



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**GSK-3 ANTAGONİSTİ OLAN TİDEGLUSİB'İN İNSAN DİŞETİ
FİBROBLASTLARI, PERİODONTAL LİGAMENT
FİBROBLASTLARI VE OSTEOLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ: İN-VİTRO ÇALIŞMA**

BUSE ÖNCÜ

UZMANLIK TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi ÖMER BİRKAN AĞRALI

2019-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**GSK-3 ANTAGONİSTİ OLAN TİDEGLUSİB'İN İNSAN DİŞETİ
FİBROBLASTLARI, PERİODONTAL LİGAMENT
FİBROBLASTLARI VE OSTEOLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ: İN-VİTRO ÇALIŞMA**

BUSE ÖNCÜ

UZMANLIK TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi ÖMER BİRKAN AĞRALI

2019-İSTANBUL

TEZ ONAYI



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm safhalarda etik dışı davranışımın bulunmadığını, 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 olmadığını beyan ederim.

Buse Öncü

İmza

I. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca mesleki eğitimimde büyük katkıları olan, deneyimlerini ve bilgisini özveriyle aktaran, cerrahi vizyonumun gelişmesinde büyük katkısı olan sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ömer Birkan AĞRALI'ya

Bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan, eğitimimdeki emeklerinden dolayı minnettar olduğum, değerli hocam sayın Prof. Dr. Leyla KURU'ya

Bilgi ve tecrübesiyle eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Başak DOĞAN'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Kemal Naci KÖSE, Dr. Öğr. Üyesi. H. Selin YILDIRIM, Dr. Öğr. Üyesi Hafize Öztürk ÖZENER'e

Tez çalışmalarımnda fikir, bilgi ve tavsiyeleri ile her zaman yanımda olan sevgili Doç. Dr. Betül KARADEMİR'e ve Dr. Arş. Gör. Ayşe Mine YILMAZ'a

Tezimin istatistik aşamasında büyük emek harcayan sayın Dr. Öğretim Üyesi Elif Çiğdem ALTUNOK'a,

Birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, ne zaman ihtiyacım olsa yanımda olan, eski ve yeni tüm çalışma arkadaşlarıma,

Fakültede geçirdiğim süreyi keyifli hale getiren sevgili yol arkadaşlarım Dt. Gamze KAVUNCU, Dt. Aydın AKÇAKOCA, Dt. Damla ÖZTÜRK ve Dt. Halil ÇELİK'e

Hayatımın her anında sevgiyle desteğini benden esirgemeyen, annem ve babam başta olmak üzere üzere sevgili aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DUP-131217-0658 numaralı proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
I. TEŞEKKÜR	i
II. İÇİNDEKİLER	ii
III. KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	iv
IV. RESİMLER LİSTESİ	vi
V. ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
VI. TABLOLAR LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Periodonsiyum	5
4.2. Periodontal Hücreler	9
4.2.1. Gingival Fibroblast ve Periodontal Ligament Fibroblastı	9
4.2.2. Osteoblast	10
4.2.3. Sementoblast	12
4.3. Periodontal Rejenerasyon	12
4.3.1. Periodontal Rejenerasyonda Hücrelerin Rolü	14
4.3.2. Rejeneratif Tedaviler	15
4.4. Wnt/ β - catenin Sinyal Yolu	16
4.5. GSK-3 Glikojen Sentaz Kinaz-3 (GSK-3)	21
4.6. Tideglusib	22

5. GEREÇ VE YÖNTEM	23
5.1. Deney Planı	23
5.2. Hücrelerin Çözülmesi, Pasajlanması, Çoğaltılması ve Sayılması	23
5.3. Hücre Canlılığının Belirtilmesi ve Sitotoksosite Testi	26
Hücrelerden Protein Eldesi, Protein Konsantrasyonlarının Hesaplanması ve <i>Western Blot</i> Yöntemi ile Tip I Kolajen, Tip III Kolajen Proteinlerinin Tayin Edilmesi	31
5.4.1. Dokulardan protein ekspresyonu	31
5.4.2. Protein miktarının belirlenmesi	32
5.4.3. Sodyum dodesülfat polşakrilamid jel elektroforezi	34
5.4.4. Jelden membrana proteinlerin aktarılması ve densitometrik analizler	35
5.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analizi	38
6. BULGULAR	39
6.1. Tideglusib'in Hücreler Üzerindeki Canlılık ve Sitotoksosite Etkisi	39
6.2. Tideglusib'in 50 nM Doz Uygulanan Hücreler Üzerindeki Tip I Kolajen Salınımının Değerlendirilmesi	47
6.3. Tideglusib'in 50 nM Doz Uygulanan Hücreler Üzerindeki Tip III Kolajen Salınımının Değerlendirilmesi	50
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
8. KAYNAKLAR	60
9. ÖZGEÇMİŞ	72

III. KISALTMALAR ve SİMGELER

% : Yüzde

°C : Santigrat derece

ALP : Alkalen fosfataz

APC : Adenomatöz polipozis koli

β : Beta

BMP : Kemik morfojenik proteini

BSP : Kemik sialoproteini

CK1 : Kazein kinaz

Dkk1 : *Dickkopf 1*

ECM : Ekstrasellüler matriks

Fz : *Frizzled*

GF : Gingival fibroblast

GSK : Glikojen sentaz kinaz

hfob : İnsan fetal osteoblast hücreleri

hgf-1 : İnsan dişeti fibroblastı

hPdlf : İnsan periodontal ligament fibroblastı

IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü

IL : İnterlökin

LEF : *Lymphoid enhancer factor*

Lrp : LDL reseptör ilişkili protein

ml : Mililitre

nM : Nanomolar

ON :Osteonektin

OPN :Osteopontin

PDGF : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PDLF :Periodontal ligament fibroblastı

PMNL : Polimorfonükleer lökosit

S.P.S.S.: *Statistical Package for Social Sciences*

TCF : *T cell factor*

TDZD :Thiadiazolidinones

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü

TLR : *Toll-like* reseptor

μ l : Mikrolitre

IV. RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.1. 10x büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü (a) hPdlf hücreleri, (b) hfob hücreleri, (c) hgf-1 hücreleri

Resim 5.2. (a) Thoma lamı, (b) 10x büyütmede görüntülenen hücreler, (c) Işık Mikroskobu

Resim 5.3. Tideglusib

Resim 5.4. Hücre canlılığı deneyi için 96 kuyucuklu plağa hücre ekimi (C: Kontrol grubu (hücre+medium), B: sadece medium, C,D,E: 50, 100, 200 nM Tideglusib eklenmiş test grupları)

Resim 5.5. Microplate Reader

Resim 5.6. Buz üzerinde inkübasyon

Resim 5.7. Sonikasyon cihazı

Resim 5.8. Santrifüj cihazı

Resim 5.9. BCA protein tayini kiti, (a) Reagent A, (b) Reagent B, (c) Albumin standartı ampülleri

Resim 5.10. 96 kuyucuklu plakalara BCA eklenmesi

Resim 5.11. (a) %12'lik mini-protean jel, (b) *Laemmi Sample Buffer*

Resim 5.12. Trans-Blot transfer sistemi

Resim 5.13. (a) *Western blotting luminol reagent*, (b) Görüntüleme sistemi

V. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Normal periodonsiyum yapısı.

Şekil 4.2. Wnt sinyal yolu

Şekil 4.3. Wnt sinyal yolu osteoblast/osteoklast aktivitesi

Şekil 5.1. MultiTox-Glo Multiplex sitotoksiste testi Şematik diyagramı

Şekil 6.1. hgf-1 hücresinde 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası canlılık

Şekil 6.2. hPdlf hücresinde 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası canlılık

Şekil 6.3. hfob hücresinde 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası canlılık

Şekil 6.4. hgf-1 hücresinde 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası sitotoksiste

Şekil 6.5. hPdlf hücresinde 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası sitotoksiste

Şekil 6.6. hfob hücresinde 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası sitotoksiste

Şekil 6.7. (a) Kontrol ve test grupları bant yoğunlukları, **(b)** hgf-1 hücreleri tip I kolajen salınımı

Şekil 6.8. (a) Kontrol ve test grupları bant yoğunlukları, **(b)** hPdlf hücreleri tip I kolajen salınımı

Şekil 6.9. (a) Kontrol ve test grupları bant yoğunlukları, **(b)** hfob hücreleri tip I kolajen salınımı

Şekil 6.10. Kontrol ve test grupları bant yoğunlukları ve tip III kolajen salınımı **(a)** hgf-1 hücresi, **(b)** hPdlf hücresi, **(c)** hfob hücresi

VI. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 5.1. Tüm hücre gruplarının canlılık ve sitotoksisite değerleri (%)

Tablo 5.2. Standart grafikte kullanılacak olan standartların 2000 µg/ml stok albümin standartından hazırlanması.

Tablo 5.3. Tüm hücre gruplarındaki tip I kolajen/ GAPDH protein yoğunluğu değerleri

Tablo 5.4. Tüm hücre gruplarındaki tip III kolajen/ GAPDH protein yoğunluğu değerler

Tablo 6.1. Tüm hücre gruplarında 0, 50, 100, 200 nM grupları arası canlılık karşılaştırması

Tablo 6.2. hPdlf hücrelerine uygulanan Tideglusib dozları sonrası canlılığın ikili karşılaştırması

Tablo 6.3. Tüm hücre gruplarında 0, 50, 100, 200 nM grupları arası sitotoksisite karşılaştırması

Tablo 6.4. hgf-1 hücrelerine uygulanan Tideglusib dozları sonrası sitotoksitenin ikili karşılaştırması

Tablo 6.5. hfob hücrelerine uygulanan Tideglusib dozları sonrası sitotoksitenin ikili karşılaştırması

Tablo 6.6. Tüm hücre grupları için tip-I kolajen salınımı verileri

Tablo 6.7. Tüm hücre grupları için tip III kolajen salınımı verileri

GSK-3 Antagonisti Olan Tideglusib`in İnsan Dişeti Fibroblastları, Periodontal Ligament Fibroblastları ve Osteoblast Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi: İn-vitro Çalışma

Uzmanlık Öğrencisi: Buse ÖNCÜ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ömer Birkan AĞRALI

Anabilim Dalı: Periodontoloji

1. ÖZET

Amaç: Periodontal rejenerasyonun sağlanması için pek çok materyal denenmiş ancak tam rejenerasyon sağlayan bir materyal bulunamamıştır. Bu çalışmanın amacı Tideglusib`in periodontal rejenerasyondaki olası etkinliğini değerlendirmek için insan dişeti fibroblastı (hgf-1), periodontal ligament fibroblastı (hPdlf) ve osteoblastlar (hfob) üzerine etkisinin değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Tideglusib`in hgf-1, hPdlf ve hfob hücreleri üzerindeki sitotoksosite ve proliferasyon etkisini belirlemek amacıyla, farklı konsantrasyonlardaki Tideglusib (50, 100, 200 nM) kullanılarak MultiTox deney protokolü 24 saat süreyle uygulandı. 50 nM Tideglusib üç farklı hücre üzerine 24 saat süreyle uygulanarak tip I - tip III kolajen protein salınımı *Western blot* analizi ile ölçüldü.

Bulgular: Proliferasyon deneyinde her hücre dizisi için Tideglusib uygulanan test gruplarıyla uygulanmayan kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). hgf-1 ve hfob hücrelerinde 200 nM Tideglusib`in sitotoksitesite kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulunurken ($p=0.012$, 0.012), hPdlf hücresinde test grupları ile kontrol grubu arasında fark bulunmadı ($p>0.05$). Bu veriler ışığında 50 nM Tideglusib hgf-1 ve hfob hücrelerine uygulandığında tip I kolajen seviyesi kontrol grubuna kıyasla artarken ($p=0,029$, $p=0.029$), hPdlf hücresinde fark bulunmadı ($p>0.05$). Tip III kolajen salınımında ise tüm hücre gruplarında kontrol grubuyla test grupları arasında fark tespit edilmedi ($p>0,05$).

Sonuçlar: Tideglusib`in hgf-1 ve hfob hücrelerinde tip I kolajen artışına sebep olması, öte yandan hPdlf üzerine anlamlı bir etki göstermemesi gibi sebeplerle Tideglusib molekülünün kemik rejenerasyonuna olumlu yönde etki gösterebileceği düşünülebilir.

Anahtar Sözcükler: GSK-3 inhibitörü, Periodontal rejenerasyon, Tideglusib, Wnt sinyal yolu.

2. SUMMARY

Effects of GSK-3 Antagonist Tideglusib on Human Gingival Fibroblasts, Periodontal Ligament Fibroblasts and Osteoblast Cells: An *In-Vitro* Study

Objective: Many materials have been tried for periodontal regeneration, but no material has been proposed for complete regeneration. The aim of this study was to evaluate the effect of Tideglusib on different human periodontal cell lines pointing to assess the potential effectiveness of Tideglusib in periodontal regeneration.

Materials and Methods: MultiTox test protocol was applied on human periodontal ligament fibroblast (hPdlf), gingival fibroblast (hgf-1) and osteoblast (hfob) cell lines for 24 hours by using Tideglusib at different concentrations (50nM, 100 nM, 200 nM) in order to determine its cytotoxicity and proliferation effect. Type I and type III collagen expressions were evaluated by Western blot analysis after 24 hours application of 50nM dose Tideglusib to three cell lines.

Results: : In the proliferation experiment, no significant differences were found between the Tideglusib applied test groups and no Tideglusib applied control for each cell lines ($p > 0.05$). In the cytotoxicity test, the cytotoxicity of 200 nM Tideglusib was significantly higher in hgf-1 and hfob cell lines ($p = 0.012, 0.012$), but no difference was found in hPdlf cell line ($p > 0.05$). After the application of 50 nM Tideglusib to hgf-1 and hfob cell lines, type I collagen level was significantly increased ($p = 0.029, p = 0.029$) but no statistically significant difference was found in the hPdlf cell line ($p > 0.05$). Type III collagen expressions were not statistically different between the tests and the control for each cell lines ($p > 0.05$).

Conclusion: It can be thought that Tideglusib may have a positive effect on bone regeneration due to the fact that tideglusib molecule causes type I collagen increase in hgf-1 and hfob cells, but not on hPdlf.

Key Words: GSK-3 inhibitor, Periodontal regeneration, Tideglusib, Wnt signaling pathway.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Periodontal hastalıklar ilerleyerek dişi destekleyen dokuların kaybına sebep olan enflamatuvar karakterde hastalıklardır (Brown ve Loe, 1993; Kocher ve ark., 2000). İleri periodontal hastalıkların tedavisinde uygulanan geleneksel periodontal tedaviler, tamir niteliği taşıyan uzun bağlantı epiteli oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Melcher, 1976). Günümüzde ise tam bir rejenerasyon amaçlanmaktadır ve periodontal tedavi ile hastalık sonucu kaybedilen alveol kemiği, sement ve periodontal ligamentin yeniden oluşturulması beklenmektedir. Rejenerasyonun sağlanması için pek çok materyal denenmiş ancak tam anlamıyla rejenerasyon sağlayan bir materyal bulunamamıştır (Bosshardt ve Sculean, 2009; Akman ve ark., 2015).

Bir organizmada hem embriyonik hem de erişkin dönemde görev alan çeşitli sinyal yolları mevcuttur. Wnt/ β -cat sinyal yolu, Wnt sinyal yollarından birisidir. Wnt/ β -cat sinyalizasyonunun aktivasyonu doku hasarında erken verilen cevaptır ve tüm dokulardaki hücresel temelli onarımın uyarılması için gereklidir (Tanır ve Demirezen, 2009). Wnt sinyal mekanizması aktif veya inaktif durumda olabilir. Wnt proteini reseptörlere bağlyken, bir dizi fosforillenme işlemi sonrası glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) inhibe edilir, transkripsiyon faktörleri aktive olur ve Wnt sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonu başlar. Bu aktivasyonla, hem sinyal yolunda görev yapan proteinlerin transkripsiyonu gerçekleşir, hem de proliferasyon, hücre siklusu ve farklılaşmada önemli rol oynayan birçok genin transkripsiyonunun kontrolü sağlanmış olur. Wnt reseptörlere bağlı değil iken sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonu baskılanır (Willert ve Nusse, 1998; Miller, 2002). Wnt sinyalindeki azalmanın kemik kaybına sebep olduğu ve rejeneratif kapasiteyi azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Minear ve ark., 2010; Whyte ve ark., 2012). Wnt sinyal yolu aktive edildiğinde ise kemik artışına yol açan tüm parametrelerde artış ile birlikte osteoblast ve fibroblastların aktivasyonunun ve proliferasyonunun arttığı gösterilmiştir (Morvan ve ark., 2006; Han ve ark., 2012). Tüm bu bilgilerin ışığında, Wnt sinyal yolu aktivasyonunun rejenerasyonda kullanımını tartışılmaktadır.

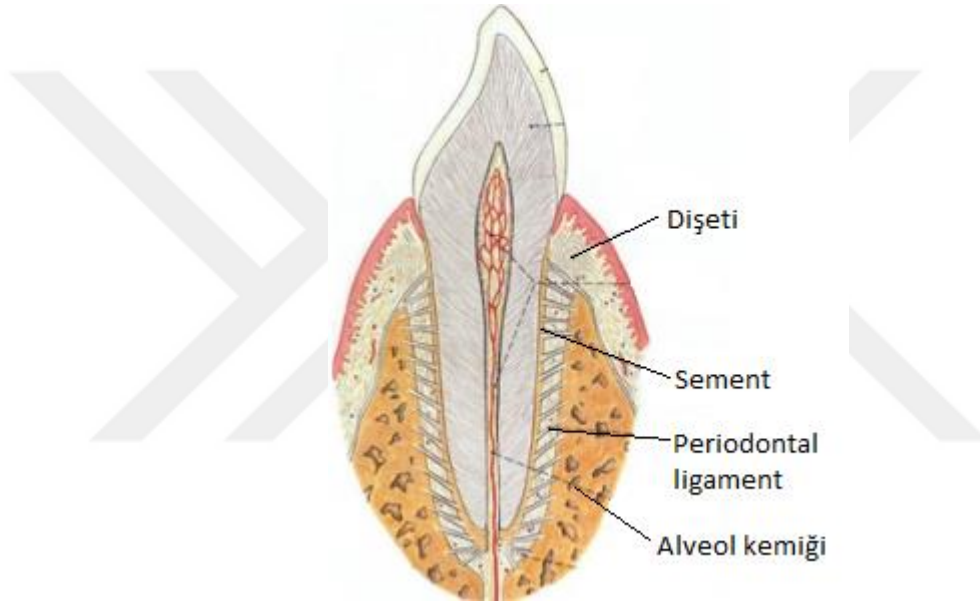
GSK, glikojen sentezinin düzenlenmesinde fonksiyonu araştırılan ilk kinazlardan birisidir ve GSK-3, hücre bölünme siklusu, kök hücre yenilenmesi ve farklılaşması, apoptoz, transkripsiyon ve insülin aktivitesini regüle etmede büyük bir öneme sahiptir (Frame ve ark., 2001; Jope ve Johnson, 2004; Meijer ve ark., 2004). GSK-3'ün farmakolojik inhibitörlerinin, Alzheimer hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıklar, tip 2 diyabet, kanser, psikiyatrik hastalıklar ve rejeneratif tıp gibi çeşitli alanlarda etkili olabileceği düşünülmektedir (Meijer ve ark., 2004). GSK-3'ün pek çok inhibitörü geliştirilmiş ve etkinliği gösterilmiştir, bunlardan biri de Alzheimer gibi nörolojik bozuklukların tedavisinde klinik olarak denenmiş, non-ATP competitive GSK-3 β inhibitörü, thiazolidinones (TDZD) grubu bir ilaç olan Tideglusib'dir. Derin çürüklü dişlerde yapılan bir çalışmada Tideglusib'in reperatif dentin oluşum sürecini desteklediği bulunmuştur (Neves ve ark., 2017).

