfield: 0111550)
 Neubauer-İmproved Hemositometre (Marienfield: 0640010)
 Grid, 200 mesh, 3 mm, Cu (Electro Microscopy Sciences: Spi: 2020C)
 Grid, 300 mesh x 83µm, Cu (Sigma: G4901-1VL)
 Steril enjektörler 10ml/ 0,80 x 38mm (Beybi: 24.09001)
 Steril bisturi ucu, karbon çeliği (Broche: 0197)
 Sterilizasyon otoklav poşetleri (Assure Plus: # 83000)
 Sterilizasyon otoklav poşetleri (Euronda BA09025)
 Rt-PCR kabı (Axygen: PCR-96-FLT-BK)
 0.5 - 10 µl'lik filtreli mikropipet uçları (Axygen: TTF-20-C-HTR-S)
 200 µl'lik filtreli mikropipet uçları (Axygen: TT-200-C-HTR-S)
 1000 µl'lik filtreli mikropipet uçları (Axygen: TTF-1000-C-HTR-S)
 0.2 ml'lik PCR tüpü (Axygen: PCR-02-C)
 0.5 ml'lik PCR tüpü (Axygen: PCR-05-C)

3.1.2. Cihazlar

Laminar kabin (Esco: Class II)
 CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific: Heracell 150i)
 Vorteks mikser (BioCote: Stuart SA8)
 Santrifüj (Eppendorf: 5810R)
 Dijital çalkalamalı su banyosu (Fischer Scientific)
 Sıvı azot tankı (Thermo Scientific)
 20 L azot tankı (Thermo Scientific)
 Distile su cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium pro VF)
 UV'li steril bidistile su cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium 61215)
 Masaüstü otoklav (Thermo Scientific Varioklav: 25T)
 pH metre (Inolab: WTW730)
 Mikrosantrifüj (Package, 230V 50, Thermo Scientific: Espresso)
 Ultramikrotom (C. Reichert: Om U3)
 İnvirt (Ters) mikroskop (Olympus: IX71)
 Işık mikroskobu (Olympus: BX61)
 Elektron mikroskobu (Jeol: JEM-1011)

Spektrofotometre (Thermo Scientific: Nanodrop 2000)

Thermal cycler (Bio- Rad: T100)

Real time system (Bio-Rad: CFX connect)

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Dulbecco's modified eagle's medium DMEM high glucose (Hy Clone: SH30243.01)

Dulbecco's modified Eagle's medium Hams' F-12 DMEM - F12 (Lonza: Be12-719f)

Fetal bovine serum FBS (Capricorn Scientific: FBS-12A)

Penisilin- streptomisin (100X) solüsyonu (Gibco by Life Technologies: 15140-122)

Tripsin- EDTA solüsyonu 0.25 % (1X; Sigma Lifescience: T4049)

L-Glutamin 200 mM (100X) solüsyon (Gibco İnvitrogen: 25030)

Dimetil sülfoksit (Sigma- Aldrich: D2650)

2-Propanol (Merck Millipore: 1.09634.2511)

Metanol (Merk:1.06007.2500)

Paraformaldehit (Merck Millipore: 1040051000)

Formaldehit %37 (Carlo Erba Reagents: 415666)

Hidrojen peroksit (Merck: 10860.100)

Resveratrol \geq 99% HPCL (Sigma- Aldrich: 501-36-0)

Kemik kseno grefti, 0.5-1.2mm (Ti-oss®: 20-1217)

Bromodeoksiuridin (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)

Anti- BrdU primer antikoru (Abcam: BU1/75 ICR1)

Polivalent HRP kit 125 ml (Ultra vision Thermo Fisher Scientific: TL-125-HL)

AEC kromojen / Substrate detection kit (Scy Tek: ACJ125)

Gliserol yaklaşık 87% (Riedel- de Haen Sigma- Aldrich: 140501)

PBS (Genaxxon Scientific: D2000.0100)

Borik asit (Genaxxon Bioscience: M3273.0500)

Hidroklorik asit %37 (Merck: 100317.2500)

Di-Sodyum tetraborat dekahidrat (Merck: 1.06303.1000)

Agar (Multicell: 800-010-LG)

Millonig fosfat tampon 0.2M (Electron Microscopy Sciences: 11582-05)

% 25 gluteraldehit (Merck Millipore: 1.04239.0250)
 Osmium (VIII) oksit (Merck Millipore: 1.24505.0100)
 Absolü etil alkol (Carlo Erba Reagents: CAS N.64-17-5)
 Propilen oksit (Merck Millipore: 8.07027.1000)
 Araldite M (Fluka Analytical: 10951-250ml)
 Araldite M accelerator 960 (Fluka Analytical: 10952-250ml)
 Araldite M hardener 964 (Fluka Analytical: 10953-250ml)
 Toluidin mavisi (Merck: 7471451)
 Uranil asetat dihidrat (Riedel-de Haen: 31698)
 Kurşun (II) sitrat tribasic trihidrat (Sigma-Aldrich: 15326)
 Tri-sodyum sitrat dihidrat (Merck Millipore: 1.06448.1000)
 Sodyum hidroksit saf tabletler (Merck Millipore: 1.06462.1000)
 Steril su (Eczacıbaşı: P1605009)
 CellROX[®] Deep green reagent (Invitrogen: C10444)
 RNA izolasyon kiti (Jena Biosciences: PP 210S)
 SCRIPT cDNA sentez kiti (Jena Biosciences: PCR 511S)
 qPCR green master with UNG/lowROX kiti (Jena Biosciences: PCR-306S)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü Yöntemi

Çalışmamızda in-vitro iyileşme modellerinde yaygın olarak kullanılan 3T3 embriyonik fare fibroblast hücre soyu seçildi (165), hücreler Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalından alındı.

Çalışmamızda kullandığımız 3T3 hücrelerini in vitro çoğaltabilmek için öncelikle uygun besiyeri seçildi. Besiyeri olarak 1:1 DMEM-F12+DMEM Yüksek Glikozlu + %10 FBS (fetal bovine serum) + antibiyotik (100 ug/ml penicillin G + 100 ug/ml streptomycin) kullanıldı. 7,5 ml besiyeri içeren 25 cm²'lik flaslara hücre süspansiyonları ekildi. Hücreler medyum içeren flaslarda 37°C'de, %5 CO₂, %95 hava karışımı ve nem içeren inkübatörde kültüre edildi ve rutin olarak pasajlanarak çoğaltıldı.

İnvert mikroskopta hücrelerin %80-90 yoğunluğa ulaştığı gözlemlendikten sonra aşağıda belirtilen adımlar: Pasajlama, hücre dondurma veya deney kurumu gerçekleştirildi.

3.2.1.1. Pasajlama Yöntemi

- Kültür ortamından medyum uzaklaştırıldı.
- Hücrelere tripsin uygulanıp flask tabanına yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı.
- Tripsinin enzimatik etkisini sonlandırmak amacıyla flasklara besiyeri ilave edildi.
- 1000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenen hücre süspansiyonunun süpernatantı atıldı.
- Kalan hücre pelletine 1 ml besiyeri eklenip yeniden süspansiyon edildi.

3.2.1.2. Hücre Dondurma Yöntemi

Hücreler konflüensiye ulaştıktan sonra dimetil sülfoksit (DMSO) (Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich) ve medyumdan oluşan kriyoprezervasyon solüsyonu içerisinde kademeli olarak donduruldu.

Dondurma prosedürü için final çözeltisinde %10 konsantrasyonda olacak şekilde DMSO kullanıldı. Dondurma işlemi aşağıda belirtilen şekilde gerçekleşti:

- 1,8ml'lik steril santrifuj tüplerinde 800µl besiyeri+200µl DMSO karıştırılarak kriyoprezervasyon solüsyonu hazırlandı.
- Pasajdan elde edilen pellet hücre üzerine 1000µl besiyeri eklenip pipetaj yapıldı.
- Kriyoprezervasyon tüplerine önceden hazırladığımız 250µl kriyoprezervasyon solüsyonu + 250 µl hücre süspansiyonu eklendi.
- Kademeli dondurma işlemi gerçekleştirilebilmek için karışım ilk 1 gece -80°C de saklandı.
- Son aşamada -80°C den çıkarıp sıvı azot içerisine alındı.

3.2.2. Doz ve Zaman Belirleme Deneyleri

Çalışma başlangıcında kullanılan H₂O₂ (Hidrojen Peroksit, Merck), kemik grefti (Kemik ksenogrefti, 0.5-1.2mm Ti-oss®: 20-1217) ve RES (Resveratrol ≥ 99% HPCL, Sigma- Aldrich) için doz ve zaman belirleme deneyleri yapıldı. Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlandı.

3.2.2.1. H₂O₂ Doz ve Zaman Belirleme Deneyleri

H₂O₂, stok konsantrasyonda hazırlandı ve doz belirleme deneyleri yapıldı.

Pasajlama işleminden sonra elde edilen hücre pelleti süspansiyon edildi, 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapıldı. Uygun şekilde hazırlanan hücreler 24 saat kültüre edildi ve 24 saatin ardından farklı doz denemeleri yapıldı.

Literatürde farklı hücre soylarında H_2O_2 doz aralığı 0-1000 μ M olarak gösterilmiştir (101). Çalışmamızda 0 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 750 μ M ve 1000 μ M dozlarda H_2O_2 in vitro olarak denendi. Deneylerde 6 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı ve her kuyucuğa 3ml besiyeri eklendi. Dozların etkileri önce invert mikroskopta değerlendirildi, daha sonra PDT indeksleri incelendi ve ön deneyler sonucunda etkin doz belirlendi.

Ayrıca H_2O_2 'nin zamana bağlı etkileri yine literatür dikkate alınarak 1, 6, 12, 24 ve 48 saat olarak belirlendi ve yapılan ön deneyler sonucunda etkin olan zaman seçildi (166, 167).

3.2.2.2. Resveratrol Doz ve Zaman Belirleme Deneyleri

RES toz formda satın alındı. RES çözeltisi hazırlayabilmek için üretici firma tarafında önerilen çözücü olarak DMSO seçildi. 2mg RES, 50 μ l DMSO içinde çözüldü ve bu hazırlanan stok çözelti -20°C'de saklandı. Gerekli konsantrasyonlara ulaşabilmek için kültür medyumunu ile dilüe edildi ve sterilizasyon için filtreden geçirilerek kullanıldı.

RES'in etkileri doza bağlı farklılıklar göstermektedir. Literatürde kullanılan dozlar arasında en düşük doz 5 μ M (101), en yüksek doz ise 1000 μ M'dır (24). Etkin dozun belirlenmesi amacıyla 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M RES dozlarından oluşan ön-deney grupları oluşturuldu.

Pasajlama işleminden sonra elde edilen hücre pelleti süspansiyon edilip hücreler 12'li ve 24'lü kültür kaplarında, steril yuvarlak lameller üzerine ekildi ve her kuyucuğa 2ml besiyeri eklendi. Hazırlanan hücreler 24 saat kültüre edildi, ardından 48 saat süre ile farklı doz uygulamaları yapıldı.

Ön deneylerin sonuçlarında 10 μ M'ın üzerindeki dozlarda RES uygulamasının hücrelerde toksik etki yarattığı görüldüğü için deneye 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M dozlarla devam edildi. RES deney grupları şu şekilde belirlendi: Kontrol, 500 μ M H_2O_2 , 1 μ M RES, 5 μ M RES, 10 μ M RES, 500 μ M H_2O_2 +1 μ M RES, 500 μ M H_2O_2 +5 μ M RES, 500 μ M H_2O_2 +10 μ M RES.

Ayrıca PDT deneyleri için 6'lı kültür kaplarına hücreler doğrudan ekildi ve her kuyucuğa 3ml besiyeri eklendi.

Yukarda belirlenen yöntemle hücreler inkübe edildi PDT ve BrdU immünohistokimyasal işaretleme ile hücre proliferasyonu ve CellROX® floresan yöntemi ile ROS reaktivitesi incelendi.

3.2.2.3. Greft Materyal Deneyleri

Kemik greft modelinin uygulamasına yönelik olarak yine ön deney grupları oluşturuldu. Greft materyalin farklı mikroskopik incelemeleri için farklı uygulama modelleri oluşturuldu: İn vivo şartlardaki gibi normal salinle ya da besiyeri ile ıslatılmış lameller üzerine konuldu ve sonra üzerilerine hücre ekimi yapıldı. İki yöntem arasında belirli bir fark tespit edilmediği için diğer uygulamalarda standardı koruyabilmek için aşağıdaki işlemler uygulandı.

Pasajlama işleminden sonra elde edilen hücreler 12'li veya 24'lü kültür kaplarına, steril yuvarlak lameller üzerine ekildi ve her kuyucuğa 2ml besiyeri eklendi. Hazırlanan hücreler 24 saat kültüre edildi ve 24 saatin ardından farklı miktarda greft uygulamaları yapıldı.

Kemik greft materyali olarak kullandığımız Ti-oss® greft (G) miktarını belirlemek amacıyla 3T3 fibroblastları yukarıda belirtilen metotla ve literatüre uygun olarak kontrol, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml dozlarda G materyali ile inkübe edildi (168, 169).

PDT deneyleri için 6 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller kullanılmadan doğrudan ekim yapıldı ve her kuyucuğa 3ml besiyeri eklendi.

PDT, BrdU immünohistokimyasal analizi ile hücre proliferasyonu ve CellROX floresan yöntemi ile ROS reaktivitesi (oksidatif stres) incelendi.

3.2.3. İmmünohistokimya Yöntemleri

Hücre siklusunun S fazındaki hücreleri belirlemek amacıyla nukleozid timidinin sentetik bir analogu olan. bromodeoksiuridin (BrdU) ile işaretleme yöntemi kullanıldı. S fazında replike olan DNA'ya katılan BrdU, anti-BrdU antikorları ile işaretleme yapılarak tespit edildi.

Anti-BrdU immünohistokimya yöntemi için gerekli malzemeler hazırlandı. Hidroklorik asit %37 (Merck) distile su ile dilüe edilerek 2M HCl çözeltisi olarak hazırlandı. Borat buffer için toz borik asit (Genaxxon Bioscience) distile suda çözülerek 0,2M borik asit (stok A) olarak hazırlandı. Stok B için (Di-Sodyum Tetraborat

Dekahidrat, Merck) kullanıldı. Distile suda çözülerek 0,005M sodyum tetraborat elde edildi. Stok A 5,5ml ve stok B 4,5ml hacimlerde karıştırılarak 8,4 pH'lı borat buffer hazırlandı.

BrdU Uygulama Protokolü

- Deneyin son saatinde (47. saatin sonunda) 100µl 20 mM BrdU'dan besiyeri içerisine eklenip 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra 3x5 dakika 37°C'de PBS ile yıkama yapıldı.
- Hücreler oda sıcaklığında metanol (Merck) kullanılarak 5 dakika fikse edildi.
- 3x5 dakika oda sıcaklığında ikinci bir yıkama gerçekleşti.
- Fikse edilmiş hücreler 2M HCl ile 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.
- 2x5 dakika oda sıcaklığında borat buffer ile yıkama gerçekleşti.
- 3x5 dakika PBS ile yıkama yapıldı.
- Polyvalent HRP kitin 125 ml (Ultravision ThermoFisher Scientific: 125-HL) bloklama solüsyonu yardımıyla antijen bloklama uygulandı.
- PBS ile 1/200 dilüe etikten sonra primer antikorunu uygulanıp gece boyu inkübasyonda bırakıldı.
- Ertesi gün PBS ile 2x5 dakika yıkama yapıldı.
- Sekonder antikor ile 20 dakika inkübe edildi.
- PBS ile yıkama uygulandı.
- HRP solüsyonu ile 20 dakika inkübe edildi.
- PBS ile yıkandı.
- AEC Kromojen (AEC chromogen kit, Scy Tek: ACJ125) uygulandı ve invert mikroskopta kontrol edilerek uygun zamanda reaksiyon durduruldu.
- Gliserojelatin kullanılarak yuvarlak lameller kapatıldı. Gliserojelatin 5gr jelatin, 35ml gliserol ve 30 ml distile su 60°C de homojen bir kıvam alana kadar karıştırılarak hazırlandı.
- Fotomikroskopta Image J (Image J 1,51g NIH, USA) programı kullanılarak hücre sayımı yapıldı.

Image J programında BrdU immünopozitif ve negatif hücreler toplam beş alanda sayıldı ve yüzde oranları hesaplandı. Alanların ortalamaları alınarak hücrelerin proliferasyon düzeyleri tespit edildi.

3.2.4. Popülasyon İikilenme Zaman (PDT) Hesaplamaları

PDT hücre proliferasyon potansiyelini değerlendirebilmek için kullanılan bir saptama metodudur. PDT hesaplama yöntemi için 2 formül vardır: Kümülatif popülasyon ikilenmesi ve popülasyon ikilenme zamanı:

$$\text{Popülasyon ikilenmesi} = \text{Log} (\text{Toplam hücre sayısı} / \text{Ekilen hücre sayısı}) * 3,33$$

$$\text{Popülasyon ikilenme zamanı} = \text{Toplam zaman} / \text{Popülasyon ikilenmesi}$$

Çalışmamızda kullanılan H₂O₂, G ve RES için ayrı ayrı farklı dozlarda PDT hesaplandı.

İlk olarak pasajlama işlemden sonra elde edilen hücre pelleti süspanse edilip hücreler 1,5x10⁵ hücre/ml konsantrasyonunda olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür ortamına ekildi. Not: Her kuyucuğa önceden 3ml besiyeri eklenmişti. Hazırlanan hücreler 24 saat kültüre edildi ve 24 saatin ardından H₂O₂, G ve RES'in farklı doz uygulamaları yapıldı.

48 saat sonra, deneyin sonunda kültür ortamından medyum uzaklaştırıldı ve hücrelere tripsin verilip hücreler kaldırıldı. 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi ve süpernatantı atıldı. Kalan hücre pelletine 1 ml besiyeri eklenip yeniden süspanse edildi. Neubauer-Improved Hemositometre (Marienfield) kullanarak hücre sayımı yapıldı. Yukardaki belirtilen formüllerle PDT hesaplandı.

3.2.5. RT-PCR (Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

3T3 hücrelerinin H₂O₂, G ve RES uygulamalarının bağlı kolajen üretiminin nasıl etkilendiğini değerlendirmek için RT-PCR yapıldı. İlk etapta deney gruplarına ait hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı.

3.2.5.1. RNA İzolasyon Yöntemi

RNA izolasyonu için hazır ticari kitler kullanıldı (Spin Kolon yöntemine dayalı). Jena Bioscience PP-210S katalog numaralı (Almanya). Total RNA izolasyon kiti ile RNA izolasyon işlemi aşağıda belirtilen şekilde gerçekleşti. Çalışmanın tüm işlemleri buz üzerinde yapıldı.

- Hücreler -80°C'den çıkartılarak buz üzerine konuldu ve çözümleri beklendi.
- Tüpten 100µl örnek alınarak üzerine 500µl Lysis Buffer (2-Merkaptanol (2-ME) eklenmiş) eklendi ve 10 saniye boyunca vortekslendi.

- Kolon aktivasyonu için; spin kolon 2 ml tüp içerisine konuldu ve spin kolon içine 100 µl aktivasyon buffer eklendi.
- Tüpler santrifüje konularak 30 saniye boyunca 10.000g de santrifüj edildi.
- Tüplerin dibinde biriken sıvı atıldı.
- Örnek ve 2-ME içeren lizat içerisine 300µl izopropanol eklendi ve vortekslendi.
- Bu karışım spin kolon içerisine aktarılarak 10.000 g de 30 saniye boyunca santrifüj edildi.
- Tüpün dibinde biriken sıvı atıldı.
- Spin kolon içerisine etanol eklenmiş 700µl primer yıkama tamponu ilave edildi ve tekrar 10.000 g de 30 saniye santrifüj edildi.
- Tüp dibinde biriken sıvı atıldı.
- Spin kolon içine etanol eklenmiş 700µl sekonder yıkama tamponu ilave edildi ve tekrar 10.000g de 30 saniye santrifüj edildi.
- Tüp dibinde biriken sıvı atıldıktan sonra tüpler tekrar 10.000g'de 2 dakika santrifüj edildi ve kalan etanol kalıntıları uzaklaştırıldı.
- Spin kolon DNAaz/RNAaz içermeyen tüpler içine konuldu ve spin kolonun tam merkezine 50 ul elüsyon tamponu eklendi.
- Oda ısısında 1 dakika inkübe edildikten sonra 10.000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Tüp dibinde elde edilen RNA hemen -80°C'e konuldu.

RNA izolasyonu yapıldıktan sonra tüm örneklerin RNA konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Scientific Nanodrop 2000 cihazı ile ölçüldü. 1ul RNA örneği alınıp cihaza konularak konsantrasyon miktarı ve 260/280 ve 260/230 oranlarına bakılarak saflıkları belirlendi.

3.2.5.2. cDNA Sentezi

RNA eldesinden sonra cDNA işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının script cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi.

3.2.5.3. cDNA Reaksiyonu

cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları 100ng/ μ l olacak şekilde eşitlendi. Toplam hacim 20 μ l olacak şekilde reaksiyon örnek başına Tablo 3-1'deki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3- 1: cDNA sentez işlemi için örnek içerikleri

Malzeme	Miktar
RNAse içermeyen su	10 μ l
Script RT buffer	4 μ l
dNTP miks	1 μ l
Oligo dT Primer	0,5 μ l
DTT	1 μ l
RNAaz inhibitör	1 μ l
Enzim	0,5 μ l
RNA ürün	2 μ l

Enzim eklemeyen önce tüpe konulan tüm reaktifler birkaç kez pipet ile karıştırıldı. Tüm reaktifler ve örnek tüpe konulduktan sonra tüpler Bio-Rad termal döngü cihazına konularak cDNA reaksiyonu aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirildi.

42°C \longrightarrow 10 dakika

50°C \longrightarrow 60 dakika

70°C \longrightarrow 10 dakika

Bu süre sonunda elde edilen ürün -20°C'de saklandı.

3.2.5.4. RT-PCR Reaksiyonu

cDNA eldesinden sonra diğer işlem olan Real Time PCR işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının qPCR GreenMaster with UNG (Urasil-N-

Glikozilaz)/ low ROX kiti kullanılarak Real time PCR gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi.

Toplam hacim 20ul olacak şekilde Tablo 3-2'e göre gerçekleştirildi.

Tablo 3- 2: Real Time PCR işlemi için örnek içerikleri

Malzeme	Miktar
PCR grade Su	6,8µl
Real Time Master Miks	10µl
İleri (Forward) Primer	0,6µl
Geri (Reverse) Primer	0,6µl
cDNA ürün	2µl

Daha sonra 96 kuyucuklu kültür kabı içerisine konulan standart ve örnek karışımları Agilent Stratagene 3005P cihazına yerleştirilerek reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

50°C'de	→	2 dakika	
95°C'de	→	2 dakika	
95°C'de	→	15 saniye	} 40 siklus
56°C'de	→	40 saniye	
72°C'de	→	30 saniye	

Cihaz üzerinde EVA green deteksiyon seçildi ve deteksiyon step olarak 56°C belirlendi.

RT-PCR sonrası elde edilen Ct değerleri 2^{-ddCt} metodu kullanılarak değerlendirildi.

3.2.6. Oksidatif Stres Değerlendirme Tekniği

Canlı hücrelerde oksidatif stres seviyesi CellROX[®] Deep Green Reagent (Invitrogen) kullanılarak değerlendirildi. Uygulama yöntemi aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

- Deney sonlandırma öncesinde final konsantrasyonu 5 μ M olacak şekilde Cell ROX[®] Deep Green Reagent medyuma eklendi ve 30 dakika 37°C’de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 3x5 dakika oda sıcaklığında PBS ile yıkandı.
- Hücreler 15 dakika %3,7 formaldehitte oda sıcaklığında inkübe edilerek fikse edildi.
- PBS ile son bir yıkama yapıldıktan sonra yuvarlak lamellerin kapatılması yapıldı.
- İmmünofloresan mikroskop görüntülerinde Image J (Image J 1,51g NIH, USA) programı kullanılarak hücre sayımı yapıldı.

Image J programında ROS için pozitiflik ve negatiflik gösteren hücreler toplam beş alanda sayıldı ve yüzde oranları hesaplandı. Alanların ortalamaları alınarak hücrelerin oksidatif stres düzeyleri tespit edildi.

3.2.7. Hücre Migrasyon Test Yöntemi

H₂O₂, G ve RES ile yaptığımız doz deneylerinin sonucunda elde ettiğimiz bulgularla kontrol, 500 μ M H₂O₂, 1mg/ml G, 1 μ M RES, 1mg/ml G+1 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+1 mg/ml G, 500 μ M H₂O₂+1 μ M RES, 500 μ M H₂O₂ +1mg/ml G+1 μ M RES final deney gruplarını oluşturduk. Bu gruplar için deneyler aşağıda belirlenen şekilde gerçekleşti:

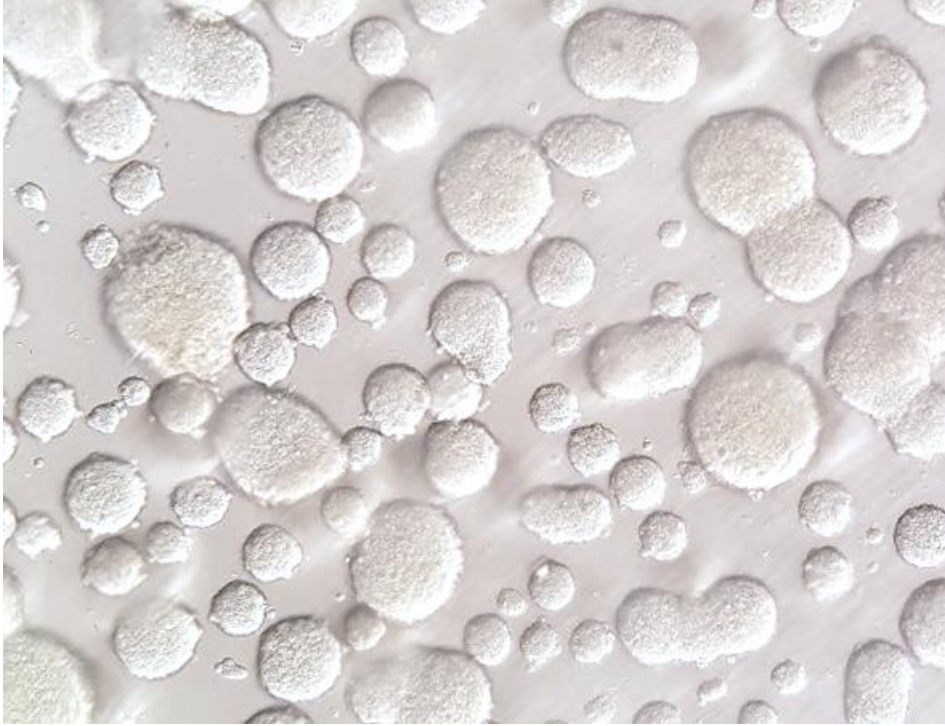
Pasajlama işleminden sonra elde edilen hücre pelleti süspansiyon edilip 24’lü kültür kaplarına, steril yuvarlak lameller üzerine ekildi ve her kuyucuğa 2ml besiyeri eklendi. Bu şekilde hazırlanan hücreler 24 saat kültüre edildi. 24 saatin sonunda lamellerdeki hücreler üzerinde pipet ucu yardımıyla yarıklar oluşturuldu. Yarık oluşturulmasına bağlı olarak besiyerinde yüzen hücreleri uzaklaştırabilmek için besiyerleri toplandı ve yeni besiyeri eklendi. Oluşturulan yarığın ölçümleri yapıldı. Sonra ilk G ve RES doz uygulamaları yapıldı ve 30 dakika sonra H₂O₂ dozu uygulandı. Deney 24 ve 48 saat süreyle gözlemlendi ve invert mikroskopta fotoğraflandı ve hücre ilerlemesi ölçülüp hücre migrasyonu değerlendirildi. $\Delta X(\mu\text{m}) = X1 - X2$ formülüne göre hesaplandı (X1: Yarık oluşturulduğu andaki mesafe, X2: Yarık oluşturulduktan 24 saat sonraki mesafe). 48. saat verilerinde in vitro yarıklar kontrol grubu da dahil olmak üzere tamamen kapandığı için değerlendirmeye alınmadı.

3.2.8. Elektron Mikroskop Analizi

Elektron mikroskopik analiz ve değerlendirmeleri için in vitro olarak oluşturduğumuz sferoitler kullanıldı.

3.2.8.1. Sferoit Oluşumu

Seroit oluşturabilmek için hücre ekimi yapılmadan 6 kuyucuklu kültür kapları steril edilmiş %2 agar ile kaplandı ve her kuyucuğa 3ml besiyeri eklendi. Pasajlama işleminden elde edilen hücreler agarla kaplı kültür kaplarına ekilip 24 saat süreyle 37°C'de, %5CO₂ ve %95 hava karışımı ve nem içeren inkübatörde kültüre edildi. Oluşturulan sferoitlerin invert mikroskopik görüntüsü Şekil 3-1'de verilmiştir.



Şekil 3- 1: 3T3 hücre sferoitleri.

Elektron mikroskopik incelemeler için gruplar: Kontrol, 500µM H₂O₂, 1mg/ml G, 1µM RES, 1mg/ml G+1µM RES, 500µM H₂O₂+1mg/ml G, 500µM H₂O₂+1µM RES, 500µM H₂O₂+1mg/ml G+1 µM RES şeklinde organize edilmiştir.

Final deney gruplarından elde edilen 3T3 fibroblastlarıyla oluşturulan sferoitler elektron mikroskopi takibi için seçildi. Büyük olan sferoitler mikropipet ucu ile ekarte edildi ve geri kalan sferoitler elektron mikroskopik takibe alındı. Takip prosedürü aşağıda belirlenen şekilde gerçekleşti:

- Deneyin 48. saatinin sonunda sferoitler toplanıp 15ml'lik santrifüj tüplerine alındı.
- 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı, pelletin üzerine 1ml PBS eklenip hafifçe çalkalandı.
- 1000 rpm'de 3 dk ikinci bir santrifüjden geçirildi ve PBS uzaklaştırıldı.
- Kalan pellet üzerine %2,5 glutaraldehit (Glutaraldehyde 25% Aqueous Solution (Merck Millipore) solüsyonu eklenip 1 saat boyunca +4°C'de inkübe edildi.
- Glutaraldehidi uzaklaştırmak için yine 1000rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı ve glutaraldehit atıldı.
- 1ml Millonig'in tamponu eklendi, 1000rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Pellet üzerine 1ml osmik asit eklenerek 30dk boyunca +4°C'de inkübasyon yapıldı, son 10dk 1000rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 1ml Millonig'in tamponu eklenerek yıkama yapıldı, 10 dk 1000rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Sferoitler %2 agara gömüldü ve yükselen alkol serisinden geçirerek standart takip prosedürleri ile devam ettirildi.
- %80, %96'lık alkollerde 10'ar dk ve %100 alkolde 2 x 10 dk.
- Propilende 2x10 dk tutuldu.
- 1:1 oranda propilen-araldit ve 1:3 oranda propilen-araldit 45'er dk inkübe edildi.
- Saf araldit ile 1 gece (20 saat) +4°C'de inkübe edildi.
- Son olarak polimerizasyon işlemini gerçekleştirebilmek için sferoitler yuvarlak kaplara dökülmüş saf araldite gömülüp 1 gece 45°C'de ve 2 gece 60°C'de inkübe edildi.
- Araldit bloklar küçültülerek ultramikrotomda yarı ince kesitler alındı.
- Tripan mavisi ile boyandıktan sonra uygun hücre alanlarından ultramikrotomla ince kesitler alındı.

Ultramikrotomla alınan ince kesitler uranil asetat çözeltisi ve Reynold'un kurşun sitratı ile kontrastlanarak transmisyon elektron mikroskopunda (Jeol: JEM-1011) değerlendirildi.

Kontrastlama yöntemi:

- Parafilmle kaplı lam üzerine uranil asetat çözeltisi damlatıldı ve üzerlerine gridler yerleştirildi. 45 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi.
- Gridler %50 alkol ve distile sudan geçirildi.
- Lam temizlenip kurulandıktan sonra Reynold'un kurşun sitratı ile 15 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta kontrastlandı.
- 2 defa distile sudan geçirilip incelenmek üzere hazır hale getirildi.

3.2.9. İstatistiksel Değerlendirmeler

Tüm gruplardan elde edilen en az beş parametrelili semikantitatif ve kantitatif veriler GraphPad InStat ver. 3.06 (GraphPad Inc, CA, USA) programı ile üç parametrelili RT-PCR ve PDT verileri ise SPSS (IBM SPSS Advanced Statistics 20.0, 2011) programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Ortalama veriler one way ANOVA ile gruplar arasındaki varyasyonlar Tukey-Kramer Multiple Comparison Test ve Tukey HSD Multiple Comparison Test ile karşılaştırıldı. $P<0.05$, $P<0.01$ ve $P<0.001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

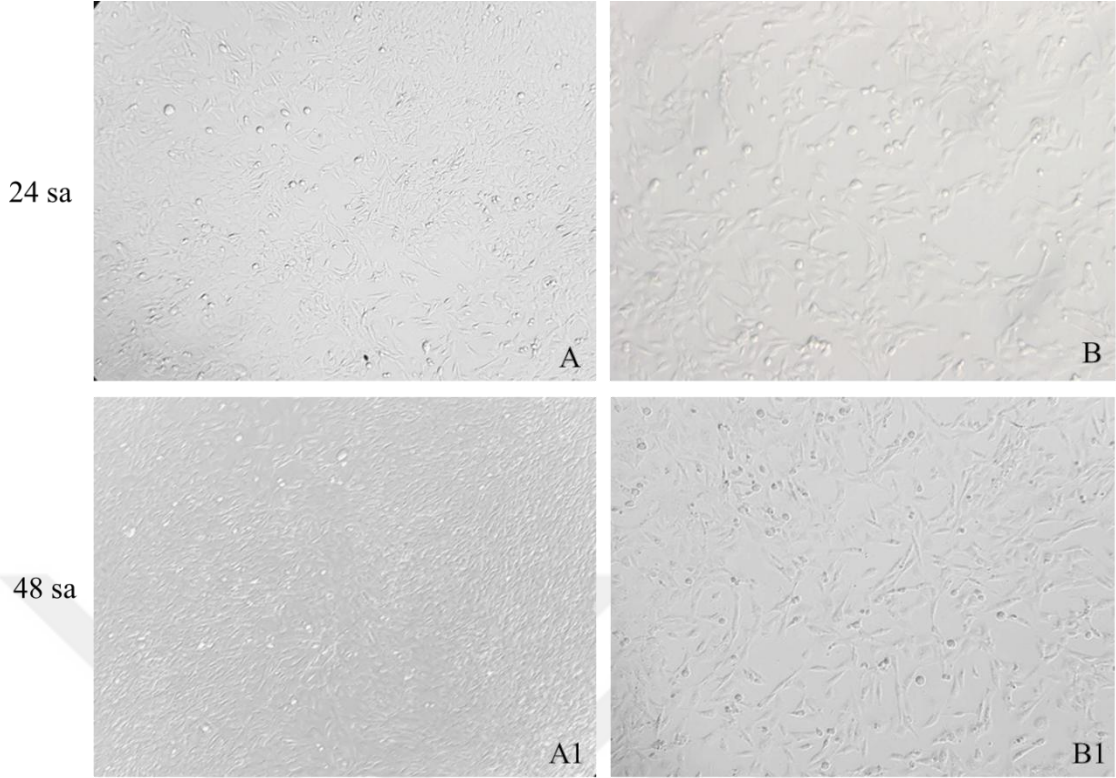
4.1. Doz Belirleme Denejlerinin Bulguları

Çalışma başlangıcında 3T3 hücre soju kullanılarak oluşturulan in-vitro modelde öncelikle H₂O₂ ve Ti-oss® (G) kemik greft materyali farklı doz ve zamanlarda uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda RES'in doz belirleme çalışmaları yapılarak deney grupları oluşturulmuştur.

4.1.1. H₂O₂ Bulguları

Ön deney grupları olarak kontrol, 10µM, 25µM, 50µM, 100µM, 250µM, 500µM, 750µM ve 1000µM dozlarda H₂O₂ in vitro olarak 24 ve 48 saat sürelerle denenmiştir. İvert mikroskopta yapılan değerlendirmede 750µM ve üzerindeki dozun toksik olduğu ve canlı hücrelerin tamamen ortadan kalktığı görüldü, 500µM hücrelerin korunduğu en yüksek doz olarak tespit edildi (Şekil 4-1).