Bu çalışmada Tideglusib'in periodontal rejenerasyondaki olası etkinliğini değerlendirmek amacıyla hPdlf, hgf-1 ve hfob hücreleri üzerindeki etkisinin proliferasyon ve sitotoksosite açısından değerlendirilmesi, ardından tip I ve tip III kolajen salınımının incelenmesi amaçlandı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Periodonsiyum

Normal periodonsiyum, dişlerin işlevini sürdürebilmesi için gerekli desteği sağlar. Periodonsiyumu oluşturan temel dokular: dişeti, periodontal ligament, sement ve alveol kemiğidir (Şekil 4.1) (Bartold ve ark., 2000).



Şekil 4.1. Normal periodonsiyum yapısı.

Dişeti, çiğneme mukozasının bir parçasıdır. Ağız mukozasının alveol kretini örter ve dişleri çevreler (Schroeder ve Listgarten, 1997; Schroeder, 2012). Anatomik olarak üç bölümde incelenmektedir: dişeti kenarı, yapışık dişeti ve interdental dişeti. (Ainamo ve Talari, 1976). Dişeti histolojik olarak incelendiğinde ise çok katlı yassı epitel ve altındaki bağ dokusundan oluşmaktadır. Dişeti çok katlı yassı epitelindeki temel hücreler keratinositlerdir. Bunun yanında Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri ve melanositler de bulunmaktadır. Dişeti epiteli, bağ dokusuna bazal lamina ile bağlanmaktadır (Schroeder ve Theiiade, 1966). Dişeti bağ dokusuna *lamina propria* da denilmektedir. *Lamina propriadaki* temel yapılar: kolajen lifler (bağ dokusunun

%60'ı), sinir ve damarlar, ekstrasellüler matris (ECM) ve fibroblastlardır. Bağ dokusunda 3 farklı tip lif bulunmaktadır bunlar kolajen, retiküler ve elastik liflerdir.

Normal dişetinde en sık görülen kolajenler, tip I ve tip III'tür. Tip I kolajen ($[\alpha 1(I)]_2\alpha 2[I][\alpha 1(I)]_3$) 285 kDA molekül ağırlığındadır ve cilt, tendon, kemik, dentin, sement, periodontal ligament, dişeti gibi pek çok dokuda en sık görülen kolajendir. *Lamina propria*'nın ana kütesini oluşturur ve dişetine dayanıklılık sağlar. Tip III kolajen ise ($[\alpha 1(II)]_3$) 285 kDA ağırlığında ve fetal dokularda, dişeti, periodontal ligament, sement, cilt, kan damarlarında bulunan kolajendir (Mariotti, 1993). Tip III kolajen dokularda gerilme kuvvetlerine karşı dayanıklılık sağlar ve kolajen yapım/yıkım mekanizmasında rol almaktadır (Narayanan, 1983). Yara iyileşmesinin ilk fazlarında tip III kolajen dokuya dayanıklılık sağlarken son fazlarda yerini daha dayanıklı olan tip I kolajene bırakır (Rai ve ark., 2005). Tip I, tip II ve tip III kolajen, fibroblastlar ve monositler için kemoatraktan özellik taşımaktadır (Postlethwaite ve ark., 1978). Ayrıca tip I kolajen osteoblast farklılaşmasını gösteren önemli bir belirteçtir (Dacic ve ark., 2001).

Periodontal ligament, diş kökünü çevreleyen ve alveol kemiğinin iç duvarına bağlanan kompleks, vasküler, çok sayıda hücre içeren bağ dokusudur (McKee ve ark., 1996). Dişlere gelen kuvvetleri absorbe ederek alveol kemiğine iletir. Ayrıca dişin beslenmesine katkıda bulunur, sement yapımı ve alveol kemiğin yenilenmesi için gerekli öncül hücreleri bulundurur. Periodontal ligamentteki kolajen fibriller kemiği ve sementi birbirine bağlar, bulunduğu yere ve dizilişlerine göre çeşitli gruplara ayrılırlar, bunlar:

- Transseptal fibriller, interproksimal alanda uzanır ve bitişik dişin sementine gömülür. Periodontal hastalık sebebiyle alveol kemiğin yıkılmasından sonra yeniden oluşurlar. Bu lifler dişetine bağlı olarak kabul edilebilir, çünkü kemik bağlantısı yoktur (Newman ve ark., 2014).
- Alveol kret fibrilleri, bağlantı epitelinin altında sementten alveol krete doğru oblik olarak uzanırlar. Ayrıca alveol kretin üstündeki sementten ve periostun fibröz tabakasından da geçerler. Alveol kret fibrilleri dişin ekstrüzyonunu önler ve lateral diş hareketlerine karşı dayanıklılık sağlar (Newman ve ark., 2014).

- Horizontal fibriller, dişin uzun eksenine dik bir şekilde, sementten alveol kemiğine kadar uzanırlar (Newman ve ark., 2014).
- Oblik fibriller, periodontal ligamentteki en büyük grubu oluşturur. Kemikten kuronal doğrultuda semente doğru uzanır. Bu lifler, dikey çiğneme kuvvetlerini karşılar ve alveol kemiğine iletir (Newman ve ark., 2014).
- Apikal fibriller, dişin apikal bölgesindeki sementten kemiğe doğru düzensiz bir şekilde yayılırlar. Oluşumu tamamlanmamış köklerde meydana gelmezler (Newman ve ark., 2014).
- İnterradiküler fibriller, çok köklü dişlerin furkasyon bölgelerinde sementten dişe doğru dağılım gösteren fibrillerdir (Newman ve ark., 2014).

Periodontal ligament histolojik açıdan incelendiğinde, bağ dokusu hücreleri, epitelyal kalıntı hücreleri, immün sistem hücreleri ve nörovasküler sistemle ilgili hücreleri içerdiği görülmektedir (Ko ve Bernard, 1981; Newman ve ark., 2014). Periodontal ligament bağ dokusundaki hücreler fibroblast, osteoblast, osteoklast, sementoblast, odontoblast, monosit, makrofaj, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri ve Malessez epitel artıklarıdır. En sık gözlenen hücreler fibroblastlardır ve kolajen yapım/yıkım mekanizmasından sorumludurlar. Periodontal ligamentin ana proteini kolajen olmakla birlikte dişeti ve sement ile ortak olarak en çok tip I ve tip III kolajen içermektedir (Narayanan, 1983; Bartold ve Narayanan, 1998) (Becker ve ark., 1991). Perivasküler alanda bulunan farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri rejeneratif tedavi açısından umut vadetmektedir (Akman ve ark., 2015). Periodontal ligamentte yer alan kök hücrelerin uygun koşullarda osteoblastlara ve sementoblastlara farklılaşabileceği bilinmektedir ayrıca *in-vivo* araştırmalarda da periodontal ligamentin, kemik ve sement oluşturabileceği gösterilmiştir (Bright ve ark., 2015).

Sement, anatomik diş kökünü kaplayan kalsifiye ve avasküler, yapımı yaşam boyu süren mineralize bir dokudur. Periodontal ligament fibrillerinin kök yüzeyine bağlanmasını sağlar ve kök yüzeyinde hasar sonrası tamir mekanizmasını başlatır (Lang ve Lindhe, 2015). İçerdiği hücre çeşidi ve kolajen fibrillerin kaynağı bakımından farklılık gösteren 2 tip sement dokusu bulunmaktadır, bunlar hücresiz sement ve hücreli sementtir. Hücresiz sement diş gelişimi sırasında ilk oluşan sementtir ve kökün kuronal 2/3'ünde yer alır (Akman ve ark., 2015). Sementin

yapısında % 50 oranında hidroksiapatit, % 50 oranında ise kolajen ve kolajen dışı proteinler bulunmaktadır (Birkedal-Hansen ve ark., 1977). Sementi oluşturan organik matriksin büyük çoğunluğu tip I kolajen (%90) ve tip III kolajendir (%5) (Newman ve ark., 2014). Olgunlaşmış sementin protein salgılarının hücre yapışmasını ve hücre göçünü arttırdığı, periodontal ligament hücreleri ile gingival fibroblastların (GF) protein sentezini uyardığı bilinmektedir (Saygin ve ark., 2000). Sementin dentine bağlanma mekanizmasının bilinmesi, periodontal rejenerasyonun sağlanmasına yönelik tedavilerin geliştirilebilmesi açısından önemlidir. Sement oluşumu, dentinin mineralizasyonunun henüz tamamlanmadığı zaman başlar ve bu aşamada sement fibrilleri dentine tutunur. Bu olaylar zincirinin gerçekleşmediği durumlarda ise sement rejenerasyonunun sağlanmasına rağmen oluşan sementin dentinden ayrılacağı belirtilmektedir (Diekwisch, 2001; Akman ve ark., 2015). Periodontal rejenerasyonun sağlanması sırasında bağ doku fibrillerinin sementte yeni ataşman oluşturması önemli bir adımdır, sement bu süreçte kritik rol oynamaktadır.

Kemik, organik ve inorganik minerallerden oluşan metabolik olarak aktif bir organdır. Kompakt ve kansellöz kemikten meydana gelmektedir. Kemik dokusunun %60-70'i inorganik, % 5-8'i su ve geri kalan kısmı organik içeriklidir. İnorganik maddenin büyük bir kısmı kalsiyum ve fosfat içermektedir. Organik kısmın %90'ını tip I ve tip IV kolajen, %5'lik kısmını tip III kolajen oluşturmaktadır, geri kalanında ise kolajen olmayan proteinler ve proteoglikan bulunmaktadır (Saito ve Tsuji, 2012). Kolajen olmayan kısım ise osteonektin (ON), osteopontin (OPN), proteoglikan, matriks glikoprotein gibi proteinler içermektedir (Shwartz, 1997).

Periodonsiyumun bölümlerinden biri olan alveol kemiği ise, maksilla ve mandibulada diş soketini destekleyen kısımdır ve gelişim döneminde dental kesede yer alan farklılaşmamış hücrelerin osteoblastlara dönüşmesi sonucu oluşmaktadır. Alveol kemiği; havers kanallarından ve kompakt lameller tarafından oluşturulan kortikal kemiğin eksternal tabakası ve soket duvarını kaplayan, radyografide *lamina dura* olarak görülen ince ve kompakt kemik duvarından oluşmaktadır. Histolojik açıdan, alveol kemiğinin merkez bileşeni olan süngerimsi kemiğe iletimi sağlayan, nörovasküler demetlerin periodontal ligamentle bağlandığı kribriform tabaka olarak adlandırılan bir dizi açıklık içerir (Newman ve ark., 2014). Hüresel açıdan osteoblast,

osteoklast, osteosit ve farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri içerir. Osteoblast ve osteoklastlar alveol kemiğinin yeniden yapılanmasında birlikte rol oynarlar (Akman ve ark., 2015).

Kemiğin dış yüzeyini örten bağ dokusuna periost denilmektedir ve 2 tabakadan oluşmaktadır. İç tabakaya osteojenik tabaka da denilmektedir ve osteoblastlara farklılaşabilme kapasitesine sahip progenitör hücreler ve osteoblastlar içermektedir. Dış tabaka ise fibröz tabaka olarak da isimlendirilir ve kan damarları, sinirler, kolajen fibriller ve fibroblast içerir. Periosttaki osteoblast/osteoklast dengesini sağlamaya yönelik hücresel olaylar kemikteki şekilsel ve boyutsal değişimleri yaşam boyunca belirler (Parfitt, 1983).

Alveol kemikte yaşam boyu rezorpsiyon ve remodelasyon faaliyetleri görülmektedir. Kemik, oluşan hasarın derecesi ve yerine göre tepki verme, onarma ve hasarlı dokuyu yeni yapılan kemikle değiştirme özelliklerine sahiptir. Sağlıklı dokularda kemik yapım/yıkım mekanizmasının dengelenmesi için osteoblast ve osteoklastların farklılaşmasını düzenleyecek otokrin ve parakrin hormonlar, lokal faktörler gibi pek çok mekanizma görev almaktadır (Schwartz ve ark., 1997).

4.2. Periodontal Hücreler

4.2.1. Gingival Fibroblast ve Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri

Fibroblastlar, bağ dokusunun liflerini ve ECM yapımını sağlayarak ve eski lifleri rezorbe ederek bağ dokunun remodelasyonunu ve korunmasını sağlayan hücrelerdir. Yapılan *in-vitro* çalışmalarda özellikle periodontal ligament fibroblastlarının (PDLF) periodontal ligamentin devamlılığı, tamiri ve rejenerasyonu yanında sementoblast ve osteoblastlara farklılaşma kabiliyeti sayesinde sement ve alveol kemiği yapım/yıkım mekanizmalarında da görev aldıkları bildirilmiştir (Mariotti ve Cochran, 1990; Cho ve Garant, 1996).

Aktif fibroblastlar genellikle kolajen demetlerin yakınında bulunur ve kolajen demetlerinin uzun eksenine paralel olarak yer alırlar. Yassılaştırmış yıldız şeklinde hücrelerdir ve gittikçe incelen sitoplazmik uzantıları bulunmaktadır. Hücrenin geniş,

granüllü, oval bir çekirdeği ve 1 ya da 2 adet belirgin çekirdekçiği bulunur. Gelişmiş bir Golgi aygıtı ve granüllü endoplazma retikulumu (GER) göze çarpar. Fibrosit olarak adlandırılabilen inaktif fibroblastların ise sitoplazmaları asidofiliktir ve aktif fibroblastlara oranla daha küçük ve oval hücrelerdir. Gittikçe incelen şekle sahiptir ayrıca daha küçük ve koyu boyanan çekirdekleri vardır. Elektron mikroskopunda incelendiğinde, az miktarda GER fakat bol miktarda serbest ribozom görülmektedir (Gartner ve Hiatt, 2001; Güzel ve ark., 2006).

Rejeneratif süreçte bu hücrelerin rolünü daha fazla anlamak için, aynı bireyden elde edilen PDLF hücreleri ile GF hücrelerinin aynı pasajı *in-vitro* olarak karşılaştırılmış ve PDLF hücrelerinde, protein ve kolajen üretimi GF'lere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Ek olarak PDLF hücrelerinin daha yüksek alkalin fosfataz (ALP) seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir (Somerman ve ark., 1988). PDLF'nin hücrel aktivitesinin fazla olduğu düşünülmektedir ve kolajen sentezinin, dişeti fibroblastlarından 2 kat, dermal fibroblastlardan 4 kat fazla olduğu gösterilmiştir (Sodek, 1977).

Hou ve Yaeger (Hou ve Yaeger, 1993) yaptıkları çalışmada, GF ve PDLF hücrelerini tip I ve tip III kolajene spesifik antikolar ile histokimyasal teknikler kullanarak karşılaştırmışlardır. Hem tip I kolajenin hem de tip III kolajenin floresan yoğunluğunu GF'lerde PDLF'ye kıyasla daha zayıf olduğunu bulmuşlardır. Bu bilgilere dayanarak, PDLF'nin GF'lere göre daha aktif olduklarını göstermekle birlikte, PDLF'nin mineralizasyonu başlatmak sürecinde önemli hücreler olabileceğini düşünmüşlerdir.

4.2.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar iskelet yapımında ve korunmasında son derece önemli olan kemik matriksinin salgılanması ve osteoklast aktivitesinin düzenlenmesinden sorumlu, tek çekirdekli ve özelleşmiş, mezenkimal kaynaklı hücrelerdir (Canhão ve ark., 2005; Caetano-Lopes ve ark., 2007). Mezenkimal kök hücreler, olgun osteoblast hücrelerini oluşturmak için birkaç transkripsiyon aşamasına uğrar. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara farklılaşmaya başladıklarında daha sonra hidroksiapatitin

mineralleşmesi için gerekli olan tip I kolajen salgılamaya başlar (Young ve ark., 1992; Bassi ve ark., 2011).

Osteoblastlar aktif durumdayken kübik formdadırlar ve tip I, tip V kolajen ve protein-karbonhidrat karışımı içeren amorf bir organik matriks salgırlar (Nanci, 2003) (Gelişim, 1993; Majeska, 2001). Bu matriksin temel elemanları şunlardır:

- Osteokalsin osteoblastlar tarafından sentezlenir, kalsiyum ve mineral bağlar, minerilizasyonun olgunlaşmasını düzenler (Sikavitsas ve ark., 2001; Nanci, 2003).
- ON osteoblast ve trombositler tarafından sentezlenir, mineral organizasyonundan sorumludur (Sikavitsas ve ark., 2001; Grzesik ve Narayanan, 2002; Nanci, 2003).
- OPN asidik bir sialoproteindir. Kemik matriksine hücre yapışmasını sağlar (Sikavitsas ve ark., 2001; Grzesik ve Narayanan, 2002; Nanci, 2003).
- ALP vücuttaki çoğu hücre zarında bulunan membrana bağlı bir glikoproteindir. Fibroblast ve osteoblast aktivitesinden sorumludur (Carranza, 1951; Fedde ve ark., 1990).
- Fibronektin ekstraselüler bir polipeptiddir. Hücre yapışması için kullanılır (Sikavitsas ve ark., 2001; Grzesik ve Narayanan, 2002; Nanci, 2003).
- Trombosponin kalsiyum, hidroksiapatit ve osteonektini bağlar ve kemik hücrelerine yapışır. Büyüme faktörü olarak da görev alır (Sikavitsas ve ark., 2001).
- Proteoglikan I ve II kolajen fibrillerin büyümesini kontrol eder (Sikavitsas ve ark., 2001).

Kemiğin yeniden şekillenme sürecinin durmasıyla inaktif olan osteoblastlar ECM oluşturarak oluşturdukları matris içerisine gömülürler ve osteosit hücrelerine dönüşürler. Osteoblastlar ek olarak kemik rejenerasyonu ile ilgili kemik morfogenetik proteini (BMP), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I, IGF-II), interlökin (IL-1), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi sinyal proteinlerini de salgılamaktadırlar (Junqueira ve ark., 2003).

4.2.3. Sementoblast

Sementoblastlar, dental folikülden köken alan ektomezenşimal kaynaklı hücrelerdir. Hem hücreli hem de hüresiz sement oluşumunda rol alan sementoblastlar, yuvarlak kromatin açısından zengin bir çekirdek ve protein sentezi ve taşınması için gerekli olan endoplazmik retikulum içeren büyük, kübik hücrelerdir (Furseth, 1969; Bosshardt, 2005). Tip I kolajen, OPN, ON ve bone sialoprotein (BSP) gibi polipeptid yapıların sentezine katılırlar (Bosshardt, 2005). İnaktif durumdaki sementoblastlar mineralize matris içine gömülerek düşük seviyede matris sentezi yapmaya devam ederler bu formlarına sementosit denilir ve osteositlere benzer özellik gösterirler (Bartold ve ark., 1996).

4.3. Periodontal Rejenerasyon

Periodontal hastalıklar destek dokuların enflamatuvar reaksiyonudur ve sonuçta dişi destekleyen alveol kemiğin, sementin ve periodontal ligamentin yıkımına yol açarlar (Brown ve Loe, 1993; Kocher ve ark., 2000). Periodontal hastalıkların tedavisinde amaç, mikrobiyal etiyolojiyi ve ilgili risk faktörlerini kontrol altına alarak enfeksiyonun ilerlemesini durdurmak ve yıkıma uğramış destek periodontal dokuların yeniden sağlıklı durumlarına dönmelerini ve rejenerasyonlarını sağlamaktır. Periodontal hastalıkların tedavisi sonrası iyileşme tamir ya da rejenerasyonla olabilmektedir. Tamir yaranın tamamen yapısal ve fonksiyonel olarak restore edilmeden iyileşmesidir. Periodontal rejenerasyon ise hastalık sonucu kaybedilen dişeti, alveol kemiği, periodontal ligament ve sementin yeniden oluşturulması ve fonksiyonel olarak restore edilmesidir (Bosshardt ve Sculean, 2009; Akman ve ark., 2015). İdeal periodontal tedavi, kaybolan periodonsiyumun rejenerasyonunu içermelidir.

Periodontal rejenerasyon amacıyla gerçekleştirilen cerrahi işlemler sırasında yapılan ensizyonu takiben gözlenen yara iyileşmesi üç faza ayrılmıştır (Wikesjo ve Selvig, 1999; Polimeni ve ark., 2006). Bu fazlar, yumuşak dokuda iltihap, granülasyon dokusu ile ECM oluşumu ve remodelasyonudur. Bu basamaklar, periodonsiyumda oluşan yaralanmalar sonrasında da benzerdir. Yaralanma sonrası fibrinojen, fibrin

pıhtısının dentine yapışmasını sağlar. İlk 1 saat içinde, flepten gelen nötrofiller pıhtıya infiltre olarak yumuşak doku iyileşmesinin erken fazını başlatır. Sonraki 6 saat içinde nötrofiller yaradan gelen bakterileri ve parçalanmış doku hücrelerini fagosite ederler (Wikesjo ve Selvig, 1999). Ensizyondan 3 gün sonra ise iltihabın geç fazı başlar. Bu fazda, polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) yerine makrofajlar gelir ve ilk olarak PMNL ile eritrositleri fagosite eder. Diğer yandan dokudan sitokinler ve doku büyüme faktörleri salgılanır. Bu moleküller iltihabi aşamadan granülasyon dokusuna geçişi gösterir (Wikesjo ve Selvig, 1999). Klinik olarak ise flep ile diş/kemik arasındaki mesafe azalır ve epitel flep kenarında ilerlemeye başlar (Bartold ve ark., 2000; Newman ve ark., 2014). Ensizyonun 7. gününde fibroblastlar bölgeye gelir, yeni damar ve bağ dokusu içeren hücreden zengin granülasyon dokusu oluşur (Wikesjo ve Selvig, 1999). Aynı anda kök üzerinde hemidesmozom ve bazal lamina aracılığıyla epitelyal bağlantı oluşur. İyileşmenin ikinci haftasında kök yüzeyine paralel kolajen lifler oluşmaya başlar. Bu aşamada flep ile diş arasındaki bağlantı hala zayıftır fakat klinik görüntü neredeyse sağlıklıdır (Newman ve ark., 2014). İyileşmenin son döneminde yeni oluşan bağlantılardaki gerilimler doku büzülmesine sebep olur, granülasyon dokusu fonksiyonel ihtiyaçlara göre remodelasyon ve olgunlaşma ile sonuçlanır ayrıca dişeti oluşu duvarı epitelize olur ve birleşim epiteli meydana gelir. Bu dönemde ayrıca kret üzerinde kolajen lifler oluşmuştur ve epitel hücreleri fonksiyonel dizilime ulaşmışlardır (Clark, 1993; Singer ve Clark, 1999; Polimeni ve ark., 2006; Ramseier ve ark., 2012; Newman ve ark., 2014). Dişeti epitelinin ve bağ dokusunun iyileşmesi birkaç haftada tamamlanırken, sement ve alveol kemiğinin iyileşmesi çok daha uzun sürmektedir (Polimeni ve ark., 2006). Periodontal cerrahi sonrası iyileşmede kök yüzeyine ilk gelen hücreler bağ dokusundan gelen hücreler ise dişeti hacminde azalma, dişeti çekilmesi, cep oluşumu ve kök rezorpsiyonu görülebilmektedir. Kök yüzeyine ilk olarak alveol kemiği hücrelerinin gelmesi durumunda ise kök rezorpsiyonu ve ankiloz oluşabilmektedir (Ramseier ve ark., 2012).

4.3.1. Periodontal Rejenerasyonda Hücrelerin Rolü

Periodontal dokuların rejenerasyonunun sağlanmasında gerekli olan bazı temel bileşenler; hücreler, kanlanma desteği, taşıyıcı iskelet yapılar ve sinyal molekülleridir

(Taba ve ark., 2005). Hücreler yeni doku gelişimini ve farklılaşmasını sağlarlar. Büyüme faktörleri hücrel aktiviteyi düzenler ve matriks üretimi, yeni kanlanma ağı, doku gelişimi ve homeostaz sağlar. Destek taşıyıcı iskelet yapılar ise rejenerasyon basamaklarını kolaylaştırmak amacıyla çeşitli biyolojik/biyoaktif moleküllerin yara bölgesine taşınmasına yardım ederek üç boyutlu bir iskeletin oluşturulmasını sağlar (Taba ve ark., 2005; Kurtiş, 2008).

Rejenerasyonda periodontal ligamentteki progenitör hücrelerin rol aldıkları bilinmektedir (Oringer, 2002). Progenitör hücreler, rejeneratif kapasitesi iyi olan özelleşmiş hücrelere dönüşerek rejenerasyon sırasında bu hücrelerin prolifer olmalarını sağlamaktadırlar (Garrett, 1996; Nanci, 2003; Bartold ve ark., 2006). Hem periodontal ligament hem de gingival dokunun, periodontal rejenerasyonu uyaraabilen hücreleri barındırdığı düşünülmektedir (Melcher, 1976; Nyman ve ark., 1987).

Fibroblastlar, toplam gingival ve periodontal ligament bağ dokusu hacminin yaklaşık % 5,6'sını oluşturur. Yaralanma veya periodontal cerrahi sonrası, bu hücreler aktive edilir; prolifer olurlar, yara bölgesine göç ederler ve hasar düzeltilene kadar yeni matris bileşenlerini sentezlerler (Narayanan ve Page, 1983). Periodontal cerrahiden sonra, gingival bağ dokusunun kök yüzeyine temas etmesi ile kök rezorpsiyonunun meydana gelebileceği gösterilmiştir. Aksine, periodontal ligament hücrelerin selektif olarak kök yüzeyi ile temas etmesine izin verildiğinde, fonksiyonel bir periodonsiyum rejenerasyonu histolojik olarak gözlemlenebilir (Melcher, 1976). Bu gözlemlere dayanarak, güncel cerrahi teknikler periodontal ligamentin yenilenmesine odaklanmıştır. Çeşitli türlerdeki membranların kullanılmasıyla, bu tür yönlendirilmiş doku rejenerasyonu teknikleri, dişeti epitel hücrelerinin apikal göçünü sınırlandırabilir ve PDLF ile yeni bir bağlantının kurulmasını destekleyebilir.

4.3.1. Rejeneratif tedaviler

Periodontal rejenerasyonun sağlanabilmesi amacıyla kemik greftleri, bariyer membran, büyüme faktörlerinin cerrahi bölgede kullanılması gibi yöntemlerin yanı sıra doku mühendisliği kapsamında gen tedavisi ve hücre uygulamalarını da içeren farklı yöntemler araştırılmaktadır (Foster ve Somerman, 2005). Geleneksel tedaviler sonrası ideal koşullar sağlandığında bile sınırlı miktarda kemik, sement ve bağ dokusu

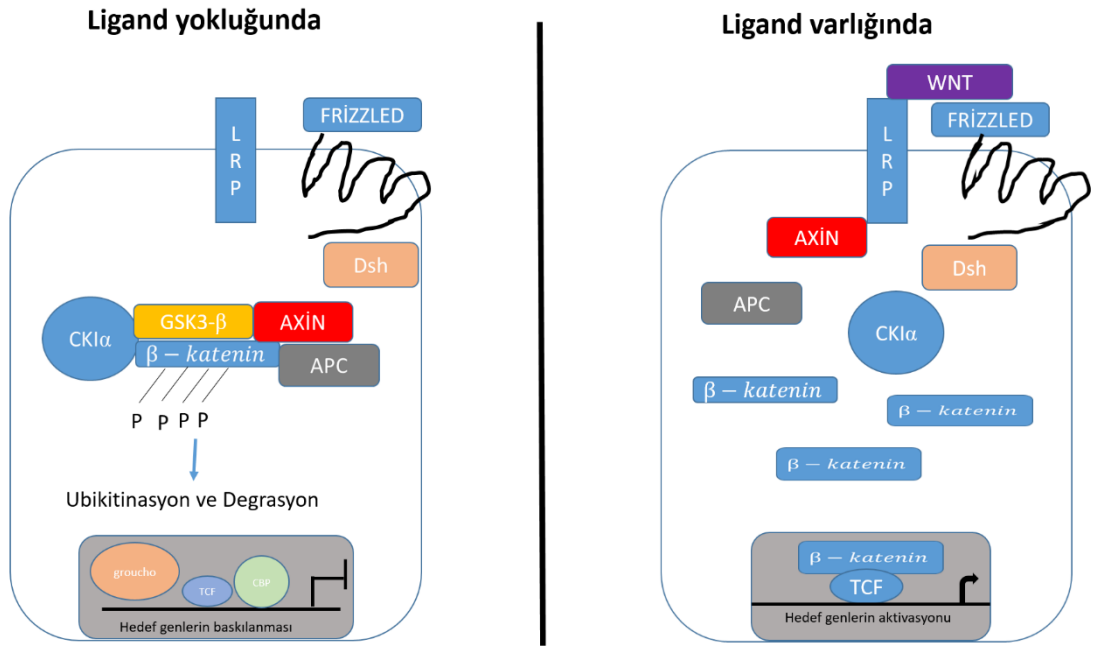
oluşmaktadır. Son yıllarda ise periodontal rejenerasyon sağlanmaya çalışılmaktadır. Rejeneratif periodontal tedavinin başarılı olabilmesi için en önemli faktör, tam bir rejenerasyonun sağlanabilmesi için gerekli olan moleküler ve hücrel olayların anlaşılmasıdır. Yapılan araştırmalar, periodontal rejenerasyonun oluşumu ve periodontal dokuların gelişiminde benzer olayların gerçekleştiğini göstermiştir (Öztürk ve Bozkurt, 2005). Hem gelişim sürecinde hem de rejenerasyonda hücrelerde migrasyon, proliferasyon, biyosentez ve farklılaşma gözlenmektedir. Bu olayların oluşumunu tetikleyen biyolojik mediyatörler de aynıdır. Periodonsiyumun gelişiminde rol oynayan molekül ve proteinlerin periodontal tamir ve rejenerasyonda da etkili olduğu bilinmektedir (Osborn ve Price, 1988; McCauley ve Somerman, 1998). Dişin gelişimi sırasında, epitelial ve mezenkimal kaynaklı hücreler çeşitli büyüme faktörleri ve morfojenler ile uyarılırlar. Periodontal dokuların gelişimindeki ve rejenerasyonundaki en önemli olan faktör, uygun hücrelerin bu alana gelmesidir. Periodontal hastalıkların cerrahi tedavisi sonrası iyileşme döneminde yara bölgesine gelen hücreler, oluşacak dokunun ve iyileşmenin karakterini belirler. Periodontal yara bölgesine ilk ulaşan hücreler dişeti epiteline ait hücrelerdir. Bu hücrelerin çoğalma ve göç etme hızları periodonsiyumdaki diğer hücelere göre çok daha hızlıdır (Melcher, 1976). Nyman ve ark., (Nyman ve ark., 1982) yaptıkları çalışmada, yeni sement ve bağ dokusu ataşmanı oluşturma kapasitesinin sadece periodontal ligament hücrelerinde bulunduğunu ve yeni sement ile bağ dokusu ataşmanı oluşumunu sağlamak için yara bölgesinde çoğalma önceliğinin periodontal ligament hücrelerine verilmesini sağlayan teknikler uygulanması gerekliliğini göstermişlerdir.

4.4. Wnt/ β - catenin Sinyal Yolu

Int-1 geni ilk olarak farelerdeki meme karsinomlarında, fare meme tümörü virüsü (MMTV) tarafından en sık hedef olan gen olarak tanımlanmıştır (Nusse ve Varmus, 1982). MMTV provirüslerinin tetiklediği diğer tümörlerde tespit edilen genler, bu genlerin kodlama potansiyeli hakkındaki bilgi yokluğu sebebiyle *int-2* ve *int-3* olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda *int-1* geni ile *int-2* ve *int-3* geninin arasında bağlantı olmadığı ortaya çıkmıştır ve *int-1* geninin *Drosophila wingless* genine benzer glikoprotein salgıladığı bulunmuştur (van Ooyen ve Nusse, 1984; Rijsewijk ve ark.,

1987). Tüm bu veriler ışığında *int-1* geni ailesi *wingless*type kısaltması olan ‘Wnt’ olarak adlandırılmıştır (Nusse ve ark., 1991).

Wnt sinyal yolları erişkin dönemde rejeneratif kapasitesi olan hücrelerin adezyonunda, hedef hücrelerin gen transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki hücrelerde ise hücre polaritesinin, proliferasyonunun sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde önemli rol oynamaktadır (Tanır ve Demirezen, 2009). Wnt/ β -catsinyal yolu, Wnt sinyal yollarından birisidir. Wnt / β -cat sinyalizasyonunun aktivasyonu, doku hasarında erken bir cevaptır ve tüm dokulardaki hücre sel temelli onarımın uyarılması için gereklidir (Eisenmann, 2005; Popelut ve ark., 2010; Whyte ve ark., 2012) (Şekil 4.2). Wnt sinyal mekanizması aktif veya inaktif durumda olabilir. Wnt proteini sentezlendikten sonra ekzositozla intraselüler boşluklara bırakılır ve hedef hücre zarına ulaşır. Hedef hücre zarındaki *Frizzled* (Fz) ve LDL reseptör ilişkili protein (Lrp) reseptörüne bağlanır. Fz reseptörü G proteini ailesine ait transmembran proteindir. Lrp proteini ise Fz proteininin ko-reseptörüdür ve transmembran proteindir. Wnt, Fz ve Lrp kompleksi Wnt sinyal yolunun ilk basamağını oluşturur (Cadigan ve Liu, 2006; Mikels ve Nusse, 2006; Chen ve ark., 2007; Altınok ve Sunguroğlu, 2016). Bu bağlanmanın ardından sinyal sitoplazmaya iletilir ve *dishvelled* (DVL) fosforilasyonu uyarılır. Bu fosforilasyon Axin, kazein kinaz 1 (CK1), Adenomatöz polipozis koli (APC) ve GSK-3’ten oluşan yıkıcı kompleksin dağılmasına sebep olarak β -kateninin stabilizasyonunu sağlar. Ardından β -katenin çekirdeğe girerek *T-cell factor/Lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) transkripsiyon faktörlerine bağlanır ve sonuç olarak hücrenin proliferasyonunu sağlayacak birçok Wnt geninin transkripsiyonunu başlatır (Veeman ve ark., 2003; Altınok ve Sunguroğlu, 2016). Bu aktivasyonla, hem sinyal yolunda görev yapan proteinlerin transkripsiyonu gerçekleşir, hem de proliferasyonda, hücre siklusunda, farklılaşmada önemli rol oynayan birçok genin transkripsiyonunun kontrolü sağlanmış olur (Willert ve Nusse, 1998; Miller, 2002; Mikels ve Nusse, 2006; Tanır ve Demirezen, 2009). Wnt reseptörlere bağlı değilken hücre içi ara molekül olan β -katenin sürekli yıkıma uğrar ve sonuçta çekirdeğe girecek β -katenin ortamda bulunmadığından sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonu baskılanmış olur (Orsulic ve ark., 1999; Miller, 2002; Daugherty ve Gottardi, 2007; Tanır ve Demirezen, 2009).