İvert mikroskopta yapılan ön inceleme sonuçları doğrultusunda 3T3 hücreleri 24 ve 48 saat boyunca 10-500µM arası dozlarda H₂O₂ ile kültüre edildi ve PDT indeksleri incelendiğinde 48 saatlik bütün doz gruplarında, 24 saatlik gruplara kıyasla anlamlı değişiklikler saptandı. Bu nedenle deney modelinde 48 saatlik H₂O₂ uygulaması tercih edildi ve 100µm H₂O₂ dozundan itibaren hücrelerin PDT indekslerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edildi (Tablo 4-1, Şekil 4-2). 100 µm H₂O₂ dozunda PDT indeksinde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 5 saatlik anlamlı bir artış görülürken ($P<0,05$), bu indeks 500 µM dozunda kontrol grubunun yaklaşık 2 katına çıktı ($P<0,001$). PDT sonuçlarımız doğrultusunda 48 saatlik 500µM H₂O₂ dozu etkin doz olarak seçildi ve diğer deney modellerinde bu doz ve zamanda kullanıldı



Şekil 4- 1: 3T3 hücrelerinin A, A1) kontrol grubunda ve B, B1) belirlenen 500μM dozunda H₂O₂ grubunda 24 ve 48 saatlik invert mikroskop fotomikrografları, X10.

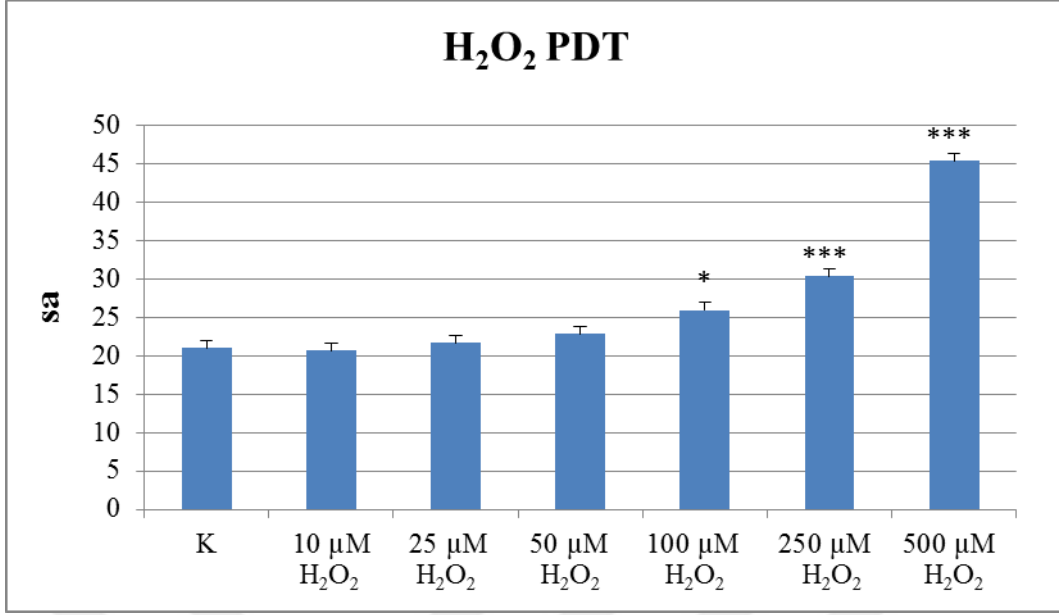
Tablo 4- 1: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda H₂O₂ (10μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM ve 500 μM) gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları.

Gruplar	Ort ± SEM (sa)	P ^a	P ^b
Kontrol	20,74 ± 0,40	-	<0,001
10μM H₂O₂	20,71 ± 0,14	>0,05	<0,001
25μM H₂O₂	21,78 ± 0,10	>0,05	<0,001
50 μM H₂O₂	23,69 ± 0,41	>0,05	<0,001
100μM H₂O₂	25,98 ± 0,23	<0,05	<0,001
250μM H₂O₂	30,35 ± 0,15	<0,001	<0,001
500μM H₂O₂	45,37 ± 2,73	<0,001	-

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

b; 500 μM H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı.

Ort ± SEM: Ortalama ± Standart hata ortalaması.



Şekil 4- 2: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda H₂O₂ (10µM, 25µM, 50µM, 100µM, 250µM ve 500µM) gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları grafiği. Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, *P<0,05 ve ***P<0,001.

4.1.2. Kemik Greft Bulguları

Kemik greft materyali olarak in vitro deney modelimizde kullandığımız Ti-oss® dozlarını belirlemek amacıyla 3T3 fibroblast hücrelerini literatüre uygun olarak kontrol, 0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml dozlarda G materyali ile inkübe ettik. PDT indeksi (Tablo 4-2, Şekil 4-3) ve BrdU immünohistokimyasal analizleri ile hücre proliferasyonunu (Tablo 4-3, Şekil 4-4, Şekil 4-5) ve cellROX floresan yöntemi ile oksidatif stres reaktivitesini inceledik (Tablo 4-4, Şekil 4-6, Şekil 4-7).

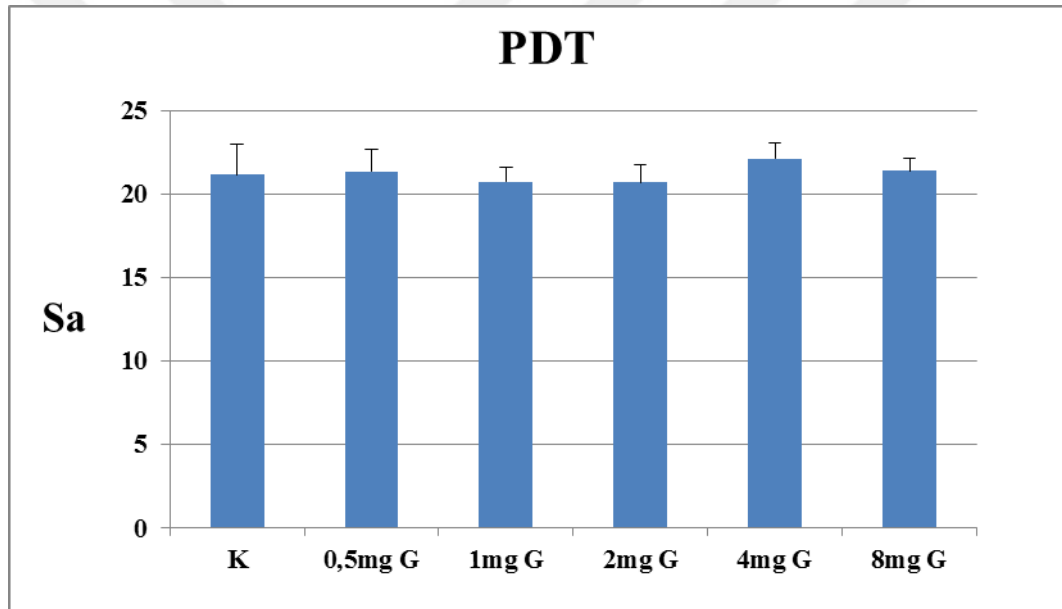
G uygulanan 3T3 fibroblast hücrelerinin PDT sonuçlarına göre kontrol ve doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark tespit edilmedi (P>0,05). Bu bulgular greft materyalinin farklı dozlarının biyo-uyumlu olduğunu göstermiştir. Ancak doz grupları arasında anlamlılık olmamasına rağmen yüksek dozlarda 4 mg/ml PDT indeksinde yaklaşık 1 saatlik artış kaydedildi.

Tablo 4- 2: 3T3 hücrelerinin farklı oranlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan grupların PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları.

Gruplar	Ort ± SEM (sa)	P ^a
Kontrol	21,14 ± 1,83	-
0,5mg/ml G	21,33 ± 1,33	>0,05
1mg/ml G	20,74 ± 0,87	>0,05
2mg/ml G	20,71 ± 1,05	>0,05
4mg/ml G	22,13 ± 0,94	>0,05
8mg/ml G	21,36 ± 0,75	>0,05

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Ort ± SEM: Ortalama ± Standart hata ortalaması



Şekil 4- 3: Farklı oranlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan gruplarda 3T3 hücrelerinin PDT (%) sonuçları grafiği.

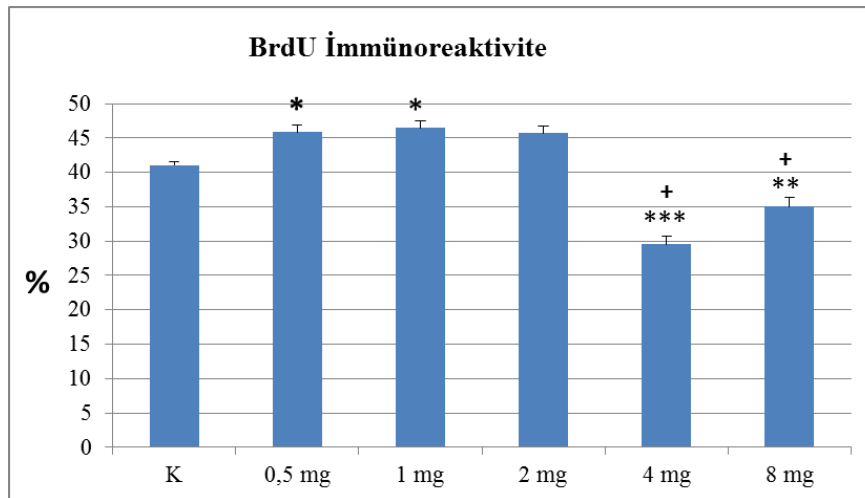
4.1.3. Kemik Greft Gruplarında BrdU İmmünoreaktivitesi

3T3 fibroblast hücrelerinin pozitif BrdU immünoreaktivite sonuçlarına göre 0,5 mg/ml ve 1mg/ml dozlarda G ile inkübe edilen hücrelerin proliferasyonlarında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışlar gözlemlendi ($P<0,05$) ancak 2mg/ml grubunda görülen artış anlamlılık göstermedi (Tablo 4-3, Şekil 4-4, Şekil 4-5). Proliferasyon indeksinde 4 mg/ml ve 8mg/ml G gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalma kaydedildi ($P<0,001$ ve $P<0,01$). Bu gruplar 1mg/ml grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklar görüldü ($P<0,001$). Dolayısıyla en yüksek proliferasyon oranı 1 mg/ml G dozunda görüldüğü için bu doz etkin doz olarak seçildi ve diğer deney modellerinde kullanıldı.

Tablo 4- 3: Farklı dozlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan gruplarda 3T3 hücrelerinin BrdU pozitif immünoreaktivite (%) sonuçları.

Gruplar	Ort \pm SEM	P ^a	P ^b
Kontrol	41,04 \pm 0,42	-	<0,05
0,5mg/ml G	45,82 \pm 1,23	<0,05	>0,05
1mg/ml G	46,45 \pm 1,20	<0,05	-
2mg/ml G	45,66 \pm 1,56	>0,05	>0,05
4mg/ml G	30,67 \pm 0,97	<0,001	<0,001
8mg/ml G	35,04 \pm 1,45	<0,01	<0,001

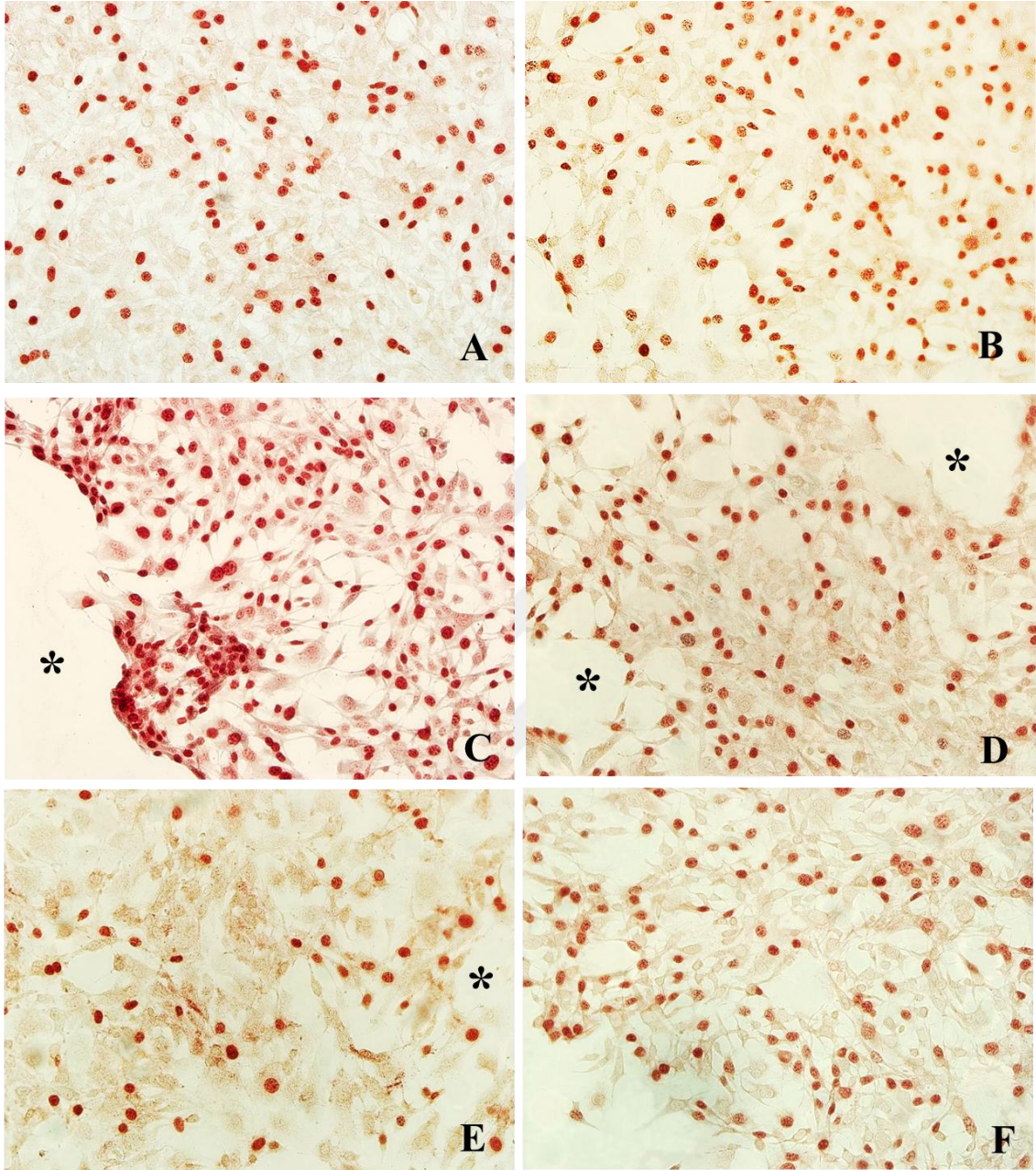
a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı. b; 1mg/ml G grubu ile karşılaştırıldı. Ort \pm SEM: Ortalama \pm Standart hata ortalaması.



Şekil 4- 4: Farklı oranlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan 3T3 hücre deney gruplarında BrdU immünoreaktivite (%) sonuçları.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, * $P<0,05$, ** $P<0,01$ ve *** $P<0,001$

1mg/ml G grubu ile karşılaştırıldı, + $P<0,001$ değerleri anlamlı kabul edildi.



Şekil 4- 5: Farklı oranlarda greft uygulanan 3T3 hücre gruplarında, kırmızı renk reaksiyonu veren BrdU pozitif hücre fotomikrografları.

A: Kontrol, B: 0,5mg/ml G, C: 1mg/ml G, D: 2mg/ml G, E: 4mg/ml G ve F: 8mg/ml G). (*) greft bulunan alanlara ait boşluklar, X20.

4.1.4. Kemik Greft için Oksidatif Stres Bulguları

3T3 fibroblast hücrelerinin reaktif oksijen türevleri (ROT) ile okside olan ve floresan mikroskopta değerlendirilen oksidatif stres reaktivite sonuçlarına göre 0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml oranlarda G ile inkübe edilen hücrelerde kontrol grubuna ve 1mg/ml doz grubuna kıyasla anlamlı değişiklikler saptanmadı (Tablo 4-4, Şekil 4-6, Şekil 4-7). Elde edilen bulgular uygulanan G miktarlarının 3T3 fibroblast deney modelinde oksidatif strese yol açmadığını gösterdi. Bu nedenle proliferasyon bulgularına göre seçilen 1mg/ml G dozuyla deney modeline devam edilmesine karar verildi.

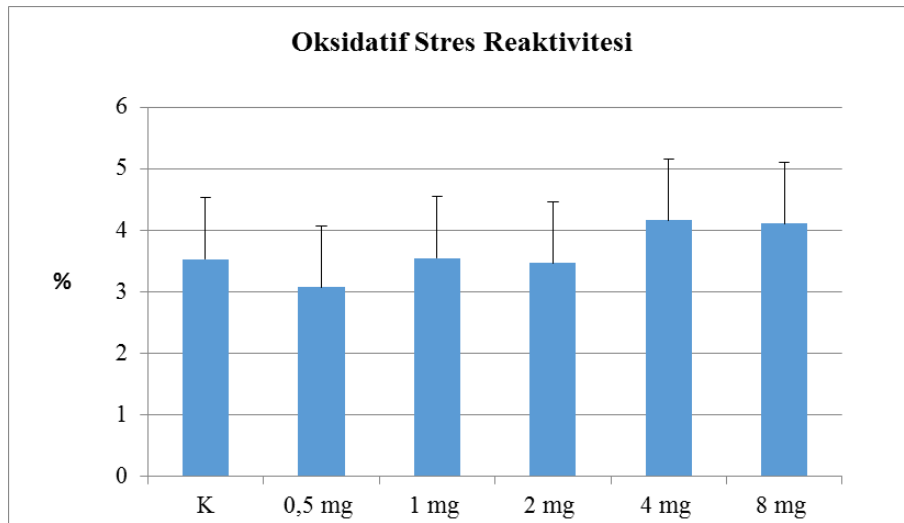
Tablo 4- 4: 3T3 hücrelerinin farklı oranlarda greft (0,5 mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan gruplarında oksidatif stres reaktivite (%) sonuçları.

Gruplar	Ort ± SEM	P ^a	P ^b
Kontrol	3,52 ± 0,62	-	>0,05
0,5mg/ml G	3,07 ± 0,42	>0,05	>0,05
1mg/ml G	3,55 ± 0,48	>0,05	-
2mg/ml G	3,46 ± 0,48	>0,05	>0,05
4mg/ml G	4,16 ± 0,42	>0,05	>0,05
8mg/ml G	4,11 ± 0,83	>0,05	>0,05

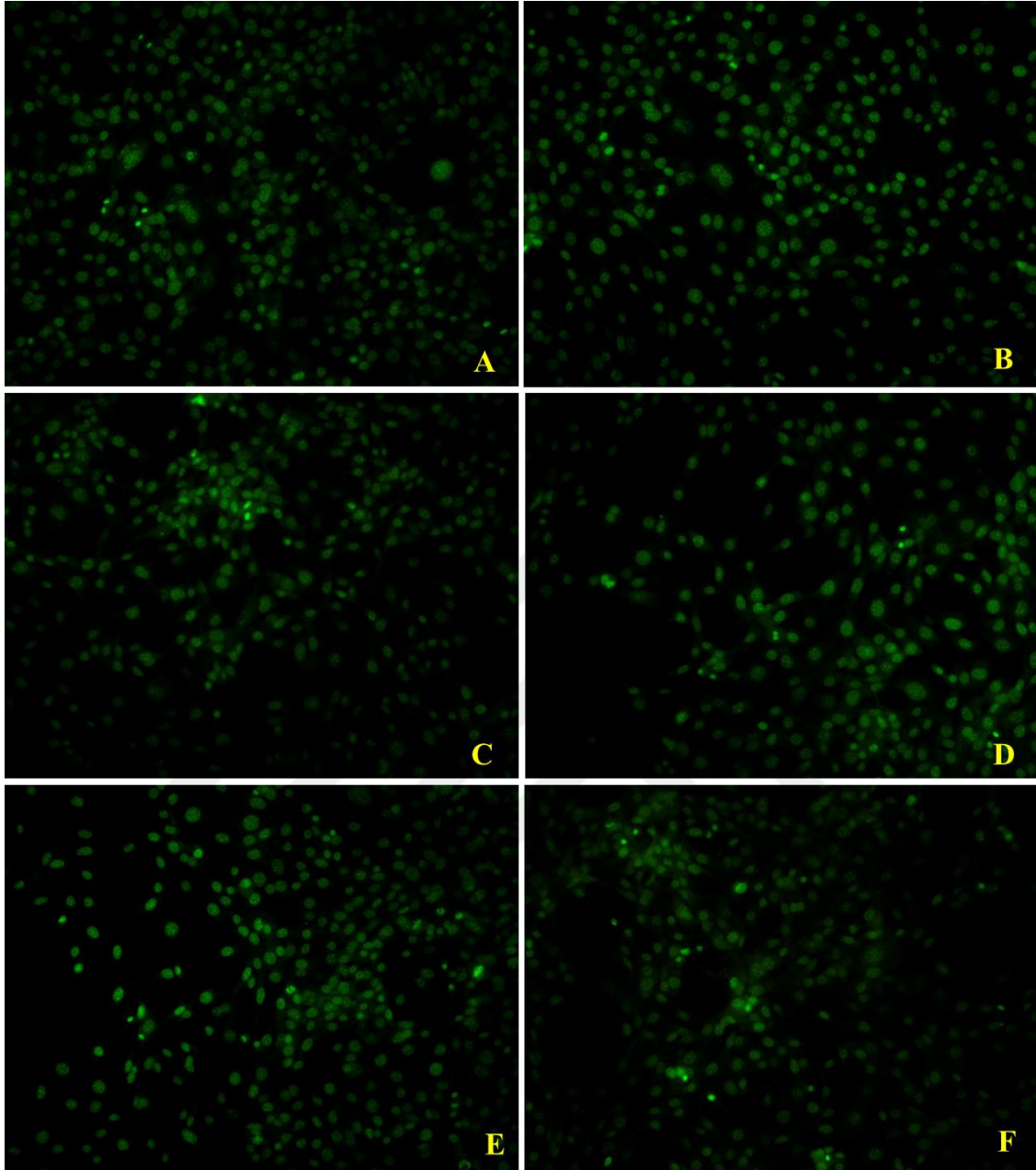
a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

b; 1mg/ml G grubu ile karşılaştırıldı.

Ort ± SEM: Ortalama ± Standart hata ortalaması.



Şekil 4- 6: 3T3 hücrelerinin farklı oranlarda greft (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml ve 8mg/ml G) uygulanan gruplarında oksidatif stres reaktivitesi (%).



Şekil 4- 7: Farklı oranlarda greft A: Kontrol, B: 0,5mg/ml, C: 1mg/ml, D: 2mg/ml, E: 4mg/ml ve F: 8mg/ml G uygulanan deney gruplarında oksidatif strese sahip hücreler floresan mikroskopta ROT'ların oksidasyonu ile parlak yeşil reaktivite göstermektedir, X20.

4.1.5. Resveratrol Bulguları

RES için oluşturulan in-vitro modelde etkin dozun belirlenmesi amacıyla 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M dozlarda RES kullanılarak ön deneyler yapıldı. 10 μ M üzerindeki dozlarda RES uygulaması hücrelerde toksik etki yarattığı ve hücreleri tamamen ortadan kaldırdığı için deneye 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M dozlarla devam edildi. RES antioksidatif etkisini belirlemek için deney gruplarımız şu şekilde belirlendi: Kontrol, 500 μ M H₂O₂, 1 μ M RES, 5 μ M RES, 10 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+1 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+5 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+10 μ M RES. Etkin doz seçimi için hücrelerin PDT indeksi, BrdU immünohistokimyasal analizi ve CellROX floresan yöntemi ile ROT reaktivitesi incelendi.

PDT indeksi değerlendirildiğinde 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M dozlarda RES ve H₂O₂+1 μ M RES gruplarının kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği belirlendi. Ancak H₂O₂+5 μ M RES ve H₂O₂+10 μ M RES gruplarının PDT indekslerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar kaydedildi (Tablo 4-5, Şekil 4-8). H₂O₂+5 μ M RES grubunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 katlık bir artış görülürken (P<0,01) H₂O₂+10 μ M RES grubunda yaklaşık 2,5 kat artış görüldü (P<0,001). H₂O₂+1 μ M RES grubu ile diğer grupların PDT indeksleri karşılaştırıldığında: H₂O₂ grubuna kıyasla H₂O₂+1 μ M RES grubunda hücrelerin daha hızlı bölündüğü (diğer bir deyişle PDT indeksinin azaldığı) anlamlı değişiklik kaydedildi (P<0,05). Buna karşın H₂O₂+5 μ M ve H₂O₂+10 μ M RES gruplarının H₂O₂ grubu ile benzer PDT indeksine sahip olduğu ve H₂O₂+1 μ M RES grubuna kıyasla hücrelerin daha yavaş bölündüğü ve PDT indeksindeki bu artışın H₂O₂+10 μ M RES grubunda anlamlı olduğu tespit edildi (P<0,01).

Tablo 4- 5: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H₂O₂ uygulanan gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları.

Gruplar	Ort ± SEM	P ^a	P ^b	P ^c	P ^d
	(sa)				
Kontrol	20,49 ± 0,61	-	<0,001	>0,05	>0,05
H₂O₂	46,78 ± 5,08	<0,001	-	<0,001	<0,05
1 µM R	20,52 ± 0,84	>0,05	<0,001	-	>0,05
5 µM R	21,60 ± 0,80	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05
10 µM R	23,53 ± 0,37	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05
H₂O₂+1µM R	30,65 ± 0,89	>0,05	<0,05	>0,05	-
H₂O₂+5µM R	39,12 ± 3,83	<0,01	>0,05	<0,01	>0,05
H₂O₂+10µM R	49,75 ± 3,53	<0,001	>0,05	<0,001	<0,01

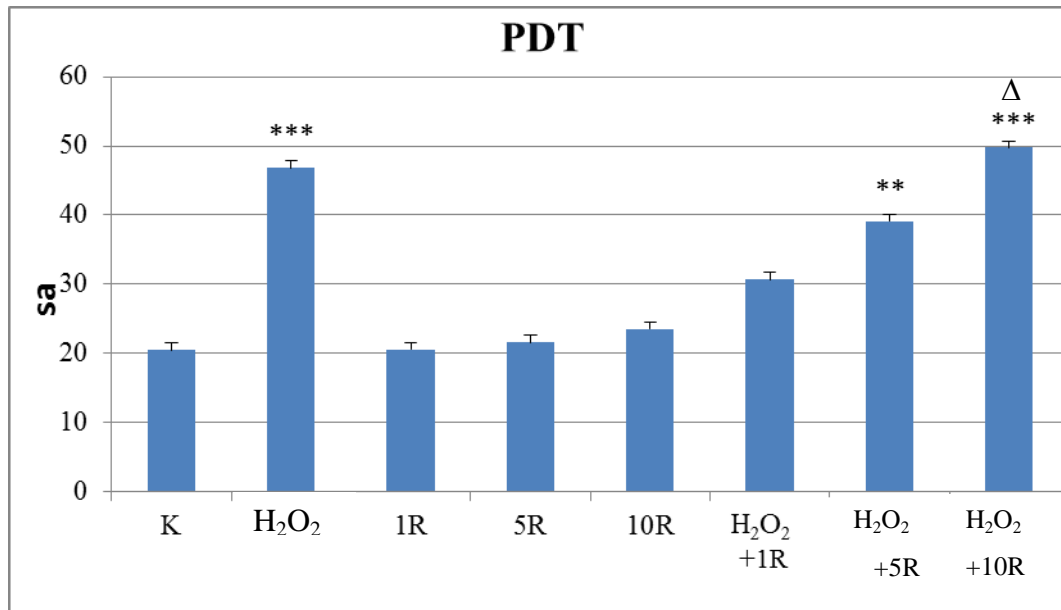
a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

b; 500µM H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı.

c; 1µM R grubu ile karşılaştırıldı.

d; 500µM H₂O₂+1µM R grubu ile karşılaştırıldı.

Ort ± SEM: Ortalama ± Standart hata ortalaması



Şekil 4- 8: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H₂O₂ gruplarında PDT (%) sonuçları grafiği.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, ***P<0,001 ve **P<0,01.

500µM H₂O₂+1µM R grubu ile karşılaştırıldı, Δ P<0,01.

4.1.6. Resveratrol Gruplarında BrdU İmmünoreaktivitesi

Resveratrolün etkin dozunu seçmek üzere oluşturulan kontrol, 500 μ M H₂O₂, 1 μ M RES, 5 μ M RES, 10 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+1 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+5 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+10 μ M RES gruplarının BrdU immünoreaktivitesi değerlendirildi. Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında H₂O₂ grubunda önemli bir proliferasyon düşüşü (P<0,001) görülürken 1 μ M ve 5 μ M RES gruplarında proliferasyon artışlarına rastlandı ancak 1 μ M RES grubundaki artış anlamlıydı ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında en yüksek orandaydı (P<0,05) (Tablo 4-6, Şekil 4-9, Şekil 4-10). H₂O₂+1 μ M RES grubunda kontrol grubu ile benzer proliferasyon oranlarına rastlanırken H₂O₂+5 μ M ve H₂O₂+10 μ M RES gruplarında kontrol grubuna kıyasla proliferasyonda düşüşler kaydedildi fakat sadece H₂O₂+10 μ M RES grubundaki düşüş istatistiksel olarak anlamlıydı (P<0,001). 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M RES grupları arasında karşılaştırma yapıldığında doz artışıyla birlikte proliferasyon oranlarının azaldığı tespit edildi, 1 μ M ve 5 μ M RES grupları arasındaki fark anlamlı değilken 1 μ M ve 10 μ M grupları arasındaki fark anlamlıydı (P<0,001). H₂O₂+1 μ M, H₂O₂+5 μ M ve H₂O₂+10 μ M RES grupları sadece 1 μ M RES grubu ile karşılaştırıldığında giderek artan oranlarda anlamlı proliferasyon azalmaları kaydedildi ve en fazla azalma H₂O₂+5 μ M ile H₂O₂+10 μ M RES gruplarında görüldü. H₂O₂+1 μ M grubunun proliferasyon oranı diğer gruplarla karşılaştırıldığında, H₂O₂+5 μ M ile aralarında istatistiksel bir fark görülmezken, H₂O₂+10 μ M RES grubunda ciddi bir düşüş gözlemlendi (P<0,001). Ayrıca H₂O₂+5 μ M ve H₂O₂+10 μ M RES grupları da kendi aralarında anlamlı olarak farklıydı (P<0,001). Bu nedenle deney modelinde 1 μ M RES dozu hücre proliferasyonunda etkin doz olarak seçildi.

Tablo 4- 6: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H₂O₂ uygulanan gruplarında BrdU immünoreaktivite (%) sonuçları.

Gruplar	Ort ± SEM	P ^a	P ^b	P ^c	P ^d	P ^e
Kontrol	42,90 ± 1,12	-	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05
H₂O₂	22,42 ± 1,40	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001
1µM R	48,92 ± 1,70	<0,05	<0,001	-	<0,05	<0,001
5µM R	44,98 ± 1,38	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05
10µM R	38,59 ± 1,06	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05
H₂O₂+1µM R	41,92 ± 0,85	>0,05	<0,001	<0,05	-	>0,05
H₂O₂+5µM R	39,16 ± 1,49	>0,05	<0,001	<0,001	>0,05	-
H₂O₂+10µM R	29,93 ± 0,84	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

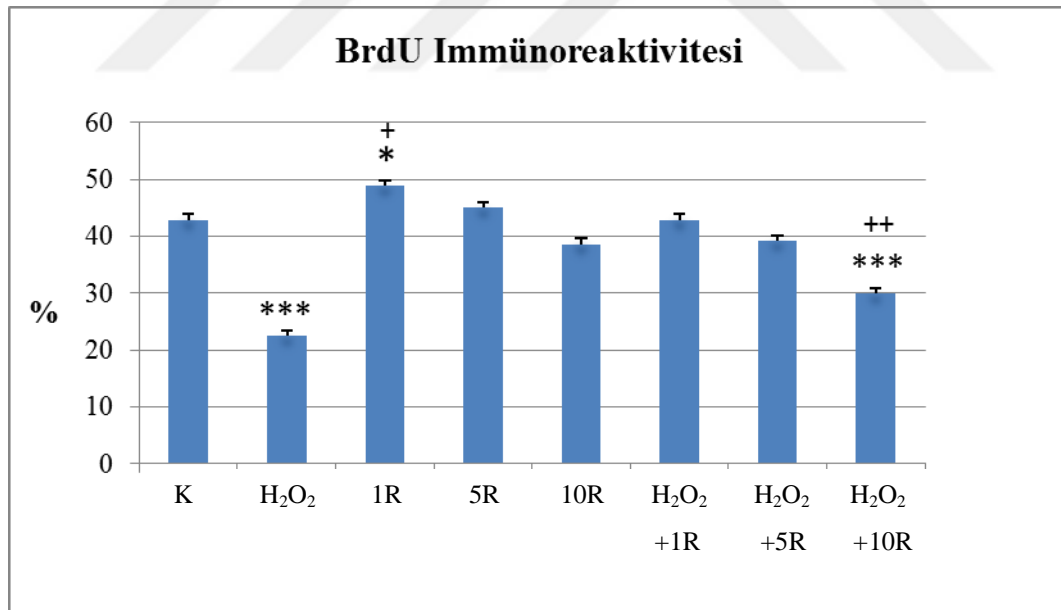
b; H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı.

c; 1µM R grubu ile karşılaştırıldı.

d; H₂O₂+1µM R grubu ile karşılaştırıldı.

e; H₂O₂+5µM R grubu ile karşılaştırıldı.

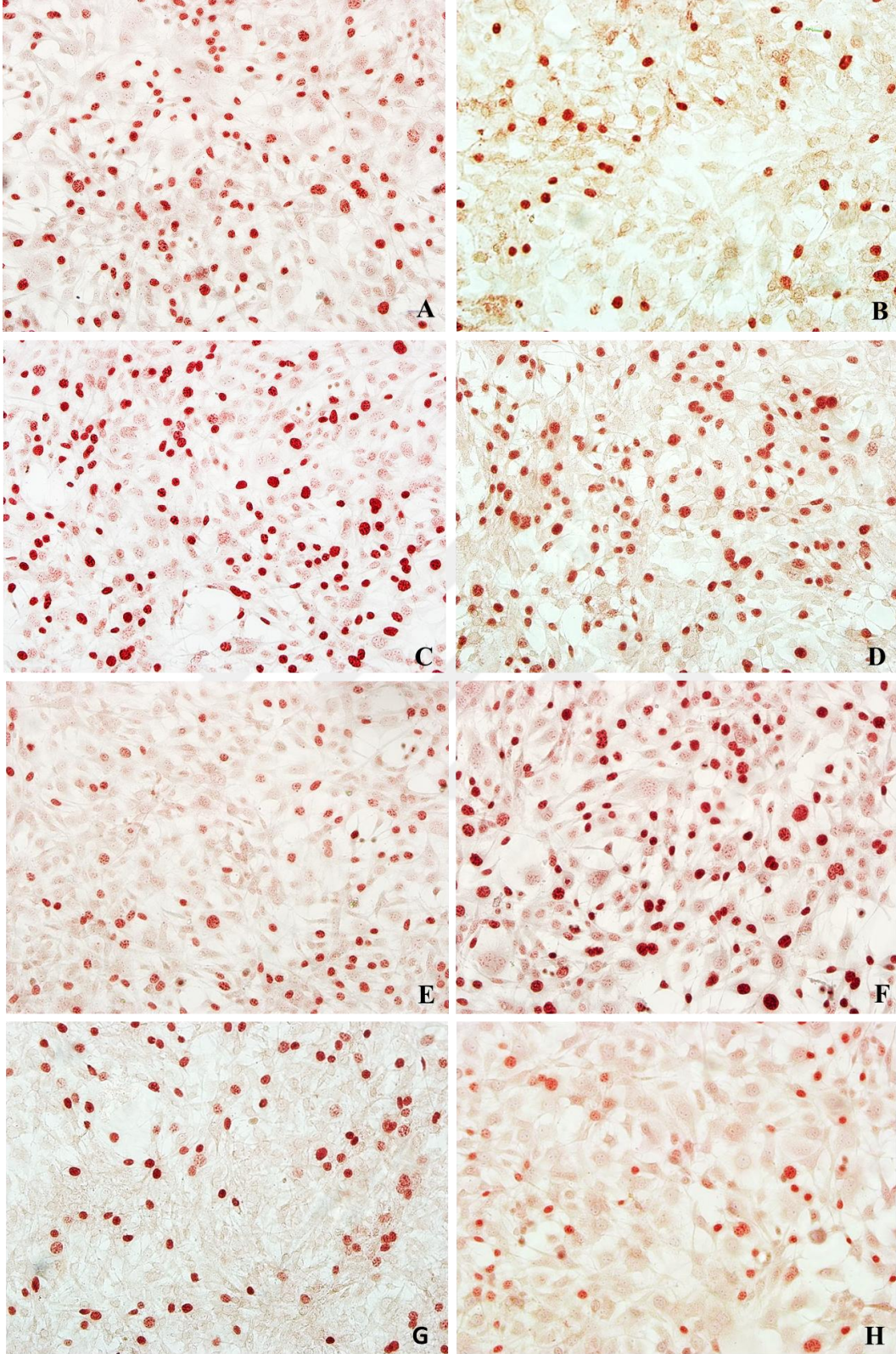
Ort ± SEM: Ortalama ± Standart hata ortalaması



Şekil 4- 9: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H₂O₂ uygulanan gruplarında BrdU immünoreaktivitesi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, *P<0,05 ve ***P<0,001.