Şekil 4.2. Wnt sinyal yolu (Eisenmann, 2005)

Genel olarak Wnt sinyal yolunun aktivasyonunun azaltılmasının rejeneratif kapasiteyi azalttığı bilinmektedir (Whyte ve ark., 2012). Güçlü rejeneratif kapasitesi olan planaryalarda Wnt sinyal yolunun inhibe edilmesi sonrası biçimsiz anatomik oluşumlar ortaya çıkmıştır (Gurley ve ark., 2008; Petersen ve Reddien, 2009; Yazawa ve ark., 2009). Aynı şekilde, zebra balığındaki dorsal yüzgecin ampütasyonundan sonra Wnt sinyal yolu inhibe edildiğinde normal yüzgeç rejenerasyonunun bozulduğu görülmüştür (Kawakami ve ark., 2006). Retinaları sürekli rejenerere olan hayvanlarda Wnt sinyal yolu inhibe edildikten sonra rejeneratif kapasitenin kesintiye uğradığı gözlenmiştir (Kubo ve ark., 2003). Rejeneratif kapasitesi limitli olan dokularda ise Wnt sinyal yolu tamir için gereklidir (Whyte ve ark., 2012). Örneğin, iskeletteki kırık sonrası Wnt sinyal yolu inhibe edilirse kaynaşmamış kemik ortaya çıkmaktadır (Chen ve ark., 2007; Kim ve ark., 2007; Leucht ve ark., 2008). Memelilerde cilt yaralanmalarında iyileşme genelde skarla olmaktadır ancak Wnt sinyal yolu aktive edildiğinde tamamen işlevsel epidermis oluştuğu görülmüştür (Ito ve ark., 2007). Multiple myeloma hastalarında yeni kemik oluşumunu teşvik etmek için Wnt sinyal yolunun aktive edilmesiyle ilgili fazI/II klinik çalışmalar yürütülmektedir (Yaccoby ve ark., 2007; Fulciniti ve ark., 2009). Kemoterapi sonrası ortaya çıkan oral

mukozyitisin tedavisi amacıyla yapılan bir çalışmada Wnt agonisti olan R-spondin'in sistemik kullanımının mukoza yenilenmesini uyardığı gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2009).

Wnt sinyal yolunun periodontal dokuların gelişiminde ve homeostazındaki rolü bilinmektedir (Kim ve ark., 2007; Rooker ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2013; Lim ve ark., 2014). Wnt antagonistlerinin aşırı ifadesiyle Wnt sinyalinde azalma, Wnt ligandlarının eksikliği veya Wnt reseptörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar kemik kaybına neden olmaktadır (Minear ve ark., 2010). Kim ve ark. (Kim ve ark., 2007) farelerde yaptıkları çalışmada Wnt sinyal yolunu bir Wnt antagonisti olan *dickkopf 1* (Dkk1) ile inhibe etmiş ve iskelet yaralanmasına bağlı kemik rejenerasyonunda %84 oranında azalma, osteoblastlarda ise farklılaşmada gecikme gözlemlenmiştir. Tersine, Wnt sinyalinin arttırılması, artmış kemik hacmine, anormal kemik yoğunluğuna (hiperostozis) ve sklerozan kemik displazisi olarak bilinen bir durum olan kemiğin patolojik kalınlaşmasına neden olur (Minear ve ark., 2010).

β -katenin'in stabilize edildiği farelerde yapılan deneylerde mezenkimal hücrelerin aşırı sement oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2007; Rooker ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda, Wnt sinyal yolunun inaktif olduğu farelerde diş kökü gelişiminin durduğu gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2013). Wnt 3a'nın ALP ve osteokalsini baskıladığı böylece sementoblast farklılaşmasını durdurarak proliferasyonunu desteklediği bilinmektedir (Nemoto ve ark., 2009).

Wnt sinyal yolunun aktivasyonunun, sıçan periodontal defekt modelinde ve insan periodontal ligament hücrelerindeki *in-vitro* çalışmalarda sementoblast farklılaşması ve sement rejenerasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Han ve ark., 2015). Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada Wnt sinyal yolunun aktivatörü olarak bilinen lityum iyonlarının biyoaktif iskelelerden salınımı sonrası periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir (Han ve ark., 2012).

Embriyonik fasiyal çukıntılarda hücre proliferasyonu alanları güçlü Wnt sinyal yolu yanıtı olan bölgelerle örtüşmektedir (Brugmann ve ark., 2007). Bu bilgilerden yola çıkılarak yapılan bir çalışmada Wnt sinyal yolunun periodontal ligament üzerinde aynı etkiye sahip olup olmadığı incelenmiş ve periodontal ligament proliferasyonunun

arttığı bölgelerde Wnt sinyal yoluna yanıt veren hücre sayısının fazla olduğu bulunmuştur (Rooker ve ark., 2010).

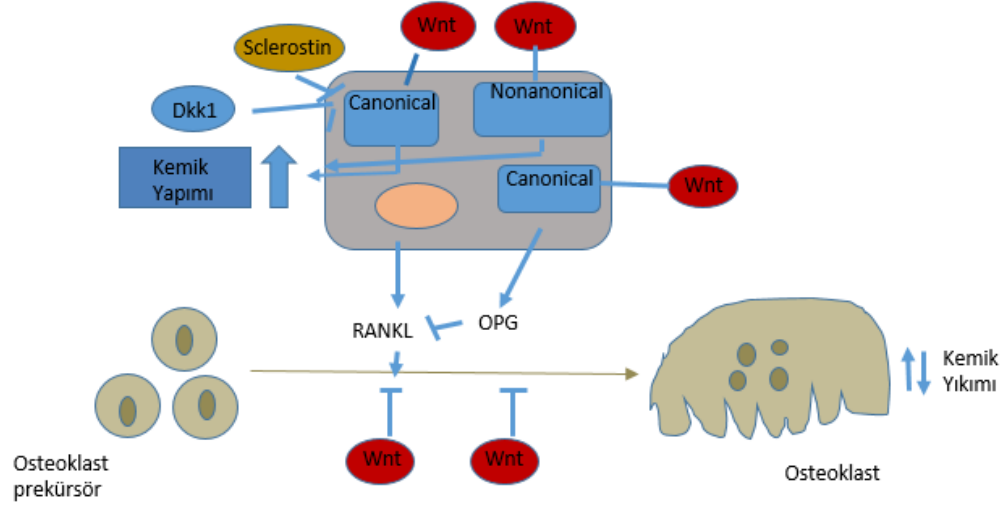
Wnt- β cat sinyal yolunun mezenkimal kök hücrelerini osteoblastlara dönüşmesinde rol oynadığı düşünülmektedir ve bazı Wnt proteinlerinin (Wnt1, Wnt2 ve Wnt3a) osteoblast farklılaşmasında rol oynayan önemli bir marker olan ALP'yi indüklediği gösterilmiştir (Rawadi ve ark., 2003; Westendorf ve ark., 2004). Wnt sinyal yolunun sadece osteoblast farklılaşmasında değil aynı zamanda proliferasyonunda da rol oynadığı bilinmektedir (Caetano-Lopes ve ark., 2007).

Morvan ve ark. (Morvan ve ark., 2006) yaptıkları çalışmada Dkk1 eksikliği bulunan farelerde kemik fenotipini incelemiş, yapısal açıdan bir değişiklik gözlemlenmemekle birlikte kemik artışına yol açan tüm parametrelerde artış gözlemlenmişlerdir. Babij ve ark. (Babij ve ark., 2003) yaptıkları çalışmada LRP5 mutasyonu olan farelerde yüksek kemik kütlesi bulmuşlardır. LRP5'in Wnt sinyal yolu bileşeni olan Axin 2 ile etkileşime geçerek kemik kütlesini arttırdığı düşünülmektedir.

Popelut ve ark., (Popelut ve ark., 2010) farelerde implant uygulamasının ardından osseointegrasyonu inceledikleri çalışmada Wnt sinyalinin kemik oluşumundaki asıl rolünün yanı sıra, implant osseointegrasyonunda yaygın bir kullanıma sahip olabileceğini göstermişlerdir.

Wnt sinyal yolunun kemik üzerindeki bu etkileri osteoblast aktivitesinin artışı, osteoklast aktivitesinin inhibisyonu veya pluripotent kök hücrelerin farklılaşması ile açıklanabilir (Şekil 4.3) (Lerner ve Ohlsson, 2015). Gaur ve ark. (Gaur ve ark., 2005) hem *in-vivo* hem de *in-vitro* çalışmalarında kemik yapımı ile ilişkili olan Runx2 gen ekspresyonunun Wnt sinyal yoluyla pluripotent mezenkimal ve osteoprogenitör hücrelerde indüklendiğini göstermiştir. Glass ve ark. (Glass ve ark., 2005) farklılaşmış osteoblastlarda β -katenin stabilizasyonunun artan kemik kütlesiyle ilişkili olduğunu, bu artışın kemik yapımından ziyade yıkımın engellenmesinin sebep olduğunu öne sürmüşlerdir. Yaptıkları çalışmalarda β -kateninin TGF proteinleri ile birlikte osteoklast farklılaşmasının ana inhibitörü olan osteoprotegerinin osteoblast ekspresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir. Bu bulgular β -katenin ve dolayısıyla Wnt sinyal yolunun osteoblastların osteoklasta farklılaşmasını inhibe etme kabiliyetini arttırdığını göstermektedir. Farelerde β -kateninin bağlandığı transkripsiyon faktörü olan Lef-1 eksikliğinin eksik diş oluşumuna ve diş gelişiminde tomurcuk safhasında

duraklamaya sebep olduğu gösterilmiştir (van Genderen ve ark., 1994). Lef-1'in aşırı ekspresyonu ise epitelde artış ve diş benzeri yapıların oluşumuna sebep olmaktadır (Zhou ve ark., 1995).



Şekil 4.3. Wnt sinyal yolu osteoblast/osteoklast aktivitesi (Lerner ve Ohlsson, 2015)

Wnt sinyal yolunun periodonsiyumun gelişmesiyle veya devamlılığının sağlanmasındaki rolü ile ilgili sınırlı sayıda bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, diğer kök hücreler üzerindeki davranışlarına dair birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, embriyonik mezenkimal hücrelerde Wnt sinyal yolu, proliferasyonu artırırken diferansiyasyonu azaltmaktadır (ten Berge ve ark., 2008). Rooker ve ark. (Rooker ve ark., 2010) Wnt sinyal yolunun periodonsiyum üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada farelerde sürekli olarak süren kesici dişler ile yavaş süren molar dişleri karşılaştırmışlar, çalışma sonucunda kesici dişlerdeki periodontal ligamentte proliferasyonun fazla olduğu alanlarda Wnt yanıtının daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

4.5. Glikojen Sentaz Kinaz-3

Hücreler tarafından enzimleri ve yapısal proteinleri düzenlemek için kullanılan en yaygın post-translasyonel mekanizma olan protein fosforilasyonu yaklaşık 520 protein kinaz ve 80 protein fosfataz ile kontrol edilmektedir. Birçok hastalık protein fosforilasyon anomalileri ile ilişkili olduğundan kinazların farmakolojik inhibitörleri ve fosfatazlar ilaç keşfinde önemli bir hale gelmiştir (Cohen, 2002; Meijer ve ark., 2004; Noble ve ark., 2004). GSK, glikojen sentezinin düzenlenmesindeki fonksiyonunu tanımlamak üzere çalışılan ilk kinazlardan biridir (Frame ve Cohen, 2001; Jope ve Johnson, 2004; Meijer ve ark., 2004). GSK-3'e olan ilgi son yıllarda glikojen metabolizmasının çok ötesine geçmiştir ve GSK-3'ün pek çok hücrel ve fizyolojik olayda merkezi bir aşamada bulunduğu bilinmektedir (Meijer ve ark., 2004).

GSK-3'ün birbirine yakın 3 formunun (GSK-3 α , GSK-3 β ve GSK-3 β 2) Wnt ve *Hedgehog* sinyal yollarında ve hücre bölünme siklusunda, kök hücre yenilenmesinde ve farklılaşmasında, apoptozda, transkripsiyonda ve insülin aktivitesini regüle etmede büyük öneme sahip olduğu bildirilmiştir ve GSK-3'ün farmakolojik inhibitörlerinin Alzheimer hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıklar, bipolar affektif bozukluk ve şeker hastalığı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür (Meijer ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalarda GSK-3 inhibitörleri *in-vitro* olarak denenmiş ve GSK-3'ün sıçanlarda osteoblast farklılaşmasını ve kemik kütlelerini arttırdığı görülmüştür (Kulkarni ve ark., 2006). Derin çürüklü dişlerde yapılan bir çalışmada GSK-3 inhibitörleri reperatif dentin oluşum sürecini desteklemiştir ve doğal, işlevsel dentin oluşturmuştur (Neves ve ark., 2017).

Periodontitisi karakterize eden doku yıkımı, bakteriyel patojenlere karşı oluşan konak yanıtı sebebiyle meydana gelir. GSK-3, Toll-like reseptör (TLR) bağlı immün yanıtın yönlendirilmesinde hayati rol oynayan aktif bir kinazdır. GSK-3'ün inhibisyonu TLR'nin baskılanmasına neden olur (Martin ve ark., 2005). GSK-3'ün bakteriyel enfeksiyonlar sırasında proinflamatuvar sitokin üretiminin önemli bir aracısı olduğu ve GSK-3'ün inhibisyonunun oral ve diğer patojenlere karşı hiporeaktiviteye yol açtığı bilinmektedir. Bu bilgilerden yola çıkılarak yapılan bir çalışmada, farelerde *P. gingivalis* kaynaklı deneysel periodontal hastalık oluşturulmuş ve GSK-3 inhibitörü

olan SB216763 intraperitoneal uygulanmıştır. SB216763'ün kemik kaybını durdurduğu, sistemik sitokin yanıtını, lokal nötrofil infiltrasyonunu ve IL-17 ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur (Adamowicz ve ark., 2012).

4.6. Tideglusib

GSK-3'ün birçok küçük molekül inhibitörü geliştirilmiş ve farklı deneylerde etkili bir şekilde Wnt aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir, bunlardan biri de Alzheimer gibi nörolojik bozuklukların tedavisinde klinik olarak denenmiş, farelerde pulpa hasarında reparatif dentin oluşturduğu bilinen, GSK-3 β inhibitörü, TDZD grubu bir ilaç olan Tideglusib (NP-12, NP03112)'dir (Meijer ve ark., 2004; Neves ve ark., 2017). Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, rejeneratif yanıtta önemli bir değere sahip Wnt/ β cat sinyal yolunun aktif hale gelmesinin sağlanmasında GSK-3 inhibitörü bir molekül olan Tideglusib'in kullanılmasıyla rejeneratif periodontal doku yanıtı elde edilebileceği düşünülebilir. Bu *in-vitro* çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki Tideglusib'in hPdlf, hgf-1 ve hfob hücreleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Deney Planı

Bu çalışmada Tideglusib'in periodontal hücreler üzerine etkisini incelemek amacıyla hgf-1¹, hPdlf² ve hfob³ hücre dizileri kullanıldı.

İki aşamalı olarak planlanan bu çalışmanın birinci bölümünde Tideglusib'in farklı konsantrasyonlarının 24 saatlik uygulanması süresi sonunda hücrelerin proliferasyon ve sitotoksosite üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla MultiTox-Fluor Multiplex Sitotoksosite Testi⁴ uygulandı. İkinci aşamada ise tüm hücre grupları için ortak doz belirlenerek 24 saatlik tip I ve tip III kolajen salınımı *Western blot* analizi ile değerlendirildi.

Bu plan doğrultusunda Tideglusib uygulanan hücre grupları test grubu olarak belirlenirken, Tideglusib uygulanmayan gruplar kontrol grubu olarak belirlendi.

5.2. Hücrelerin Çözülmesi, Pasajlanması, Çoğaltılmaları ve Sayılması

Sıvı nitrojende -152⁰ C'de saklanan hücrelerin -152⁰ C'den alınarak hızla çözülmesi sağlandı. Çözünen hücreler içerisinde 10 ml besi yeri bulunan 15 ml'lik tüplere alınarak 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet resüspanse edilerek besiyeri içeren flasklara ekildi. hgf-1'ler için kültür ortamı; %10 *Fetal bovine serum* (FBS), 2 mM sodyum pirüvat, %1 L-glutamin, yüksek D-glukoz ve sodyum bikarbonat içeren *Dulbecco's modified Eagle medium*⁵ (DMEM) ve %0.1 amfoteresin/gentamisin eklenerek besiyeri ile sağlandı. hPdlf'ler için kültür ortamına ayrıca %0.1 fibroblast büyüme faktörü⁶ ve %0.1 insülin benzeri büyüme faktörü⁷ eklendi. Hfob hücresinin kültür ortamı ise; %10 FBS⁸, %1 L-glutamine⁹

¹ Katalog no: CRL-2014, ATCC®, A.B.D.

² Katalog no: CC-7049, Lonza, İsviçre

³ Katalog no: CRL-11372, ATCC®, A.B.D.

⁴ Katalog no: G9200, Promega, A.B.D.

⁵ DMEM Complete Medium, Katalog no: SLM-241-B, Sigma-Aldrich, Almanya

⁶ Katalog no: GF002, Sigma-Aldrich, Almanya

⁷ Katalog no: I3769, Sigma-Aldrich, Almanya

⁸ Katalog no: 16000-036, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, A.B.D.

⁹ Katalog no: W368401, Sigma-Aldrich, Almanya

(500µl), %0,1 amfoterisin/gentamisin, 22 ml DMEM¹⁰, 22 ml DMEM/F12¹¹ ile sağlandı. Hücreler 37°C'de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılıp, hücre çoğalması her gün takip edildi (Resim 5.1). Pasaj yapmak için hücrelerin ekildikleri flaskları %70-80 oranında doldurmaları beklendi, dolan flasklardaki hücreler *Phosphate buffered saline*¹² (PBS) ile üç kez yıkandı, eklenen tripsin-EDTA¹³ ile 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tripsin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla eklenen besiyeri ile birlikte 15 ml'lik tüplere toplanan hücreler 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjün ardından pelletin miktarına göre besiyeri ile resüspanse edilerek flasklara ekildi. Hücrelerin sayılması amacıyla, 10µl hücre süspansiyonu 10µl tripan mavisi ile karıştırılarak, thoma lamı ve lamel arasına konuldu ve ışık mikroskopunda¹⁴ 10X büyütmede hücreler sayıldı (Resim 5.2). Tripan mavisi ile boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirildi ve aşağıdaki formüle göre ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \text{Ortalama sayım değeri} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4 \times 2$$

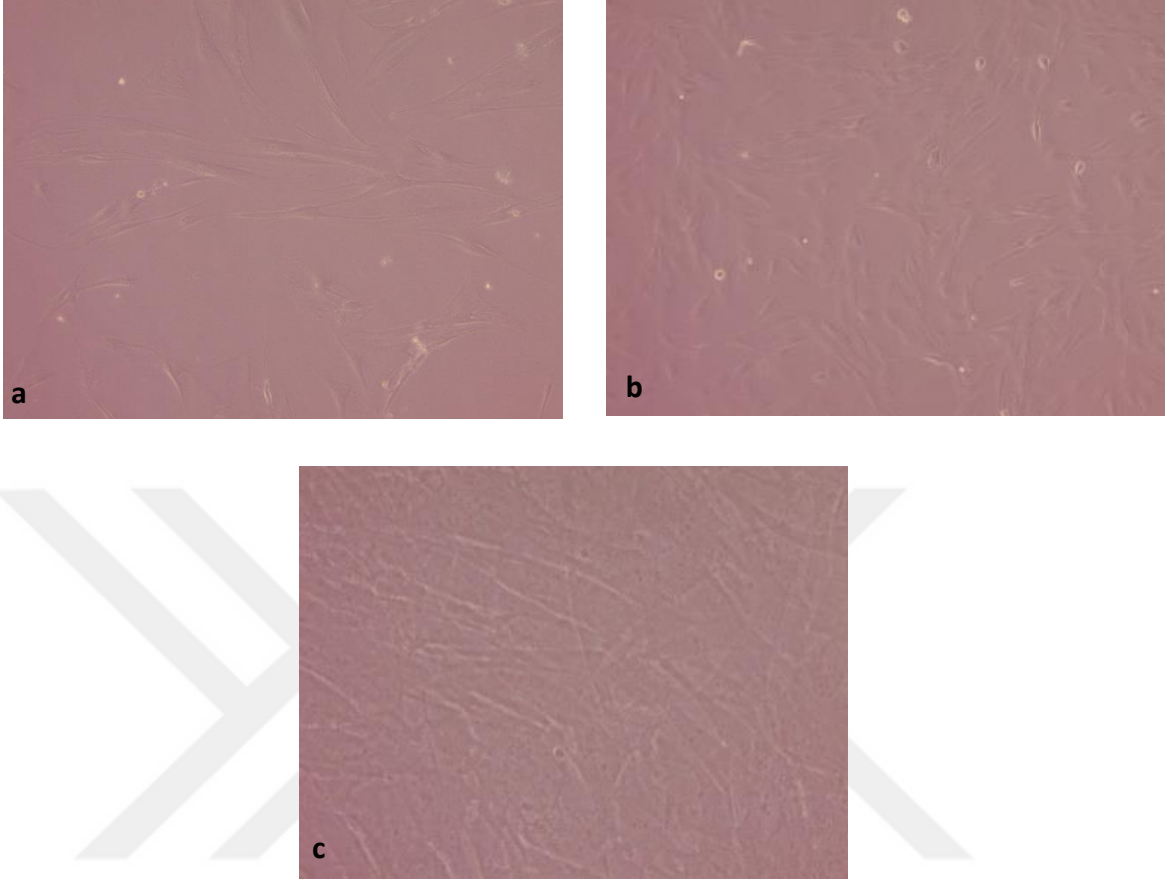
¹⁰ Katalog no: P04-01549, Pan-Biotech, Almanya

¹¹ Katalog no: P04-41500, Pan BioTech, Almanya

¹² Katalog no: P5493, Sigma-Aldrich, Almanya

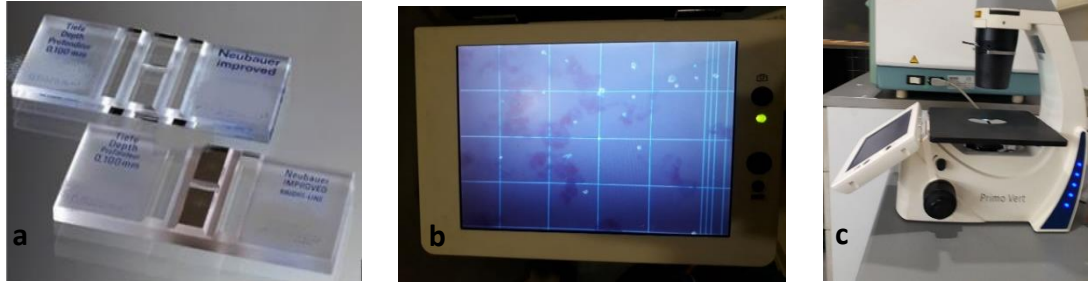
¹³ Katalog no: P10-0235SP, Pan-Biotech, Almanya

¹⁴ ZEISS Primovert, Almanya



Resim 5.1. 10x büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü (a) hPdlf hücreleri , (b) hfob hücreleri, (c) hgf-1 hücreleri

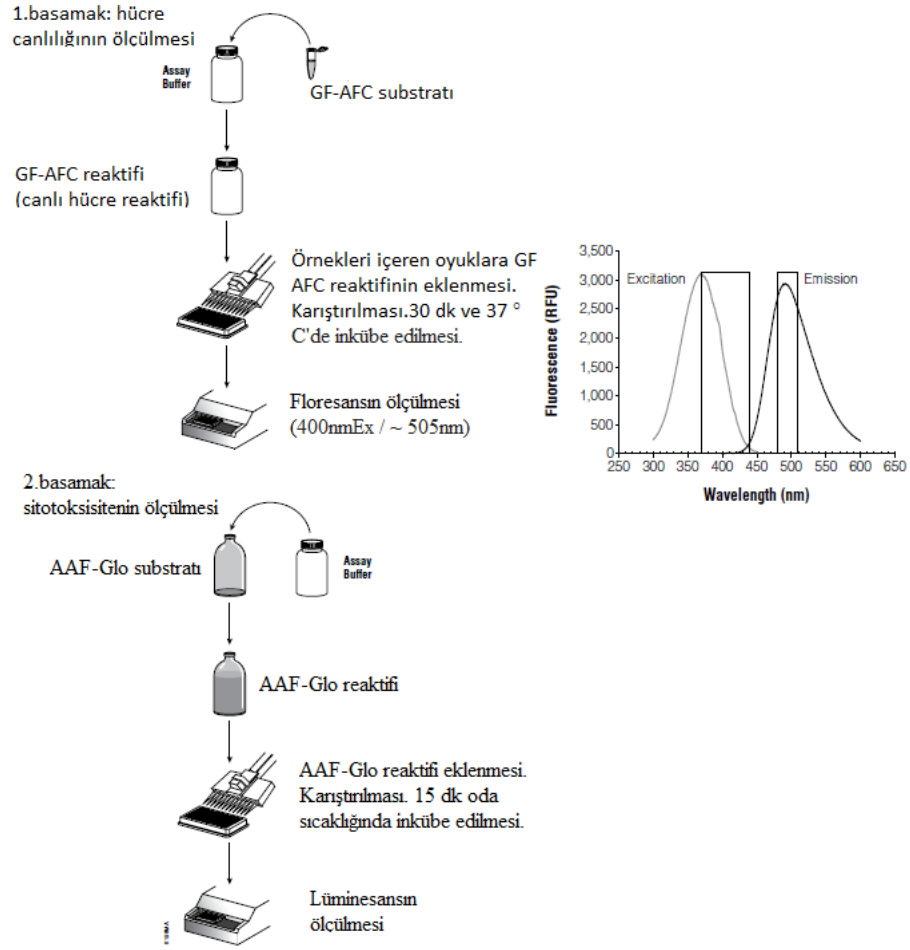
Canlılık ve sitotoksisite testi için deney protokolünde belirtilmiş olan kuyucuk başına gerekli olan hücre sayısına göre (5.000 hücre/kuyucuk) kullanılması gereken hücre süspansiyonu miktarı hesaplandı.



Resim 5.2. (a) Thoma lamı, (b) 10x büyütmede görüntülenen hücreler, (c) Işık Mikroskobu

5.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi ve Sitotoksisite Testi

Tideglusib'in biyolojik uyumluluğunu ve sitotoksitesini araştırmak için MultiTox testi kullanıldı. Bu deney iki aşamalı olarak yapıldı ve biri hücre canlılığını diğeri ise sitotoksisiteyi ölçen iki proteaz aktivitesi sıralı olarak ölçüldü (Şekil 5.1)



Şekil 5.1. MultiTox-Glo Multiplex sitotoksiste testi şematik diyagramı

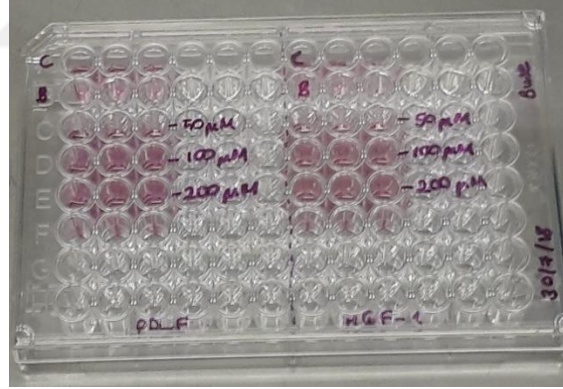
Hücre canlılığının belirlenmesi için, kuyucuk başına 5.000 hücre olacak şekilde hazırlanan süspansiyon 96 oyuklu plakalara her oyukta 100 µl süspansiyon olacak şekilde eklenerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından Tideglusib¹⁵ (Resim 5.3.) DMSO'da çözülerek test gruplarına 50, 100 ve 200 nM olacak şekilde eklendi ve 24 saat beklendi (Resim 5.4). Canlılık testi için 24 saat sonunda, tüm oyuqlara 50 µl GF-AFC reaktifi eklendi. Homojenlik sağlanması için 5 dk süreyle orbital karıştırıldı ve 37⁰ C'de 60 dk süreyle inkübe edildi. Plakalar alüminyum folyaya sarılarak ışığa

¹⁵ Katalog no: SML0339-50MG, Sigma-Aldrich, Almanya

karşı korundu. Elde edilen floresans Multilabel Microplate Reader¹⁶ (Resim 5.5) ile floresansı ~ 400nmEx / ~ 505nm aralıkta olacak şekilde ölçüldü.



Resim 5.3. Tideglusib



Resim 5.4. Hücre canlılığı deneyi için 96 kuyucuklu plağa hücre ekimi (C: Kontrol grubu (hücre+medium), B: sadece medium, C,D,E: 50,100,200 nM Tideglusib eklenmiş test grupları)

¹⁶ EnSpire 2300 Multilabel Microplate Reader, Perkin Elmer, A.B.D.

Sitotoksisite testi için, tüm kuyucuklara 50 µl AAF-Glo™ Reaktif eklendi. Orbital sallayarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edildi. Plaka alüminyum folyoya sarılarak ışıktan korundu, ölü hücre luminesansı Multilabel Microplate Reader ile ölçüldü.



Resim 5.5. Multilabel Microplate Reader

Elde edilen canlılık ve sitotoksisite sonuçları absorbans değerinden hesaplanarak % canlılık ve % sitotoksisite olarak verildi. (Tablo 5.1)

Tablo 5.1. Tüm hücre gruplarının canlılık ve sitotoksosite değerleri (%)

	hgf-1 Canlılık (%)			hPdf Canlılık (%)			hfob Canlılık (%)		
0nM	100	100	100	100	100	100	100	100	100
50nM	97,12	100,86	119,11	100,32	110,93	111,29	114,16	113,69	119,46
100nM	90,73	100,24	114,83	102,61	107,34	105,11	123,81	81,04	126,00
200nM	83,48	91,33	108,01	95,95	97,63	99,31	103,10	92,57	11,27
	hgf-1 Sitotoksosite (%)			hPdf Sitotoksosite (%)			hfob Sitotoksosite (%)		
0nM	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50nM	1561,43	1963,32	1816,17	1932,18	1924,64	1157,93	214,25	130,30	129,05
100nM	2306,95	2436,78	2282,96	8642,74	4350,70	2093,71	254,4	247,99	295,26
200nM	2785,19	3290,34	3091,22	7596,37	4393,20	2359,17	530,22	310,56	295,79

Tideglusib'in tüm hücreler üzerindeki 24 saatlik sitotoksosite ve proliferasyon etkisinin değerlendirilmesinin ardından, tüm hücre grupları için toksik olmayan ve canlılığı en çok destekleyen doz seçilerek (50 nM) protein salınımı *Western blotting* yöntemi ile tayin edildi.

5.4. Hücrelerden Protein Eldesi, Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması ve *Western blot* Yöntemi ile Tip I Kolajen ve Tip III Kolajen Proteinlerinin Tayin Edilmesi

5.4.1. Dokulardan protein ekspresyonu

Hücrelerden protein eldesi için, kontrol ve test gruplarının 60'lık *dish*lere ekilmesinin ardından 50 µl Tideglusib test gruplarına eklenerek 24 saat beklendi. İnkübasyon süresi sonrası besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandıktan sonra hücre lizis tamponu; *Cell Lysis Buffer*¹⁷(CLB: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 Mm Na₂EDTA, 1 mM EGTA, % 1 Triton, 2.5 mM sodyum pirofosfat, 1 mM betagliserofosfat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml löpeptin, 1 mM PMSF) kullanıldı. Her 10 ml lizis tampon içine 1 ml proteaz inhibitörü eklendi ve her 10 ml tampon 1 ml ddH₂O ile dilue edildi. 10 cm² solüsyona 400 µl CLB olacak şekilde *dish*lere eklendi ve 5 dk süreyle buz üzerinde inkübe edildi (Resim 5.6).



Resim 5.6. Buz üzerinde inkübasyon

¹⁷ katalog no: 9803, *Cell Signaling Technology, A.B.D.*

İnkübasyonun ardından *scraper* ile hücreler kazındı ve eppendorf tüplere konuldu. Buz içerisinde 1 dk süre ile sonikasyon¹⁸ (Resim 5.7) yapıldı daha sonra 10 dk süre ile 14.000 g'de soğuk santrifüj¹⁹ (Resim 5.8) yapıldı. Santrifüj sonrası elde edilen ve tüm hücre lizatı olarak geçen süpernatant *Western blot* analizinde kullanıldı.

5.4.2. Protein miktarının belirlenmesi

Elde edilen örneklerdeki total protein konsantrasyonu BCA protein tayini²⁰ (Resim 5.9) ile belirlendi. Albümin standartının dilüsyonu ile hazırlanan grafik kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı. Protein tayini için 96 kuyucuklu plakalarda, kuyucuklara 10 µl standart ve 10 µl supernatant konularak her kuyucuğa 200 µl hazırlanan BCA protein solüsyonu eklendi (Resim 5.10). Standartlar Tablo 5.2'ye göre hazırlandı.

Tablo 5.2. Standart grafikte kullanılacak olan standartların 2000 µg/ml stok albümin standartından hazırlanması.

Standart	Dilüent miktarı (µl)	BSA Miktarı (µl)	BSA konsantrasyonu (µg/mL)
A	0	300(µl)	2000(µg/mL)
B	125(µl)	375(µl)	1500(µg/mL)
C	325(µl)	325(µl)	1000(µg/mL)
D	175(µl)	175(µl)	750(µg/mL)
E	325(µl)	325(µl)	500(µg/mL)
F	325(µl)	325(µl)	250(µg/mL)
G	325(µl)	325(µl)	125(µg/mL)
H	400(µl)	100(µl)	25(µg/mL)
I	400(µl)	0	0

¹⁸ Sonupuls, Bandelin, Almanya

¹⁹ Allegra X-15R Centrifuge, Beckman-Coulter, A.B.D.

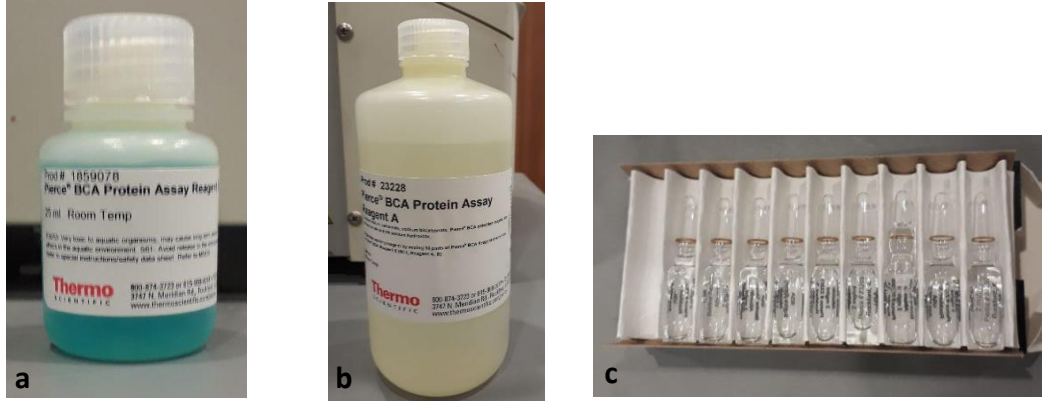
²⁰ Katalog no: 23225, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, A.B.D



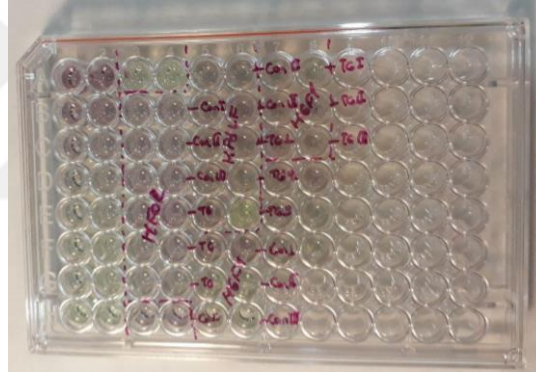
Resim 5.7. Sonikasyon cihazı



Resim 5.8. Santrifüj cihazı



Resim 5.9 BCA protein tayini kiti, (a) Reagent A, (b) Reagent B, (c) Albumin standartı ampulleri



Resim 5.10. 96 kuyucuklu plakalara BCA eklenmesi

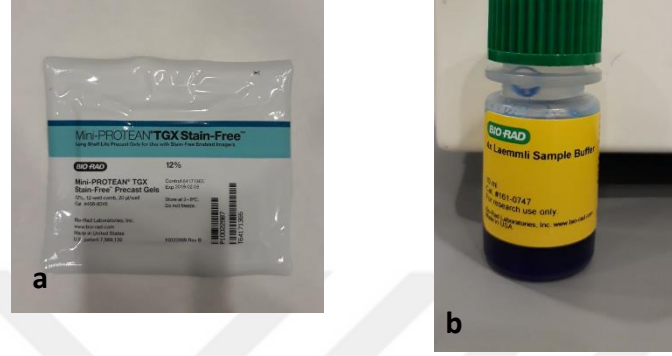
Karanlık ortamda 30 dk olmak üzere inkübasyon sonrası oluşan mavi renk gözlemlenerek 562 nm’de standartların ve örneklerin absorbansları ölçüldü, oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki protein miktarları hesaplandı.