H₂O₂+1µM R grubu ile karşılaştırıldı, †P<0,05 ve †† P<0,001



Şekil 4- 10: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1µM, 5µM ve 10µM R) ve 500µM H₂O₂ uygulanan gruplarında BrdU immünoreaktivitesi gösteren hücre nükleusları kırmızı renkte boyanmış olarak izlenmekte.

A: Kontrol, B: H₂O₂, C: 1µM R, D: 5µM R, E: 10µM R, F: H₂O₂+1µM R, G: H₂O₂ + 5µM R, H: H₂O₂ + 10µM R, X20.

4.1.7. Resveratrol için Oksidatif Stres Bulguları

3T3 fibroblast hücreleri ile oluşturduğumuz kontrol, 500 μ M H₂O₂, 1 μ M RES, 5 μ M RES, 10 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+1 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+5 μ M RES, 500 μ M H₂O₂+10 μ M RES gruplarının ROT reaktivitesiyle OS bulguları değerlendirildi (Tablo 4-7, Şekil 4-11, Şekil 4-12). ROT reaktivitesi parlak yeşil olarak gözükmemektedir. Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında H₂O₂ ile inkübe edilen hücrelerde ROT oranı yaklaşık 12 kat artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0,001). Sadece resveratrol uygulanan grupların ROT oranları kontrol grubuna yakın olup istatistiksel farklılık göstermemektedir. Ancak kültür ortamına H₂O₂ eklendiğinde ROT oranı H₂O₂+5 μ M RES grubunda yaklaşık 2 katına çıkmış ve H₂O₂+10 μ M RES grubunda ise yaklaşık 4 katına çıkmıştır. Bu son gruptaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0,001). En yüksek ROT oranına H₂O₂ grubunda rastlandı ve bu oran kontrol grubunun yaklaşık 12 katıydı (P<0,001). H₂O₂+1 μ M, H₂O₂+5 μ M ve H₂O₂+10 μ M RES grupları ile H₂O₂ grubu arasında da ciddi farklar bulundu (P<0,001). RES dozu yükseldikçe ROT oranı artış gösterdi. H₂O₂+10 μ M RES grubunun ROT oranı H₂O₂+1 μ M ve H₂O₂+5 μ M RES gruplarına göre anlamlı olarak yükselmişti (sırasıyla P<0,001 ve P<0,01).

PDT indeksi, BrdU immünoreaktivitesi ve ROT oranları göz önüne alındığında 1 μ M RES dozu etken doz olarak seçildi ve deney modelinde kullanıldı.

Tablo 4- 7: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M R) ve 500 μ M H₂O₂ uygulanan gruplarında ROT reaktivite (%) sonuçları.

Gruplar	Ort \pm SEM	P ^a	P ^b	P ^c	P ^d
Kontrol	5,48 \pm 0,62	-	<0,001	>0,05	>0,05
H₂O₂	60,24 \pm 2,80	<0,001	-	<0,001	<0,001
1μM R	7,02 \pm 1,26	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05
5μM R	7,73 \pm 0,86	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05
10μM R	12,54 \pm 1,12	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05
H₂O₂+1μM R	6,16 \pm 0,75	>0,05	<0,001	-	>0,05
H₂O₂+5μM R	12,31 \pm 1,44	>0,05	<0,001	>0,05	-
H₂O₂+10μM R	21,16 \pm 1,89	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01

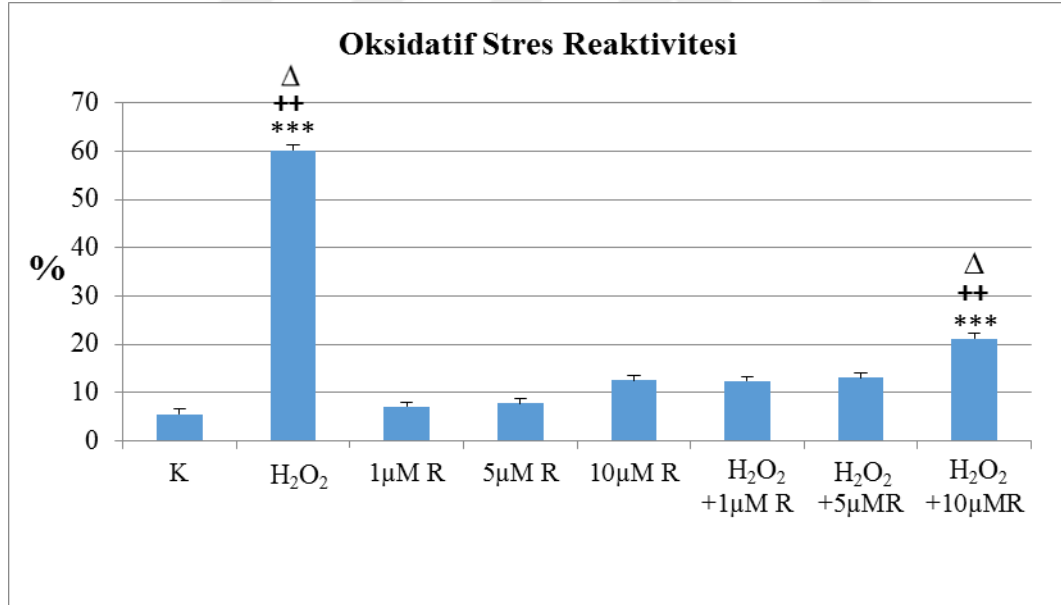
a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

b; H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı.

c; H₂O₂+1 μ M R grubu ile karşılaştırıldı.

d; H₂O₂+5 μ M R grubu ile karşılaştırıldı.

Ort \pm SEM: Ortalama \pm Standart hata ortalaması

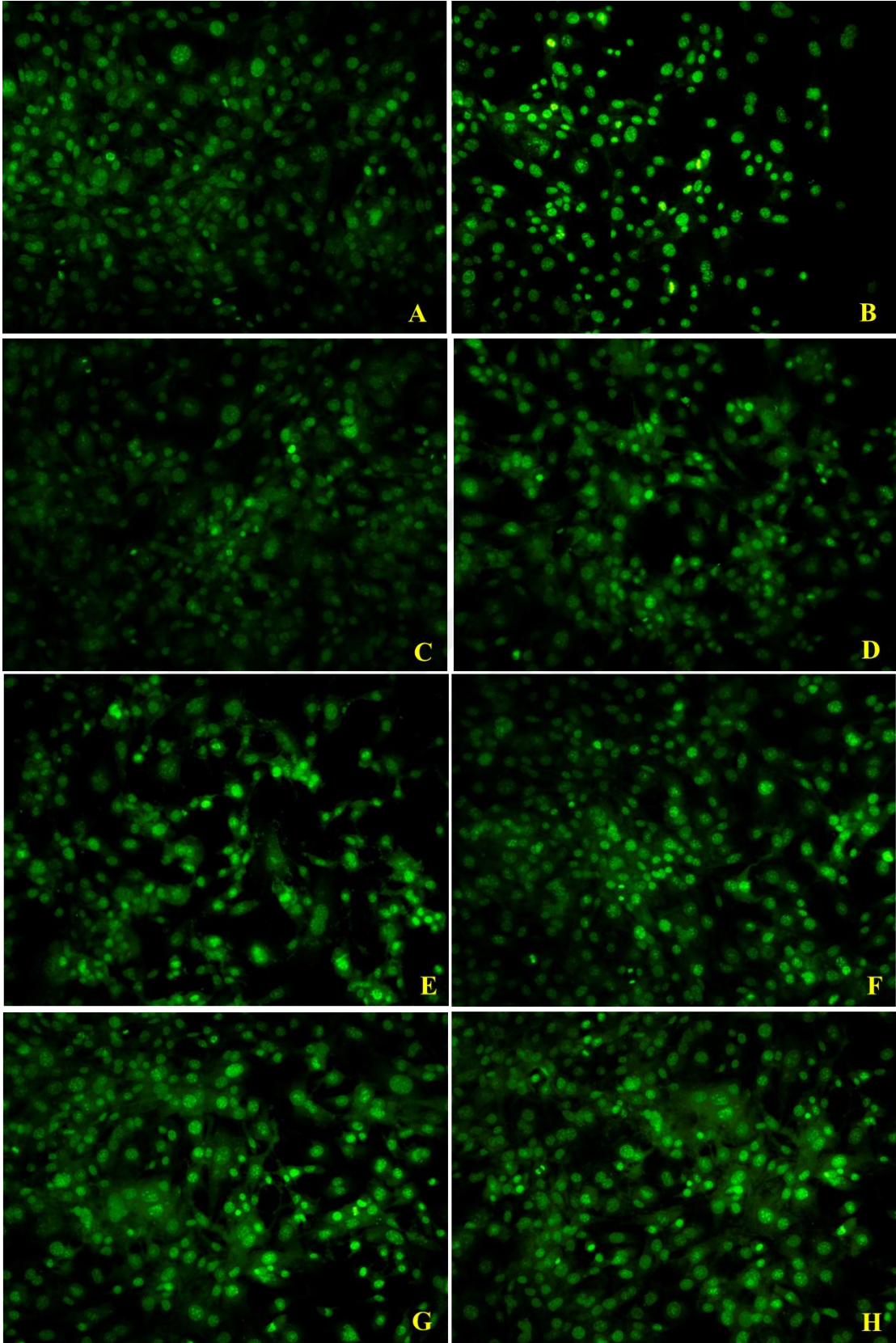


Şekil 4- 11: 3T3 hücrelerinin farklı dozlarda resveratrol (1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M R) ve 500 μ M H₂O₂ uygulanan gruplarında ROT reaktivitesi (%).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, ***P<0,001.

H₂O₂+1 μ M R grupları ile karşılaştırıldı, ++P<0,001.

H₂O₂+5 μ M R grubu ile karşılaştırıldı Δ P<0,001.



Şekil 4- 12: 3T3 hücrelerinin A: Kontrol, B: 500 μ M H₂O₂ farklı dozlarda resveratrol, C: 1 μ M R, D: 5 μ M R, E: 10 μ M R, F: H₂O₂+1 μ M R, G: H₂O₂+5 μ M R, H: H₂O₂+10 μ M R gruplarında ROT'ların reaktivite görüntüleri, X20.

4.2. Final Deney Gruplarına Ait Bulgular

H₂O₂, G ve RES ile yaptığımız doz deneylerinin sonucunda elde ettiğimiz bulgularla Grup 1: Kontrol, Grup 2: 500µM H₂O₂, Grup 3: 1mg/ml G, Grup 4: 1 µM RES, Grup 5: 1mg/ml G+1µM RES, Grup 6: 500µM H₂O₂+1mg/ml G, Grup 7: 500µM H₂O₂+1µM RES, Grup 8: 500µM H₂O₂+1mg/ml G+1µM RES final deney gruplarını oluşturduk. Bu deney gruplarında 3T3 fibroblast hücrelerinin PDT indeksleri, BrdU immünoaktivitesi, ROT reaktiviteleri ile oksidatif stres düzeyleri, hücre migrasyon oranları ve RT-PCR analizi (kolajen tip Iα zinciri) ve elektron mikroskopik incelemeleri yapıldı.

4.2.1. PDT Bulguları

Kontrol grubunun PDT indeksleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında 1mg/ml G, 1µM RES ve 1mg/ml G+1µM RES ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 4-8, Şekil 4-13). Buna karşın sadece H₂O₂ ve H₂O₂+G ile inkübasyon sonucunda PDT indekslerinin yaklaşık 2 katından fazla seviyelere yükseldiği görüldü. H₂O₂+RES ve H₂O₂+G+RES gruplarında da kontrol grubuna nazaran anlamlı artışlar (P<0,01) görülmesine rağmen H₂O₂ grubuna göre önemli azalmalar kaydedildi (P<0,001) (Tablo 4-8, Şekil 4-13). Sonuç olarak kullandığımız G, H₂O₂ ile kombine edildiğinde PDT indeksi açısından H₂O₂ ile inkübasyon bulguları ile farklılık göstermedi. Aynı şekilde G, RES ile kombine edildiğinde sadece resveratrol ile inkübe edilen gruplarla karşılaştırıldığında da aralarında bir fark görülmedi.

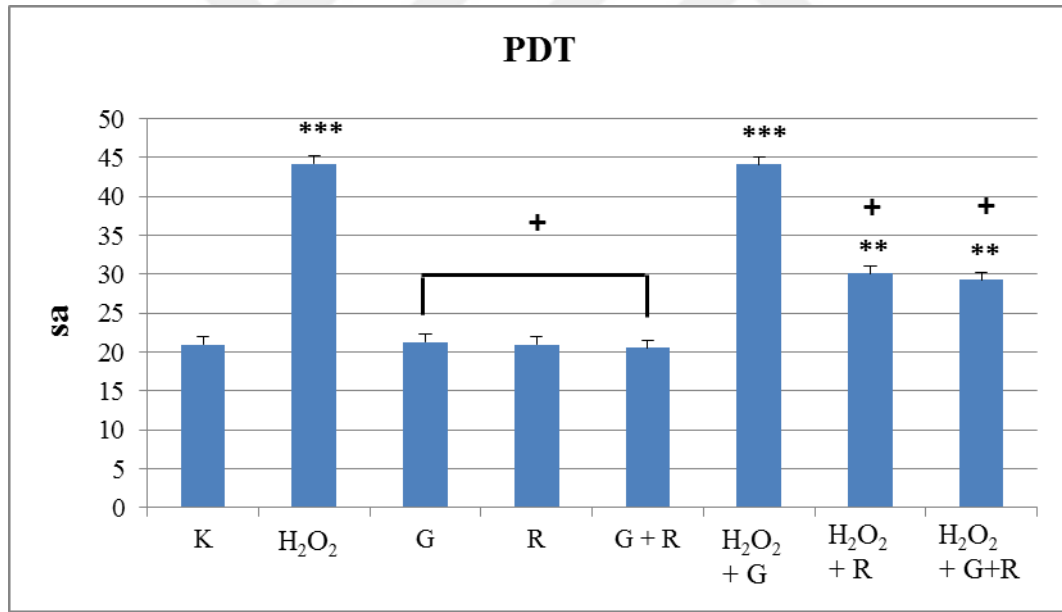
Tablo 4- 8: 500 μ M H_2O_2 , 1 μ M resveratrol (R) ve 1mg/ml Ti-oss® grefti (G) uygulanan final deney gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) sonuçları.

Gruplar	Ort (saat) \pm SEM	P ^a	P ^b
Kontrol	21,03 \pm 0,50	-	<0,001
H₂O₂	44,18 \pm 2,52	<0,001	-
G	21,30 \pm 1,27	>0,05	<0,001
R	20,93 \pm 0,95	>0,05	<0,001
G+R	20,52 \pm 1,25	>0,05	<0,001
H₂O₂+G	44,10 \pm 2.06	<0,001	>0,05
H₂O₂+R	30,10 \pm 1.67	<0,01	<0,001
H₂O₂+G+R	29,31 \pm 0.21	<0,01	<0,001

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

b; 500 μ M H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldı.

Ort \pm SEM: Ortalama \pm Standart hata ortalaması



Şekil 4- 13: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında PDT (Popülasyon ikilenme zamanları, saat) grafiği.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldı *** P<0,001 ve ** P<0,01.

500 μ M H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldı + P<0,001.

4.2.2. BrdU İmmünoreaktivitesi

Final deney grupları BrdU immünoreaktivite sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 500µM H₂O₂ ve H₂O₂+1mg/ml G gruplarında belirgin bir proliferasyon düşüşü (P<0,001) görülürken, 1µM RES ve 1mg/ml G gruplarında hücre proliferasyonu en yüksek orandaydı ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı (P<0,05) (Tablo 4-9, Şekil 4-14, Şekil 4-15). 1mg/ml G+1µM RES grubunda proliferasyon açısından artış görüldü ancak istatistiksel olarak bir fark görülmedi. H₂O₂+1µM RES ve H₂O₂+1mg/ml G+1µM RES gruplarında kontrol grubu ile benzer proliferasyon oranlarına rastlandı. Deney grupları H₂O₂ grubu ile kıyaslandığında Kontrol, 1µM RES, 1mg/ml G, 1mg/ml G+1µM RES, H₂O₂+1µM RES ve H₂O₂+1mg/ml G+1µM RES gruplarında önemli oranlarda proliferasyon artışı kaydedildi, her birinde istatistiksel anlamlılık mevcuttu (P<0,001). Fakat H₂O₂ ile birlikte greft materyali kullanıldığında sadece H₂O₂ uygulanan grup ile benzer sonuca ulaşıldı (Tablo 4-9, Şekil 4-14, Şekil 4-15).

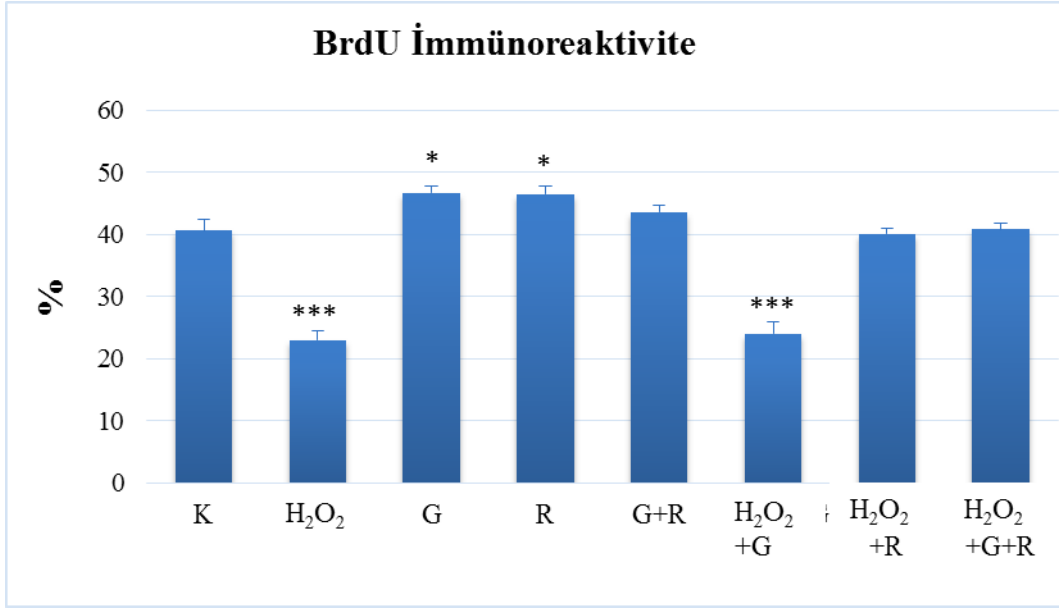
Tablo 4- 9: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında BrdU proliferasyon (%) sonuçları.

Gruplar	Ort ± SEM	P^a	P^b
Kontrol	40,62 ± 1,86	-	<0,001
H₂O₂	23,00 ± 1,45	<0,001	-
G	46,73 ± 1,12	<0,05	<0,001
R	46,46 ± 1,25	<0,05	<0,001
G+R	43,59 ± 1,03	>0,05	<0,001
H₂O₂+G	24,03 ± 1,85	<0,001	>0,05
H₂O₂+R	40,11 ± 0,86	>0,05	<0,001
H₂O₂+G+R	40,84 ± 1,04	>0,05	<0,001

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

b; H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı.

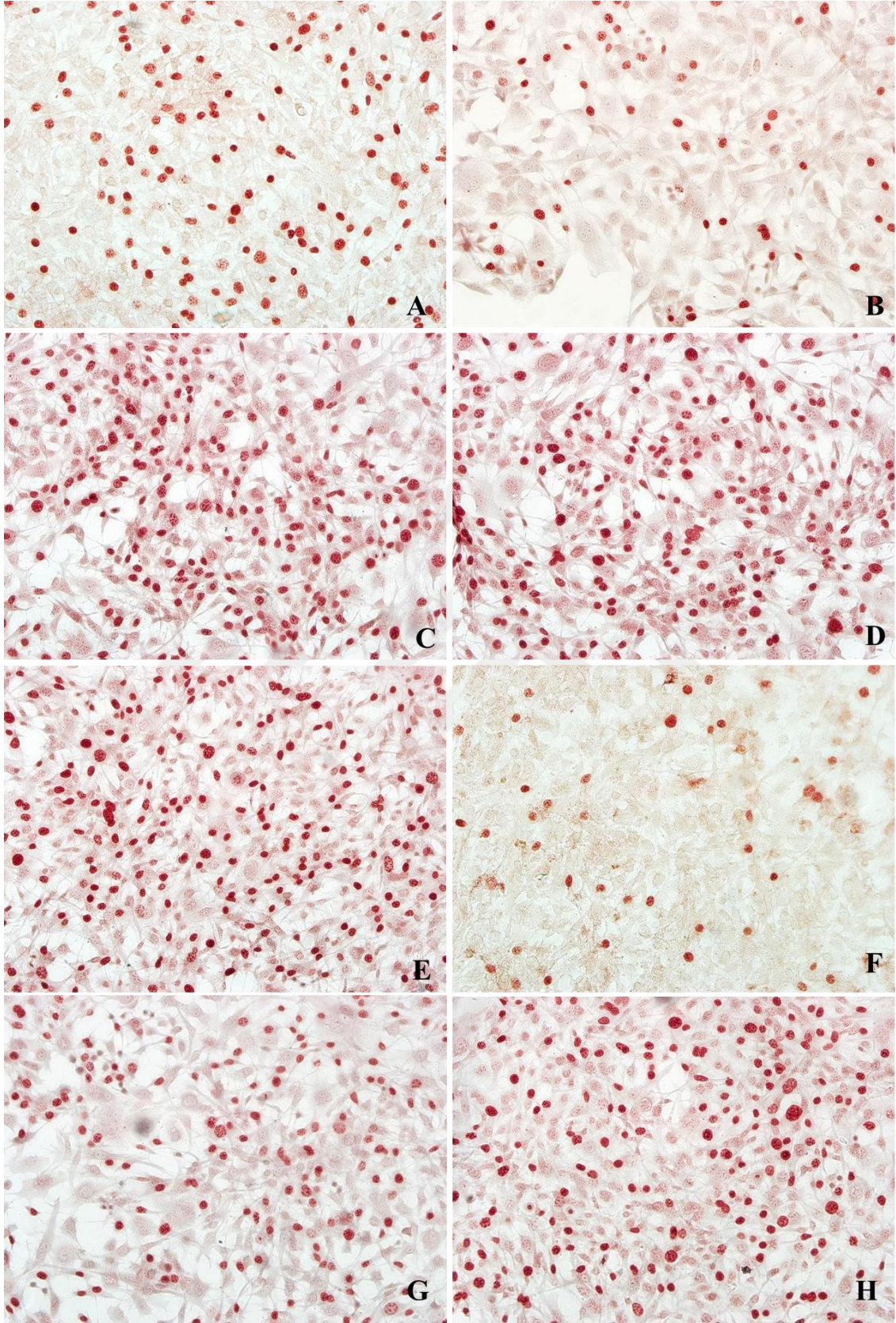
Ort ± SEM: Ortalama ± Standart hata ortalaması



Şekil 4- 14: Final deney gruplarına ait BrdU proliferasyon (%) indeks grafiği.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, *P<0,05 ve **P<0,001.

H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı. ***P<0,001.



Şekil 4- 15: 3T3 hücrelerinin 500µM H₂O₂, 1mg/ml greft (G) ve 1µM resveratrol (R) dozlarında BrdU immünoreaktivite işaretlenmeleri, X20.

A) Kontrol, B) H₂O₂, C) G, D) R, E) G+R, F) H₂O₂+G, G) H₂O₂+R, H) H₂O₂+ G+R grupları.

4.2.3. Oksidatif Stres Bulguları

Final deney gruplarında oksidatif stres, cellROX kiti ile yaptığımız ROT floresan işaretlemeleri (parlak yeşil) ile değerlendirildi ve sonuçlar Tablo 4-10, Şekil 4-16 ve Şekil 4-17’de gösterildi. Kontrol grubunun ROT oranları ile diğer gruplar karşılaştırıldığında H_2O_2 uygulanan bütün gruplarda anlamlı artışlar gözlemlendi ($P<0,001$). En yüksek ROT oranı H_2O_2 ve H_2O_2+1mg/ml G gruplarında görüldü ve kontrolün yaklaşık 11 katına yükseldi. G, RES ve G+RES grupları ise kontrol ile benzer oranlara sahipti. H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldığında H_2O_2+G grubunda sonuçlar yakın bulundu ve anlamlı bir fark saptanmadı. Ancak H_2O_2 ile diğer deney grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görüldü ($P<0,001$) (Tablo 4-10, Şekil 4-16 ve Şekil 4-17).

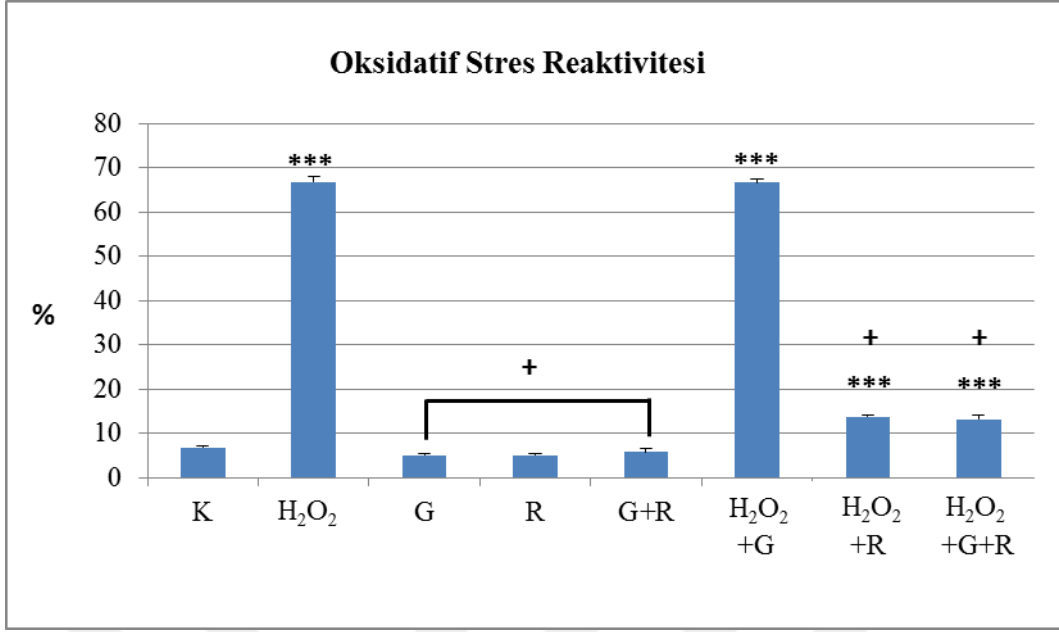
Tablo 4- 10: Final deney gruplarında ROT reaktivite (%) sonuçları.

Gruplar	Ort \pm SEM	P ^a	P ^b
Kontrol	6,76 \pm 0,30	-	<0,001
H₂O₂	66,90 \pm 1,30	<0,001	-
G	5,07 \pm 0,43	>0,05	<0,001
R	5,05 \pm 0,23	>0,05	<0,001
G+R	5,80 \pm 0,69	>0,05	<0,001
H₂O₂+G	66,73 \pm 0,67	<0,001	>0,05
H₂O₂+R	13,69 \pm 0,52	<0,001	<0,001
H₂O₂+G+R	13,10 \pm 0,99	<0,001	<0,001

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

b; 500 μ M H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldı.

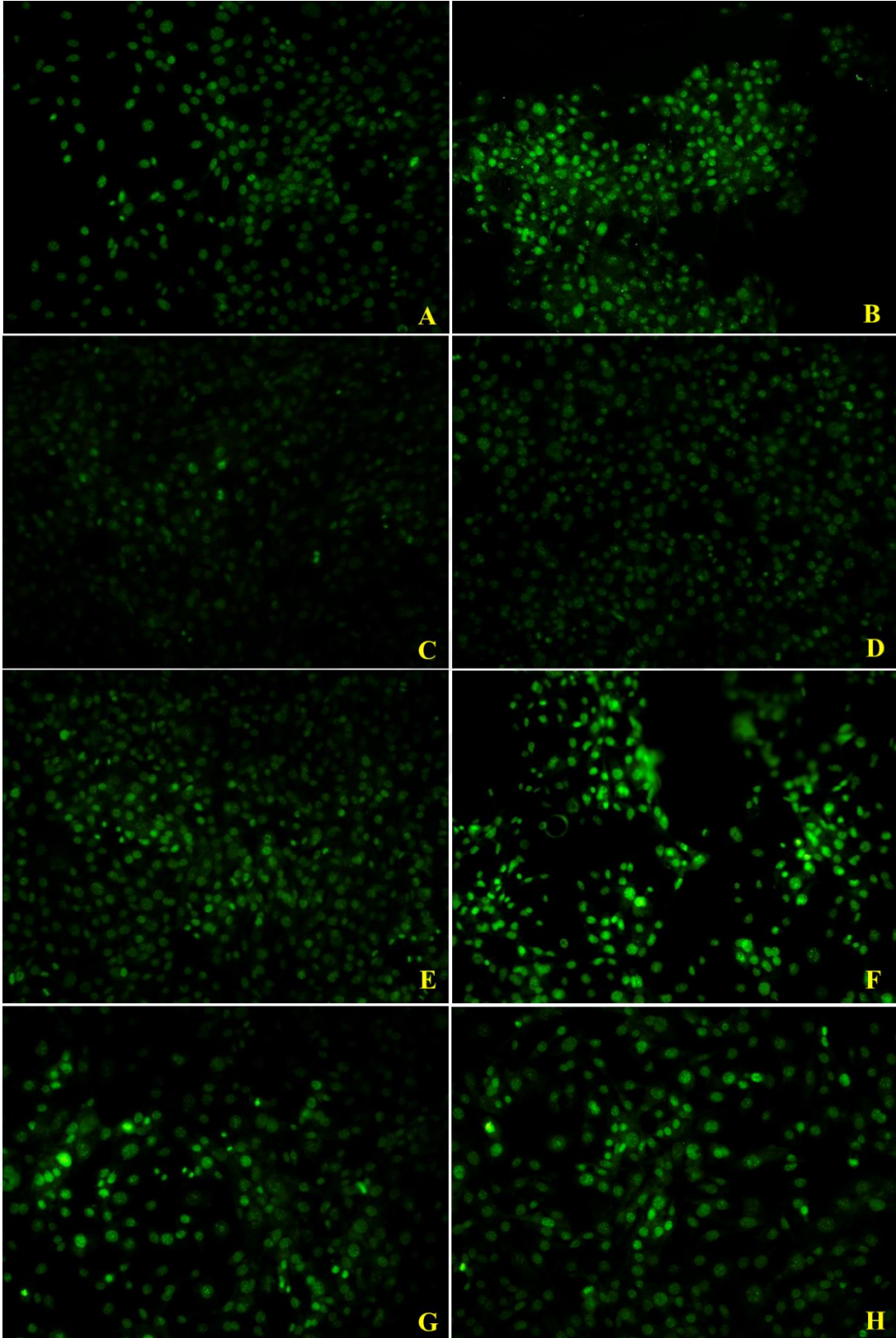
Ort \pm SEM: Ortalama \pm Standart hata ortalaması



Şekil 4- 16: Final deney gruplarında 3T3 hücrelerinin ROT reaktivitesi (%) grafiği.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, ***P<0,001.

H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı, †P<0,001.



Şekil 4- 17: 3T3 hücrelerinin 500µM H₂O₂, 1mg/ml Ti-oss® grefti (G) ve 1µM resveratrol (R) dozlarında floresan mikroskopta ROT reaktivitesi gösteren görüntüleri, X20.

A) Kontrol, B) H₂O₂, C) G D) R, E) G+R, F) H₂O₂+G, G) H₂O₂+R ve H) H₂O₂+G+R

4.2.4. Migrasyon Bulguları

Tüm final deney gruplarında in vitro migrasyon testi için model oluşturuldu ve invert mikroskopik ölçüm sonuçları Tablo 4-11, Şekil 4-18 ve Şekil 4-19'da verildi. Bütün grupların migrasyon mesafeleri karşılaştırıldığında en kısa migrasyon hareketi H_2O_2 grubunda saptandı ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı görüldü ($P<0,001$). En fazla migrasyona ise $H_2O_2+G+RES$ grubunda rastlandı ve hücreler kontrol grubuna göre daha iyi migrasyon performans gösterdi ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. H_2O_2+G grubundaki hücrelerin migrasyon hareketi kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalmış bulundu ($P<0,001$), H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldığında ise 20 μm kadar fazla migrasyon gösterdiği tespit edildi ancak istatistiksel fark bulunmadı. Ayrıca G, RES, G+RES ve H_2O_2+RES grupları ile kontrol grupları arasındaki değişimler de anlamlılık göstermedi (Tablo 4-11 Şekil 4-18 ve Şekil 4-19).

H_2O_2 grubu ile diğer gruplar migrasyon hareketi açısından karşılaştırıldığında H_2O_2+G grubu dışındaki tüm grupların hareketleri anlamlı derecede fazlaydı ($P<0,001$), (Tablo 4-11 Şekil 4-18 ve Şekil 4-19).

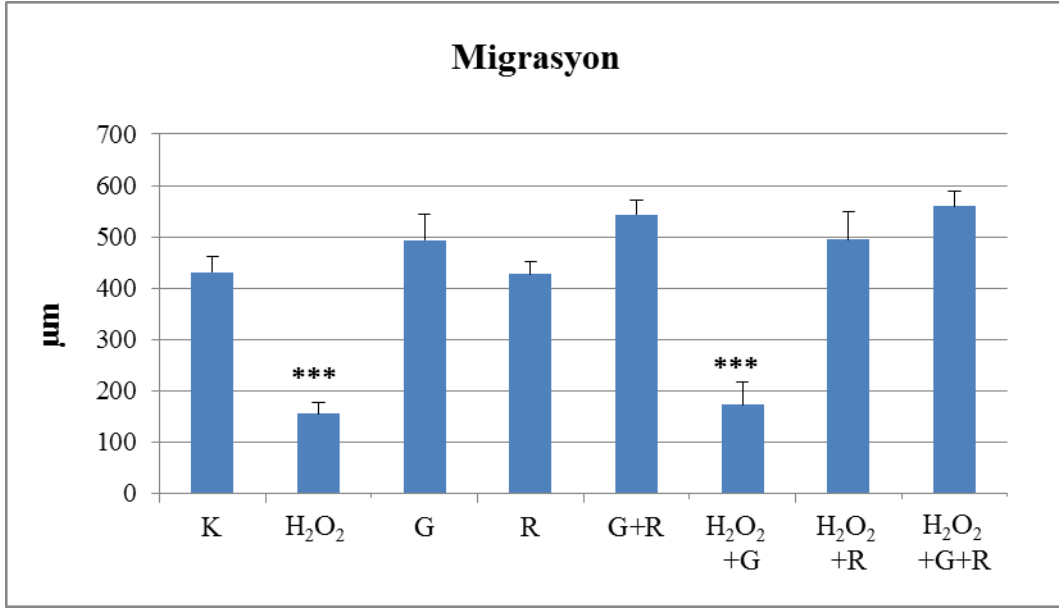
Tablo 4- 11: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında migrasyon (μm) sonuçları.