5.4.3. Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Hücrelerden elde edilen 15 µg protein içeren homojenatlara, hazırlanmış olan *Laemmi sample buffer*²¹ eklendi ve 95 °C’de 4 dakika ısıtılarak denatüre edildikten

²¹ Katalog no: 1610747, Bio-Rad, A.B.D.

sonra %12'lik mini-protean jeline²² yüklendi (Resim 5.11). Elektroforez yürütme tamponu içinde 100 volt sabit akımda 1 saat sürede proteinler ayrıştırıldı. Protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak *Precision Plus Protein*²³ kullanıldı.



Resim 5.11. (a) %12'lik mini-protean jel, **(b)** *Laemmi Sample Buffer*

5.4.4. Jelden membrana proteinlerin aktarılması ve densitometrik analizler

Ayrıştırılan proteinler *running buffer* içerisine taşındı, immunoblotting ile ortam sıcaklığında 100 volt sabit akımda, 25 mM Tris-baz, 192 mM glisin ve % 20 v/v metanol içeren pH: 8,3'lük transfer tamponunda 7 dk sürede 0,2 µm kalınlıktaki nitroselluloz membrana transblot²⁴ ile transfer edildi (Resim 5.12). Antikor ile tayin için ilk aşama olarak membrandaki bağlanmamış yerler % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat bloke edildikten sonra membran % 1 süt tozu-TBST ile 1/1000 oranında dilüe edilmiş spesifik primer antikor Colla1 Antibody²⁵ ve 1/600 oranında dilüe edilmiş spesifik primer Collagen III alpha 1 Antibody²⁶ ile 4⁰C derecede 12 saat süreyle inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların TBST ile yıkanmasından sonra membran Tip I kolajen için 1/2000 oranında dilüe edilmiş horseradish peroksidaz (HRP) işaretli Anti-rabbit IgG

²² Katalog no: 4568044, Bio-Rad, A.B.D.

²³ *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, Katalog no: 1610374, Bio-Rad, A.B.D.

²⁴ *Mini transblot elektroforetik transfer cell*, BioRad, A.B.D.

²⁵ Katalog no: 84336S, Cell Signaling Technology, A.B.D.

²⁶ Katalog no: NBP2-3332, Novus Biologicals, A.B.D.

sekonder antikor²⁷, Tip III kolajen için 1/2000 oranında dilüe edilmiş HRP işaretli Anti-mouse IgG²⁸ ile 1 saat inkübe edildi ve TBST ile yıkamanın ardından membran kemiluminesans kit²⁹ ile 1 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakılarak oluşan ışığa görüntülendi³⁰ ve protein bantlarının yoğunlukları hesaplandı (Resim 5.13). Tüm hücre grupları için deney 4 tekrar ile yapıldı. Normalizasyon için protein bant yoğunlukları GAPDH protein yoğunluğuna bölündü ve değerler kontrol grubu 100 kabul edilerek hesaplandı (Tablo 5.3, Tablo 5.4)

Tablo 5.3. Tüm hücre gruplarındaki tip I kolajen/ GAPDH protein yoğunluğu değerleri

Tekrar	hgf-1 Kolajen/GAPDH		hPdlf Kolajen/GAPDH		hfob Kolajen/GAPDH	
	Kontrol	50nM	Kontrol	50 nM	Kontrol	50 nM
1	1,47	2,56	0,11	0,10	0,02	0,15
2	1,57	2,54	0,14	0,38	0,07	0,15
3	1,69	2,65	0,13	0,13	0,05	0,25
4	1,55	1,98	1,98	0,17	0,09	0,09

Tablo 5.4. Tüm hücre gruplarındaki tip III kolajen/ GAPDH protein yoğunluğu değerleri

Tekrar	hgf-1 Kolajen/GAPDH		hPdlf Kolajen/GAPDH		hfob Kolajen/GAPDH	
	Kontrol	50 nM	Kontrol	50 nM	Kontrol	50 nM
1	0,01	0,07	0,24	0,18	0,58	0,80
2	0,02	0,07	0,14	0,32	1,24	1,12
3	0,04	0,02	0,27	0,12	0,88	0,57
4	0,05	0,07	0,33	0,11	0,53	0,65

²⁷ Katalog no: 7074S, Cell Signaling Technology, A.B.D.

²⁸ Katalog no: 7076S, Cell Signaling Technology, A.B.D.

²⁹ Western blotting luminol reagent, Santa Cruz Biotechnology

³⁰ ChemiDoc™ MP, Bio-Rad, A.B.D.



Resim 5.12. Trans-Blot transfer sistemi



Resim 5.13. (a) Western blotting luminol

reagent, (b) Görüntüleme sistemi

5.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizi

Bu çalışmada elde edilen veriler *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 25.0 paket programı³¹ aracılığı ile analiz edildi. Açıklayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama \pm standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerler şeklinde gösterildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu *Kolmogorov-Smirnov* testi ile değerlendirildi. İki den fazla grubun normal dağılıma uymayan değişkenlerin karşılaştırmasında *Kruskal-Wallis* testi, ikili karşılaştırmaları (post-hoc) için ise *Mann-whitney U* testi yapıldı. Sonuçlar *Bonferroni* düzeltmesi yapılarak yorumlandı. $p < 0.05$ seviyesindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

³¹SPSS for Windows, Release 25.0, IBM Inc., ABD

6. BULGULAR

6.1. Tideglusib'in Hücreler Üzerindeki Canlılık ve Sitotoksosite Etkisi

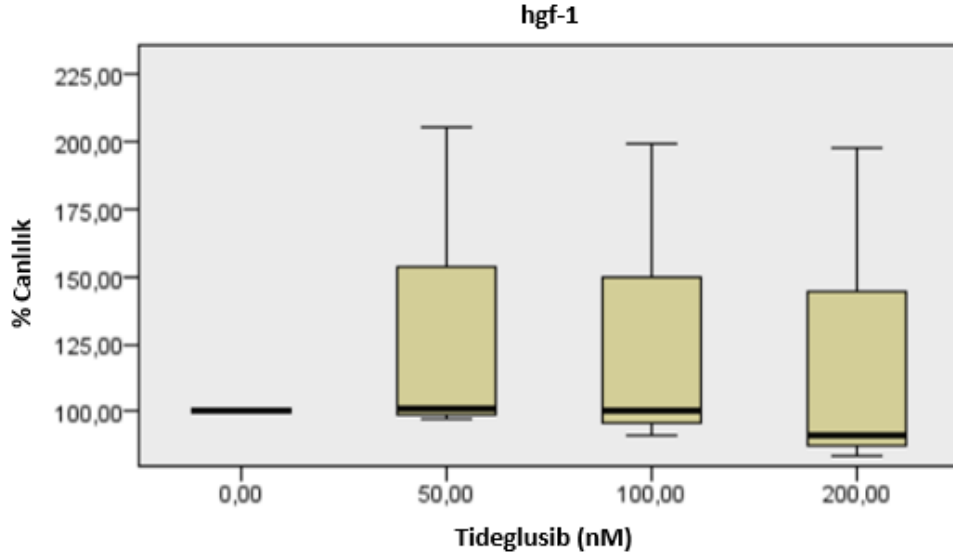
Bu çalışmada kullanılan Tideglusib'in farklı konsantrasyonlarının 24 saatlik uygulanması süresi sonunda hücreler üzerine olan canlılık ve sitotoksosite etkisinin yüzde olarak karşılaştırılması Tablo 6.1.'de verildi.

Tablo 6.1. Tüm hücre gruplarında 0, 50, 100, 200 nM grupları arası canlılık karşılaştırması

		Tideglusib Konsantrasyon (nM)				p*
		0 nM	50 nM	100 nM	200 nM	
hgf-1	N	3	3	3	3	0,639
	Ort±SS	100,00±0,00	134,60±61,63	130,13±60,20	124,08±63,64	
	Medyan	100,00	100,86	100,24	91,33	
	Minimum	100,00	97,20	90,73	83,49	
	Maksimum	100,00	205,74	199,44	197,44	
hPdLf	N	3	3	3	3	0,022*
	Ort±SS	100,00±0,00	107,51±6,23	105,02±2,36	97,63±1,68	
	Medyan	100,00	110,93	105,11	97,63	
	Minimum	100,00	100,32	102,62	95,95	
	Maksimum	100,00	111,30	107,35	99,32	
hfob	N	3	3	3	3	0,264
	Ort±SS	100,00±0,00	115,77±3,20	110,28±25,34	101,98±8,90	
	Medyan	100,00	114,16	123,81	103,10	
	Minimum	100,00	113,69	81,04	92,57	
	Maksimum	100,00	119,46	126,00	110,27	

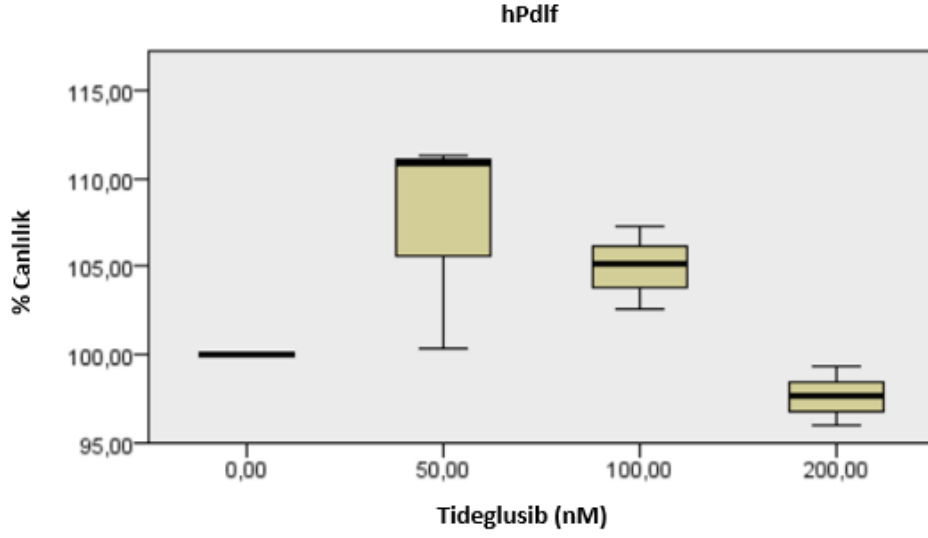
Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *Kruskal Wallis testi, $p < 0,05$

Tideglusib' in hgf-1 hücreleri üzerine canlılık etkisinin verileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuyla test grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 6.1) (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. hgf-1 hücresinde 0nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası canlılık

Tideglusib'in 0nM, 50nM, 100nM ve 200nM'lık dozlarına maruz kalan hPdlf hücrelerinin canlılık yüzdeleri hesaplanarak veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde uygulanan dozlar arasında anlamlı fark tespit edildi (Tablo 6.1) ($p=0,022$). 200 nM Tideglusib uygulanan grupta canlılık, 50 nM uygulanan gruba göre anlamlı derecede azalmış bulundu (Tablo 6.2) (Şekil 6.2) ($p=0,037$).



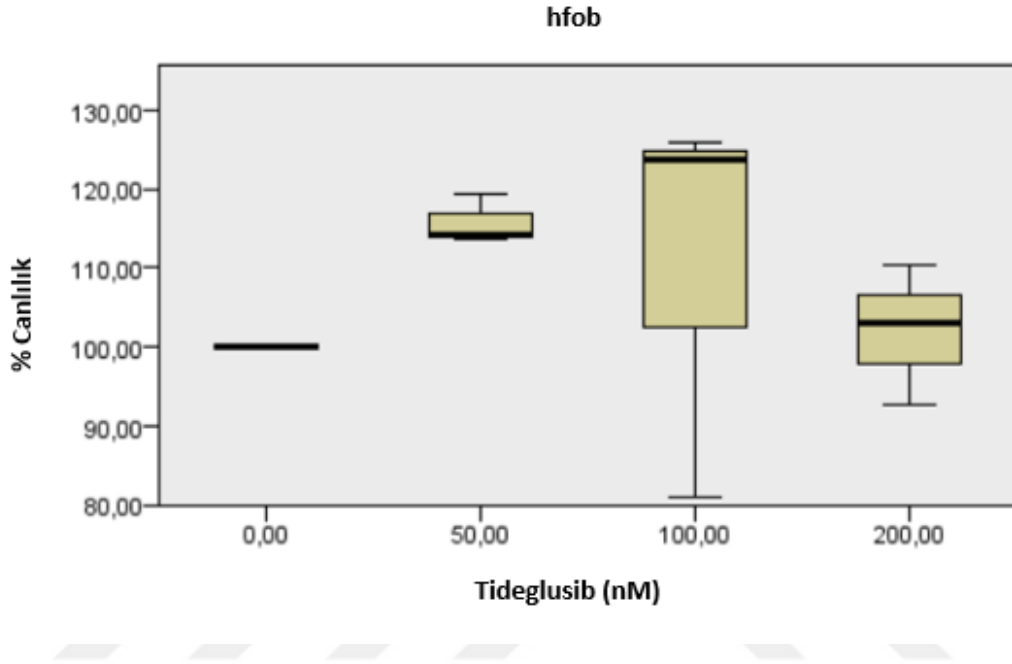
Şekil 6.2. hPdf hüresinde 0nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası canlılık

Tablo 6.2. hPdf hüresine uygulanan Tideglusib dozları sonrası canlılığın ikili karşılaştırması

Uygulanan Tideglusib Konsantrasyonu (nM)	<i>p</i> *
0 nM-50 nM	0,523
0 nM-100 nM	0,100
0 nM-200 nM	1,000
50 nM-100 nM	1,000
50 nM-200 nM	0,037*
100 nM-200 nM	1,000

*Mann Whitney-U testi Bonferroni düzeltmesi, $p < 0,05$

hfob hücrelerinin canlılıklarının 24 saat sonunda Multitox testi ile değerlendirilmesinin ardından elde edilen veriler karşılaştırıldığında, uygulanan tüm dozlarda canlılık açısından anlamlı fark bulunmadı (Tablo 6.2) (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. hfob hücresinde 0nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası canlılık

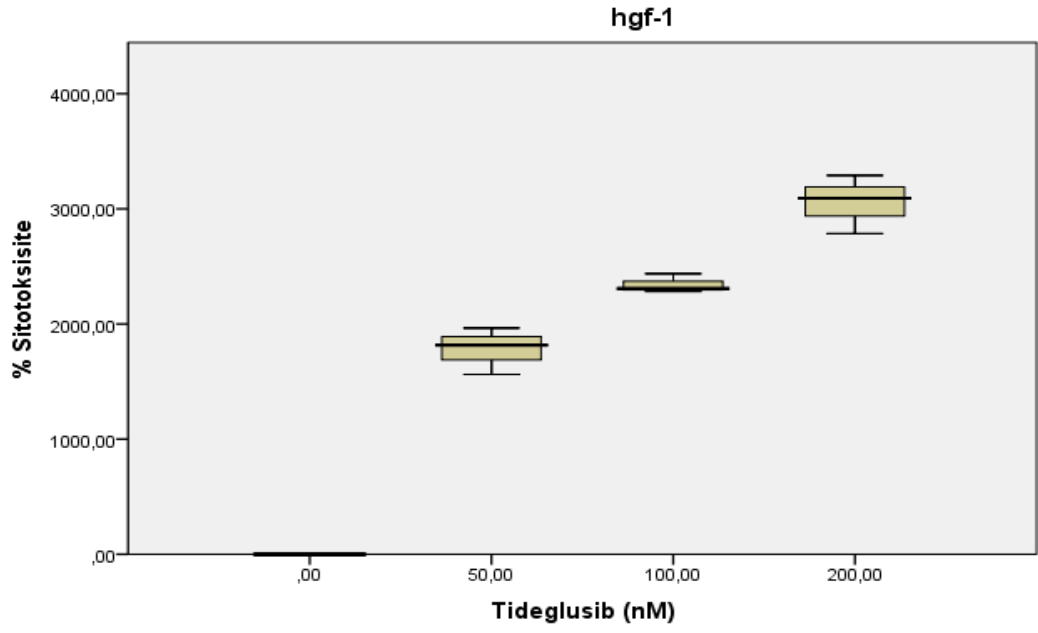
Tideglusib'in 0nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM dozlarında 24 saatlik uygulanması sonrası tüm hücre grupları için sitotoksite değerlerinin karşılaştırılması Tablo 6.3' de verildi.

Tablo 6.3. Tüm hücre gruplarında 0, 50, 100, 200 nM grupları arası sitotoksisite karşılaştırması

		Tideglusib Konsantrasyon (nM)				p*
		0 nM	50 nM	100 nM	200 nM	
hgf-1	N	3	3	3	3	0,015*
	Ort±SS	0,00±0,00	1780,30±203,33	2342,23±82,75	3329,18±564,40	
	Medyan	0,00	1816,17	2306,95	3290,34	
	Minimum	0,00	1561,43	2282,97	2785,20	
	Maksimum	0,00	1963,32	2436,78	3912,0	
hPdlf	N	3	3	3	3	0,023*
	Ort±SS	0,00±0,00	1671,58±444,85	5029,05±3326,79	4782,91±2640,26	
	Medyan	0,00	1924,64	4350,70	4393,20	
	Minimum	0,00	1157,93	2093,71	2359,18	
	Maksimum	0,00	1932,18	8642,74	7596,38	
hfob	N	3	3	3	3	0,015*
	Ort±SS	0,00±0,00	157,86±48,83	265,88±25,64	378,85±131,29	
	Medyan	0,00	130,30	254,40	310,56	
	Minimum	0,00	129,05	247,99	295,79	
	Maksimum	0,00	214,25	295,26	530,22	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *Kruskal Wallis testi, $p < 0,05$

hgf-1 hücresinde sitotoksisite değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark tespit edildi ($p=0,015$) (Tablo 6.3). Yapılan ikili karşılaştırmada 200 nM Tideglusib uygulamasındaki sitotoksisite kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış bulundu (Tablo 6.4) ($p=0,012$) (Şekil 6.4).



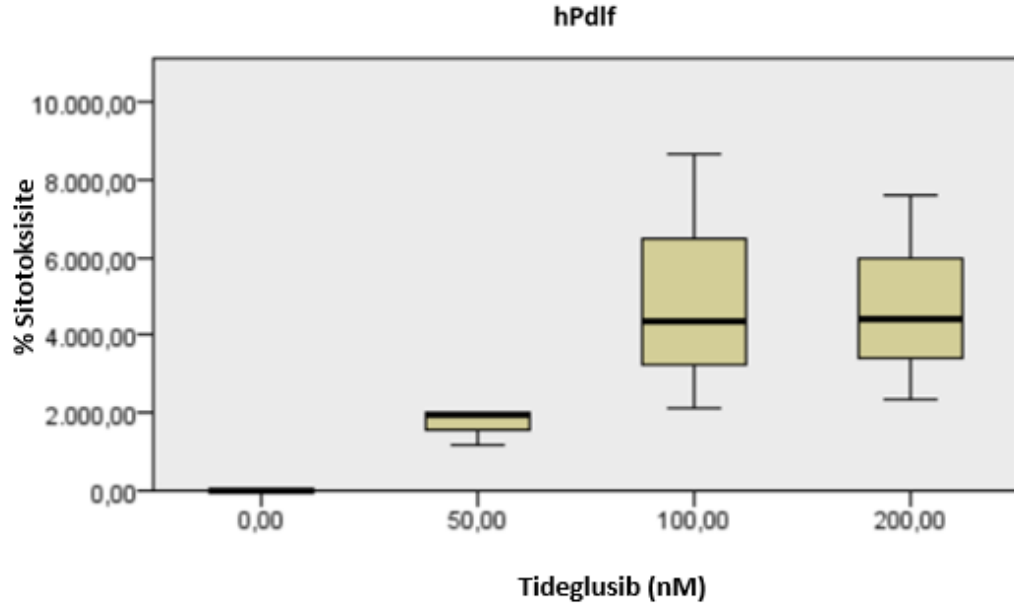
Şekil 6.4. hgf-1 hücresinde 0 nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası sitotoksosite

Tablo 6.4. hgf-1 hücresine uygulanan Tideglusib dozları sonrası sitotoksitenin ikili karşılaştırması

Uygulanan Tideglusib Konsantrasyonu (nM)	<i>p</i> değeri
0 nM- 50 nM	1,000
0 nM- 100 nM	0,241
0 nM-200 nM	0,012*
50 nM- 100 nM	1,000
50 nM-200 nM	0,241
100 nM-200 nM	1,000

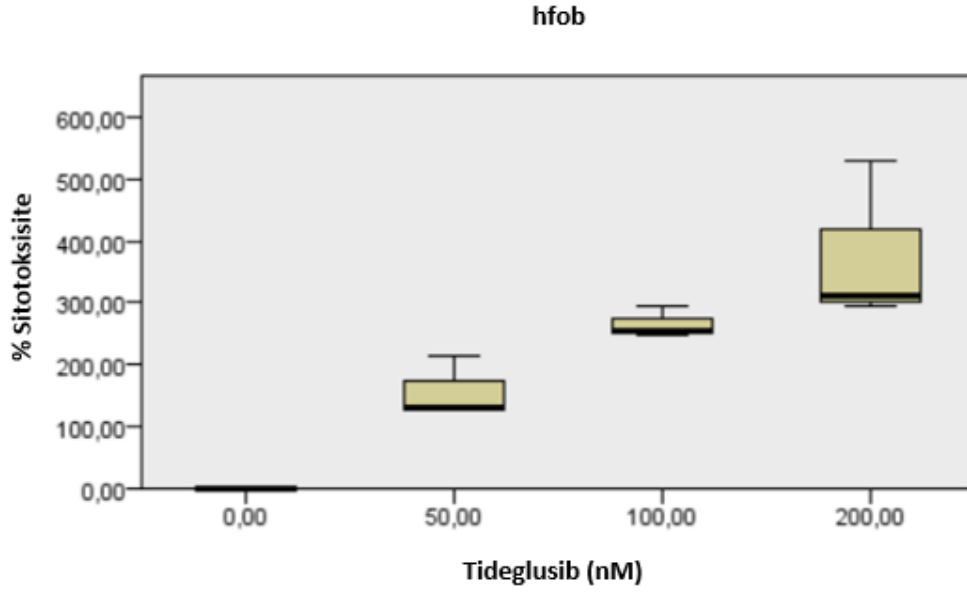
*Mann Whitney-U testi Bonferroni düzeltmesi, $p < 0,05$

hPdlf hücrelerine 24 saatlik Tideglusib uygulaması sonrası sitotoksosite değerleri istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında çoklu karşılaştırmada anlamlı fark bulunsa da ($p=0,023$) (Tablo 6.3), grupların sitotoksitesisi ikili karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 6.5).



Şekil 6.5. hPdlf hücrelerinde 0 nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası sitotoksosite

Tideglusib' in 0 nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM'lık dozlarına maruz kalan hfob hücreleri üzerindeki sitotoksosite verileri karşılaştırıldığında anlamlı fark tespit edildi (Tablo 6.3) ($p=0.015$). İkili karşılaştırma sonucu 200 nM Tideglusib uygulanan grubun sitotoksitesisi kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla bulundu (Tablo 6.5) ($p=0,012$) (Şekil 6.6).



Şekil 6.6. hfob hücresinde 0 nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM Tideglusib uygulaması sonrası sitotoksosite

Tablo 6.5. hfob hücresine uygulanan Tideglusib dozları sonrası sitotoksitenin ikili karşılaştırması

Uygulanan Tideglusib Konsantrasyonu (nM)	<i>p</i> *
0 nM- 50 nM	1,000
0 nM- 100 nM	0,241
0 nM-200 nM	0,012*
50 nM- 100 nM	1,000
50 nM-200 nM	0,241
100 nM-200 nM	1,000

*Mann Whitney-U testi, Bonferroni düzeltmesi $p < 0,05$

6.2. Tideglusib' in 50 nM Doz Uygulanan Hücreler Üzerindeki Tip I Kolajen Salınımının Değerlendirilmesi

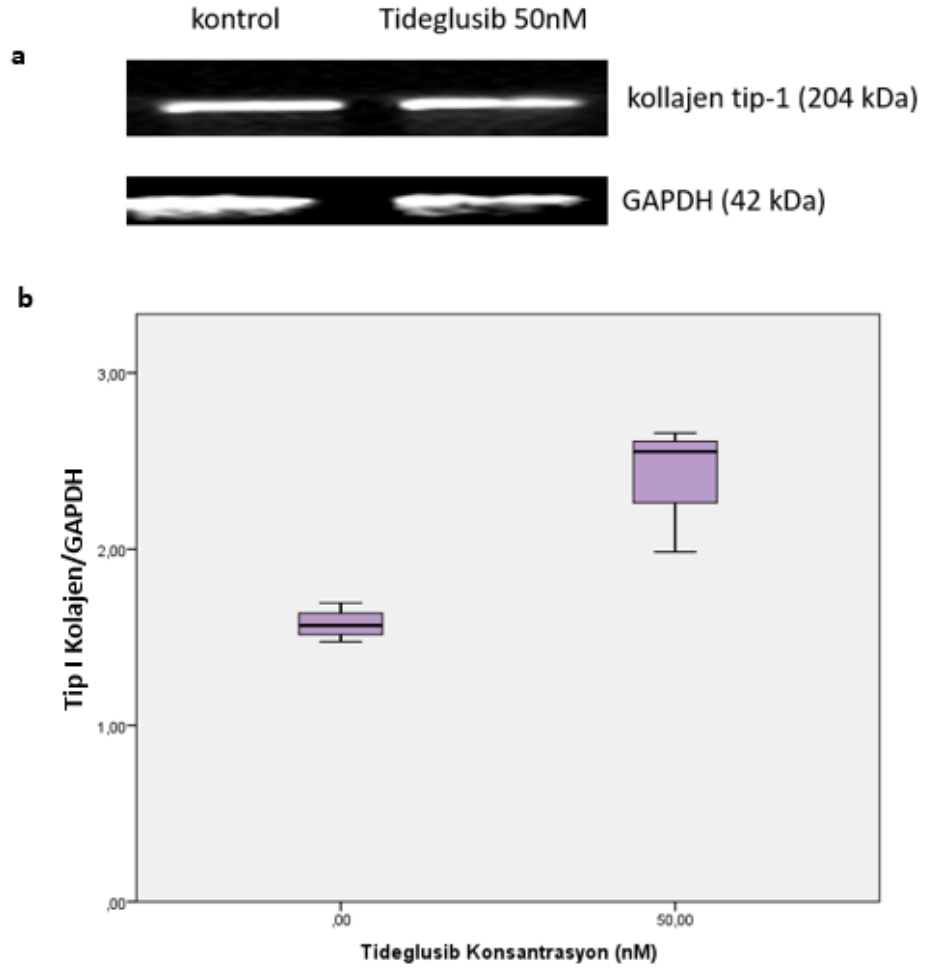
Tideglusib'in 24 saatlik uygulanması sonunda tip-I kolajen salınımı bant yoğunlukları hesaplanarak karşılaştırıldı ve elde edilen veriler Tablo 6.6'da gösterildi.

Tablo 6.6. Tüm hücre grupları için tip-I kolajen salınımı verileri

Tideglusib (nM)		hgf-1	hPdlf	hfob
Kontrol	N	4	4	4
	Ort± SS	1,57±0,09	0,11±0,03	0,06±0,02
	Medyan	1,56	0,12	0,06
	Minimum	1,47	0,07	0,03
	Maksimum	1,70	0,14	0,09
50 nM	N	4	4	4
	Ort± SS	2,43±0,30	0,19±0,12	0,16±0,06
	Medyan	2,55	0,15	0,15
	Minimum	1,98	0,10	0,09
	Maksimum	2,66	0,39	0,26
p*		0,029*	0,343	0,029*

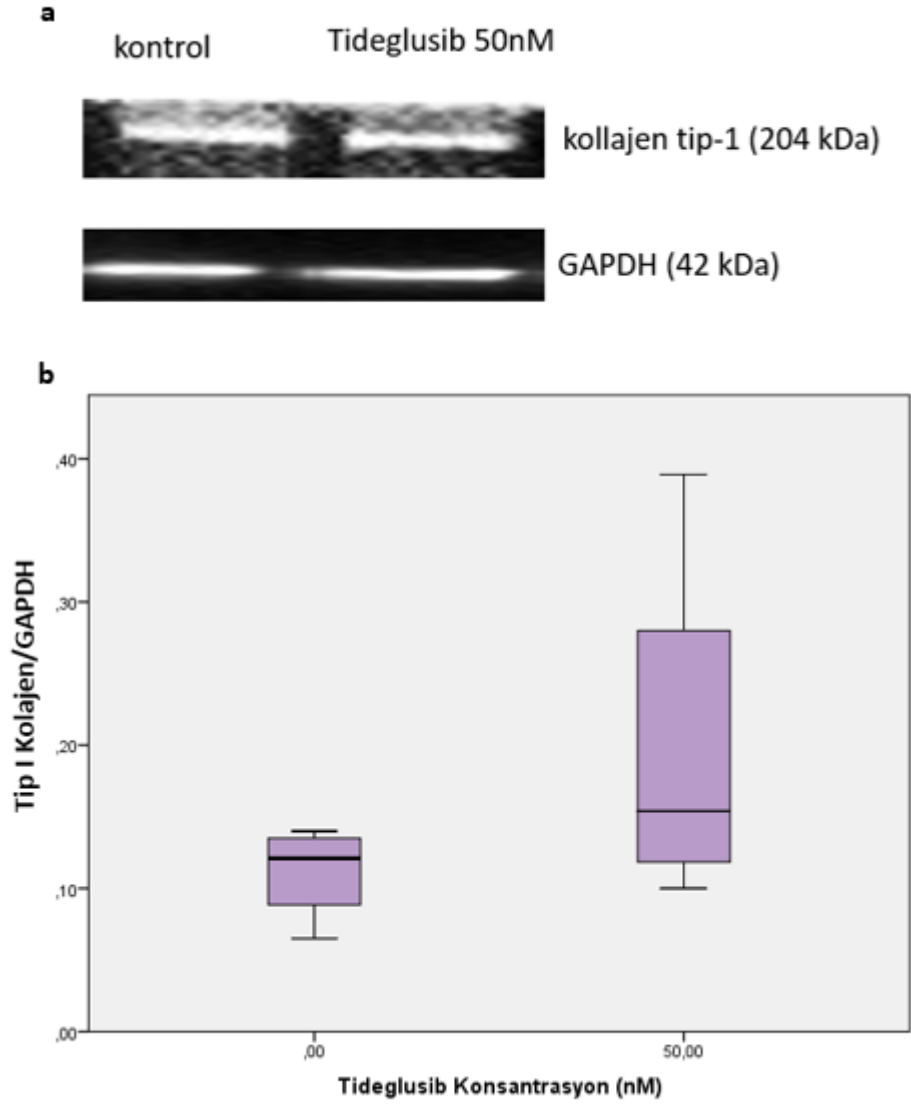
Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *Mann-Whitney U testi, Bonferroni düzeltmesi $p<0,05$

hgf-1 hücrelerinde 50 nM Tideglusib uygulanmasının ardından test grubundaki tip I kolajen salınımı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 6.7) (Tablo 6.6) ($p=0,029$).



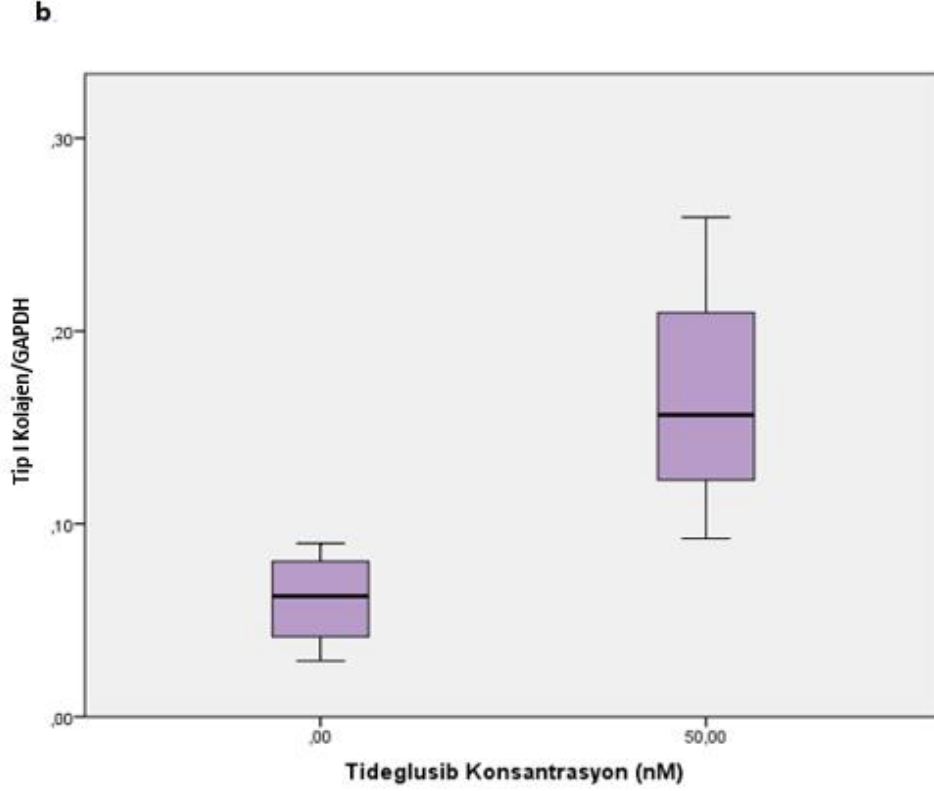
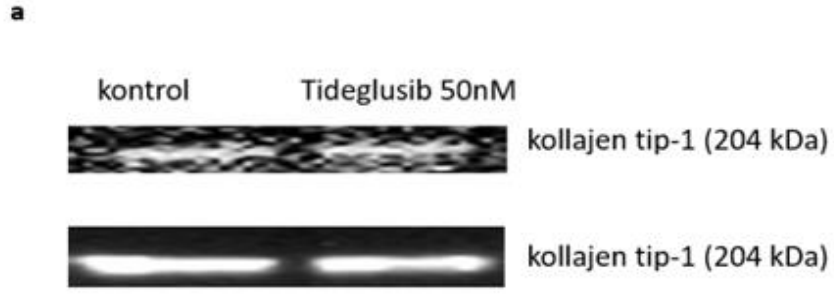
Şekil 6.7. (a) Kontrol ve test grupları bant yoğunlukları, (b) hgf-1 hücreleri tip I kolajen salınımı

hPdlf hücrelerinde tip I kolajen salınımı değerlendirildiğinde test grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 6.8) (Tablo 6.6) ($p>0.05$).



Şekil 6.8. (a) Kontrol ve test grupları bant yoğunlukları, (b) hPdlf hücreleri tip I kolajen salınımı

hfob hücrelerine ise yapılan uygulama sonrası test grubunda kontrol grubuna göre tip I kolajen miktarı anlamlı derecede artmış bulundu (Tablo 6.6) (Şekil 6.9) ($p=0,029$).