Gruplar	Ort \pm SEM	P ^a	P ^b
Kontrol	430,85 \pm 29,65	-	<0,001
H₂O₂	155,48 \pm 20,98	<0,001	-
G	493,43 \pm 49,44	>0,05	<0,001
R	426,78 \pm 25,45	>0,05	<0,001
G+R	543,14 \pm 28,99	>0,05	<0,001
H₂O₂+G	172,67 \pm 43,65	<0,001	>0,05
H₂O₂+R	494,13 \pm 54,43	>0,05	<0,001
H₂O₂+G+R	558,87 \pm 28,98	>0,05	<0,001

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

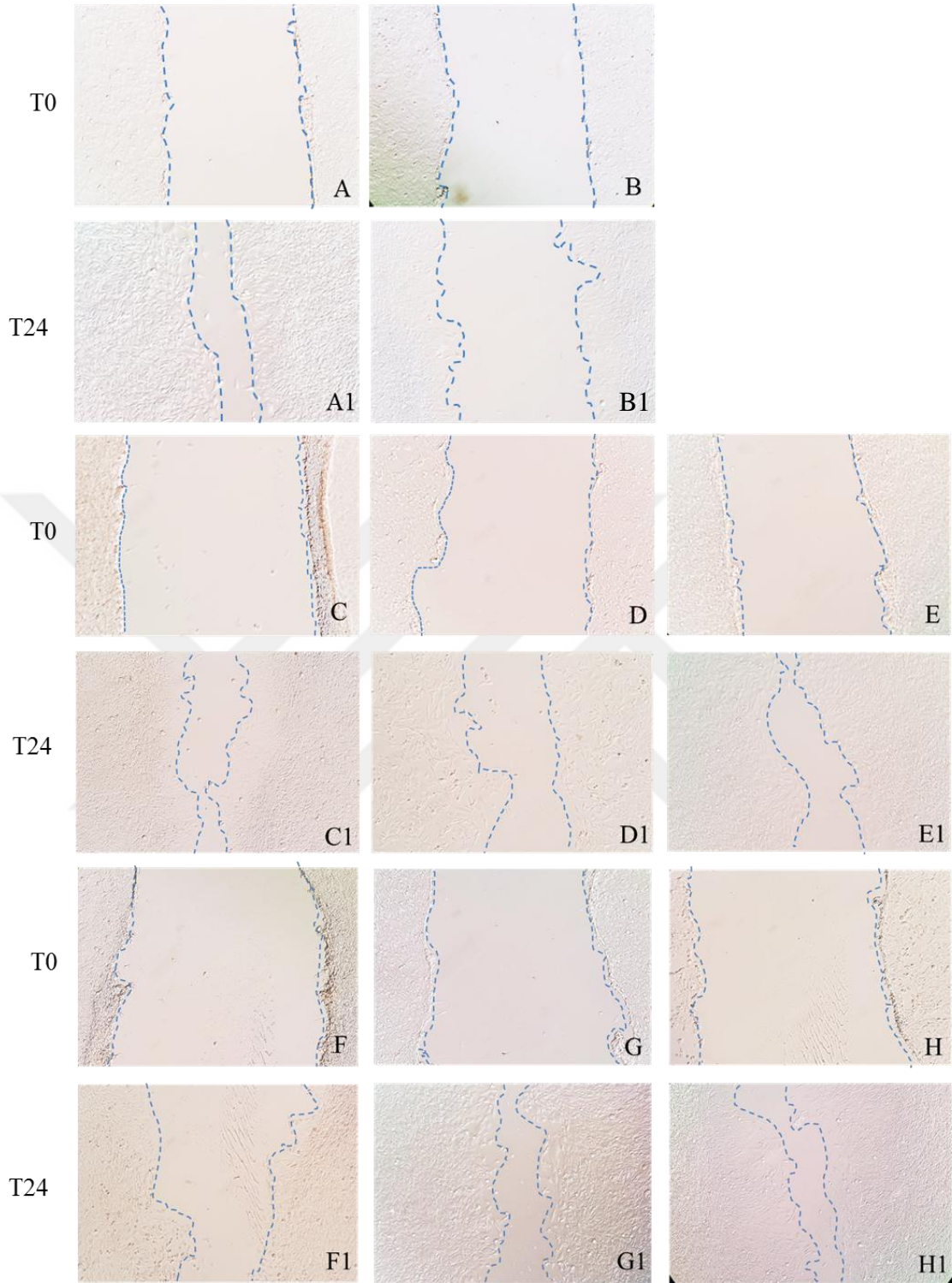
b; 500 μM H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldı.

Ort \pm SEM: Ortalama \pm Standart hata ortalaması



Şekil 4- 18: 3T3 hücrelerinin final deney gruplarında migrasyon (µm) grafiği.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, ***P<0,001.
500µM H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı. P<0,001.



Şekil 4- 19: 3T3 hücrelerinin 500µM H₂O₂, 1mg/ml G ve 1µM resveratrol dozlarında invert mikroskopta 0. saat (T0) ve 24. saat (T24) migrasyon ölçümleri göstern görüntüleri X10.

Mavi kesikli çizgiler: Hücre sınırları. A-A1) Kontrol, B-B1) H₂O₂, C-C1) G, D-D1) R, E-E1) G+R, F-F1) H₂O₂+G, G-G1) H₂O₂+R ve H-H1) H₂O₂+G+R deney grupları.

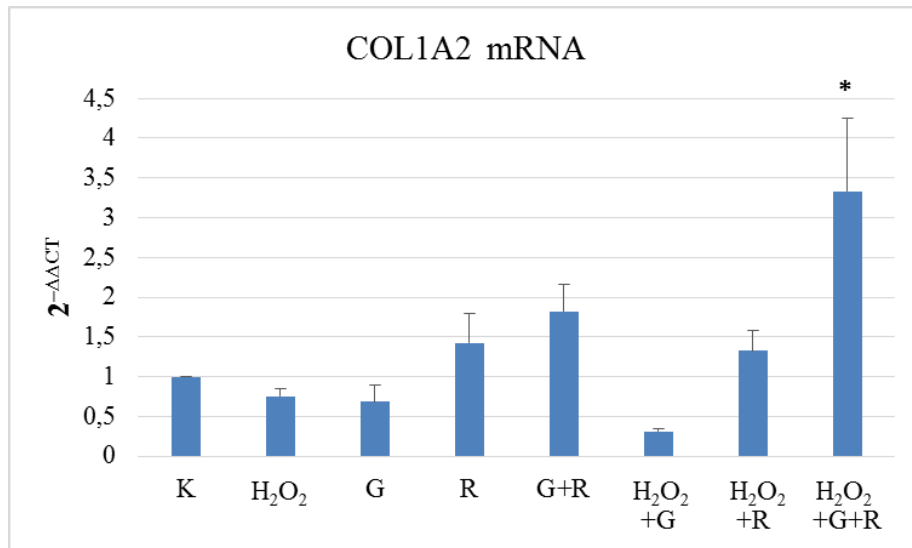
4.2.5. RT-PCR Bulguları

3T3 hücrelerinde G, H₂O₂ ve RES uygulamalarına bağlı kolajen (COL1A2) üretiminin nasıl etkilendiğini değerlendirmek için yaptığımız RT-PCR analizlerine ait COL1A2 mRNA ekspresyon sonuçları Tablo 4-12, Şekil 4-20’de görülmektedir. Kontrol grubu ile diğer gruplar COL1A2 mRNA ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında en düşük seviyelere H₂O₂, G ve H₂O₂+G gruplarında rastlandı ancak bu düşüşler anlamlılık göstermedi. Buna karşın en yüksek ekspresyon seviyesi H₂O+G+R grubunda görüldü ve bu artış kontrol grubuna kıyasla anlamlı (P<0,05) bulundu.

Tablo 4- 12: Final deney gruplarında COL1A2 mRNA RT-PCR sonuçları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Gruplar	Ort \pm SEM	P ^a	P ^b
Kontrol	1 \pm 0*	-	>0,05
H₂O₂	0,75 \pm 0,10	>0,05	-
G	0,69 \pm 0,20	>0,05	>0,05
R	1,43 \pm 0,36	>0,05	>0,05
G+R	1,82 \pm 0,33	>0,05	>0,05
H₂O₂+G	0,31 \pm 0,04	>0,05	>0,05
H₂O₂+R	1,33 \pm 0,26	>0,05	>0,05
H₂O₂+G+R	3,33 \pm 0,91	<0,05	<0,01

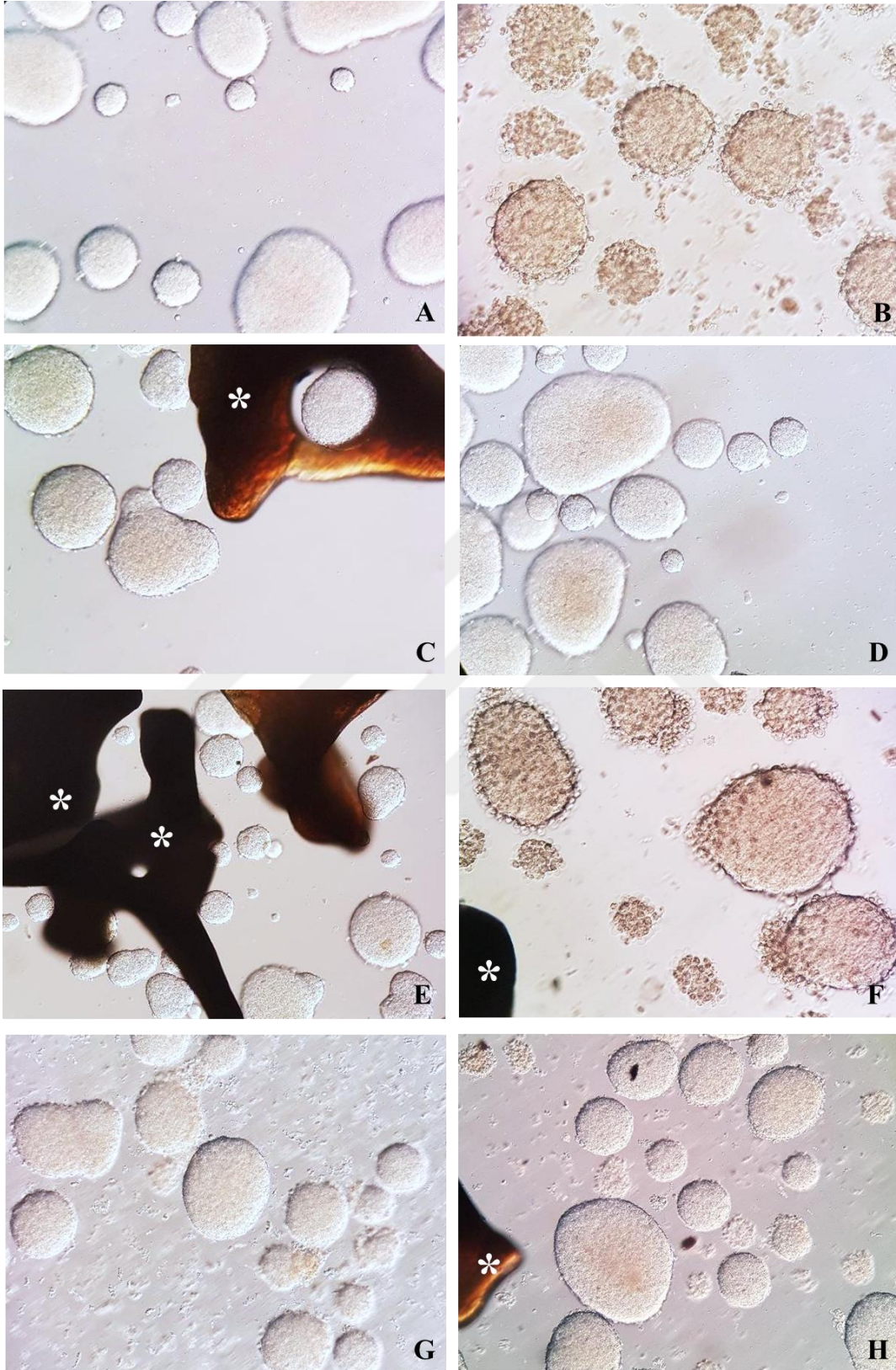
a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldı. b; 500 μ M H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı. Ort \pm SEM: Ortalama \pm Standart hata ortalaması *Kısmi mRNA ekspresyon düzeyleri aktin genine göre normalize edilmiştir.



Şekil 4- 20: Final deney gruplarında COL1A2 mRNA ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) grafiği. Kontrol grubu ile karşılaştırıldı, *P<0,05.

4.2.6. İnvirt Mikroskop Bulguları

Kontrol grubu ve 500 μ M H₂O₂, 1mg/ml G, 1 μ M RES deney gruplarından elde edilen 3T3 fibroblast hücrelerinden oluşturduğumuz sferoit kültürlerin invert mikroskopik görüntüleri Şekil 4-21 görülmektedir. Kontrol grubunda normal morfolojide sferoitler sınırlarını ve homojenitelerini korumuş iken (Şekil 4-21A). H₂O₂ grubunda sferoit yapıları deforme olmuş ve homojenliğini yitirmişti (Şekil 4-21B). Ayrıca sferoitlerden ayrılmış çok sayıda serbest fibroblast da dikkat çekmekteydi. G grubunda ise grefte bağlanmış sferoitler gözlemlendi (Şekil 21C). Sadece RES uygulanan grupta sferoitler normal bir morfolojiye sahipti (Şekil 21D). Düzgün sınırlarda ve normal homojenitede izlendiler, ancak çok az miktarda da olsa tek tek serbest fibroblastlar gözlemlendi. RES ve G kombinasyonunda kontrol grubuna kıyasla bir değişiklik saptanmadı (Şekil 20E). H₂O₂+G grubu invert mikroskopik incelemelerde H₂O₂ grubu ile benzerlik gösterdi (Şekil 20F). H₂O₂+R ve H₂O₂+G+R grupları da birbirine benzerlik gösterdi (Şekil 20G ve 20H) ve H₂O₂ uygulanan grup ile karşılaştırdığımızda sferoit yapıları normal 3 boyutlu formlarını, sınırlarını ve homojenitelerini korumuşlardı. Ayrıca kontrol grubuna göre besiyeri ortamında çok sayıda serbest fibroblastta rastlandı.



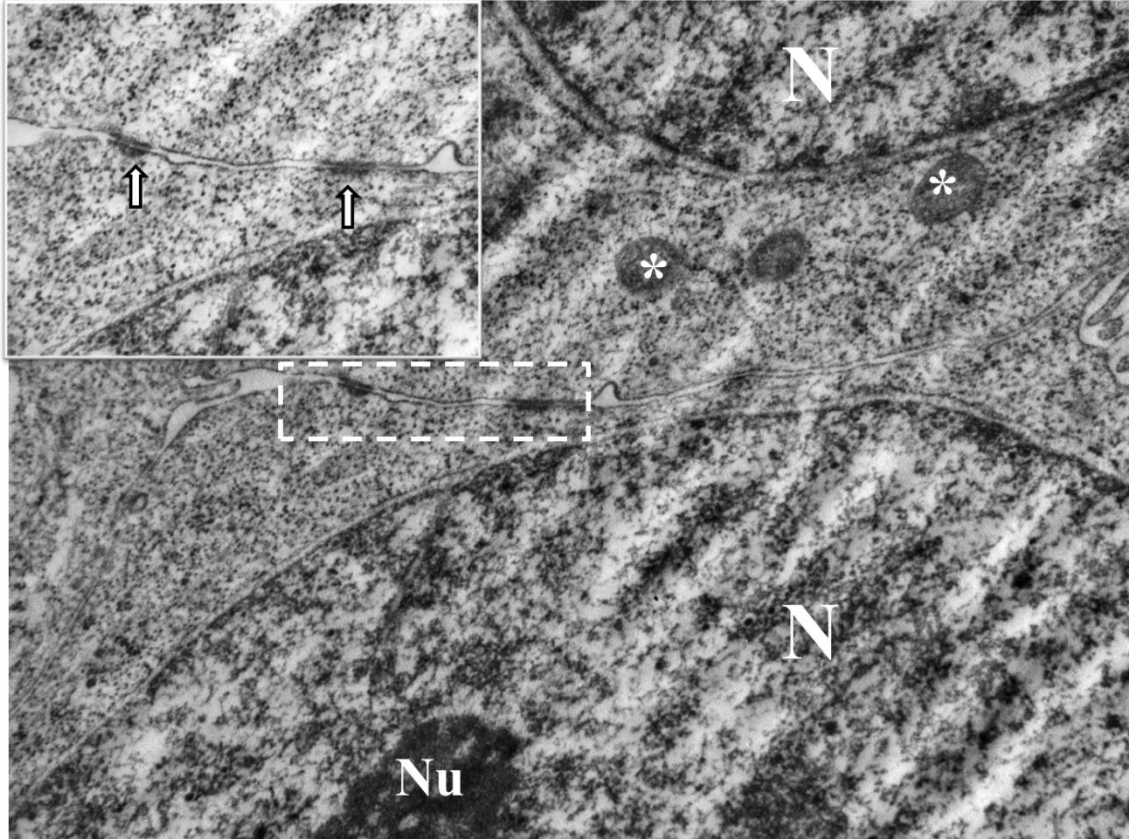
Şekil 4- 21: 3T3 hücrelerinden elde edilen sferoitler. 500 μ M H₂O₂, 1mg/ml Ti-oss® grefti (G) ve 1 μ M resveratrol (R) dozlarında invert mikroskop görüntüleri X100.

A) Kontrol, B) H₂O₂, C) G, D) R, E) G+R, F) H₂O₂+G, G) H₂O₂+R ve H) H₂O₂+G+R

4.2.7. Transmisyon Elektron Mikroskop Bulguları

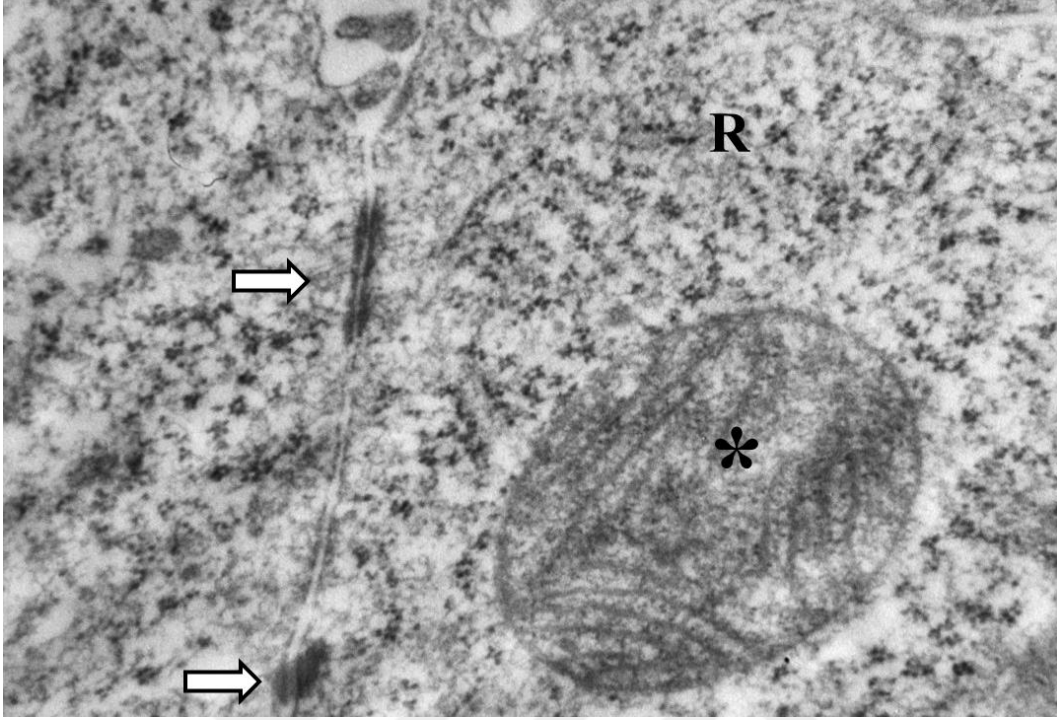
500 μ M H₂O₂, 1mg/ml G, 1 μ M RES dozları kullanılarak oluşturduğumuz final deney gruplarına ait sferoitlerin TEM görüntüleri Şekil 4-22 ve Şekil 4-47 arasında görülmektedir.

Kontrol grubunda normal strükture sahip hücre membranı, nukleus, nuklear membran ve nukleoluslar izlendi. İnterselüler boşluklar, interselüler bağlantılar olağan görünüme sahipti (Şekil 4-22). Mitokondrilerin kristalleri düzgündü ve sitoplazmada çok miktarda serbest ribozoma rastlandı (Şekil 4-23). Şekil 4-24'te dağınık yerleşmiş az miktarda heterokromatin materyale sahip ökromatik nukleus ve nukleolus izlenmektedir.

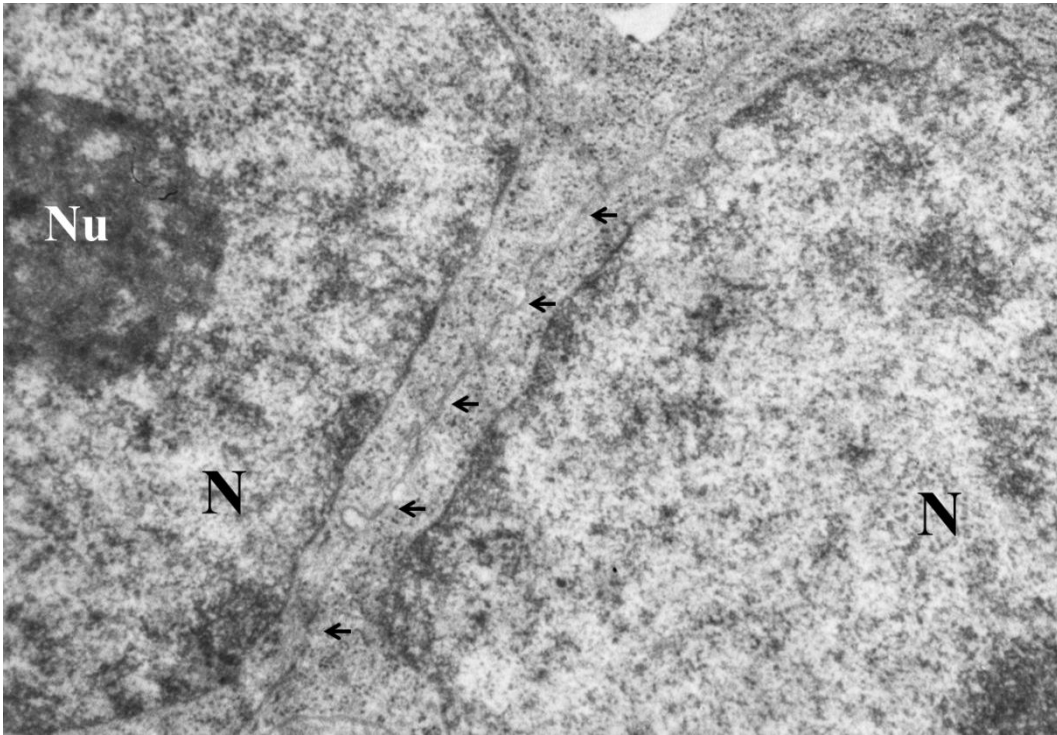


Şekil 4- 22: Kontrol grubu sferoitlerini oluşturan 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000, küçük resim: X60 000.

N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Beyaz oklar: İnterselüler bağlantılar, Beyaz yıldızlar: Mitokondri. Kesik çizgili beyaz çerçeve: Büyütülen alan.

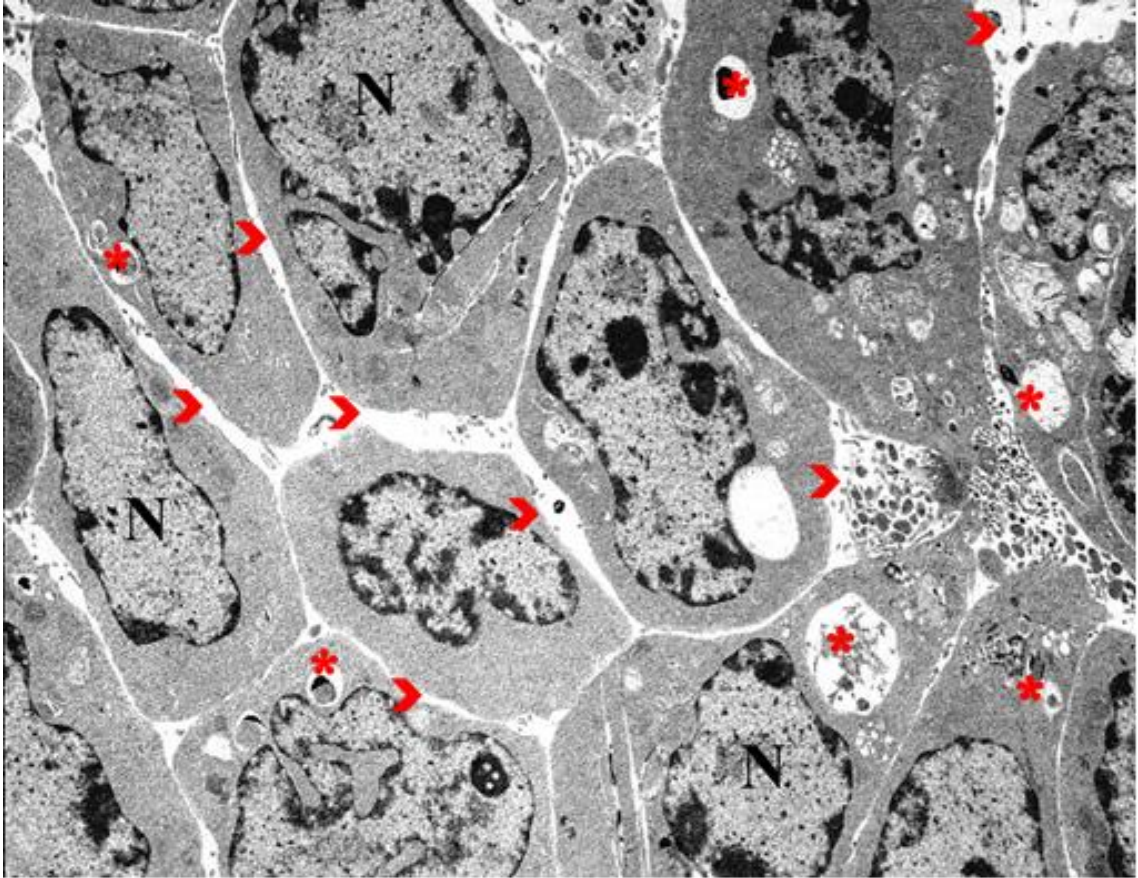


Şekil 4- 23: Kontrol grubu TEM görüntüsü, X30 000.
Beyaz oklar: İnterselüler bağlantılar, Siyah yıldız: Mitokondri, R: Serbest ribozomlar



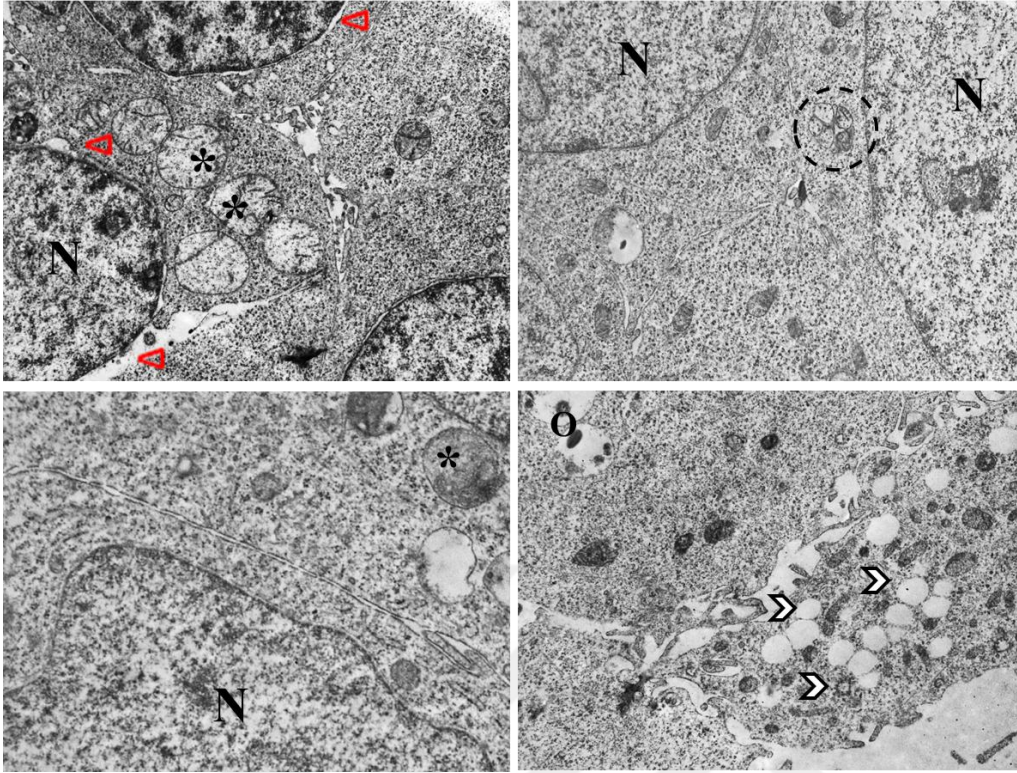
Şekil 4- 24: Kontrol grubu TEM görüntüsü, X25 000.
Siyah oklar: İnterselüler alan, N: Nukleus, Nu: Nukleolus.

H_2O_2 uygulanan sferoit kesitlerinde genel olarak interselüler mesafede artış izlendi, bazı alanlarda hücreler arası bağlantılar iyi korunmamıştı, hücre membranları ve sitoplazmalarında dejenerasyonu düşündüren ayrılmalara rastlandı (Şekil 4-25). İnterselüler bağlantıların korunduğu bazı bölgelerde görüldü (Şekil 4-27, 4-28). Fibroblast hücrelerinin sitoplazmalarında çok sayıda vakuolizasyon izlendi ve bunların bir kısmı lipid vakuolleri özelliğindedi (Şekil 4-26, 4-28). Hipertrofik, kristalleri hasarlı ve yer yer dejenere mitokondriler dikkati çekmekteydi (Şekil 4-26). Nuklear heterokromatin artarken nuklear membran yapısında yer yer incelmelerle, iç ve dış membranlar arasındaki mesafede artış izlendi. Bazı hücrelerde otofajik ve otolizozomal yapıların arttığı görüldü (Şekil 4-25, 4-28, 4-29).



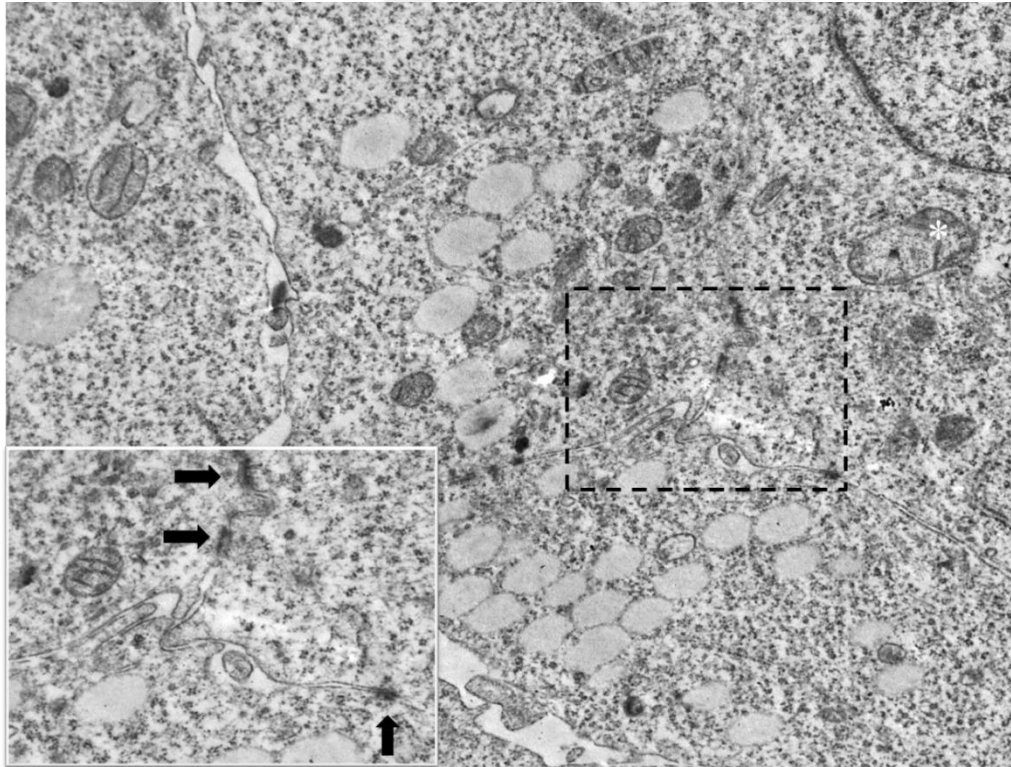
Şekil 4- 25: H_2O_2 grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X5 000.

N: Nukleus, Kırmızı oklar: Artmış interselüler alanlar, Kırmızı yıldız: Otofagozom ve otolizozom yapıları.



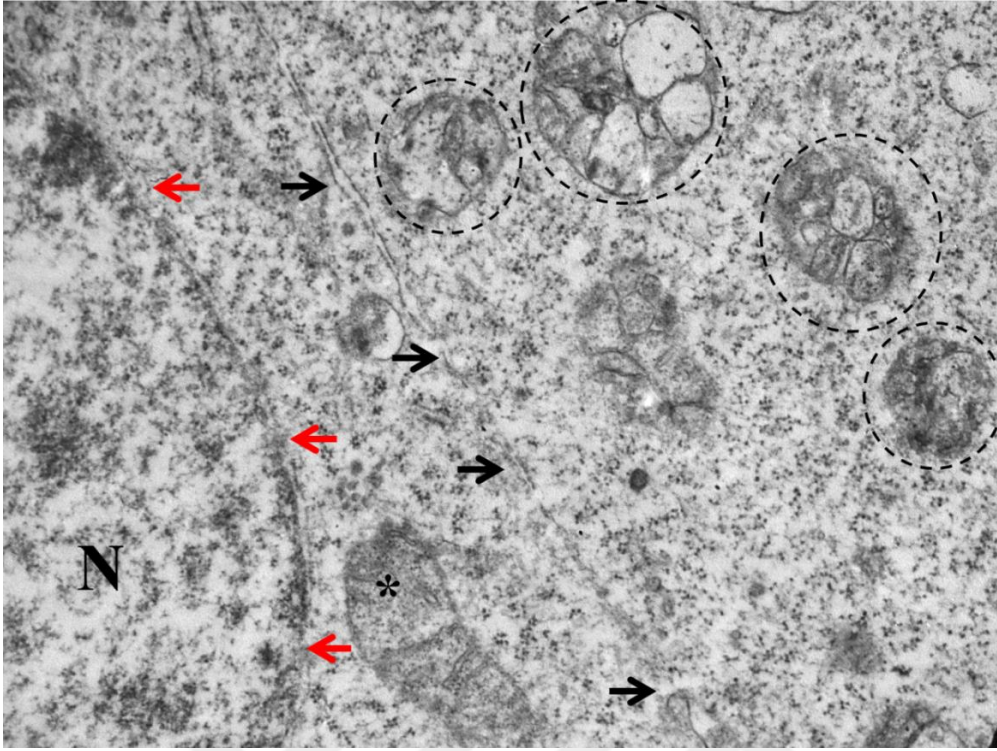
Şekil 4- 26: H₂O₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X12 000.

N: Nukleus, Kırmızı ok başları: Nuklear membran ayrılmaları, O: Otolizozom, Beyaz oklar: Vakuolizasyon, Siyah yıldızlar: Hipertrofik mitokondri, Siyah daire: Hasarlı mitokondri.



Şekil 4- 27: H₂O₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X12 000, küçük resim: X25 000.

Siyah oklar: Bazı hücrelerde interselüler bağlantılar korunmuştu, Beyaz yıldız: Dejenere mitokondri Siyah çerçeve: Büyütülen alan.



Şekil 4- 28: H₂O₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X25 000.

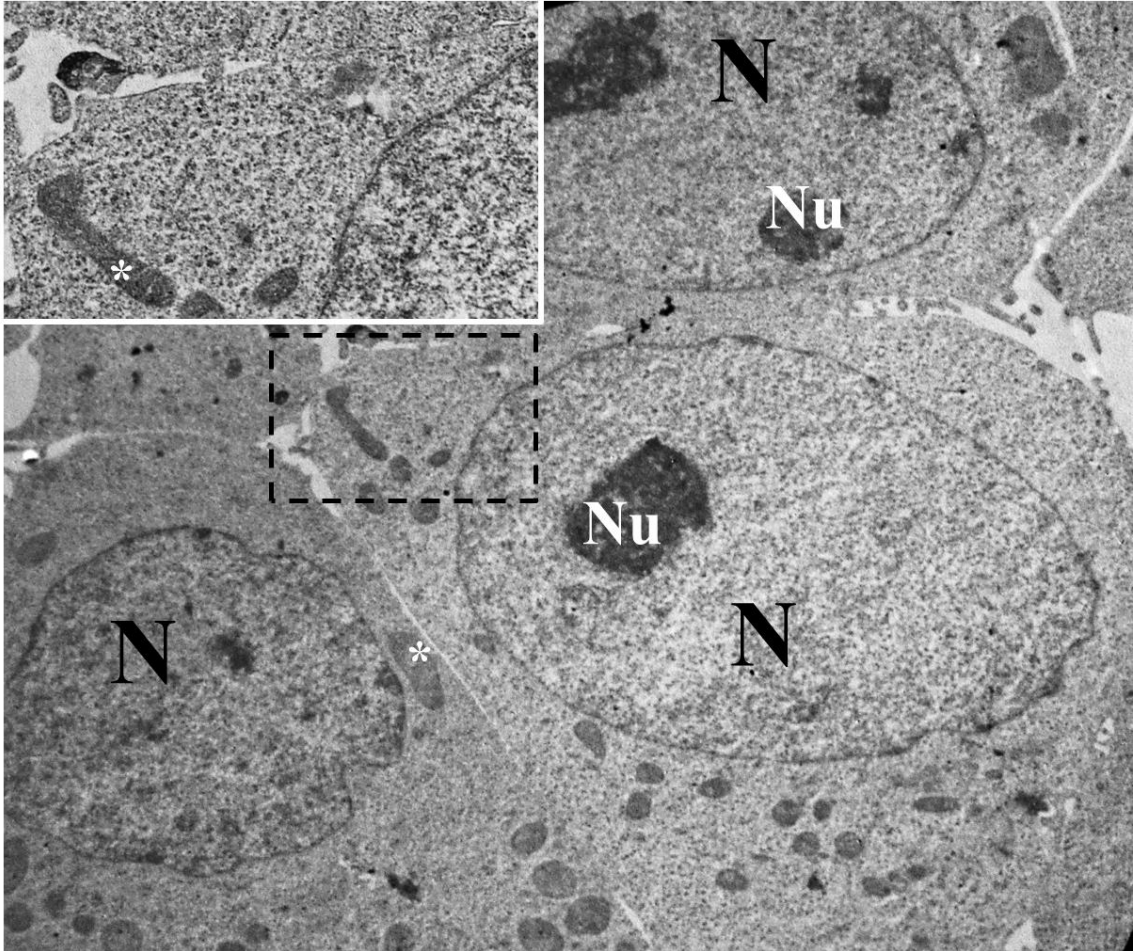
Siyah oklar: Hücre membranı, Kırmızı oklar: Düzensiz nuklear membran alanları, Siyah daireler: Hasarlı mitokondriler.



Şekil 4- 29: H₂O₂ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X15 000.

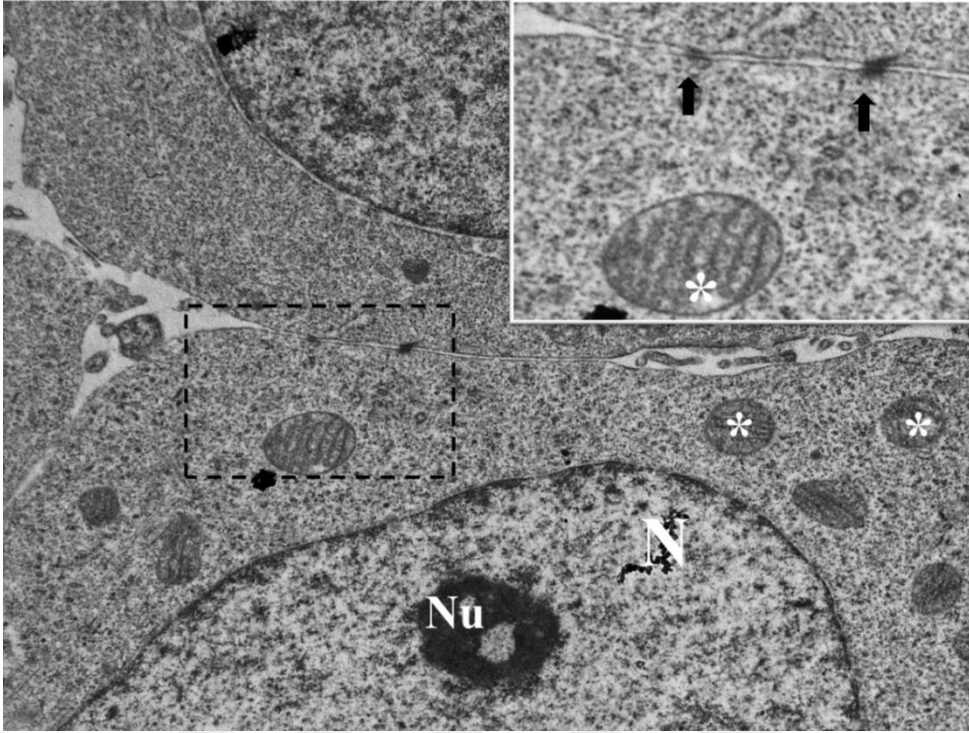
Siyah oklar: İnterselüler alan, Kırmızı oklar: Sitoplazmik uzantılar, Siyah daireler: Otofajik yapılar, Kırmızı yıldız: Miyelin figürler. Beyaz yıldız: Mitokondri.

Greft grubunda ise normal strükture sahip ökromatik nukleus, nukleolus, nuklear membran, hücre membranı, düzgün kristal mitokondriler ve yapılarını koruyan interselüler bağlantılar görüldü (Şekil 4-30, Şekil 4-31, Şekil 4-32). Uzamış mitokondriler görüldü (Şekil 4-30). Kontrol grubu ile uyumlu olarak G grubunda da sitoplazmada serbest ribozomlar ve GER yapıları korunmuştu, bölünmekte olan hücelere de rastlandı (Şekil 4-31).



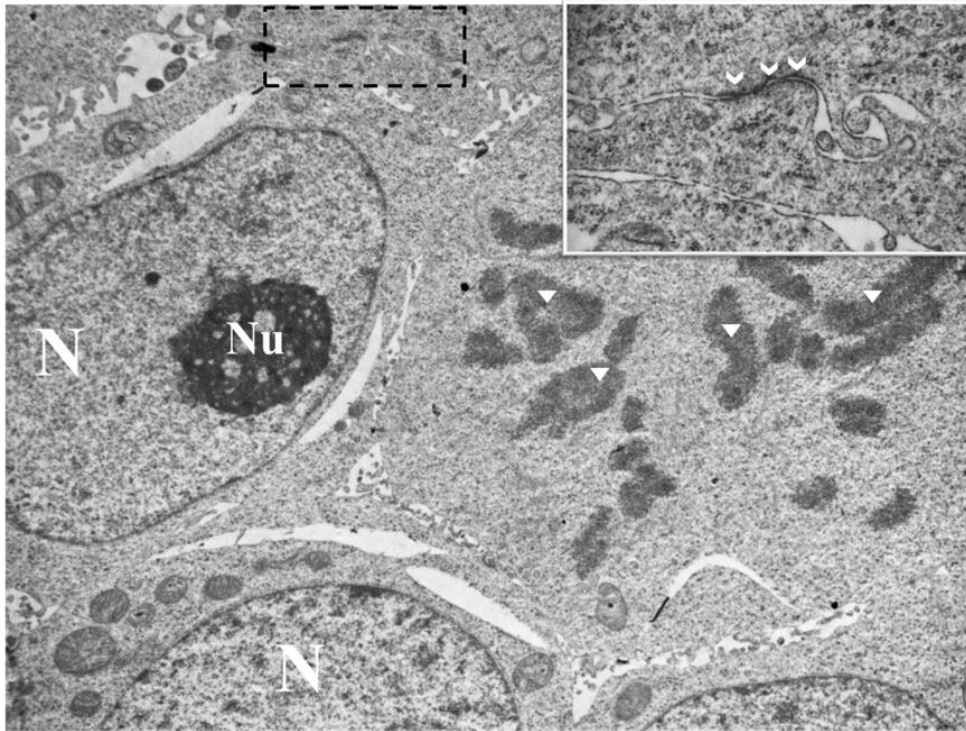
Şekil 4- 30: G grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X7500, küçük resim: X12 000.

N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Beyaz yıldızlar: Mitokondri, Siyah kesik çizgili çerçeve: Büyütülen alan



Şekil 4- 31: G grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X12 000, küçük resim: X25 000.

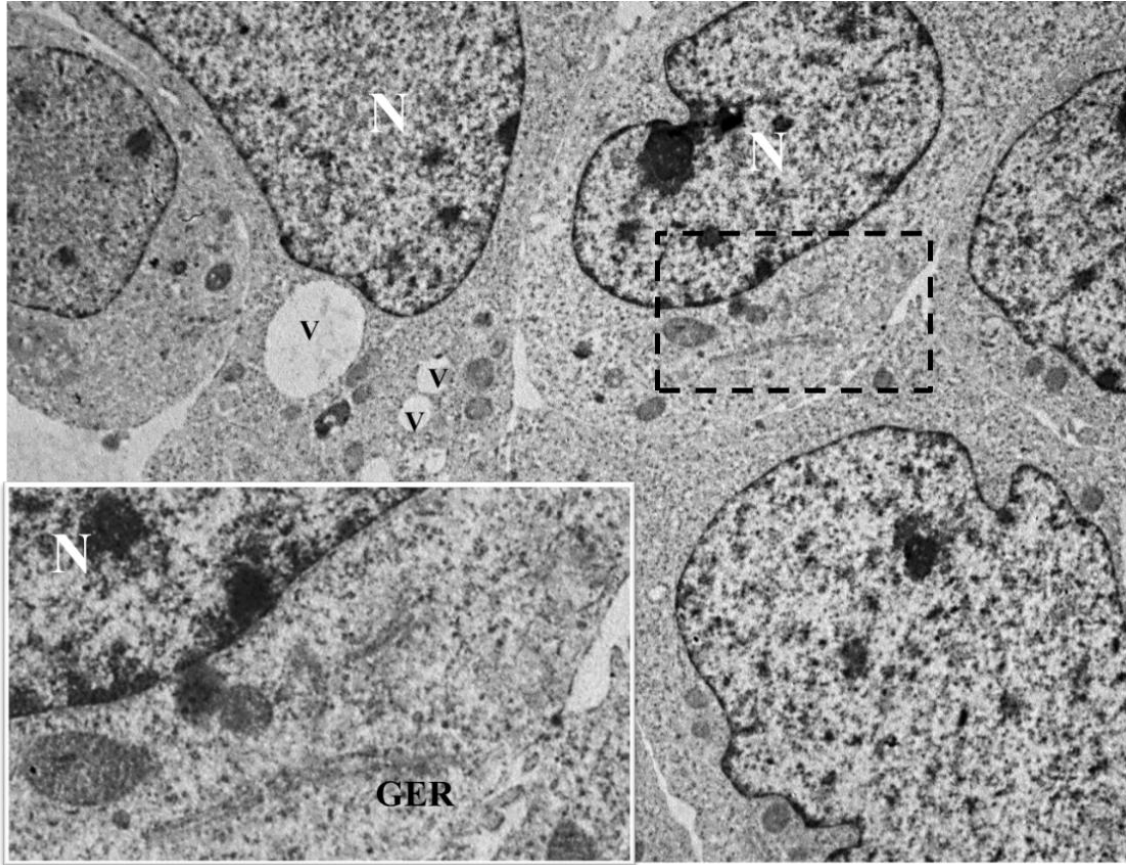
N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Beyaz yıldızlar: Mitokondri, Siyah oklar: İnterselüler bağlantılar, Siyah kesik çizgili çerçeve: Büyütülen alan



Şekil 4- 32: G grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X6000, küçük resim: X40 000.

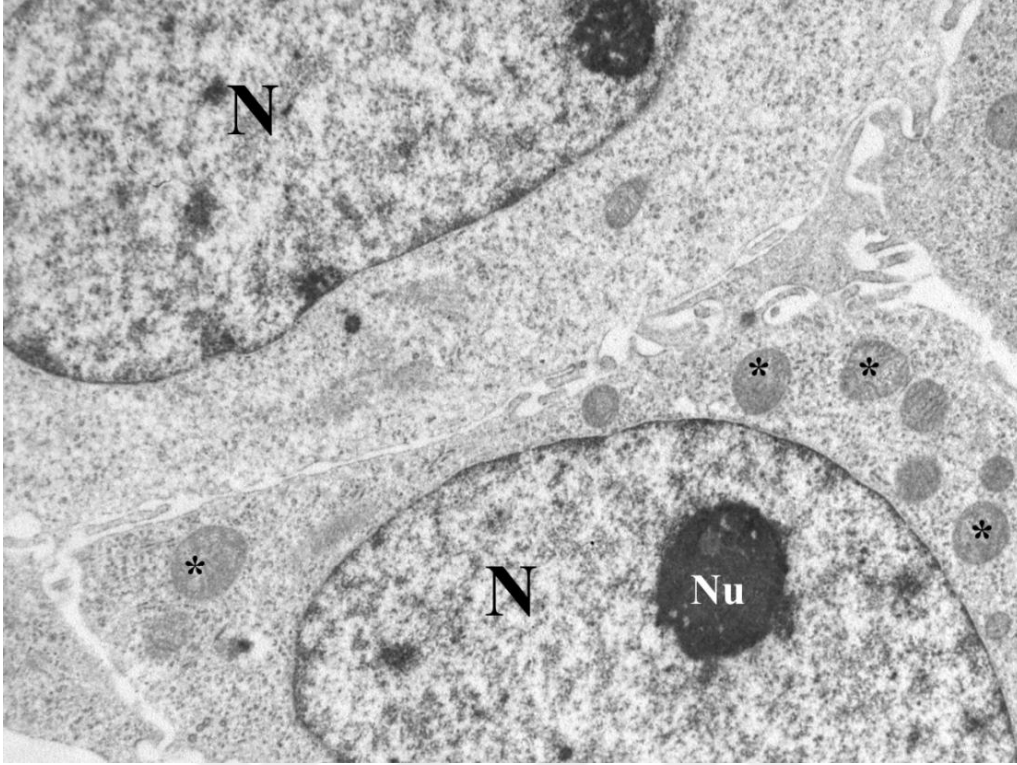
N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Beyaz üçgenler: Bölünmekte olan hücrenin kromozomları, Siyah kesik çizgili çerçeve: Büyütülen alan, Beyaz ok başları: İnterselüler bağlantılar.

Sadece RES uygulanan grubun TEM görüntülerinde hücrelerin interselüler bağlantılarını korudukları, normal yapıda nükleus, nükleolus, hücre membranı ve nükleer membrana sahip oldukları görüldü (Şekil 4-33, Şekil 4-34). Sitoplazmada çok sayıda serbest ribozom göze çarpmaktaydı. GER yapısı korunmuştu (Şekil 4-33). Bazı hücre sitoplazmalarında az sayıda vakuolizasyona rastlandı. (Şekil 4-33) İnterselüler boşluklar normale yakın izlendi (Şekil 4-35).

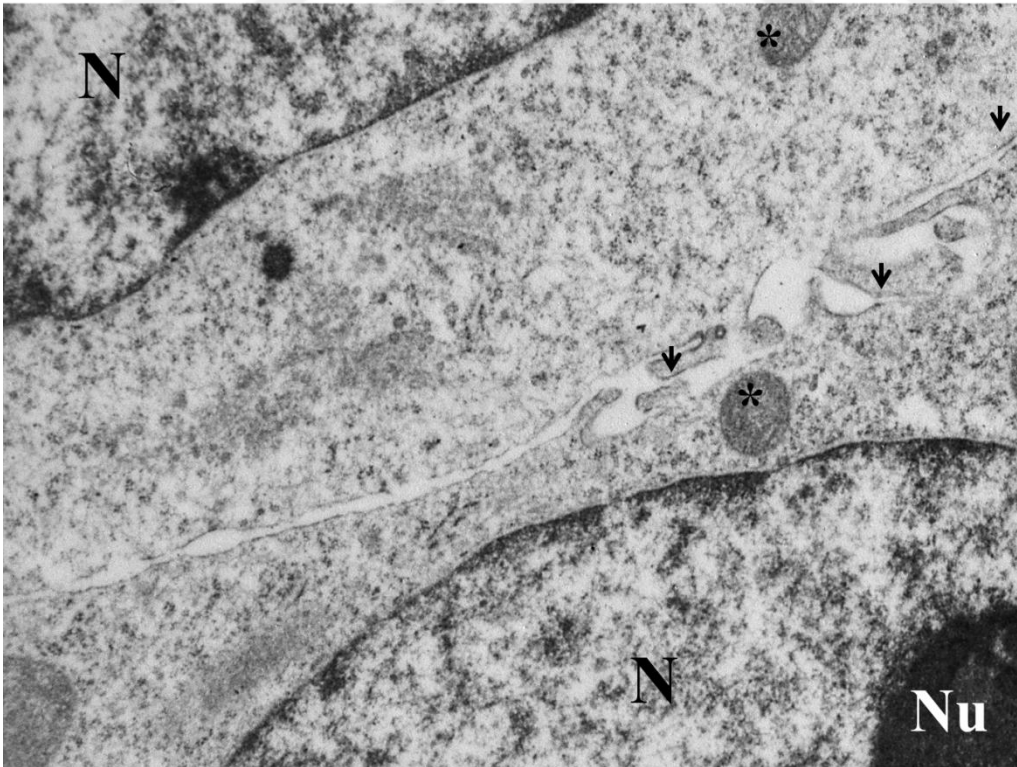


Şekil 4- 33: RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X5000, küçük resim: X10 000.

N: Nükleus, V: Vakuoller, Siyah çerçeve: Büyütülen alan, GER: Granüllü endoplazmik retikulum

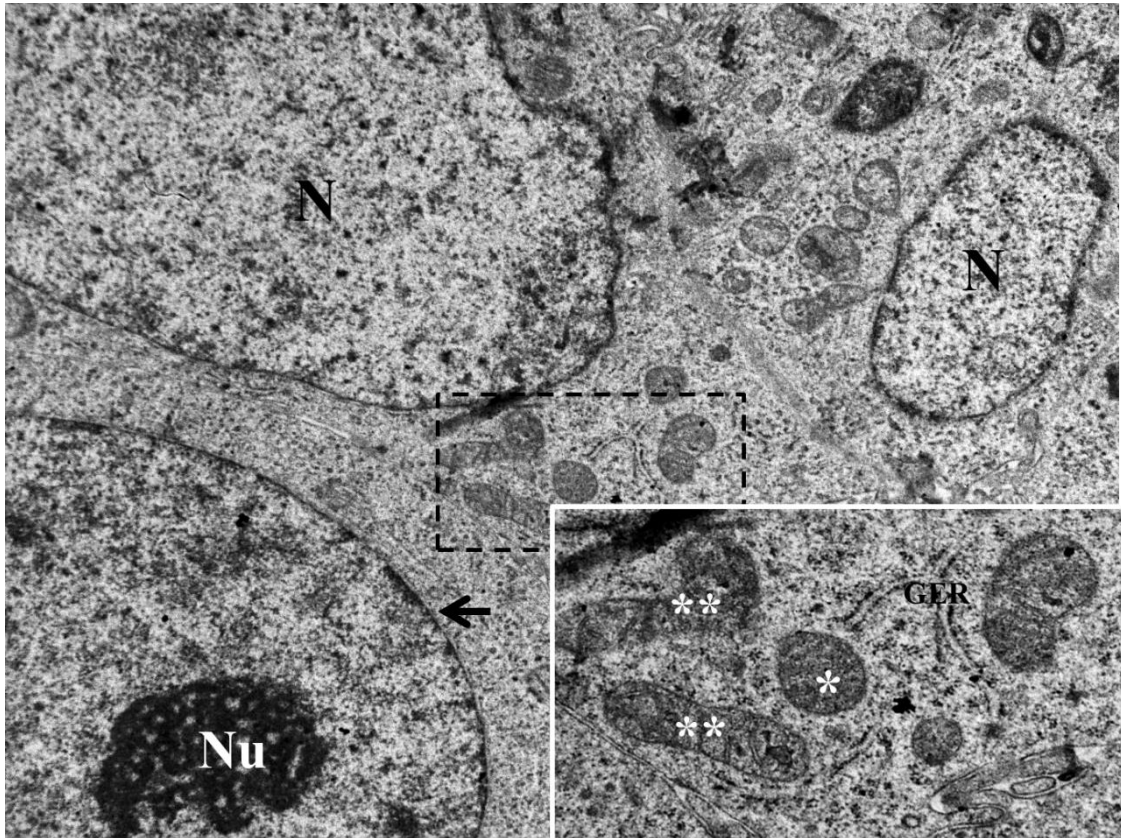


Şekil 4- 34: RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X10 000.
N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Siyah yıldız: Mitokondri.



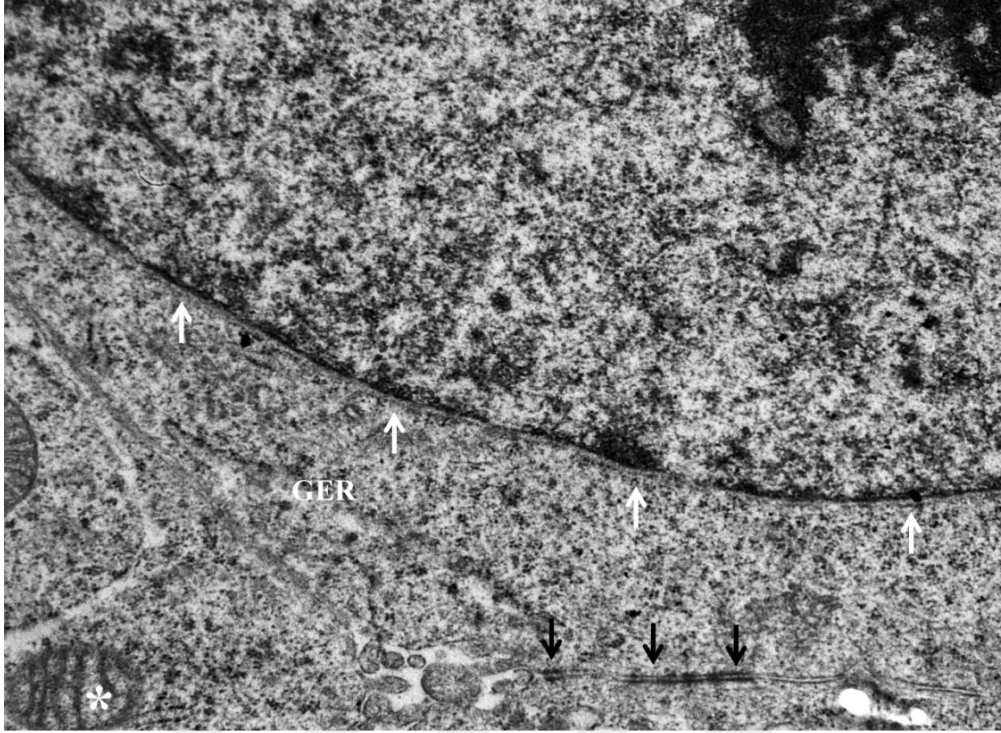
Şekil 4- 35: RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X20 000.
N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Siyah yıldız: Mitokondri, Siyah ok: İnterselüler boşluklar.

G+RES uygulanan grubun TEM görüntülerinde hücrelerin interselüler boşluklarını ve bağlantılarını korudukları, normal strüktürde ökromatik nukleus, nukleolus, hücre membranı ve nuklear membrana sahip oldukları görüldü (Şekil 4-36, 4-37). Sitoplazmada uzamış mitokondriler ve çok sayıda serbest ribozom göze çarpmaktaydı (Şekil 4-36, Şekil 4-37). Bazı bölgelerde belirgin GER yapıları da izlendi (Şekil 4-36, 4-37, 4-38).



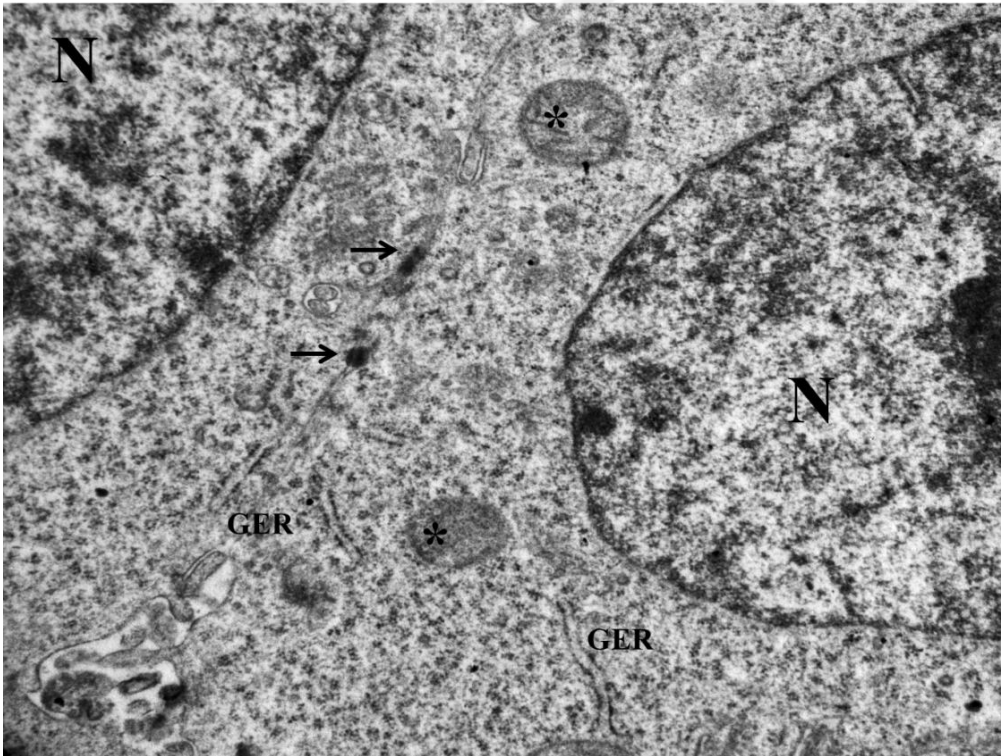
Şekil 4- 36: G+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000, küçük resim: X20 000.

N: Nukleus, N: Nukleolus, Siyah ok: Nuklear membran, Siyah çerçeve: Büyütülen alan, GER: Granüllü endoplazmik retikulum, Tek yıldız: Mitokondri, Çift yıldız: Uzamış mitokondriler.



Şekil 4- 37: G+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X10 000.

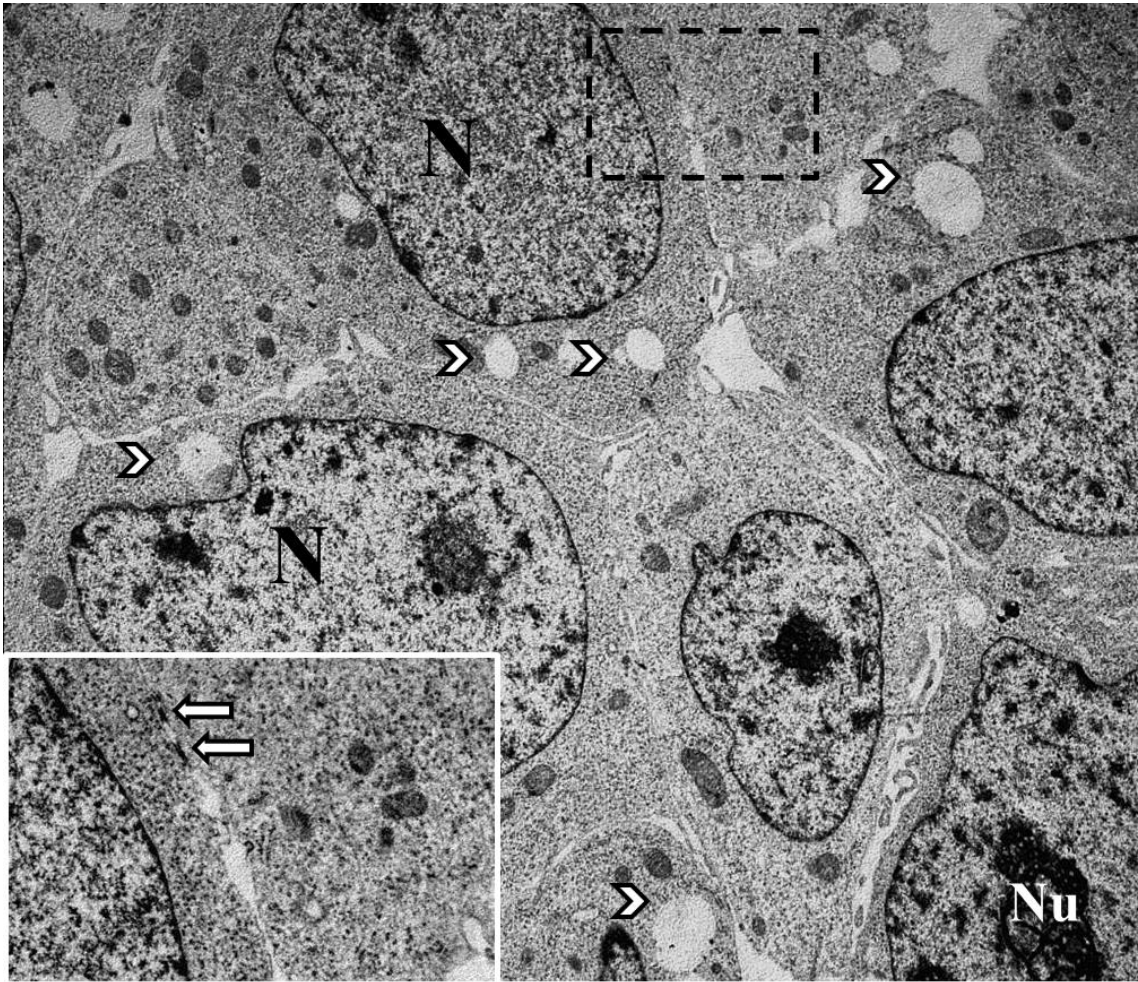
N: Nükleus, N: Nükleolus, Beyaz oklar: Nüklear membran, GER: Granüllü endoplazmik retikulum, Yıldız: Mitokondri, Siyah oklar: İnterselüler bağlantılar.



Şekil 4- 38: G+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X10 000, küçük resim: X20 000.

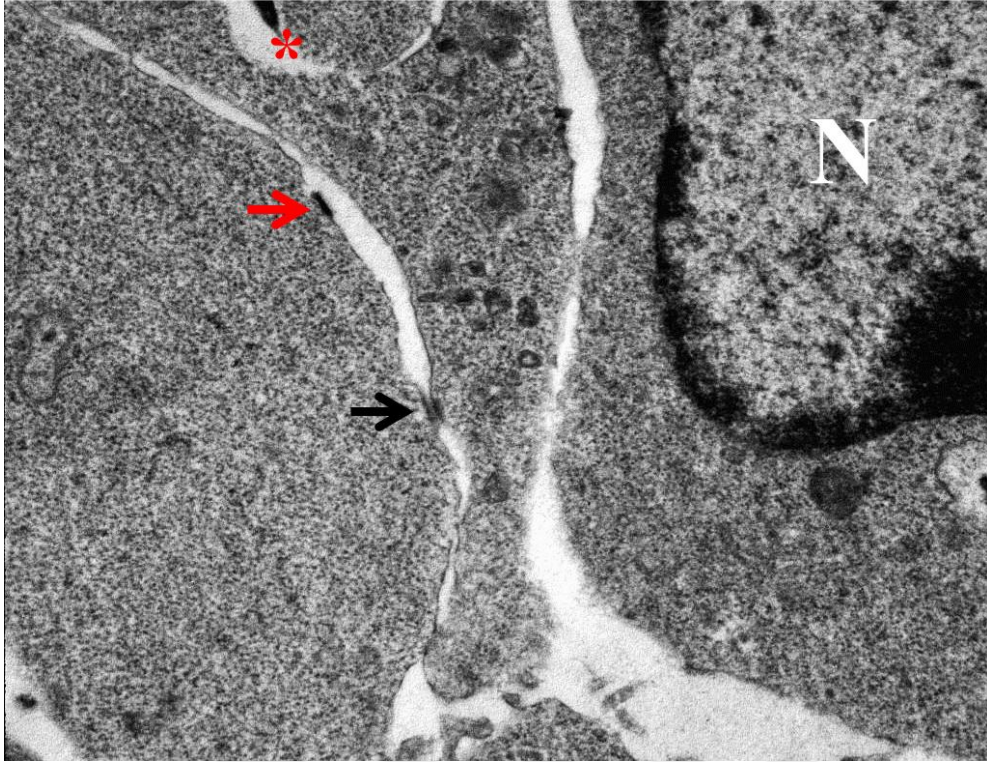
N: Nükleus Siyah oklar: İnterselüler bağlantılar, Siyah yıldız: Mitokondri.

H_2O_2+G grubundan elde edilen 3T3 fibroblastların TEM görüntülerinde H_2O_2 grubu strüktürüne yakın hücreler izlendi (Şekil 4-39). İnterselüler boşluk ve bağlantıların tam olarak korunmadığı görüldü. Bağlantılarda yer yer ayrılmalar ve sitoplazmik dejenerasyonlar saptandı (Şekil 4-40). Sitoplazmada dejenere mitokondrilerin yanı sıra vakuoller izlendi ve organel fakirliği saptandı (Şekil 4-39, Şekil 4-40). Nuklear membran yapısının yer yer incelendiği, bazı alanlarda iç ve dış tabakalar arasında mesafenin artmış olduğu izlendi. Otofagozom yapılarına da rastlandı (Şekil 4-41).

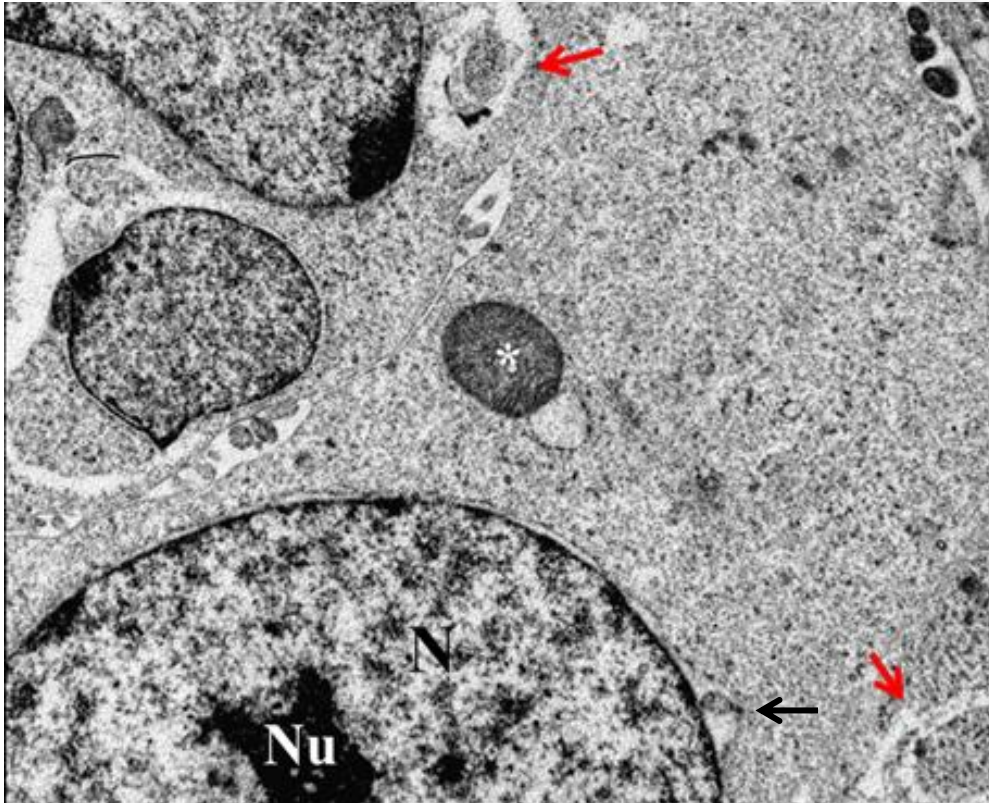


Şekil 4- 39: H_2O_2+G grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X5000, küçük resim: X15 000.

N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Ok başları: Vakuoller, Oklar: İnterselüler bağlantılar, Siyah kesik çizgili çerçeve: Büyütülen alan.

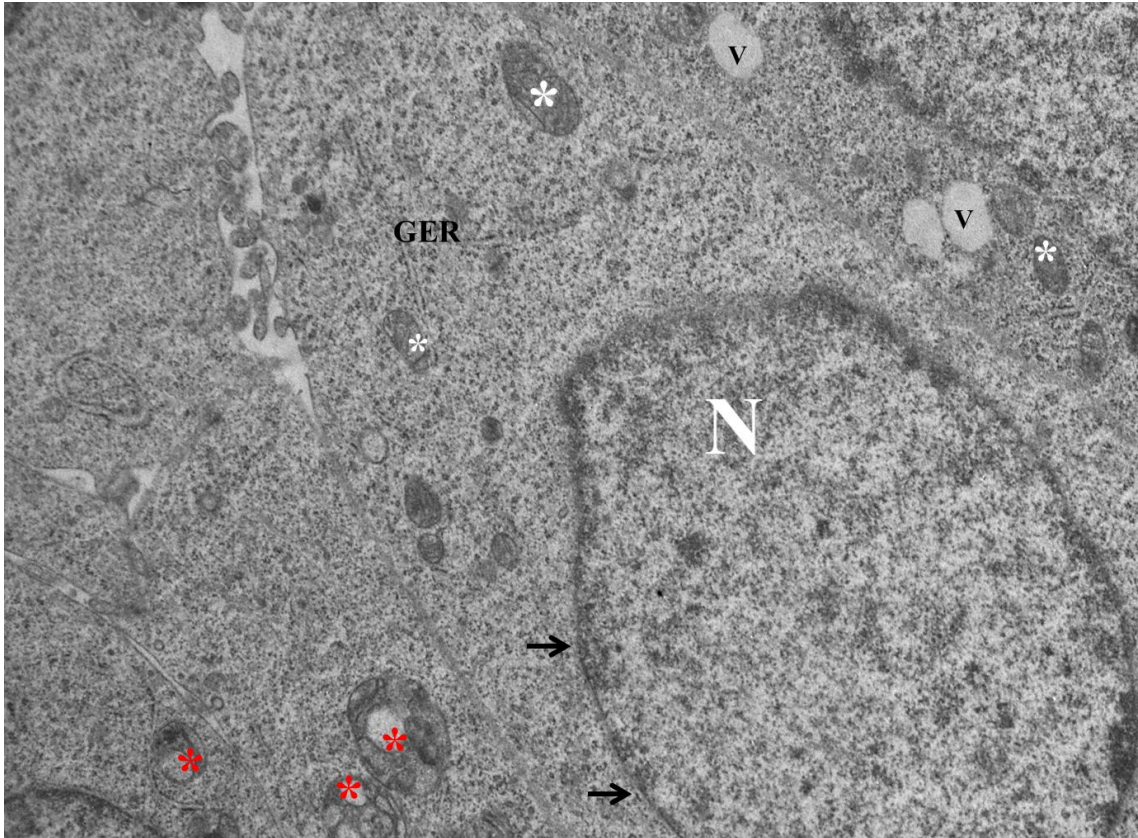


Şekil 4- 40: H₂O₂+G grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X25 000.
N: Nukleus, Siyah ok: İnterselüler bağlantı, Kırmızı ok: Kopmuş interselüler bağlantı, Yıldız: Otofagozom.



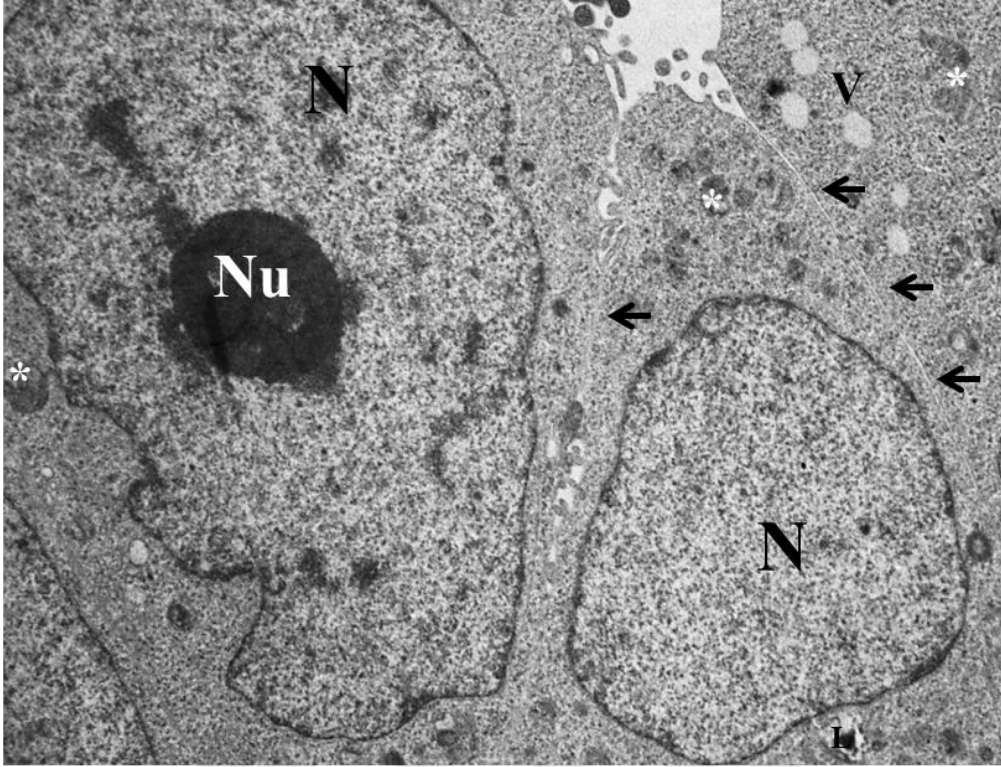
Şekil 4- 41: H₂O₂+G grubu 3T3 hücrelerinin TEM görüntüsü, X10 000
N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Siyah ok: Nuklear membran, Yıldız: Mitokondri, Kırmızı ok: Otofagozomal yapılar.

H_2O_2 +RES grubundan elde edilen 3T3 fibroblastların TEM görüntülerinde normal strükture yakın nukleus, nukleolus, hücre membranı ve nuklear membran yapıları görüldü (Şekil 4-42). İnterselüler boşlukların normal olduğu ve bağlantıların korunduğu izlendi (Şekil 4-43). Az sayıda otofagozomal yapı saptandı (Şekil 4-42). Sitoplazmada çok az sayıda dejeneratif mitokondri izlendi ve H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldığında çok daha az vakuol göze çarpıyordu (Şekil 4-42). Sitoplazmada yapısını korumuş Golgi, çok miktarda serbest ribozom ve kristalleri korunmuş, normal ultrastrükture sahip mitokondriler görüldü (Şekil 4-44).



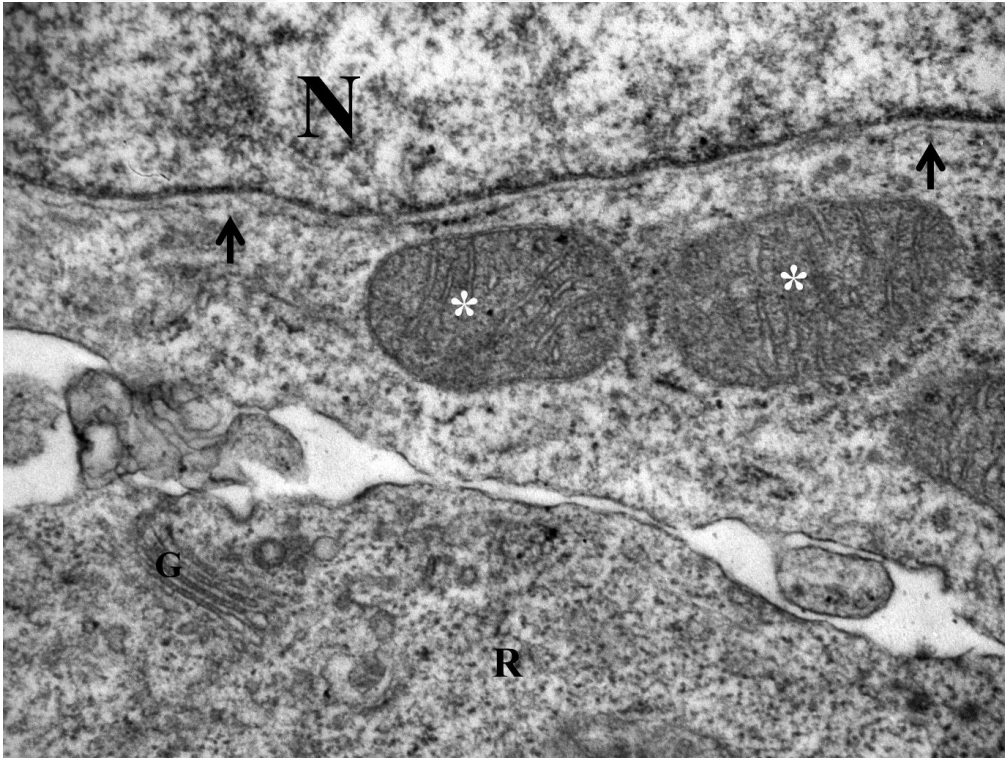
Şekil 4- 42: H_2O_2 +RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X12 000

N: Nukleus, Siyah ok: İntakt nuklear membran, V: Vakuolizasyon, Beyaz Yıldız: Mitokondri, Kırmızı yıldız: Mitokondri dejenerasyonu, GER: Granüllü endoplazmik retikulum.



Şekil 4- 43: H₂O₂+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X7500, küçük resim: X40 000.

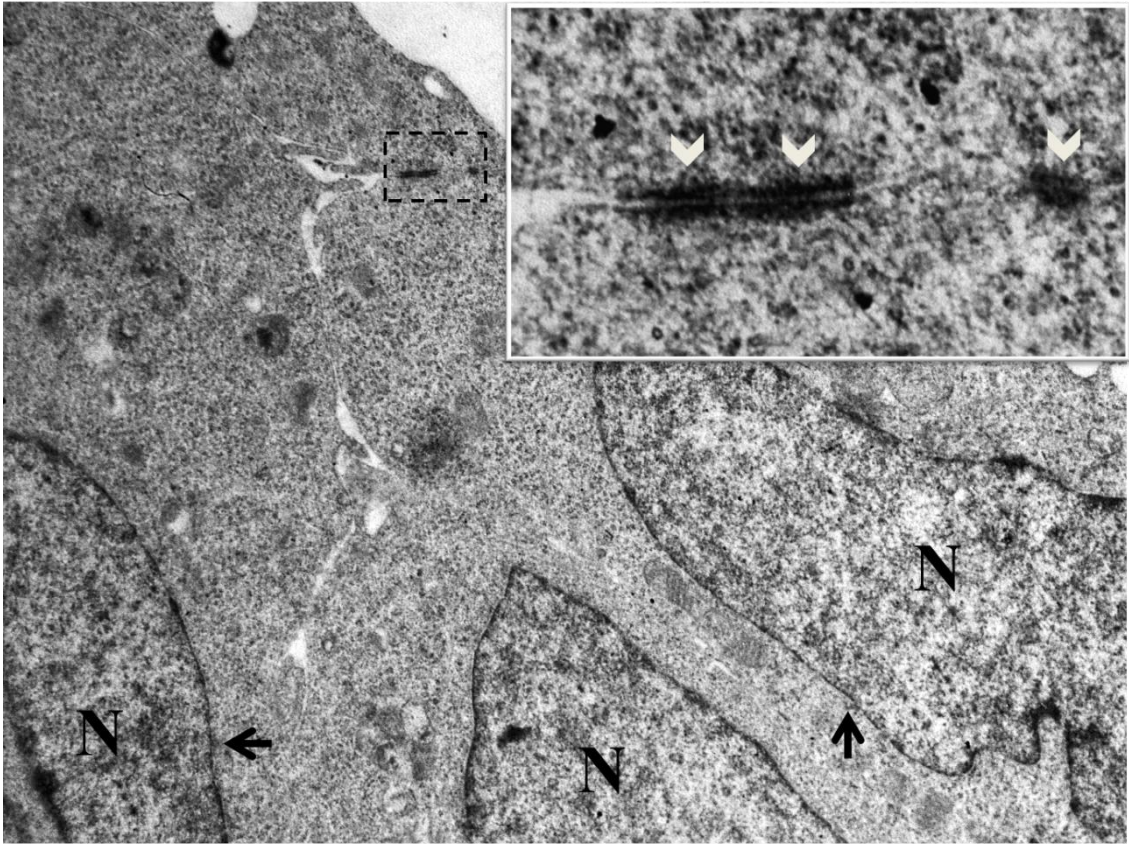
N: Nukleus, Nu: Nukleolus, Siyah ok: İnterselüler aralık, V: Vakuoller, Beyaz yıldız: Mitokondriler, L: Sekonder lizozom.



Şekil 4- 44: H₂O₂+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüsü, X40 000.

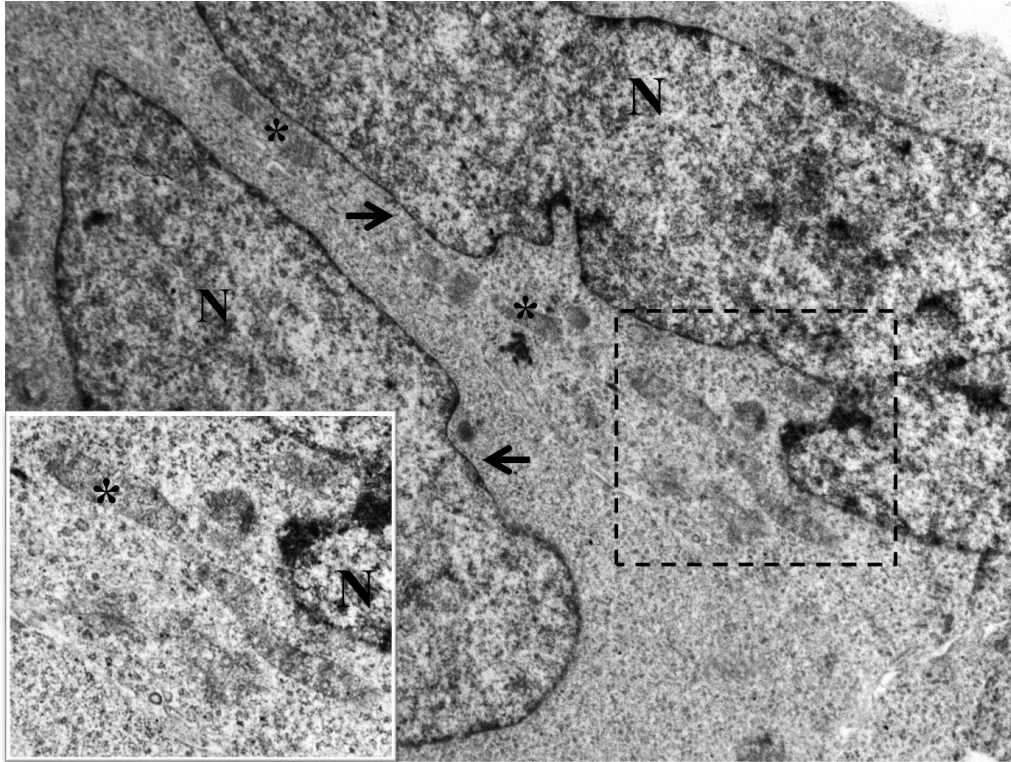
N: Nukleus, Siyah ok: İntakt nuklear membran, G: Golgi, R: Serbest ribozomlar, Beyaz Yıldız: Mitokondri.

$H_2O_2+G+RES$ grubundan elde edilen 3T3 fibroblastların TEM görüntülerinde normal strükture yakın nukleus, nukleolus, hücre membranı ve nuklear membran yapıları görüldü (Şekil 4-45). İnterselüler boşlukların ve interselüler bağlantıların normal ultrastrükture benzer olduğu saptandı (Şekil 4-45, Şekil 4-46, Şekil 4-47). Sitoplazmada az sayıda dejeneratif mitokondri görüldü (Şekil 4-45). Ayrıca bazı alanlarda kristalleri normal ultrastrükture sahip ve uzamış mitokondriler de izlendi (Şekil 4-46). H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldığında vakuoller saptanmadı. İntakt nuklear membrana, hipertrofik ancak kristalleri korunmuş mitokondri ve normal görünümde GER yapılarına rastlandı (Şekil 4-47).



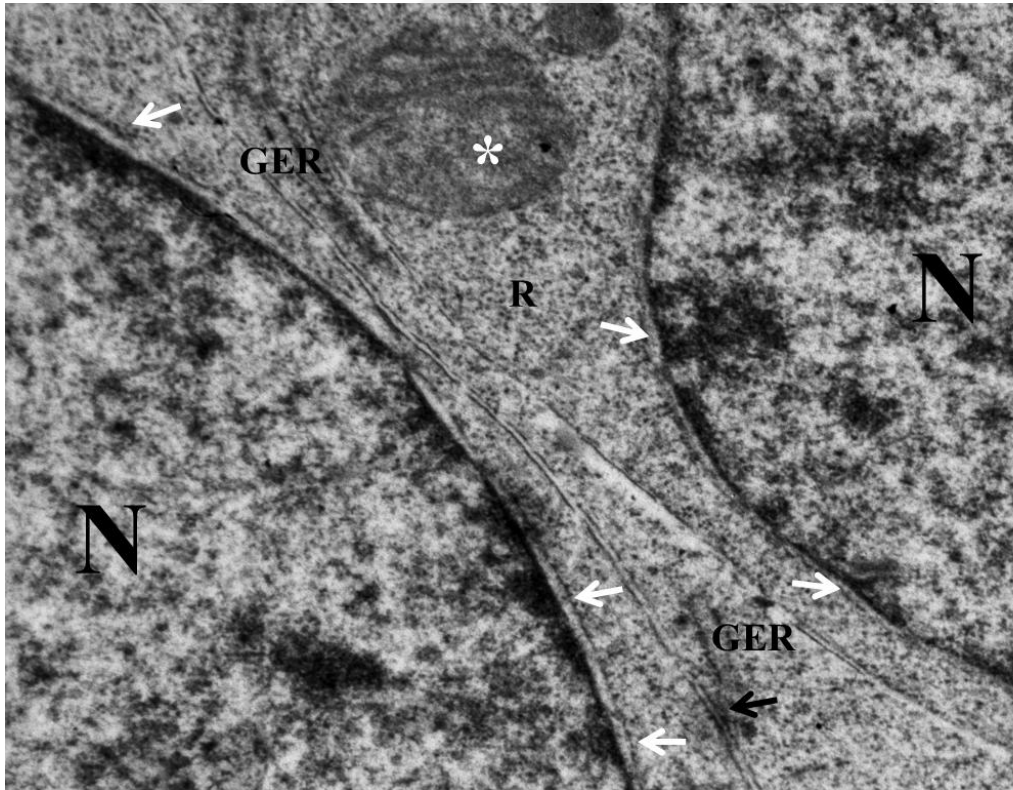
Şekil 4- 45: $H_2O_2+G+RES$ grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000, küçük resim: X60 000.

N: Nukleus, Siyah ok: İntakt nuklear membran, Siyah çerçeve: Büyütülen alan, Beyaz ok başları: İnterselüler bağlantılar.



Şekil 4- 46: H₂O₂+G+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000, küçük resim: X20 000.

N: Nukleus, Siyah oklar: İntakt nuklear membran, Siyah çerçeve: Büyütülen alan, Siyah Yıldız: Uzamış mitokondri.



Şekil 4- 47: H₂O₂+G+RES grubunun 3T3 hücrelerinden elde edilen TEM görüntüleri, X10 000.

N: Nukleus, Beyaz oklar: Nuklear membran, Beyaz Yıldız: Mitokondri, Siyah ok: İnterselüler bağlantılar, R: Serbest Ribozomlar, GER: Granüllü endoplazmik retikulum.

5. TARTIŞMA

3T3 fibroblast hücre soyu kullanılarak oluşturduğumuz in-vitro modelde, son yıllarda diş hekimliğinde kemik greft materyali olarak tercih edilen Ti-oss® ile antiseptik solüsyonlarda ve diş beyazlatma prosedürlerinde kullanılan H₂O₂' in etkileri ve bir antioksidan olan RES'in potansiyel terapötik rolü incelenmiş; PDT indeksleri, S fazındaki hücre oranları, oksidatif stres düzeyleri, hücre migrasyon oranları, COL1A2 mRNA ekspresyonu ve ultrastrüktürel yapı seviyesindeki değişiklikler ortaya konmuştur.

Ortopedik, kraniyofasiyal ve dental işlemlerde kemik greft uygulamaları yaygın olarak yapılmaktadır. Alveolar kemik ve periyodontiumun rejenerasyonu iyileşme açısından zorlu bir süreçtir (170). Diş hekimliğinde periyodontal doku rejenerasyonu için çeşitli kemik greft materyalleri kullanılmaktadır (169). Kemik defeklerinin rekonstrüksiyonu için klinisyenler tarafından kullanılan kemik greftlerinin en ideal materyalini bulmak yıllardır araştırmacıların hedefi olmuştur. Bunlar arasında sayılan otojen greftler kemik rejenerasyonu için altın standart olarak belirlense de greft materyalinin kaynakları sınırlıdır ve otojen kemiğin toplanması cerrahi işlem gerektirmektedir. Bu da donör greft bölgesinin morbiditesi, uzayan operasyon süreleri ve yüksek maliyetlerle ilişkilidir (65). Otojenik greftlere alternatif olarak çeşitli allojenik, ksenojenik veya alloplastik kaynaklar da uygulanmaktadır. Bunlardan biri olan sığır kemiği ksenogreftleri, immünolojik reaksiyonları önlemek için organik bileşenleri tamamen yok edilmiş materyallerdir. Kalan inorganik yapı doğal yapısal bir matriks ve önemli bir kalsiyum kaynağı sağlamaktadır (65). Son 20 yılda geliştirilen bu greftlerin fonksiyonunu ve kemik oluşturma yeteneklerini anlamak klinisyenlere çok sayıda yerine koyma (replasman) seçeneği sağlamaktadır. Osteokondüktif (yapısal destek) modellerin özelliklerini tanımlamak üzere tasarlanan araştırmalar klinik ve hayvan çalışmalarından önce in vitro olarak test edilmektedir. İn vitro testlerin tasarımı için de çok sayıda protokol geliştirilmiştir (168, 169, 170). Greft materyallerin biyoyumluluğunu ve güvenilirliğini belirlemek üzere rutin olarak in vitro araştırmalar yapılmakta, greftin hücre adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması üzerine etkileri incelenmektedir (168).

Dental rejeneratif cerrahide alveoler defektler için deproteinize sığır kemik greftleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu greftler farklı kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olabilirler. Ticari olarak farklı partikül yapılarında ve büyüklüklerinde olup blok olarak da bulunmaktadır. Güncel olanı ve bizim de deneylerimizde kullandığımız demineralize sığır ksenogrefti olan Ti-Oss® kemik rejeneratif prosedürleri için geliştirilmiştir. Ancak bu yeni materyalin klinik ve in vitro çalışmaları çok yetersizdir. Ekaterina ve ark. 2012 yılında sıçan kalvaryalarında yaptıkları Ti-Oss® ile ilgili ilk çalışmada bu ksenogreftin kemik iyileştirmedeki etkinliğini ticari olarak farklı greftlerle karşılaştırmışlardır (65). Ti-Oss® uygulanan sıçanlarda histomorfometrik analizle yeni kemik oluşumunun daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bu yeni ksenogreftin kemik greft materyali olarak biyoyumlu olduğunu ve kritik büyüklükteki kemik defektlerini iyileştirmede etkili olabileceğini ve ticari olarak mevcut olan ürünlerle yarışabileceğini vurgulamışlardır. Literatürde in vitro olarak greft materyali Ti-Oss® uygulanan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Greft yerleştirildikten sonra oral mukoza direkt kapatılırsa bağ doku fibroblastları greftle temasa geçerler. Bu temasın iyileşme bölgesindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Son zamanlarda Ti-Oss® greftinin diş hekimliğinde sıklıkla kullanılıyor olması nedeniyle iyileşme bölgesindeki olası etkileri oluşturduğumuz in vitro modelde incelenmiştir.

Test edilmiş kemik greft materyallerinin geniş yelpazesine rağmen greft yoğunluğunun hücre davranışlarına gerçek etkileri henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Vaziri ve ark. insan osteoblast benzeri hücre soyu olan SaOS-2 hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada ticari olarak bulunan ve dondurularak kurutulan demineralize kemik allogreft tozlarına ait farklı miktarların (4, 8, 12, 16 ve 20mg/ml) morfolojik etkilerini incelemişler, 20mg/ml konsantrasyonla 24 saatlik inkübasyonun toksik etkiye sahip olduğunu ancak daha düşük dozlarda hücrelerin normal morfoloji gösterdiğini kaydetmişlerdir (169). 24 ve 48 saatlik inkübasyonları hücre proliferasyonu açısından karşılaştırdıklarında 8 mg/ml konsantrasyonda proliferasyon oranının anlamlı derecede arttığını bulmuşlardır. Allogreftin osteoindüktif aktivitesinin doza bağlı olduğu, hatta 3 günlük uygulamalarda hücrelerin osteoblastlara farklılaştığı sonucuna varmışlardır (169). Miron ve ark. kemik grefti olarak kullandıkları doğal kemik mineralinin farklı yoğunluklarının, primer insan osteoblastlarının adezyon, proliferasyon ve farklılaşmasına etkilerini test ettikleri in vitro çalışmada, hücre adezyonunun 100 mg dozda anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir (168).

Hücrelerin çok düşük yoğunluklarda greft partikülleri yerine kültür kabına bağlanmayı tercih edebileceğini ve yüksek yoğunlukların in vitro testlerde daha gerçekçi bir yaklaşım olabileceğini iddia etmişlerdir (168). Çalışmamızda greft materyali olarak kullandığımız Ti-oss® materyalinin 3T3 fibroblast hücre davranışına etkilerini inceledik. PDT indeksi sonuçlarımıza göre kontrol grubu ile greftin farklı konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark olmaması greftin biyouyumlu olduğunu göstermiştir. Yüksek dozlarda (4 ve 8mg/ml) görülen PDT indeksinin anlamlı olmayan artışı ve hücre proliferasyonunun anlamlı düşüşü greftin volümetrik olarak büyük bir alanı kaplamasına ve kültür kaplarında yeterli alanın kalmamasına bağlı olabilir. Ya da yüksek greft yoğunluklarında hücreler greftlere kolayca ulaşip onlar üzerinde büyümeyi tercih edebilir böylece sayılamayarak değerlendirme dışı kalabilirler. Ayrıca BrdU protokolünde HCl uygulandığında greft parçaları eridiği için ve onlar üzerinde bulunan hücreler değerlendirilemediği için proliferasyon indeksinde bir azalma izlenmiş olabilir. 3T3 fibroblast modelinde yaptığımız ROT floresan analizi de greftin herhangi bir dozunun oksidatif strese yol açmadığını ve biyouyumlu olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda en yüksek proliferasyon oranı Ti-Oss® 1mg/ml dozunda görüldüğü için bu doz etkin doz olarak seçilmiştir. Bu doz volümetrik açıdan da uygun doz olarak belirlenmiştir.

Yeterli osteoindüktif ve osteokondüktif aktivite gösteren ksenogreftlerin histolojik olarak yeni kemik oluşumunda köprü görevi gösterdikleri düşünülmektedir. Bu mekanizmayla, artan ksenogreft partikülleri yeni vital kemik ile kısmen kaplanır ve yakınlarındaki partiküllerle birleşirler (171). Ksenogreft olarak kullanılan sığır kemiğinin özellikle ulaşılabilirliği sınırsızdır, fizikokimyasal yapısı insan kemiğine benzerlik gösterir (172). Sığıra özel hastalık geçişlerini önlemek için farklı türlerden elde edilen ksenogreft materyalleri de diş hekimliğinin klinik ve araştırma alanlarında kullanılmıştır (173). Ancak ksenojenik kemik greft için immün cevaba yol açabilecek antijenlerin ortadan kaldırılması bir önceliktir. Deproteinize kemiklerin immün reaktivitelerini kaybettikleri, ek olarak osteoindüktif ve osteokondüktif aktivitelerini de geri kazandıkları gösterilmiştir (174). Deproteinize hale getirilen bu ksenogreftler maksiller sinüs büyütme ve sinüs tavanını kaldırma operasyonları için de yeterli kemik grefti potansiyeline sahiptirler (175). Bu materyallerin osteointegrasyon ve parçalanma süreçleri, fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir ve biyolojik cevabın bir kısmı bu özelliklerle kontrol edilmektedir. Bu özellikler arasında granül büyüklükleri, yapı

morfolojileri, gözeneklilikleri, yüzey pürüzleri ve kalsiyum/fosfat oranı yer alır (172, 176, 177). Ramirez Fernandez ve ark. sinüs kaldırma prosedürlerinde kullanılan iki ksenogreftin (deproteinize domuz kemik materyali ve deproteinize sığır kemik materyali) fizikokimyasal özelliklerini klinik vakalardan aldıkları örneklerde histomorfometrik ve SEM analizleriyle karşılaştırmışlardır. Her iki greftin dental implantlarda kullanımının vertikal kemik boyutunu artırdığı, sığır kemik greftin diğer grefte kıyasla yeni kemik oluşumunu anlamlı derecede artırdığı, domuz kemik greftin ise partikülleri saran mineralize olmayan doku miktarını ve gözenekli yapıyı artırdığı gösterilmiştir (171). Ayrıca deprotenize kemiklerin trabeküler ve porlu yapıları kan damarları ile osteojenik mezenkimal hücrelerin göçü için elverişli bir ortam sağlamaktadır. Bunun yanı sıra trabeküler yapıları kemik hücrelerinin büyümesi için destek sağlamakta olup kemikleşmede büyük önem taşımaktadır. Bahsettiğimiz bu özellikler araştırmacıları dental prosedürlerde, biyolojik osteokondüktif materyal olarak ksenogreftlerin altın standardı olan sığır kemik materyalini seçmeye yönlendirmektedir (178).

Greft kemik materyallerinin osteokondüktif aktiviteleri osteojenik hücre ve mikrodamarların büyümesine yardımcı olarak yeni kemik oluşumunu desteklemektedir (179). Ayrıca osteogenezi desteklerken düşük rezorpsiyon oranı gösterirler (180). Deproteinize sığır kemik materyallerinin osteojenik yeteneklerine rağmen yavaş rezorpsiyona uğramaları tasarımlarında geliştirmeye gidilmesi gerektiğini göstermektedir. Yüzey iyileştirmeleri termal ve kimyasal işlemlerle yapılabilmekte ve makro büyüklükte porlu hale getirilebilmektedirler (179). Ayrıca oktakalsiyum fosfat gibi kristallerin yüzeye bağlanmasıyla daha hızlı kemik oluşumu elde edilebilmektedir. Bu kristallerin bağlandığı sığır kemik greftlerinin por büyüklüklerinin, diğer greftlere kıyasla kısmen daha geniş olduğu kapiller ve hücrelerin büyümesi için uygun koşullar sağladığı ve anjiyogenez için önemli olduğu rapor edilmiştir (179, 181). Çalışmamızda kullandığımız Ti-oss® da pre hidroksil apatit (HA) molekülü yapısında oktakalsiyum fosfat kristalleri içerir. Strüktür olarak süngerimsi (multiporoz) bir yapıya sahiptir ve rezorbe olan bir materyaldir.

Kemik greftleri gerektiğinde ek moleküllerle birlikte kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır. Bunlar arasında hormonlar, büyüme faktörleri, membranlar ve antioksidanlar yer almaktadır (179). Rezorbe olan ve olmayan membranlar klinik

uygulamalarda çeşitli fonksiyonlara hizmet etmek üzere geliştirilmiştir (182). Membranlar, kemik greftlerin mobilizasyonunu azaltmak için, diş çekimlerinden sonra alveoler parçalanmalarda, atrofik alveollerde (183) veya diş çekilmesinden sonra oyuk kaplama için, çeşitli greft materyalleri ile birlikte kullanılabilir (184). Membranların tedavi ihtiyaçlarına göre avantajları ve dezavantajları olduğu bildirilmiştir (185). Rezorbe materyaller doğal veya sentetik polimer grubuna ait membranlardır, kolajen ve alifatik poliesterler tıbbi uygulamalarda en yaygın olarak kullanılanlardır (182). Rezorbe olmayan membranlar arasında polietrafloroetilen ve titanyum yer almaktadır. Bunların kullanımındaki en büyük dezavantaj ise ikinci bir cerrahi prosedürle çıkarılmalarının gerekmesidir (186). Rezorbe membranlar vücut tarafından emilebilir ve çıkarma cerrahisi gibi ikinci bir işlemi gerektirmez (187). Ancak rezorpsiyon dereceleri tahmin edilemediği için kemik oluşum miktarını önemli ölçüde değiştirebilir ve çok hızlı rezorpsiyona uğradığında sertlik azalır ve ek desteğe ihtiyaç duyulur. Büyük partiküllü greftlerin korunmasında da yetersizdirler (188). Membranlar yakın dokulardaki inflamatuvar reaksiyonlara maruz kaldıklarında yapısal bütünlük hızlıca etkilenir ve bariyer fonksiyonları azalarak daha az kemik rejenerasyonuna neden olurlar. Bu da implant yerleştirmede özellikle greftlemede problem yaratır ve implantlar dengesiz hale gelirler (189). Ayrıca membranlar pahalı materyallerdir ve bariyer membranlarının etkisi konusunda yeni yayınlanan bir sistematik değerlendirme ve meta analize göre membran kullanılan ve kullanılmayan hastalarda kemik oluşumu miktarları benzer bulunmuştur (190). Bu yüzden membransız kullanılacak bir greft ve greft materyalin iyileşme bölgesindeki etkisini değerlendirmek büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda tek başına greft kullanımının hücre proliferasyonunu yeterli düzeyde arttırdığı görülmüştür, sonuçlarımız oral cerrahide yaraların iyileşmesinde greftin membranla birlikte kullanımının elzem olmadığını düşündürmektedir.

Dişin çekildiği aşamada erken dönem implant yerleştirilmesinde implantın integrasyonunu ve çevresinde kemik oluşumunu hızlandırmak için kemik greftleri sıklıkla kullanılan materyallerdir (191). Son zamanlarda diş implantolojisinde yumuşak doku sağlığı başarılı bir implant için giderek daha çok ilgi çeken bir konu olmuştur. Thoma ve ark. 2018 yılında yayınladığı bir çalışmada subepitelial bağ dokusunun kalınlaşmasıyla daha yüksek interproksimal marjinal kemik seviyelerine ulaşıldığını göstermişlerdir. Yumuşak doku karakteristiklerinin periimplant kemiğin homeostazı ve

stabilitesinde önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca yeterli miktarda yumuşak doku iyileşmesi ve mukoza kalınlaşması sırasında implant izolasyonunun gerçekleştiği ve tartar oluşumunun önlenildiği gösterilmiştir (192). Çalışmamızda kullandığımız greftin mukozal fibroblastlar üzerinde yan etkileri olmadığı ve özellikle hücre proliferasyonunu arttırdığı ve kolajen normal sentezini etkilemediği için implant prosedürlerinde hızlı yara iyileşmesi ve yeterli doku oluşumunu sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

%3 H₂O₂ içeren oksijenli su gibi antiseptikler uygulama bölgesindeki hücelere karşı toksik olmalarına rağmen mikroorganizmaları yok etmek ve enfeksiyonu önlemek için de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu antiseptiklerin yüksek dozlarının kültüre edilmiş fibroblast hücrelerini in vitro olarak %100 oranında yok edebileceği bildirilmiştir (193). H₂O₂ efervesan ve oksijen üreten etkilere sahiptir. Efervesan etkisi yara yatağından debrisin kaldırılmasını ve salınan oksijenle anaerobik bakterilerin de ölümünü sağlar (194). %3 H₂O₂ lokal destekleyici olarak kemikteki dev hücre tümörlerinin intralezyonel küretajında da kullanılmaktadır (195). Bir sıçan yara iyileşme modelinde ise düşük konsantrasyondaki H₂O₂'nin yara iyileşmesini arttırdığı gösterilmiştir (196). Husodo ve ark. sıçan kırık iyileşmesi modelinde 2 ila 5 hafta arasında %3'lük H₂O₂ uygulamasının kemik doku oranını azalttığını, fibröz dokuyu arttırdığını ve kırık dokuyu arttırarak kemik iyileşmesini geciktirdiğini kaydetmişlerdir (194). %3'lük H₂O₂ uygulamasının kültüre edilmiş insan fibroblastlarına toksik olduğunu gösteren eski araştırmalara (197) karşın bizim kullandığımız orana yakın olan %1,5 ila %3,5 arasındaki oranların guinea domuzlarında iskemik ülserlerin iyileşmesini anjiyogenezi destekleyerek arttırdığını gösteren bir çalışma da mevcuttur (198). Tatnall ve ark. H₂O₂'in antibakteriyel konsantrasyonlarının keratinositlerde ve fibroblastlarda toksisiteye neden olduğunu göstermiştir (199). Bizim doz belirleme deneylerimizin sonuçlarına göre 750µM ve üzerindeki H₂O₂ miktarının toksik olduğu ve canlı hücrelerin tamamen ortadan kalktığı görüldü. 100µm H₂O₂ dozundan itibaren hücrelerin PDT indekslerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar varken 500µM dozunda (yaklaşık %1) PDT indeksi kontrol grubunun yaklaşık 2 katına çıktı. Dental işlemlerde oral mukoza hücreleri yüksek dozlarda H₂O₂'e maruz kaldığı için ön deney sonuçlarına göre 500µM H₂O₂ etkin doz olarak belirlendi, uygulama süresi olarak 48 saat seçildi.

Son zamanlarda estetik sebeplerle dişin istenmeyen görüntüsünü değiştirmek için diş beyazlatma teknikleri giderek artan hızda kullanılmaktadır (200). İki ana beyazlatma tekniği klinik ortamda hekimler tarafından ve günlük kullanımda kişilerin kendilerince uygulanmaktadır. Beyazlatma işlemi dişin organik matriksi içindeki pigmentli moleküller ile okside edici ajanlar arasındaki kimyasal reaksiyona dayanmaktadır. Beyazlatma prosedürü sırasında uzun zincire sahip pigmentli moleküller oksitlenerek daha küçük ve hafif moleküllere, karbon, su ve oksijenin de dahil olduğu diğer moleküllere ayrışırlar (201). Diş beyazlatma prosedürlerinde farklı okside edici kimyasallar sıklıkla uygulanmaktadır. Ana etkili beyazlatma ajanı H_2O_2 'dir ve diğer materyaller de yıkılarak bunu meydana getirirler. Örneğin beyazlatma ürünlerinde bulunan %10'luk karbamid peroksit %3,5'lik H_2O_2 meydana getirir (201). Diş hekimi tavsiyesiyle evde yapılan beyazlatmada konservatif bir metot olarak oksidatif ajanlar diş yüzeyi ile belirli bir süre temas etmektedir. Bu metotta oksidatif ajanlara maruziyet süresi beyazlatma ajanının konsantrasyonuna ve türüne göre değişmektedir (200, 202). Akbari ve ark. % 9 H_2O_2 içeren beyazlatma jelinin etkilerini inceledikleri bir çalışmada gönüllü hastalara 2 hafta boyunca günde 30 dk süreyle jel uygulanmıştır ve uygulama sonunda hastalarda sistemik oksidatif stresin anlamlı derecede arttığı görülmüştür (200). Diş hekimliğinde kontrollü klinik koşullarda genellikle H_2O_2 kullanılarak vital beyazlatma yapılmaktadır (203). Ancak koşullara bağlı olarak beyazlatma ajanlarının insan gingiva fibroblastları gibi bazı oral hücrelerde toksik etkilere ve kimi hastalarda gingival irritasyon ve ülserasyon gibi patolojilere yol açtığı bildirilmiştir (204,32). Gutiérrez-Venegas ve ark. insan gingival hücrelerinde H_2O_2 ile yaptıkları bir çalışmada H_2O_2 'nin protein kinaz C (PKC) ve ERK1/2 proteinleri üzerinden hücre proliferasyonunu azalttığını, 10 ila 200 mM arasında kullanılan dozların apoptoza neden olduğunu (203) başka bir çalışmada ise sitotoksik etkileri olduğunu göstermişlerdir (205). Sonuç olarak H_2O_2 'nin lokal sitotoksik etkiyle oksidatif stres düzeylerini arttırmanın yanı sıra sistemik etkileri de bildirilmiştir. Beyazlatma prosedürünün güvenliği konusunda farklı iddialar da mevcuttur. Diş beyazlatma işlemlerinin kaydedilen yan etkileri arasında oral yumuşak dokuda ve özellikle gingival dokuda irritasyon yer almıştır (206-211). Geçici ve lokal yan etkilere ek olarak uzun dönem ve geri dönüşümsüz sistemik etkileri arasında genotoksisite, sitotoksisite ve karsinogenez de incelenmektedir. Uzun dönem beyazlatma periyotlarının oksidatif stresi arttırdığı ve lokal temasa bağlı olarak oral dokuda morfolojik değişimlere neden

olduğunu gösteren hayvan ve insan çalışmaları da mevcuttur (212). Biz de çalışmamızda H_2O_2 'in toksik dozunun 48 saatlik uygulamasının in vitro 3T3 fibroblast hücreleri ile oluşturduğumuz modelde proliferasyon oranlarını düşürdüğünü ve oksidatif stresi arttırdığını gösterdik. Bu etkilerin, in vivo çalışmalardan farklı olarak in vitro koşullara bağlı olarak daha hızlı şekilde elde edildiği düşünülebilir. Acil internal diş beyazlatma işlemlerinde yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 kullanılmaktadır. Jiang ve ark. %30 H_2O_2 ile hidroksiapatit tozu kombinasyonu kullanarak diş beyazlatma ürünü geliştirmiş ve etkili olduğunu iddia etmişlerdir. Dahası %30 H_2O_2 'in neden olduğu minerde mikrosertlik kaybını önemli derecede azalttığını rapor etmişlerdir (213). Menezes ve ark. da %35'lik H_2O_2 'nin minerde ve dentin dokularında benzer renk değişimlerine yol açtığını ancak sadece minenin açıklığında artışa neden olduğunu kaydetmiştir (214). Bizse 500 μ M H_2O_2 (%0,85'lik) ile in vivo çalışma sonuçlarına benzer olarak PDT indeksi, S faz hücre oranı ve oksidatif stres düzeylerini etkileyen dozunu temel alarak in vitro çalışmalarımızı gerçekleştirdik.

Antioksidanlar oksidatif stresin dahil olduğu hastalıkların tedavisinde geleneksel terapilere tamamlayıcı alternatif tedaviler olarak kullanılmaktadır ancak mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır (215). RES, bitki kaynaklı besinlerde çokça bulunan reaktif metabolitlerdir ve sindirim sisteminde özellikle de oral mukozada aktif polifenoller en yüksek konsantrasyonlarına ulaşırlar (216). Polifenoller oksidatif stres kaynaklı hastalıkların ve inflamatuvar süreçlerin ilerlemesini engelleyebilecek, tersine çevirebilecek veya geciktirebilecek potansiyel kaynaklar olarak ilgi çekmektedirler (217, 218). Polifenoller arasında yer alan ve bu çalışmanın da konusu olan RES'in anti-inflamatuvar ve anti-oksidan etkiler de dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (89, 219). H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres modelinde antioksidanların insan gingival fibroblastlarındaki biyolojik etkilerini araştıran bir çalışmada, 50 μ M dozda RES'in H_2O_2 uygulanan (220) hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı, ROT üretimini inhibe ettiği, mitokondriyal respirasyonu stimüle edildiği kaydedilmiş ve dolayısıyla fibroblastlar için etkili bir antioksidan olduğu sonucuna varılmıştır (36). Biz de çalışmamızda H_2O_2 ile oluşturduğumuz in vitro oksidatif stres modelinde RES'in fibroblast hücrelerinin hücresel fonksiyonlarına etkilerini incelemek amacıyla farklı dozlarda RES kullandık ve hücrelerin PDT indeksine, proliferasyon oranlarına ve ROT düzeylerine etkilerini inceledik. Etkin dozun belirlenmesi amacıyla 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M RES kullanılarak yapılan ön

deneyler sonucunda 10 μ M üzerinde toksik etki gözlemlendi ve hücrelerin tamamına yakını kaybedildiği için deneye 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M dozlarla devam edildi. 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M RES grupları arasında karşılaştırma yaptığımızda 1 μ M RES grubunda PDT indeksi en düşük düzeyde ve S faz hücre oranı en yüksek düzeyde olduğu için, RES dozu yükseldikçe ROT oranı artış gösterdiği için ve H₂O₂ ile kombine edildiğinde en iyi antioksidan etki 1 μ M RES grubunda görüldüğü için etkin ve güvenli doz olarak seçildi. Sadece RES uyguladığımızda hücre proliferasyonu açısından indükleyici bir etki gözlerken kültür ortamına H₂O₂ eklediğimizde oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğunu tespit ettik.

Yukarıda tanımladığımız üzere Ti-Oss®, H₂O₂ ve RES ile yaptığımız doz ve zaman belirleme deneyleri sonucunda elde ettiğimiz bulgularla oluşturduğumuz final deney gruplarında 1mg/ml G, 500 μ M H₂O₂, ve 1 μ M RES dozları 48 saat süreyle uygulandı. H₂O₂ ve H₂O₂+G ile inkübasyon sonucunda 3T3 hücrelerinin PDT indekslerinin istatistiksel olarak anlamlı uzama gösterdiği tespit edildi. H₂O₂+RES ve H₂O₂+G+RES gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PDT indekslerinin uzadığı, H₂O₂ grubuyla karşılaştırıldığında ise azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak kullandığımız G, H₂O₂ ile kombine edildiğinde PDT indeksi açısından koruyucu, terapötik veya indükleyici bir etki göstermemiştir. Aynı şekilde G+RES kombine edildiğinde kontrol ve sadece RES ile inkübasyon bulguları arasında da bir fark görülmemiştir. Dolayısıyla greft uyguladığımızda bulguların değişmemesi, greftin fibroblast hücreleri için biyouyumlu olduğunu düşündürmektedir. Deney modelinde uyguladığımız doza benzer H₂O₂'inin 3T3 fibroblast hücrelerinin proliferasyon oranlarını düşürmesi cerrahi öncesinde ve sonrasında antiseptik olarak kullanılmaması gerektiğini ve alternatif antiseptiklerin seçilebileceğini düşündürmüştür.

Kronik periyodontit gibi enfeksiyöz hastalıklarda bakteriyel enfeksiyondan sonra oluşan ilk inflamatuvar cevap, sitokinler ve kemokinler yoluyla immün sistemi aktive eder. Savunmanın ilk hattında rol oynayan nötrofiller enfeksiyon bölgesinde ROT üretimine yol açarlar (221). Düşük konsantrasyonlarda ROT'un kültür koşullarında gingival fibroblast ve epitelyal hücrelerin büyümelerini stimüle ettiği fakat yüksek konsantrasyonlarda serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatarak doku hasarını indüklediği gösterilmiştir (222). Normal koşullarda koruyucu antioksidanlar hızlıca ROT hasarını tamir ederler. ROT ile antioksidanlar arasındaki dengesizlik periyodontal

hastalıkların başlangıcı ve gelişimindeki anahtar faktörlerden biridir (216). ROT'un fazla ve devamlı üretimi ve/veya antioksidanların hasarlı fonksiyonu oksidatif strese yol açarak periyodontal yapının, alveolar kemiğin ve bağ dokunun bozulmasını indükler (216, 221, 223).

Periyodontolojide kemik greftleri, alveoler kemik ve periyodontiyumun rejenerasyonu için osteokondüktif özellikler taşısa da doku rejenerasyonunu tetiklemek ihtiyacı doğabilir (170). Anjiyogenez, hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu ve inflamasyon gibi süreçleri hedefleyen terapötik stratejiler kemik iyileşmesini ve oral doku rejenerasyonunu desteklemektedir. Rekombinant büyüme faktörleri bu yaklaşımda etkili olmasına rağmen pahalı moleküllerdir ve katabolik çevrede parçalanabilirler (224, 225). Bu nedenle çalışmamızda RES gibi kolay ulaşılabilir bir antioksidanın koruyucu etkilerinin yanı sıra biyolojik hücre fonksiyonları güçlendirme yeteneklerine bağlı olarak greftlerle birlikte destekleyici tedavi olarak kullanılabilmesi hipotezi oluşturuldu. RES'in farklı dozlarının yüksek glikozla indüklenmiş ROT üretimine etkisinin incelendiği bir çalışmada 1-100 μ M dozlarının vasküler düz kas hücre kültüründe ROT düzeyini düşürdüğü ancak 200 ila 500 μ M arasındaki dozların hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı sonucuna varılmıştır (24). Doz aralığımızı belirlerken referans aldığımız bu çalışmada RES'in yüksek glikozla indüklenmiş oksidatif stresi inhibe edebildiği ve ROT'un fazla üretimini baskılayarak düşük dozlarda hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Biz de 3T3 hücreleri için 1 μ M RES dozunun, en yüksek hücre proliferasyonunu, en düşük ROT oranını sağladığı ve H₂O₂ varlığında en iyi antioksidan etkiyi gösterdiği için etkin ve güvenli doz olarak seçtik. 500 μ M H₂O₂, 1mg/ml G ve 1 μ M RES dozları kullanarak oluşturduğumuz deney gruplarında proliferasyon indeksi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında H₂O₂ ve H₂O₂+G gruplarında belirgin proliferasyon düşüşleri görülürken, yalnızca RES ve G uygulandığında hücre proliferasyonu artmıştır. G ile RES kombine edildiğinde proliferasyon açısından anlamlı olmayan bir artışa neden olmuştur. H₂O₂ + G + RES'in birlikte uygulandığında üçlü kombine grupta kontrol grubu ile benzer proliferasyon oranlarına rastlanmıştır. Fakat H₂O₂ ile birlikte G materyali uygulanan grupta G'nin olumlu ya da olumsuz bir etki oluşturmadığı ve biyoyumlu olduğu, H₂O₂ uygulanan gruba benzer sonuçlar gösterdiği izlenmiştir.

ROT; hücre migrasyonu, hücre siklusu, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili çok sayıda sinyal yolağını aktifleştirebilir (226). Uzun süreli ve yüksek düzeylerde ROT kaynaklı oksidatif stresin engellenmesi için kullanılan besin takviyelerinden biri olarak antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip RES'in SOD izoformları, GPx1, katalaz, hem oksijenaz-1, NADPH: kuinon oksidoredüktaz ve γ -glutamilsistein sentazın da dahil olduğu çok sayıda antioksidan enzimi destekleyebildiği ortaya konmuştur (227, 228). RES, farklı organizmaların doku ve hücrelerinde süre ve doza bağlı farklı etkiler göstermektedir (101). Sonuç olarak RES dozlarının, değişik hücre soylarında oksidatif stres düzeylerini farklı şekilde etkileyebileceği gerçeğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. RES'in ortalama dozlarının sağlığa yararlı etkilere sahip olduğu ancak yüksek dozlarının proapoptotik veya tümöral etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (229). Bu bağlamda Nakagawa ve ark. $\leq 22\mu\text{M}$ RES'in insan meme kanseri hücre soyunda proliferasyonu arttırdığını, ancak $\geq 44\mu\text{M}$ 'in hücre büyümesini baskıladığını kaydetmişlerdir (230). Farklı bir in vitro çalışmada RES'in 1 ila $5\mu\text{M}$ dozlarda apoptozu azaltarak ve oksidatif stres faktörlerini düşürerek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (231). Literatürde RES'in fibroblast hücrelerinin proliferasyon oranlarına, oksidatif stres düzeylerine ve ultrastrüktürel yapısına etkileri konusunda az sayıda veri mevcuttur. Dolayısıyla çalışmamızda incelenen parametrelerden biride 3T3 fibroblastları ile oluşturulan in vitro modelde RES'in oksidatif stres üzerine etkilerinin gösterilmesiydi. Floresan mikroskopik incelemede H_2O_2 uygulanan bütün gruplarda ROT oranlarında anlamlı artışlar görülürken, en yüksek ROT oranlarına H_2O_2 ve $\text{H}_2\text{O}_2+\text{G}$ gruplarında rastlanmıştır. Seçilen dozlarda G ve RES ile ikili kombinasyon gruplarında beklendiği üzere oksidatif stres oluşmamıştır. Ancak $\text{H}_2\text{O}_2+\text{G}$ grubunda H_2O_2 grubuna benzer şekilde artış görülmüş ancak eklenen RES ile oluşan üçlü kombinasyon grubunda oksidatif stres dramatik düşüş göstermiştir. Bu da tek başına greftin, hücrelerin oksidatif stres düzeylerini etkilemediğini, H_2O_2 'nin indükleyici etkisini de değiştirmediğini ancak uygulanan RES'in antioksidatif etkisiyle birlikte oksidatif stres düzeyini azaltabildiğini düşündürmüştür.

Literatürde RES'in oksidatif stres varlığında hücre migrasyonuna etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birinde RES'in doza bağlı olarak fibroblastların plastisitesini etkilediği, düşük konsantrasyonlarda ROT'un hücre migrasyonunu güçlendirirken yüksek konsantrasyonlarda zayıflattığı, benzer şekilde

düşük dozlarda RES'in hücre migrasyonunu stimüle ettiği buna karşın yüksek dozların hücre migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (101). Ayrıca RES'in dozuna bağlı olarak hücre füzyonunda giderek artan düzeylerde inhibe edildiği kaydedilmiştir. 24 saatlik H₂O₂ inkübasyonun hücre migrasyonu üzerine yine doza bağlı olarak etkileri gösterilmiş, yüksek dozlarda (500µM ve 100mM) motilite ve füzyonun neredeyse engellendiği bildirilmiştir. H₂O₂'nin hücre migrasyonu üzerine zararlı etkilerini önceden uygulanan RES'in engelleyebildiği ancak hücre füzyonunu düzeltmediği, sonucuna varılmıştır. Ayrıca H₂O₂'nin neden olduğu mitokondriyal hasar açısından RES'in yetersiz kaldığı ve yüksek dozlarının hasarı arttırdığı kaydedilmiştir (101). Hücre migrasyonu greft kullanımında önem taşımaktadır, ksenojen kemik greft materyallerinin kullanımından hemen sonra osteojenik mezenkimal hücrelerin migrasyonunda ve mikropiller hücrelerde artış bildirilmiştir. Biyolojik yanıt greftin por büyüklüğüne ve şekline göre değişiklik göstermektedir. Por büyüklüğünün osteojenik hücrelerin ve mikro damarların migrasyonunu doğrudan etkilediği, mikropor ve makropor kombinasyonlarının ise anjiyogenezi arttırdığı bildirilmiştir (179). Migrasyon ölçümlerimiz sonucunda en kısa migrasyon mesafesinin H₂O₂ grubunda olduğu ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. H₂O₂+G grubundaki hücrelerin migrasyon mesafesi de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede azalmıştır. En uzun migrasyon mesafesine anlamlı olmasa da H₂O₂+G+RES grubunda rastlanmıştır. G, RES, G+RES ve H₂O₂+RES deney grupları ile intakt kontrol grubu arasındaki değişimler de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. G içeren gruplarda, artmış bir oksidatif stres kaynağının olmadığı durumlarda artan migrasyon mesafeleri hücrelerin grefte selektif adezyon gösterdiğini düşündürmektedir. Bu görüşün kanıtlanabilmesi için adezyon molekülleriyle veya taramalı elektron mikroskopi (SEM) ile daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

RES'in antioksidan etkisinin yanı sıra yara iyileşmesi gibi koşullarda profibrotik faktörler ve kolajen üretiminin düzenlenmesinde de rolü olduğunu gösteren çalışmalar giderek artmaktadır (36, 232, 233). RES'in antioksidan olarak insan gingival fibroblastlarındaki biyolojik etkilerini araştıran bir çalışmada, H₂O₂ uygulanan hücrelerde proliferasyonu arttırdığı, ilk 24 saatte tip I kolajen gen ekspresyonunun yukarı regülasyonunda rol aldığı, ancak 48 ve 72 saatlerde etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Sadece H₂O₂'nin ise 12 ve 24 saatte kontrole kıyasla kolajen sentezini düşürdüğü fakat 48. saatte kontrole yaklaştığı izlenmiştir. (36). Li ve ark. primer

intestinal fibroblast kültürleriyle yaptıkları bir çalışmada 50 ve 100 μ M RES'in, insülin büyüme faktörüyle indüklenen kontrole yaklaştığını göstermişlerdir. Kullandıkları insülin büyüme faktörü 1 kolajen I ekspresyonunu artırırken yüksek dozlarda kullandıkları RES bu etkiyi inhibe etmiştir (232). Zeng ve ark. hipertrofik skar dokusundan elde edilmiş fibroblastlarda RES'in tip I ve tip III prokolajen mRNA ekspresyonuna ve hidroksiprolin (veya kolajen) düzeylerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada 75-300 μ M arasındaki konsantrasyonların 24 saatlik inkübasyonda kolajen düzeylerini düşürmeye başladığını, 48 ve 72. saatlerde bu düşüşün doza bağlı olarak devam ettiğini göstermişlerdir (233). Tip I ve Tip III prokolajen mRNA ekspresyonlarının ise 150 μ M RES ile 24 ve 48. saatlerde kontrole benzer düzeylerde olduğu fakat 72. saatte anlamlı düşüşün başladığı kaydedilmiştir. RES'in kolajen sentezi, hücre siklusu ve apoptozu ile ilişkili olabileceği, kolajen sentezi ile birikimi arasındaki dengenin uygun dozlarda RES ile kontrol edilebileceği ve böylelikle yara iyileşmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (233).

Miron ve ark. primer insan osteoblastları ile yaptıkları in vitro çalışmada farklı miktarlardaki kemik greftlerinin kolajen I ekspresyonuna etkilerini incelemiş, yüksek dozların kolajen I ekspresyonunu anlamlı derecede arttırdığı fakat düşük dozlardaki artışın anlamlı olmadığı sonucuna varmışlardır (168). Crespi ve ark. yeni çekilmiş diş soketlerine uyguladıkları domuz kaynaklı kemik greftlerinin hastalardan elde edilen primer osteoblastlardaki kolajen ekspresyonuna etkisini incelemiş ve greft kullanılan hücrelerde kolajen ekspresyonunun anlamlı derecede arttığını kaydetmişlerdir. Dolayısıyla ksenogreftlerin kemik matriks oluşumuna katkıda bulunabileceğini düşünmüşlerdir (234). 3T3 fibroblast hücrelerinde G, H₂O₂ ve RES uygulamalarının COL1A2 mRNA ekspresyonuna etkilerini RT-PCR ile inceledik, en düşük ekspresyon H₂O₂, G ve H₂O₂+G deney gruplarında izlendi ancak bu düşüşler anlamlı bulunmadı. Buna karşın gruplar arasında anlamlı en yüksek ekspresyon seviyesi H₂O₂+G+RES grubunda görülmüştür. Dolayısıyla G ve RES'in ortamda yeterli dozlarda bulunmasının kolajen üretimini arttırmayı başardığı söylenebilir. G+RES ikili grubu ve H₂O₂ ile kombine üçlü gruptaki COL1A2 mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek bulunmuş ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu düzeydeki artışın hızlı iyileşmede etkili olabileceği ancak hipertrofik doku oluşumuna sebep olmayacağı düşünüldü.

İki boyutlu kültürler iyi tanımlanmış ve tekrarlanabilir in vitro test teknikleridir. Fakat iki boyutlu kültürler hücre fizyolojisi ve davranışları için çok önemli olan interselüler ilişkilerin hepsini göstermemektedir (162). Bu kültür sistemleri üç boyutlu dokulardan farklı sonuçlar doğurabileceği için in vivo sistemlere benzer üç boyutlu kültür sistemleri geliştirilmiştir. Basit bir üç boyutlu sistem çeşidi olan sferoit kültürler greftlerin etki ve güvenilirliklerinin test edilmesi açısından iki boyutlu kültürler ile in vivo çalışmalar arasındaki boşluğu doldurabilecek modeller olarak kullanılmaktadır (162). 3T3 fibroblast hücreleri ile oluşturduğumuz sferoitlerin invert mikroskop incelemelerinde; kontrol grubunda morfoloji ve homojenitenin korunduğu, H_2O_2 uygulandığında sferoit yapılarının deforme olduğu ve homojenliğini yitirdiği izlenmiştir, ayrıca sferoitlerden ayrılmış çok sayıda serbest fibroblast dikkati çekmiştir. G grubunda ise grefte bağlanmayı tercih etmiş sferoitlerle birlikte kontrol grubundaki gibi normal strüktürde serbest sferoitler de gözlenmiştir. Bu da greftin biyoyumluluğunun başka bir kanıtı sayılabilir düşüncesindeyiz.

Oksidatif stres hücresele düzeyde hücre iskeletini etkileyebilmekte ve organel dinamikleri, ultrastrüktürü ve veziküler trafik de dahil olmak üzere birçok fizyolojik sürece hasar verebilmektedir. Özellikle mitokondrinin morfolojik ve metabolik olarak etkilenmesi mitokondriyal disfonksiyona yol açmakta ve bu da mitokondriyal homeostaza zarar verebilmektedir (235). Mitokondriler fazlaca dinamik organellerdir. Mitokondrilerin morfolojisi füzyon ve fizyon olayları aracılığıyla değişkenlikler gösterir. Oksidatif stres mitokondri fonksiyonlarının düzenlenmesini bozarak hücresele hasara yol açabilir (236). Kamogashira ve ark. Korti organından elde edilmiş epiteliyal hücre soyunda 1mM H_2O_2 ile 1 saatlik inkübasyon sonucunda mitokondrilerin mikroskobik olarak değişime uğradıklarını tespit etmiş, fragmente, balon şeklinde veya hiperfüzyona uğramış mitokondriler görüldüğünü bildirmişlerdir. Hasarlı mitokondrilerin yanı sıra yakınlarında parlak materyaller ve yoğun organeller içeren, çift membranlı otofagozomlara da rastlamışlardır. Mitokondriyal füzyon ve fizyon arasındaki denge hücre fonksiyonları açısından önemlidir ve çeşitli stres koşullarında bozulabilmektedir. Kamogashira ve ark. bazı mitokondrilerin fizyonla fragmente olduğunu ve bazılarının da hiperfüzyonla birleşerek genişlediğini izlemişlerdir (235). Wang ve ark. ise 12 saatlik 100 μ M H_2O_2 inkübasyonunun nöronlar üzerine ultrastrüktürel etkilerini inceledikleri bir çalışmada membran blepleriyle birlikte apoptotik hücrelere ve kromatin kondensasyonuna rastlamışlardır (237). Biz de TEM incelemelerinde, H_2O_2

uygulanan grupta çok sayıda sitoplazmik vakuolizasyona, hipertrofik, kristalları hasarlı ve hatta yer yer kaybolmuş mitokondrilere rastladık. Bazı bölgelerde interselüler bağlantılar korunurken bazılarında sitoplazmik dejenerasyonları düşündüren ayrılmalar görüldü. Nuklear ökromatin artarken nuklear membran yapısı yer yer incelmış olarak izlendi. Bazı alanlarda H₂O₂ uygulamasının hasar verici etkileri lizis, otofaji ve mitofaji olarak görülmüştür.

Literatürde ksenogreftlerin oral mukoza hücrelerine ultrastrüktürel etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Kubosch ve ark. ksenojenik bir greftin 3 haftalık uygulanmasının kemik lezyonlarının iyileşmesine etkisini inceledikleri bir çalışmada osteoblastların greft üzerinde homojen dağıldığını, iyi adezyon ve büyüme gösterdiğini ve perisellüler ekstrasellüler matriks birikiminin gerçekleştiğini SEM ile göstermişlerdir (238). Bizim çalışmamızda kullandığımız ksenogreft grubunda normal strüktüre sahip nukleus, nukleolus, nuklear membran, hücre membranı, düzgün kristallı mitokondriler ve yapılarını koruyan interselüler bağlantılar izlenmiş ve bazı mitokondrilerin uzadıkları görülmüştür. Mitokondrilerin uzaması füzyon geliştiğini düşündürmüştür. Füzyon ve fizyonun sık döngüleri, hücrelerin metabolik ihtiyaçlarına göre mitokondrinin morfolojisini adapte etmektedir (239). Kültüre edilen fibroblastlarda, mitokondrinin uzamış bir konfigürasyona bürünme eğilimi olmasına rağmen çeşitli morfolojilere sahip olabileceği gösterilmiştir (240). Kontrol grubu ile uyumlu olarak G grubunda da sitoplazmada serbest ribozomlar ve GER yapıları korunmuşdur ve yer yer bölünmekte olan hücrelere rastlanmıştır. Dolayısıyla ultrastrüktürel olarak greftin tamamen biyoyumlu olduğu söylenebilir. H₂O₂+G grubundan elde edilen 3T3 fibroblastların normale yakın strüktürde nukleus, nukleolus, hücre membranı ve nuklear membrana sahip oldukları ancak periferik kromatin yoğunluklarında hafif artışlar olduğu görülmüştür. Interselüler bağlantılarını tam olarak koruyamadıkları izlenmiş, bağlantılarda yer yer ayrılmalara ve sitoplazmik dejenerasyonlara rastlanmıştır. Ayrıca dejenere mitokondriler, az sayıda vakuol görülmüş, hatta bazı bölgelerde otofajik bulgulara izlenmiştir. Yani G'nin H₂O₂'ye karşı koruyucu veya terapötik bir etkisinin olmadığı ortadadır ancak bu G'in fibroblastlarla biyoyumlu olmadığını göstermemektedir.

RES'in hücre morfolojisi üzerine etkilerini gösteren in vitro çalışmalar az sayıdadır. Suwalsky ve ark. insan eritrositlerinde oksidatif hasara karşı koruyucu

etkilerini araştırdıkları bir çalışmada SEM bulgularına göre özellikle 1-10mM dozlarda kullanılan RES'in morfolojik değişimlere neden olduğunu ve hücre membranlarını etkileyerek eritrositleri ekinositlere dönüştürdüğünü göstermişlerdir (241). Opipari ve ark. ise daha düşük dozlarda (50-200μM) RES'in 24 saatlik inkübasyonunun ovaryan kanser hücreleri üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada RES'in otofagositik granül görünümlerine, kromatin kondensasyonuna ve organel degradasyonuna yol açtığını göstermişlerdir (242). Çalışmamızda sadece 1μM RES uygulanan grubun TEM görüntülerinde hücrelerin interselüler bağlantılarını korudukları, normal strüktürde nukleus, nukleolus, hücre membranı, nuklear membran, çok sayıda serbest ribozom ve GER'e sahip oldukları görülmüştür. Fakat sitoplazmada az miktarda vakuolizasyon ile birlikte kısmen dejenere olmuş mitokondriler ve hafif artmış interselüler boşluklar dikkati çekmiştir. Bu nedenle RES'nin oksidatif stres dışındaki normal şartlar altında fibroblastlar için ultrastrüktürel açıdan tamamen koruyucu olduğu söylenemez. G+RES uygulanan grubun TEM görüntülerinde hücrelerin interselüler boşluklarını ve bağlantılarını korudukları, normal strüktürde nukleus, nukleolus, hücre membranı ve nuklear membrana sahip oldukları görüldü. Sitoplazmada füzyona uğradığı düşünülen uzun mitokondri ve çok sayıda serbest ribozom göze çarpmıştır. Bazı bölgelerde ise hipertrofik GER yapılarına rastlanmış ancak vakuolizasyon saptanmamıştır. Yani G'nin RES ile kombinasyonunun herhangi bir değişikliğe yol amadığı, hatta yalnız başına RES uygulanan grubun sonuçlarıyla karşılaştırıldığında daha korunmuş bir ultrastrüktürel yapının izlendiği söylenebilir. H₂O₂+RES grubundan elde edilen 3T3 fibroblastların TEM görüntülerinde normal strüktürde nukleus, nukleolus, hücre membranı ve nuklear membran yapıları ile periferik kromatin yoğunluklarında artışlar görülmüştür. İnterselüler boşlukların arttığı ve yer yer sitoplazmik dejenerasyonların izlendiği alanlar saptanmıştır. Sitoplazmada görülen az sayıda mitofajik yapıyla birlikte vakuollerin görülmesi de RES'in ultrastrüktürel olarak H₂O₂'ye karşı koruyucu etkisinin yeterli olmadığını düşündürmüştür. H₂O₂+G+RES grubundan elde edilen TEM görüntülerinde normal strüktürde nukleus, nukleolus, hücre membranı ve nuklear membran yapıları görülmüş, interselüler boşlukların ve interselüler bağlantıların korunduğu saptanmıştır. Sitoplazmada az sayıda mitofajik ve dejeneratif mitokondriye rastlanmış normal ultrastrktrde kristalar izlenmiş ve sitoplazmik vakuolizasyona rastlanmamıştır. Uzun mitokondriler füzyon geliştiğini düşündürmüştür. Literatüre göre ROT mitokondrial füzyonu inhibe etmekte veya füzyonu stimüle edici rol oynamaktadır.

Mitokondriyal füzyonun, stres sırasında artan hasardan hücreyi kurtaran veya koruyan bir mekanizma olduğu öne sürülmüştür (243). Robb EL ve ark. RES'in fibroblastlardaki mitokondrileri mitofusin-2 aracılığıyla füzyona soktuğunu göstermişlerdir (244). Bizim bulgularımız da G ve RES kombinasyonunun, ultrastrüktürel olarak H_2O_2 'ye karşı koruyucu etki gösterdiğini ve H_2O_2 'nin dejeneratif etkilerine karşı birlikte kullanılacaklarını düşündürmüştür.



KAYNAKLAR

1. Ardakani FE, Mirmohamadi SJ. Osteoporosis and oral bone resorption: a review. *J Maxillofac Oral Surg*, 2009; **8**(2):121-6.
2. Bousdras VA, Ayliffe PR, Barrett M, Hopper C. Esthetic and functional rehabilitation in patients with cleft lip and palate. *Ann Maxillofac Surg* 2015; **5**(1):108-11.
3. Kamil W, Al Bayati L, Hussin AS, Hassan H. Reconstruction of advanced bone defect associated with severely compromised maxillary anterior teeth in aggressive periodontitis: a case report. *J Med Case Rep* 2015; **25**:9:211.
4. Srivastava S, Tandon P, Gupta KK, Srivastava A, Kumar V, Shrivastava T. A comparative clinico-radiographic study of guided tissue regeneration with bioresorbable membrane and a composite synthetic bone graft for the treatment of periodontal osseous defects. *J Indian Soc Periodontol* 2015; **19**(4):416-23.
5. Misawa M, Lindhe J, Araújo MG. The alveolar process following single-tooth extraction: a study of maxillary incisor and premolar sites in man. *Clin Oral Implants Res* 2016; **27**(7):884-9.
6. Mampilly MO, Rao LP, Sequiera J, Rao BH, Chandra J, Rai G. Rehabilitation of edentulous atrophic anterior mandible - the role of vertical alveolar distraction osteogenesis. *J Clin Diagn Res* 2014; **8**(11): ZR01-3.
7. Kattimani VS, Chakravarthi PS, Kanumuru NR, Subbarao VV, Sidharthan A, Kumar TS, et al. Eggshell derived hydroxyapatite as bone graft substitute in the healing of maxillary cystic bonedefects: a preliminary report. *J Int Oral Health* 2014; **6**(3):15-9.
8. Dominguet MH, Dominguet AA, Matos BH, Dominguet PR, León JE, Oliveira LR. Extensive presentation of central ossifying fibroma treated with conservative surgical excision. *Case Rep Dent* 2014; **2014**:204258.
9. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 2010; **132**:15-30.
10. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med* 2014; **25**(10):2445-61.

11. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials* 2017; **2**(4):224-247.
12. Kheirallah M, Almeshaly H. Bone Graft Substitutes for Bone Defect Regeneration. A Collective Review. *Int J Dentistry Oral Sci* 2016; **03**(5):247-257.
13. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; **10** Suppl 2:S96-101.
14. Syed S, Majid JS, Farooq SA, Asif Y, Manu B. Bone grafts and bone substitutes in dentistry; Review article. *J Oral Res Rev* 2016; **8**(1): 36-8
15. Ohe JY, Kim GT, Lee JW, Al Nawas B, Jung J, Kwon YD. Volume stability of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate biphasic bone graft material in maxillary sinus floor elevation: a radiographic study using 3D cone beam computed tomography. *Clin Oral Implants Res* 2016; **27**(3):348-53.
16. Dahabreh Z, Panteli M, Pountos I, Howard M, Campbell P, Giannoudis PV. Ability of bone graft substitutes to support the osteoprogenitor cells: An in-vitro study. *World J Stem Cells* 2014; **26**; **6**(4):497-504.
17. Macedo RM, Lacerda SA, Thomazini JA, Brentegani LG. Bone integration behavior of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate graft implanted in dental alveoli: a histomorphometric and scanning electron microscopy study. *Implant Dent* 2014; **23**(6):710-5.
18. Cardoso CL, Curra C, Santos PL, Rodrigues MFM, Ferreira-Júnior O, de Carvalho PSP. Current considerations on bone substitutes in maxillary sinus lifting. *Revista Clínica de Period, Implantología y Rehabilitación Oral* 2016; **9**(2):102-7.
19. Chavda S, Levin L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. *J Oral Implant* 2018; **44**(1):74-84.
20. Wilcko W, Wilcko MT. Accelerating tooth movement: the case for corticotomy-induced orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013; **144**(1):4-12.
21. Figliuzzi MM, De Fazio R, Tiano R, De Franceschi S, Pacifico D, Mangano F, et al. Histological evaluation of a biomimetic material in bone regeneration after one year from graft. *Ann Stomatol (Roma)* 2014; **20**; **5**(3):103-7.
22. Watson T. Soft Tissue Healing Review [web page on the Internet] (2016). Erişim 01.11.2017, University of Hertfordshire, Hatfield, Hertfordshire, United

Kingdom:

<http://www.electrotherapy.org/assets/Downloads/tissue%20repair%202016.pdf>.

23. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlası. 6th ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2014.
24. Guo R, Li W, Liu B, Li S, Zhang B, Xu Y. Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro. *Med Sci Monit Basic Res* 2014; **20**:82-92.
25. Fang C, Zhang BB, Han L, Gao CF, Wang M. d-Fagomine Attenuates High glucose-induced endothelial cell oxidative damage by upregulating the expression of PGC-1 α . *J Agricult Food Chem* 2018; **66**(11):2758-64.
26. Gölz L, Memmert S, Rath-Deschner B, Jäger A, Appel T, Baumgarten G, et al. LPS from *P. Gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periyodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis. *Mediators Inflamm* 2014; **2014**:986264.
27. Torres-Rodríguez C, Portolés MT, Matesanz MC, Linares J, Feito MJ, Izquierdo-Barba I, et al. Effects of bleaching on osteoclast activity and their modulation by osteostatin and fibroblast growth factor 2. *J Colloid Interface Sci* 2016; **1**:461:285-91.
28. Choe Y, Yu JY, Son YO, Park SM, Kim JG, Shi X, et al. Continuously generated H₂O₂ stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periyodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem* 2012; **113**(4):1426-36.
29. Teixeira AH, Freire JM de O, de Sousa LHT, Parente AT, de Sousa NA, Arriaga AMC, et al. *Stemodia maritima* L. Extract decreases inflammation, oxidative stress, and alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. *Frontiers in Physiology* 2017; **8**:988.
30. Tinti F, Soory M. Oxidative actions of hydrogen peroxide in human gingival and oral periosteal fibroblasts: responses to glutathione and nicotine, relevant to healing in a redox environment. *Redox Biol* 2013; **10**:2:36-43.
31. Liu Z, Liu Y, Song Y, Zhang X, Wang S, Wang Z. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: A meta-analysis. *Dis Markers* 2014; **931083**: 10.
32. Munro I.C, Williamsb G.M, Heymannc H.O, Kroesd R. Tooth whitening products and the risk of oral cancer. *Food Chem Toxicol* 2006; **44**(3):301-15.

33. Pietropaoli D, Ortu E, Severino M, Ciarrocchi I, Gatto R, Monaco A. Glycation and oxidative stress in the failure of dental implants: a case series. *BMC Res Notes* 2013; **26**;6:296.
34. Kiyoshima T, Enoki N, Kobayashi I, Sakai T, Nagata K, Wada H, et al. Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts. *Int J Mol Med* 2012; **30**(5):1007-12.
35. Hirsch I, Prell E, Weiwad M. Assessment of cell death studies by monitoring hydrogen peroxide in cell culture. *Anal Biochem* 2014; **1**;456:22-4.
36. Orihuela-Campos RC, Tamaki N, Mukai R, Fukui M, Miki K, Terao J, et al. Biological impacts of resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine on oxidative stress in human gingival fibroblasts. *J Clin Biochem Nutr* 2015; **56**(3):220-7.
37. Shah AM, Jung H, Skirboll S. Materials used in cranioplasty: a history and analysis. *Neurosurg Focus* 2014; **36**(4):E19.
38. Vellone V, Cirignaco G, Cavarretta B, Cascone P. Canine Eruption After Secondary Alveolar Bone Graft in Unilateral Cleft Lip and Palate Patients. *J Craniofac Surg* 2017; **28**(5):1206-10.
39. Garib D, Massaro C, Yatabe M, Janson G, Lauris JRP. Mesial and distal alveolar bone morphology in maxillary canines moved into the grafted alveolar cleft: Computed tomography evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2017; **151**(5):869-77.
40. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynepas M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periyodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res* 2017; **5**:21-9.
41. Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016; **122**(4):392-402.
42. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 2011; **42** Suppl 2:S77-81.
43. Chau AMT, Mobbs RJ. Bone graft substitutes in anterior cervical discectomy and fusion. *Europ Spine J* 2009; **18**(4):449-64.
44. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; **71**(6):354-61.

45. Sheikh Z, Sima C, Glogauer M. Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation. Weber FE, ed. *Materials*. 2015; **8**(6):2953-93.
46. Majzoub Z, Berengo M, Giardino R, Aldini NN, Cordioli G. Role of intramarrow penetration in osseous repair: A pilot study in the rabbit calvaria. *J Periodontol* 1999; **70**:1501-10.
47. Crea A, Deli G, Littarru C, Lajolo C, Orgeas GV, Tatakis DN. Intrabony defects, open-flap debridement, and decortication: A randomized clinical trial. *J Periodontol* 2014; **85**:34-42.
48. Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; **33**(2):157-63.
49. Venet L, Perriat M, Mangano FG, Fortin T. Horizontal ridge reconstruction of the anterior maxilla using customized allogeneic bone blocks with a minimally invasive technique - a case series. *BMC Oral Health* 2017; **8**; **17**(1):146.
50. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 2011; **42** Suppl 2:S16-21.
51. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; **29**(20):2941-53.
52. Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br* 2007; **89**(5):574-9.
53. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014; **17**; **9**(1):18.
54. Yusof N. Advances of radiation sterilisation in tissue banking. *Cell Tissue Bank*. 2018 **19**(2): 175-186.
55. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J Radiol* 2016; **28**; **8**(4): 355-69.
56. Arahira T, Todo M. Variation of mechanical behavior of β -TCP/collagen two phase composite scaffold with mesenchymal stem cell in vitro. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016; **61**:464-74.

57. Dutta SR, Passi D, Singh P, Bhuihar A. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Ir J Med Sci* 2015; **184**(1):101-6.
58. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; **36** Suppl 3:S20-7.
59. Long B, Dan L, Jian L, Yunyu H, Shu H, Zhi Y. Evaluation of a novel reconstituted bone xenograft using processed bovine cancellous bone in combination with purified bovine bone morphogenetic protein. *Xenotransplantation* 2012; **19**(2):122-32.
60. De Barros RRM, Novaes AB Jr, de Carvalho JP, de Almeida ALG. The effect of a flapless alveolar ridge preservation procedure with or without a xenograft on buccal bone crest remodeling compared by histomorphometric and microcomputed tomographic analysis. *Clin Oral Implants Res* 2017; **28**(8):938-45.
61. Ratnayake JTB, Gould ML, Shavandi A, Mucalo M, Dias GJ. Development and characterization of a xenograft material from New Zealand sourced bovine cancellous bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017; **105**(5):1054-62.
62. Márton K, Tamás SB, Orsolya N, Béla C, Ferenc D, Péter N, et al. Microarchitecture of the augmented bone following sinus elevation with an albumin impregnated demineralized freeze-dried bone allograft (bonealbumin) versus anorganic bovine bone mineral: a randomized prospective clinical, histomorphometric, and micro-computed tomography study. *Materials (Basel)* 2018; **28**; **11**(2).
63. Salamanca E, Hsu CC, Huang HM, Teng NC, Lin CT, Pan YH, et al. Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo. *Scientific Reports* 2018; **8**:984.
64. Ti-oss® Features [web page on the Internet] (2018) <http://www.ti-oss.com/products>.
65. Ekaterina K, Kim Y, Kim JY, Kim MR, Kim SO, Kim SJ. Histomorphometric study on healing of critical sized defect in rat calvaria using three different bovine grafts. *Tissue Eng Regen Med* 2012; **9**(5):276-281.

66. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Botany* 2012; **2012**:217037.
67. Żukowski P, Maciejczyk M, Waszkiel D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Arch Oral Biol* 2018; **1**;92:8-17.
68. Napa K, Baeder AC, Witt JE, Rayburn ST, Miller MG, Dallon BW, et al. LPS from *P. gingivalis* negatively alters gingival cell mitochondrial bioenergetics. *Int J Dent* 2017; **2017**:2697210.
69. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periyodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* 2001; **6**(1):99-112.
70. Løe H. Periyodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993; **16**(1):329-34.
71. Nascimento GG, Leite FRM, Vestergaard P, Scheutz F, López R. Does diabetes increase the risk of periodontitis? A systematic review and meta-regression analysis of longitudinal prospective studies. *Acta Diabetol* 2018; **3**:112.
72. Gojkov-Vukelic M, Hadzic S, Pasic E. Evaluation of efficacy of surgical periyodontal therapy with the use of bone graft in the treatment of periyodontal intrabony defects. *Med Arch* 2017; **71**(3):208-211.
73. Li X, Xie X, Lian W, Shi R, Han S, Zhang H, et al. Exosomes from adipose derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model. *Exp Mol Med* 2018; **13**;50(4):29.
74. Feng YL, Jiang XT, Ma FF, Han J, Ta XL. Resveratrol prevents osteoporosis by upregulating FoxO1 transcriptional activity. *Int J Mol Med* 2018; **41**(1):202-12.
75. Matthews DC. The two-way relationship between diabetes and periyodontal disease. *J Can Dent Assoc* 2002; **68**(3):161-64.
76. Veskoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress & Chaperones* 2012; **17**(1):11-21.
77. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4. Oxford: Clarendon; 2007.

78. Palipoch S, Koomhin P. Oxidative stress-associated pathology: a review (patologi berkaitan tekanan oksidatif: Suatu kajian). *Sains Malaysiana* 2015; **44**(10):1441-51.
79. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 2006; **141**(2):312-22.
80. André-Lévigne D, Modarressi A, Pepper MS, Pittet-Cuénod B. Reactive oxygen species and nox enzymes are emerging as key players in cutaneous wound repair. *Int J Molecul Science* 2017; **18**(10):2149.
81. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007; **1**;401(1):1-11.
82. Jones DP. Redox theory of aging. *Redox Biol* 2015; **5**: 71-9.
83. Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci* 2009; **108**(1):4-18.
84. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periyodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007; **43**:160-232.
85. Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Frontiers in Physiology* 2017; **8**:910.
86. Nawaz W, Zhou Z, Deng S, Ma X, Ma X, Li C, et al. Therapeutic versatility of resveratrol derivatives. *Nutrients* 2017;**9**(11):1188.
87. Lançon A, Frazzi R, Latruffe N. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of resveratrol in ocular diseases. *Molecules* 2016; **2**;**21**(3):304.
88. Ferrieres, J. The french paradox: Lessons for other countries. *Heart* 2004; **90**: 107-11.
89. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol* 2012; **3**:141.
90. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* 2002; **50**(11):3337-40.
91. Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniene J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina* 2016; **52**(3): 148-55.

92. Bostanghadiri N, Pormohammad A, Chirani AS, Pouriran R, Erfanimanesh S, Hashemi A. Comprehensive review on the antimicrobial potency of the plant polyphenol resveratrol. *Biomed Pharmacother* 2017; **95**:1588-95.
93. Chedea VS, Vicaş SI, Claudia S, Pessina F, Frosini M, Maioli E, Valacchi G. Resveratrol: From diet to topical usage. *Food Funct* 2017; **8**: 3979-3897.
94. Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* 2000; **47** (3):549-55.
95. Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM. Resveratrol decreases early signaling events in washed platelets but has little effect on platelet in whole blood. *Blood Cells Mol Dis* 2000; **26**(2): 144-150.
96. Park S-J, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting camp phosphodiesterases. *Cell* 2012; **148**(3):421-33.
97. Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ precision oncology*. 2017; **1**:35.
98. Rauf A, Imran M, Suleria HAR, Ahmad B, Peters DG, Mubarak MS. A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food Funct* 2017; **8**(12):4284-305.
99. Yousef M, Vlachogiannis IA, Tsiani E. Review effects of resveratrol against lung cancer: in vitro and in vivo studies. *Nutrients* 2017; **9**(11):1231.
100. Maccarrone M, Lorenzon T, Guerrieri P, Agro A. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur J Biochem* 1999; **265**:27-34.
101. Bosutti A, Degens H. The impact of resveratrol and hydrogen peroxide on muscle cell plasticity shows a dose-dependent interaction. *Sci Rep* 2015; **28**;5:8093.
102. Fehrenbach MJ, Popowics T. *Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy*. 4th ed. Missouri: Elsevier Health Sciences; 2015.
103. Netter FH. *Netter İnsan Anatomisi Atlası*. 6th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2015.
104. Squier C, Brogden KA. *Human oral mucosa development, structure and function*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2011.

105. Avery JK, Chiego DJ. *Essential of oral histology and embryology*. ST Louis: Mosby Elsevier; 2006. pp. 177-194.
106. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology - E-Book: Development, structure, and function*. 9th ed. Missouri: Elsevier Health Sciences; 2017.
107. Squier CA. The permeability of oral mucosa. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; **2**(1):13-32.
108. Squier CA, Kremer MJ. Biology of Oral Mucosa and Esophagus. *JNCI Monographs* 2001; **29**:7-15.
109. Collins LM, Dawes C. The surface area of the adult human mouth and the thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res* 1987; **66**:1300-2.
110. Chapter 9: Oral Mucosa [web page on the Internet]. Erişim 18.05.2018: <https://pocketdentistry.com/9-oral-mucosa>.
111. Mescher AL. *Junqueira's Temel Histoloji Konu ve Atlas*. 13th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2015.
112. Seçkin İ, Koyutürk M. *Temel Doku Histolojisi Ders Kitabı*. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınevi; 2017.
113. Ciano J, Beatty BL. Regional quantitative histological variations in human oral mucosa. *Anat Rec (Hoboken)* 2015; **298**(3):562-78.
114. Winterroth F, Hollman KW, Kuo S, Izumi K, Feinberg SE, Hollister S J, et al. Comparison of scanning acoustic microscopy and histology images in characterizing surface irregularities among engineered human oral mucosal tissues. *Ultrasound Med Biol* 2011; **37**(10):1734-42.
115. Abu Eid R, Sawair F, Landini G, Saku T. Age and the architecture of oral mucosa. *Age* 2012; **34**(3):651-58.
116. Gray H. *Anatomy of the Human Body*. 20th ed. New York: Bartleby.com, 2000.
117. Lorkiewicz-Muszyńska D, Kociemba W, Rewekant A, Sroka A, Jończyk-Potoczna K, Patelska-Banaszewska M, et al. Development of the maxillary sinus from birth to age 18. Postnatal growth pattern. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2015 Sep; **79**(9):1393-400.
118. Kademani D, Tiwana P. *Atlas of Oral and Maxillofacial Surgery- E-Book*. Missouri: Elsevier Health Sciences; 2015.

119. Van Cauwenberge P, Sys L, De Belder T, Watelet JB. Anatomy and physiology of the nose and the paranasal sinuses. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; **24**(1):1-17.
120. Watelet JB, Bachert C, Gevaert P, Cauwenberge P. Wound healing of the nasal and paranasal mucosa: a review. *Am J Rhinology* 2002; **16**:77-84.
121. Cho KH, Yu SK, Lee MH, Lee DS, Kim HJ. Histological assessment of the palatal mucosa and greater palatine artery with reference to subepithelial connective tissue grafting. *Anat Cell Biol* 2013; **46**(3):171-6.
122. McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periyodontal ligament. *Periodontol 2000* 2000; **24**:56–72.
123. Barczyk M, Bolstad AI, Gullberg D. Role of integrins in the periyodontal ligament: organizers and facilitators. *Periodontol 2000*. 2013; **63**(1):29-47.
124. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periyodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* 1997; **13**:20-40.
125. Archana A, Srikanth V. Fibroblast Heterogeneity in Periodontium – a Review *Int J Dental Sci Res* 2014; **2**(3):50-4.
126. Park JC, Kim YB, Kim HJ, Jang HS, Kim HS, Kim BO, et al. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **282**(5):1145-53.
127. Hsu SH, Huang GS, Lin SY, Feng F, Ho TT, Liao YC. Enhanced chondrogenic differentiation potential of human gingival fibroblasts by spheroid formation on chitosan membranes. *Tissue Eng Part A* 2012; **18**(1-2):67-79.
128. Janga HS, Leeb MS. The study of differentiation of oral fibroblast according to the cultivating space. *Procedia Engineering* 2015; **110**: 114-17.
129. Deshmukh SN, Dive AM, Moharil R, Munde P. Enigmatic insight into collagen. *J Oral Maxillofac Pathol* 2016; **20**(2):276-83.
130. Perumal S, Antipova O, Orgel JP. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**(8):2824-9.
131. Sukotjo C, Lin A, Song K, Ogawa T, Wu B, Nishimura I. Oral fibroblast expression of wound-inducible transcript 3.0 (wit3.0) accelerates the collagen gel contraction in vitro. *J Biol Chem* 2003; **278**(51):51527-34.

132. Gartner LP. *Textbook of Histology*, 4. Edition. Philadelphia: Elsevier; 2017.
133. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; **55**(12):1531-46.
134. Chhabra S, Chhabra N, Kaur A, Gupta N. Wound healing concepts in clinical practice of OMFS. *J Maxillofac Oral Surg*. 2017; **16**(4):403-23.
135. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001; **38**(2):72-140.
136. Attinger CE, Janis JE, Steinberg J, Schwartz J, Al-Attar A, Couch K. Clinical approach to wounds: débridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plast Reconstr Surg* 2006; **117**(7 Suppl):72S-109S.
137. Van Wicklin SA. Surgical wound classification. *AORN Journal* 2015; **102**(3):301-3.
138. Mukherjee R, Manohar DD, Das DK, Achar A, Mitra A, Chakraborty C. Automated tissue classification framework for reproducible chronic wound assessment. *Biomed Res Int* 2014; **2014**:851582.
139. Sun BK, Sibrashvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science* 2014; **346**(6212):941-5.
140. Toshihiro K, Junichi F. Roles of Antioxidative Enzymes in Wound healing. *J Dev Biol* 2015; **3**: 57-70.
141. Chen L, Arbieva ZH, Guo S, Marucha PT, Mustoe TA, DiPietro LA. Positional differences in the wound transcriptome of skin and oral mucosa. *BMC Genomics* 2010; **11**:471.
142. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007; **25**(1):9-18.
143. Gizaw M, Thompson J, Faglie A, Lee SY, Neuenschwander P, Chou SF. Electrospun fibers as a dressing material for drug and biological agent delivery in wound healing applications. *Bioengineering (Basel)* 2018; **5**(1). pii: E9.
144. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2006; **117**(7 Suppl):1e-S-32e-S.
145. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol* 2016; **91**(5):614-20.

146. Henry G, Garner W. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am* 2003; **83**:483.
147. Lawrence W, Diegelmann R. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol* 1994; **12**: 157.
148. Flanagan M. The physiology of wound healing. *J Wound Care* 2000; **9**(6):299-300.
149. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009; **37**(5):1528-42.
150. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ* 2002; **324**(7330):160-3.
151. Castellanos G, Bernabé-García Á, Moraleta JM, Nicolás FJ. Amniotic membrane application for the healing of chronic wounds and ulcers. *Placenta* 2017; **59**:146-153.
152. Tuncer S, Demirci M, Schweikl H, Erguven M, Bilir A, Kara Tuncer A. Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure in vitro. *Clin Oral Investig* 2012; **16**(6):1635-46.
153. Uslu B, Biltekin B, Denir S, Özbaş-Turan S, Arbak S, Akbuğa J, et al. Differences between solution and membrane forms of chitosan on the in vitro activity of fibroblasts. *Balkan Med J* 2015; **32**(1):69-78.
154. Pupo YM, Bernardo CFF, de Souza FFFA, Michél MD, Ribeiro CNM, Germano S, et al. Cytotoxicity of etch-and-rinse, self-etch, and universal dental adhesive systems in fibroblast cell line 3T3. *Scanning* 2017; **2017**:9650420.
155. Olivier A, Grobler S, Osman Y. Cytotoxicity of seven recent dentine bonding agents on mouse 3T3 fibroblast cells. *Open J Stomatology* 2012 **2**:244-50.
156. International Standard ISO 7405. *Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry—test methods for dental materials*. International Organisation for Standardisation, Geneva, 2008.
157. Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 1963; **17**:299-313.
158. 3T3-Swiss albino (ATCC® CCL-92™) [web page on the Internet]. 04.06.2018: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-92.aspx#characteristics>.
159. Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, Mizuno H, Brooks MW, Fleming M, Zimonjic DB, Popescu NC, Weinberg RA.

- Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**(20):12606-11.
160. Rittling SR. Clonal nature of spontaneously immortalized 3T3 cells. *Experimental Cell Res* 1996; **229**(1):7-13.
161. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014; **12**(4):207-18.
162. Sambale F, Lavrentieva A, Stahl F, Blume C, Stiesch M, Kasper C, et al. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *J Biotechnol* 2015; **205**:120-9.
163. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol* 2013; **31**(2):108-15.
164. Gao Y, Li M, Chen B, Shen Z, Guo P, Wientjes MG, et al.. Predictive models of diffusive nanoparticle transport in 3-dimensional tumor cell spheroids. *AAPS J* 2013; **15**(3):816-31.
165. Esposito D, Rathinasabapathy T, Schmidt B, Shakarjian MP, Komarnytsky S, Raskin I. Acceleration of cutaneous wound healing by brassinosteroids. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2013; **21**(5):688-96.
166. Shojaee S, Parhiz H, Eshaghi A, Emami SA, Asili J, Behravan J, et al. In vitro protective effects of *Scutellaria litwinowii* root extract against H₂O₂-induced DNA damage and cytotoxicity. *J Complement Integr Med* 2014; **11**(2):121-7.
167. Reichl FX, Seiss M, Marquardt W, Kleinsasser N, Schweikl H, Kehe K, et al. Toxicity potentiation by H₂O₂ with components of dental restorative materials on human oral cells. *Arch Toxicol* 2008; **82**(1):21-8.
168. Miron RJ, Caluseru OM, Guillemette V, Zhang Y, Buser D, Chandad F, et al. Effect of bone graft density on in vitro cell behavior with enamel matrix derivative. *Clin Oral Investig* 2015; **19**(7):1643-51.
169. Vaziri S, Vahabi S, Torshabi M, Hematzadeh S. In vitro assay for osteoinductive activity of different demineralized freeze-dried bone allograft. *J Periodyontal & Implant Science* 2012; **42**(6):224-230.

170. Agis H, Hueber L, Pour Sadeghian N, Pensch M, Gruber R. In vitro release of dimethyloxaloylglycine and l-mimosine from bovine bone mineral. *Arch Oral Biol* 2014; **59**(10):1024-31
171. Ramírez Fernández MP, Mazón P, Gehrke SA, Calvo-Guirado JL, De Aza PN. Comparison of Two Xenograft Materials Used in Sinus Lift Procedures: Material Characterization and In Vivo Behavior. *Materials (Basel)* 2017; **10**(6). pii: E623
172. Carvalho AL, Faria PE, Grisi MF, Souza SL, Taba MJ, Palioto DB, et al. Effects of granule size on the osteoconductivity of bovine and synthetic hydroxyapatite: A histologic and histometric study in dogs. *J Oral Implantol* 2007; **33**:267-76.
173. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001; **22**:1599-1606.
174. Castro-Ceseña AB, Sánchez-Saavedra MP, Novitskaya EE, Chen PY, Hirata GA, McKittrick J. Kinetic characterization of the deproteinization of trabecular and cortical bovine femur bones. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013; **33**(8):4958-64.
175. Barone A, Ricci M, Covani U, Nannmark U, Azarmehr I, Calvo-Guirado JL. Maxillary sinus augmentation using prehydrated corticocancellous porcine bone: Hystomorphometric evaluation after 6 months. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012; **14**:373-79.
176. Danoux C, Pereira D, Döbelin N, Stähli C, Barralet J, van Blitterswijk C, Habibovic P. The Effects of crystal phase and particle morphology of calcium phosphates on proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Adv Healthc Mater* 2016; **5**(14):1775-85.
177. Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, Sader R, Unger RE, Ziegler G, Kirkpatrick CJ. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater* 2012; **7**(1):015005.
178. Corbella S, Taschieri S, Weinstein R, Del Fabbro M. Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2016; **27**(9):1106-22.

179. Lee JH, Kim JH, Jeon JH. Bone regeneration of macropore octacalcium phosphate-coated deproteinized bovine bone materials in sinus augmentation: a prospective pilot study. *Implant Dent* 2015; **24**(3):275-80.
180. Kurkcu M, Benlidayi ME, Cam B, Sertdemir Y. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs β -tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study. *J Oral Implantol* 2012; **38**:519-26.
181. Park JW, Kim ES, Jang JH, Suh JY, Park KB, Hanawa T. Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of submicron-sized grains with a hierarchical pore structure. *Clin Oral Implants Res* 2010; **21**(3):268-76.
182. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res* 2013; **57**(1):3-14.
183. McCall RA, Rosenfeld AL. The influence of residual ridge resorption patterns on implant fixture placement and tooth position. Part 1. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1991; **11**:9-23.
184. Kim SY, Kim YK, Kim HS, Yun PY, Kim SG, Choi YH. Extraction socket sealing using palatal gingival grafts and resorbable collagen membranes. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2017; **39**(1):39.
185. Garg A. Barrier membranes – materials review, part I of II. *Dent Implantol Update* 2011; **22**:61-4.
186. Zhang J, Xu Q, Huang C, Mo A, Li J, Zuo Y. Biological properties of an anti-bacterial membrane for guided bone regeneration: an experimental study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2010; **21**:321-7.
187. Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009; **20**:113-23.
188. Gutta R, Baker RA, Bartolucci AA, Louis PJ. Barrier membranes used for ridge augmentation: Is there an optimal pore size? *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**:1218-25.
189. Monteiro AS, Macedo LG, Macedo NL, Balducci I. Polyurethane and PTFE membranes for guided bone regeneration: histopathological and ultrastructural evaluation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; **15**: e401-6.

190. Suárez-López Del Amo F, Ortega-Oller I, Catena A, Monje A, Khoshkam V, Torrecillas-Martínez L, et al. Effect of barrier membranes on the outcomes of maxillary sinus floor augmentation: a meta-analysis of histomorphometric outcomes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015; **30**(3):607-18.
191. Singh S, Gupta H, Kumar D, Agrawai R, Natu SS, Gupta N. Immediate implant placement with bone graft and delayed implants placement in a grafted socket: a comparative study. *Int J Oral Implant Clin Res* 2015; **6**(2):40-47.
192. Thoma DS, Naenni N, Figuero E, Hämmerle CHF, Schwarz F, Jung RE, et al. Effects of soft tissue augmentation procedures on peri-implant health or disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2018; 29 Suppl **15**:32-49.
193. . Crowley DJ, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Irrigation of the wounds in open fractures. *J Bone Joint Surg Br* 2007; **89**:580-5.
194. Husodo K, Kamal AF, Yusuf AA. Effect of povidone iodine and hydrogen peroxide on fracture healing: a histomorphometric study on rats. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2016; **24**(2):245-9.
195. Gortzak Y, Kandel R, Deheshi B, Werier J, Turcotte RE, Ferguson PC, et al. The efficacy of chemical adjuvants on giant-cell tumour of bone. An in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 2010; **92**:1475-9.
196. Schreml S, Landthaler M, Schaferling M, Babilas P. A new star on the H₂O₂ rizon of wound healing? *Exp Dermatol* 2011; **20**:229-31.
197. Lineaweaver W, Howard R, Soucy D, McMorris S, Freeman J, Crain C, et al. Topical antimicrobial toxicity. *Arch Surg* 1985; **120**:267-70.
198. . Loo AE, Wong YT, Ho R, Wasser M, Du T, Ng WT, et al. Effects of hydrogen peroxide on wound healing in mice in relation to oxidative damage. *PLoS One* 2012; **7**:e49215.
199. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. *Skin Pharmacol* 1990; **3**:157-63
200. Akbari M, Nejat AH, Farkhondeh N, Mehraban Moghadam S, Hashemy SI, Mohammadipour HS. Does at-home bleaching induce systemic oxidative stress in healthy subjects? *Aust Dent J.* 2017; **62**(1):58-64.

201. Zimmerli B, Jeger F, Lussi A. Bleaching of nonvital teeth. A clinically relevant literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2010; **120**(4):306-20.
202. Marshall K, Berry TG, Woolum J. Tooth whitening: current status. *Compendium* 2010; **31**(7):486-95.
203. Gutiérrez-Venegas G, Guadarrama-Solis A, Muñoz-Seca C, Arreguín-Cano JA. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gingival fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**(12):15563-72.
204. Rotstein I, Friedman S, Mor C, Katznelson J, Sommer M, Bab I. Histological characterization of bleaching-induced external root resorption in dogs. *J Endod* 1991; **17**:436-41.
205. Gutiérrez-Venegas G, Arreguín-Cano JA, Arroyo- Cruz R, Villeda-Navarro M, Méndez-Mejía JA. Activation of ERK1/2 by protein kinase C-alpha in response to hydrogen peroxide-induced cell death in human gingival fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 2010; **24**:319-326.
206. Jorgensen MG, Carroll WB. Incidence of tooth sensitivity after home whitening treatment. *J Am Dent Assoc* 2002; **133**(8):1076-82.
207. Nathanson D. Vital tooth bleaching: sensitivity and pulpal considerations. *J Am Dent Assoc* 1997; **128**:41S-44S.
208. Powell LV, Bales DJ. Tooth bleaching: its effect on oral tissues. *J Am Dent Assoc* 1991; **122**(11):50-54.
209. Souza R, Lombardo G, Pereira S et al. Analysis of tooth enamel after excessive bleaching: a study using scanning electron microscopy and energy dispersive x-ray spectroscopy. *Int J Prosthet Dent* 2010; **23**(1):29-32.
210. Kameda A, Masuda YM, Teruo T, Yamada Y, Kimura Y, Tamaki Y, Miyazaki T. Effects of tooth coating material and finishing agent on bleached enamel surfaces by KTP laser. *Laser Ther* 2013; **22**(2):125-30.
211. Sa Y, Sun L, Wang Z, Ma X, Liang S, Xing W, Jiang T, Wang Y. Effects of two in-office bleaching agents with different pH on the structure of human enamel: an in situ and in vitro study. *Oper Dent* 2013; **38**(1):100-10.
212. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. *Clin Oral Investig* 2010; **14**(1):1-10.

213. Jiang T, Ma X, Wang Z, Tong H, Hu J, Wang Y. Beneficial effects of hydroxyapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide. *J Dent* 2008; **36**(11):907-14.
214. Menezes RP, Silva PD, Leal PC, Faria-E-Silva AL. Impact of 35% hydrogen peroxide on color and translucency changes in enamel and dentin. *Braz Dent J* 2018; **29**(1):88-92.
215. Wanasundara PK, Shahidi F. Antioxidants: science, technology, and applications. İçinde Shahidi F, editor. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons, Inc; 2005. pp. 431-89.
216. Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: a review. *J Dent* 2009; **37**: 413-23.
217. Sassi N, Mattarei A, Azzolini M, Szabo' I, Paradisi C, Zoratti M, Biasutto L. Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1837**(10):1781-9.
218. Tamaki N, Orihuela-Campos RC, Inagaki Y, Fukui M, Nagata T, Ito HO. Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. *Free Radic Biol Med* 2014; **75**: 222-9.
219. Pirola L, Fröjdö S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 2008; **60**:323-32.
220. Tsutsumi K, Fujikawa H, Kajikawa T, Takedachi M, Yamamoto T, Murakami S. Effects of L-ascorbic acid 2-phosphate magnesium salt on the properties of human gingival fibroblasts. *J Periyodontal Res* 2012; **47**:263-71.
221. Chapple IL, Matthews JB, Wright HJ, Scott AE, Griffiths HR, Grant MM. Ascorbate and α -tocopherol differentially modulate reactive oxygen species generation by neutrophils in response to Fc γ R and TLR agonists. *Innate Immun* 2013; **19**:152-9.
222. Murphy MP, Siegel RM. Mitochondrial ROS fire up T cell activation. *Immunity* 2013; **38**:201-2.
223. Bullon P, Cordero MD, Quiles JL, Morillo JM, del Carmen Ramirez-Tortosa M, Battino M. Mitochondrial dysfunction promoted by *Porphyromonas gingivalis*

- lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**:1336-43.
224. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med* 2012; **2012**:918267.
225. Poh CK, Ng S, Lim TY, Tan HC, Loo J, Wang W. In vitro characterizations of mesoporous hydroxyapatite as a controlled release delivery device for VEGF in orthopedic applications. *J Biomed Mater Res A* 2012; **100**(11):3143-50.
226. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* 2011; **32**(6):491-509.
227. Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1852**: 1114-23.
228. Poulsen MM, Fjeldborg K, Ornstrup MJ, Kjær TN, Nøhr MK, Pedersen SB. Resveratrol and inflammation: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1852**:1124-36.
229. Singh CK, Ndiaye MA, Ahmad N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1852**:1178-85.
230. Nakagawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, Senzaki H, Shikata N, Hioki K, et al. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; **127**:258-64.
231. Coleman MD. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. *Br J Dermatol* 1993; **129**:507-13.
232. Li P, Liang ML, Zhu Y, Gong YY, Wang Y, Heng D, Lin L. Resveratrol inhibits collagen I synthesis by suppressing IGF-1R activation in intestinal fibroblasts. *World J Gastroenterol* 2014; **28**; 20(16):4648-61.
233. Zeng G, Zhong F, Li J, Luo S, Zhang P. Resveratrol-mediated reduction of collagen by inhibiting proliferation and producing apoptosis in human hypertrophic scar fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; **77**(12):2389-96.
234. Crespi R, Capparé P, Romanos GE, Mariani E, Benasciutti E, Gherlone E. Corticocancellous porcine bone in the healing of human extraction sockets: combining histomorphometry with osteoblast gene expression profiles in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011; **26**(4):866-72.

235. Kamogashira T, Hayashi K, Fujimoto C, Iwasaki S, Yamasoba T. Functionally and morphologically damaged mitochondria observed in auditory cells under senescence-inducing stress. *NPJ Aging Mech Dis* 2017; **25**;3:2.
236. Gouspillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Biran M, Deschodt-Arsac V, et al. Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell* 2014; **13**(1):39-48.
237. Wang Y, Liu Q, Xu Y, Zhang Y, Lv Y, Tan Y, et al. Ginsenoside Rg1 Protects against Oxidative Stress-induced Neuronal Apoptosis through Myosin IIA-actin Related Cytoskeletal Reorganization. *Int J Biol Sci* 2016; **12**(11):1341-56.
238. Kubosch EJ, Bernstein A, Wolf L, Fretwurst T, Nelson K, Schmal H. Clinical trial and in-vitro study comparing the efficacy of treating bony lesions with allografts versus synthetic or highly-processed xenogeneic bone grafts. *BMC Musculoskelet Disord* 2016; **13**;17:77.
239. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1817**(10):1833-8.
240. Fujioka H, Tandler B, Consolo MC, Karnik P. Division of mitochondria in cultured human fibroblasts. *Microsc Res Tech* 2013; **76**(12):1213-6.
241. Suwalsky M, F Villena, Gallardo MJ. In vitro protective effects of resveratrol against oxidative damage in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1848**(1 Pt A):76-82.
242. Opiari AW Jr, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2004; **64**(2):696-703.
243. Ježek J, Cooper KF, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants (Basel)* 2018; **7**(1). pii: E13.
244. Robb EL, Moradi F, Maddalena LA, Valente AJF, Fonseca J, Stuart JA. Resveratrol stimulates mitochondrial fusion by a mechanism requiring mitofusin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; **485**(2):249-54.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KEMİK GREFT MATERYALİN VE OKSİDATİF STRESİN İN VİTRO MODELDE FİBROBLASTLAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ VE RESVERATROLÜN KORUYUCU ROLÜ

ORJİNALLIK RAPORU

%4 BENZERLİK ENDEKSİ	%2 İNTERNET KAYNAKLARI	%1 YAYINLAR	%2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Sakarya University Öğrenci Ödevi	%1
2	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	ejmii.com İnternet Kaynağı	<%1
4	www.ejmanager.com İnternet Kaynağı	<%1
5	www.jceionline.org İnternet Kaynağı	<%1
6	www.bioscience.org İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
8	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Belisa	Soyadı	KALECI
Doğ.Yeri	Arnavutluk	Doğ.Tar.	06/07/1986
Uyruğu	Arnavut	TC Kim No	99820284776
Email	Belisa.kaleci@yahoo.com.tr	Tel	05432675433

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü-CTF Histoloji- Embriyoloji AbD	2012-
Yük.Lis.		
Lisans	Tirana Üniversitesi, Tıp Fakültesi- Dış Hekimlik Bölümü	2005-2010
Lise	“Seit Nardeni” Peshkopi	2001-2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Diş Hekimi	Halk Sağlığı Müdürlüğü	2010-2011
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İtalyanca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
Türkçe	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		92

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