Şekil 6.9. (a) Kontrol ve test grupları bant yoğunlukları, (b) hFOB hücreleri tip I kolajen salınımı

6.3. Tideglusib' in 50 nM Doz Uygulanan Hücreler Üzerindeki Tip III Kolajen Salınımının Değerlendirilmesi

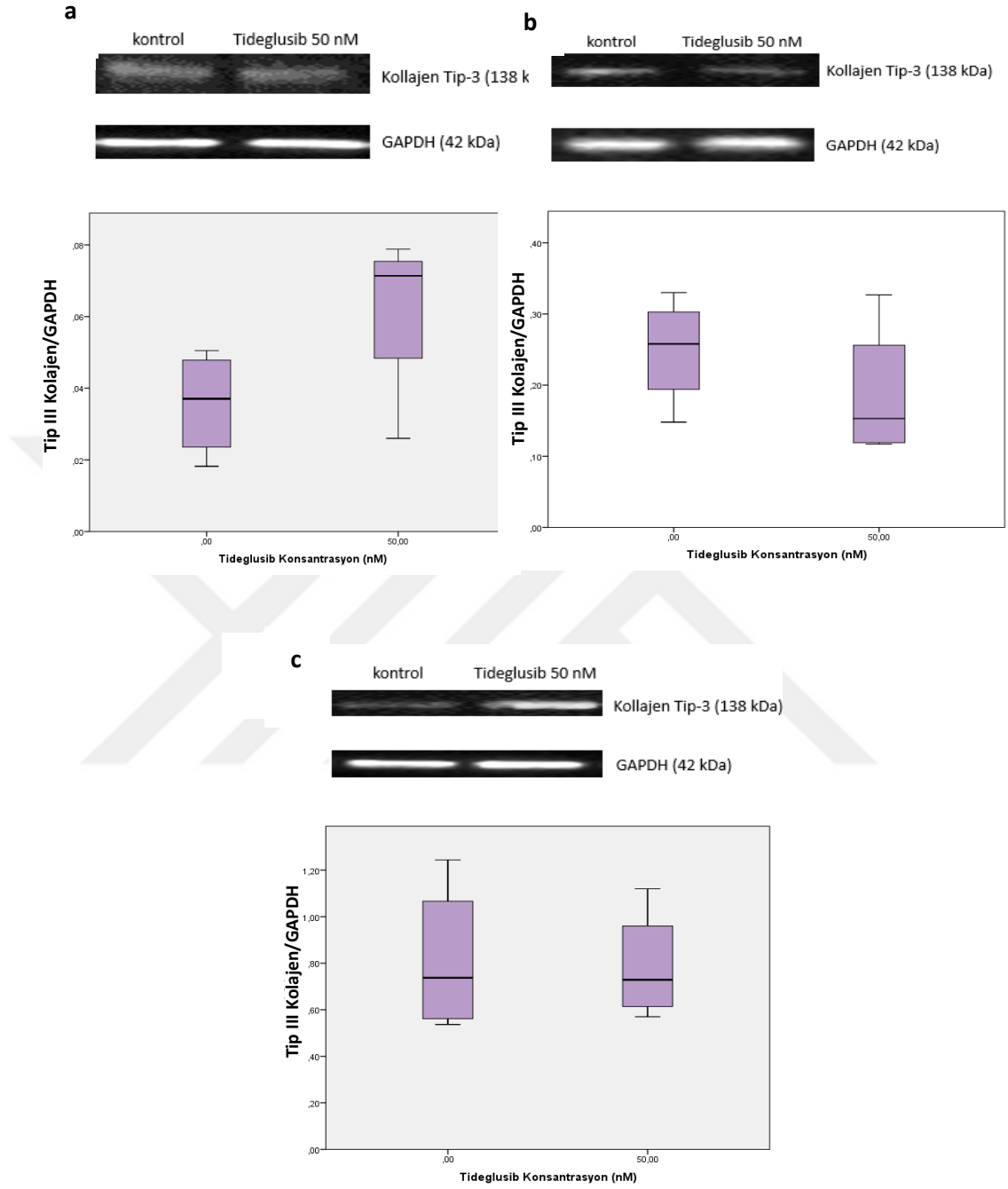
Test ve kontrol gruplarına 50 nM Tideglusib'in 24 saat süre ile uygulanmasının ardından tip III kolajen salınımı karşılaştırıldığında elde edilen veriler Tablo 6.7'de verildi.

Tablo 6.7. Tüm hücre grupları için tip III kolajen salınımı verileri

Tideglusib		Hgf-1	hPdlf	hfob
Kontrol	N	4	4	4
	Ort± SS	0,03±0,01	0,24±0,07	0,81±0,32
	Medyan	0,03	0,25	0,73
	Minimum	0,02	0,15	0,54
	Maksimum	0,05	0,33	1,24
50 nM	N	4	4	4
	Ort± SS	0,06±0,02	0,18±0,09	0,78±0,24
	Medyan	0,07	0,15	0,72
	Minimum	0,03	0,12	0,57
	Maksimum	0,08	0,33	1,12
<i>p</i> *		0,20	0,34	1,00

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *Mann-Whitney U testi, , Bonferroni düzeltmesi, $p < 0.05$

Tüm hücre gruplarına 24 saatlik 50 nM Tideglusib uygulamasının ardından tip III kolajen salınımı değerlendirildiğinde kontrol ve test grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadı (Tablo 6.7) (Şekil 6.10) ($p > 0.05$).



Şekil 6.10. Kontrol ve test grupları bant yoğunlukları ve tip III kolajen salınımı (a) hgf-1 hücresi, (b) hPdlf hücresi, (c) hfob hücresi

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Periodontal tedavilerin amacı, hastalıktan etkilenen periodonsiyumun orijinal yapı ve fonksiyonunun geri kazandırılmasıdır (Lang ve Lindhe, 2015). Günümüzde periodontal harabiyete uğramış dokuların rejenerasyonunu sağlamak amacıyla, rezorbe olabilen ve olmayan membranların kullanımı ile yönlendirilmiş doku rejenerasyonu, otojen kemik greft materyalleri, allogreftler, alloplastik greftler, ksenogreftler, mine matriks türevleri ve büyüme faktörleri gibi çeşitli materyaller ve metodlar denenmektedir ancak ideal rejenerasyona ulaşmak henüz mümkün değildir (Taba ve ark., 2005; Ramseier ve ark., 2006; Kurtiş, 2008).

Wnt/ β Cat sinyal yolu aktivasyonu, doku hasarına karşı doğal tamir mekanizmasını uyaran erken yanıt olarak bilinmektedir (Yin ve ark., 2016). Bu sebeple, Wnt/ β Cat sinyal yolu rejenerasyonda ve onarımda ana hedef olarak ortaya çıkmaktadır ve bu sinyal yolu birkaç farklı yolla uyarılabilmektedir. Wnt ligand/reseptör yokluğunda, Wnt/ β Cat sinyal yolunun kilit sitoplazmik bileşeni β -kateninin parçalanmasına yol açan fosforilat enzimi GSK-3'tür. Wnt ligand varlığında ise GSK-3 inhibe edilerek hedef hücrelerin proliferasyonu başlatılır (Clevers ve Nusse, 2012). Küçük moleküllü GSK-3 antagonistleri Wnt aktivitesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tideglusib, Alzheimer hastalığı başta olmak üzere nörolojik hastalıkların tedavisinde sistemik kullanım için klinik olarak denenilen, reperatif dentin oluşturmada başarılı, osteoblast proliferasyonunda ve doku onarımında etkili olduğu bilinen küçük moleküllü GSK-3 antagonistidir (Meijer ve ark., 2004; Tolosa ve ark., 2014; Neves ve ark., 2017). Tideglusib ile yapılmış sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmada Tideglusib'in periodontal rejenerasyondaki etkisini anlayabilmek amacıyla periodontal hücrelere olan sitotoksosite ve canlılık etkisinin yanı sıra bu hücrelerden tip I ve tip III kolajen ekspresyonu etkisi araştırıldı.

Periodontal tedavi sonrası yara bölgesine gelen ilk hücreler epitel hücreleridir ve periodontal rejenerasyona engel olmaktadır. Bu sebeple rezorbe olabilen veya olmayan membranlar kullanılarak epitel ve dişeti bağ dokusu hücrelerinin defekt bölgesine göçü engellenmeye çalışılmış bunun yerine periodontal ligament hücreleri, osteoblastlar ve sementoblastların göçü ve proliferasyonun sağlanması amaçlanmıştır

(Melcher, 1976). Bu verilerin ışığında çalışmamızda Tideglusib'in periodontal dokular üzerindeki olası rejeneratif etkisini inceleyebilmek amacıyla hPdlf, hgf-1 ve hfob hücreleri seçildi.

Çalışmamızda Tideglusib'in hücreler üzerindeki sitotoksosite ve proliferasyon etkisini incelemek amacıyla MultiTox deney protokolü uygulandı. Bu testi lüminesans/floresans ölçümüne dayalı bir yöntemdir ve aynı anda veya sıralı şekilde hem canlılığa hem de sitotoksositeye bakılmasına olanak sağlar. Bu testler, canlı ve ölü hücrelerin proteaz ve esteraz aktivitesi yönünden ayrılması yöntemiyle yapılmaktadırlar (Niles ve ark., 2007, Sali ve ark., 2016). Proteaz aktivitesine dayalı yöntemde, hücre zarını geçebilen bir substrat olan florojenik proteaz substratı (GF - AFC) canlı hücreye girer, sitoplazmik aminopeptidazlar tarafından glisin ve fenil amino asitlerinin uzaklaştırılmasıyla floresans sinyali yayan AFC'ye dönüştürülür ve canlı hücre sayısını gösterir. Ayrıca GF-AFC substratında olduğu gibi, proteaz substratı bir peptid olan fakat hücre içine giremeyen rodamin (aminolüsiferin), hücre ölümü sonrası vasa geçen proteazlar tarafından florojenik formuna dönüştürülür ve ölü hücre sayısını gösterir. Metot, iki farklı substrattan birinin uygulanmasıyla yapılabilse de bu iki belirtecin birlikte halde uygulanması, proteaz testinin hassasiyetini önemli ölçüde artırmaktadır (Niles ve ark., 2007). Diğer yöntemlerden farklı olarak bu testteki proteaz substratları deney boyunca hücre canlılığını bozmaz bu sebeple deney pek çok kez tekrar edilebilir. Aynı örnekte hem canlı hem de ölü hücre sayısının ölçülebilmesi ise kendi içinde kontrol olanağı taşır. Hücre tahribatı yaratmayan başka lüminesans sitotoksosite testleri de vardır ancak bu testlerin stabilitesi azdır ve lüsiferaz sinyallerinin yarı ömrü kısadır (Riss ve Moravec, 2002; Niles ve ark., 2007).

Hücre kültürü çalışmalarında hücresel cevapların değerlendirilmesinin amaçlandığı periyotlar, çalışma planına göre değişkenlik göstermektedir. Osteoblast aktivitesi 15 dakika-60 saat arası olmak üzere kısa dönemli ya da 1 -21 gün arası uzun dönemli ölçümlerle değerlendirilebilmektedir (Bowers ve ark., 1992; Yliheikkila ve ark., 1995; Yliheikkila ve ark., 1996; Shah ve ark., 1999; Campoccia ve ark., 2003). Aynı şekilde fibroblast aktivitesinin incelendiği çalışmalarda 24 saat ve 72 saatlik inkübasyon süreleri değerlendirilmiştir. (Kook ve ark., 2016). Bu çalışmada, literatürle

uyumlu olarak kısa dönem için 24 saatlik inkübasyon süresi (Kieswetter ve ark., 1996; Scotchford ve ark., 2003; Kim ve ark., 2000) uygulandı.

Çalışmamızda sitotoksosite ve proliferasyon deneyi için seçilen başlangıç dozları (50 nM, 100 nM ve 200 nM) Neves ve ark.'nın (Neves ve ark., 2017) çalışması baz alınarak seçildi.

Sitotoksosite deneyi sonucunda hgf-1 hücresinde 200 nM Tideglusib'in 24 saatlik uygulaması sonrası sitotoksitenin anlamlı derecede arttığı görüldü ($p=0,012$). Proliferasyon deneyinde ise test gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edilmedi. Literatürde Wnt sinyal yolu aktivasyonunun fibroblast aktivasyonunu ve proliferasyonunu arttırarak fibrozise sebep olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (Bergmann ve ark., 2011; Singh ve ark., 2015; Burgy ve Königshoff, 2018). Vuga ve ark. (Vuga ve ark., 2009) yaptıkları çalışmada Wnt aktivasyonunun akciğer fibroblastlarında proliferasyonu arttırdığını göstermiştir. Akhmetshina ve ark. (Akhmetshina ve ark., 2012) Wnt sinyal yolu aktivasyonunun fibroblastların myofibroblastlara farklılaşmasını arttırdığını ve myofibroblast sayısını arttırdığını belirtmişlerdir. Hamburg ve ark. (Hamburg ve Atit, 2012) β -kateninin sürekli aktivasyonunun dermal fibroblastların sayısını arttırarak fibrozise sebep olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmaların aksine Wnt aktivasyonunun ve GSK-3 inhibisyonunun gingival fibroblastlarda TGF-1 ekspresyonunu azaltarak dişeti büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Bahammam ve ark., 2013). Çalışmamızda Tideglusib'in hgf-1 hücresi üzerindeki proliferasyon etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ancak literatürde Tideglusib'in kullanıldığı ve Wnt sinyal yolunun hgf-1 hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği başka çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda hPdlf hücresinde Tideglusib'in sitotoksosite ve proliferasyon etkisi değerlendirildi. Literatürde Tideglusib'in hPdlf hücresi üzerine etkisinin araştırıldığı başka çalışma bulunmamaktadır, ancak Rooker ve ark. (Rooker ve ark., 2010) periodontal ligamende proliferasyonun arttığı alanlarda Wnt sinyal yanıtının daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Han ve ark. (Han ve ark., 2012) hPdlf hücreleri üzerine Wnt sinyal yolu aktivatörü olan lityum uyguladıklarında kontrol grubuna göre proliferasyonun arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda ise test grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Bu sonuç literatürdeki Wnt sinyal yolu aktivasyonunun hPdlf hücresi üzerine etkisinin araştırıldığı diğer çalışmalarla

paralellik göstermemektedir ancak çalışmamız Tideglusib'in etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır ve bu sebeple Tideglusib'in hPdlf hücresi üzerine etkisini araştırmak amacıyla daha uzun zaman periyotlarında değerlendirmek gerekli olabilir.

Çalışmamızda hfob hücresinde Tideglusib'in sitotoksosite ve proliferasyon etkisi değerlendirildiğinde Tideglusib uygulamasının hfob hücreleri üzerinde proliferasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunmadı ($p>0.05$). Sitotoksosite deneyinde ise 200 nM Tideglusib uygulamasında kontrol grubuna göre artmış sitotoksosite tespit edildi ($p=0,012$). Morvan ve ark. Wnt antagonisti olan Dkk1'i inhibe ettikleri çalışmada farelerde osteoblast sayısında artış gözlemlemişlerdir (Morvan ve ark., 2006). Babij ve ark. Wnt sinyal yolu aktive edildiğinde kemik kütlesinde artış olduğunu ve bu artışın osteoblast sayısındaki artıştan kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir (Babij ve ark., 2003). Caetano-Lopes ve ark. (Caetano-Lopes ve ark., 2007) Wnt sinyal yolunun aktivasyonunun osteoblast farklılaşmasında ve proliferasyonunda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Wnt sinyal yolu aktivasyonunun trabeküler ve kortikal kemik mekanizmasında kritik rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (Westendorf ve ark., 2004; Lerner ve Ohlsson, 2015), ancak literatürde Tideglusib'in osteoblast hücrelerine uygulanması sonrası etkilerinin değerlendirildiği başka çalışma bulunmamaktadır. Wnt sinyal yolu aktivasyonunun Tideglusib içeren bir yolak üzerinden başlatıldığı çalışmamızda osteoblast proliferasyonu anlamlı değişiklik göstermemiştir. Wnt sinyal yolu aktivasyonunun osteoblast hücreleri üzerine etkilerini farklı yolaklar üzerinden inceleyen daha detaylı ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sitotoksosite ve proliferasyon deneyi sonrası protein salınımı deneyi için tüm hücre gruplarında ortak, sitotoksik olmayan ve canlılığını en çok destekleyen Tideglusib dozu olarak 50 nM seçildi. Tüm hücre gruplarına 50 nM Tideglusib uygulanarak tip I ve tip III kolajen salınımı *Western blot* yöntemi ile ölçüldü. *Western blot*, protein analizi için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (He ve Herr, 2010; Murphy ve Lamb, 2013; Kurien ve Scofield, 2015). Proteinlerin yanı sıra proteinler üzerindeki post-translasyonel modifikasyonları tespit etmek için de kullanılır ve basit veya karmaşık biyolojik örneklerde hedef protein hakkında niteliksel veya niceliksel veriler sağlayabilir (Mishra ve ark., 2017). Tip I kolajen, dişeti, periodontal ligament, dentin, sement ve kemik gibi pek çok bağ dokusunun temel bileşenidir. Tip III kolajen ise

fetal dokularda, dişeti, periodontal ligament, sement, cilt, kan damarlarında bulunan kolajendir ve gerilme dayanımı ile kolajen yapım/yıkım mekanizmasında rol almaktadır (Narayanan, 1983; Mariotti, 1993). Tip III kolajen iyileşmenin erken döneminde dokuya dayanıklılık sağlarken, iyileşme tamamlanırken yerini tip I kolajene bırakır (Rai ve ark., 2005). Ayrıca tip I kolajen osteoblastlar için bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Dacic ve ark., 2001). Wnt sinyal yolu ile ilgili protein ekspresyonunun değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Minear ve ark. (Minear ve ark., 2010) Axin2'nin inaktive edildiği mutant farelerde osteoblast differansiyasyon belirteci olan tip I kolajenin yara bölgesinde daha hızlı ortaya çıktığını göstermişlerdir. Xiang ve ark. (Xiang ve ark., 2017) β -kateninin genetik eksikliğinde kardiyak fibroblastların tip I kolajen salınımının anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda Tideglusib'in olası rejeneratif kapasitesini incelemek amacıyla tip I ve tip III kolajen üç hücre dizisi için ortak protein olarak seçilmiştir.

Çalışmamızda, hgf-1 hücresine 50 nM Tideglusib uygulanmasının ardından, tip I kolajen seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gözlemlendi ($p=0,029$). Roh ve ark. (Roh ve ark., 2017) keloid ve normal dermal fibroblast hücrelerinin β -katenin, tip I kolajen ve tip III kolajen salınımını karşılaştırdıkları çalışmada keloidli dokulardan alınan fibroblastlarda tip I kolajen miktarının arttığını göstermişlerdir. Beyer ve ark. (Beyer ve ark., 2012) β -katenin ekspresyonunun arttırıldığı farelerde kolajen birikiminde artış olduğunu bildirmişlerdir. Beljaars ve ark. (Beljaars ve ark., 2017) sağlıklı ve karaciğer fibrozisi olan farelerde Wnt sinyal yolunu karşılaştırdıkları çalışmada, Wnt-5A geninin artışıyla fibroblastlarda tip I kolajen seviyesinin arttığını göstermişlerdir. Bergmann ve ark. (Bergmann ve ark., 2011) farelerde ve kültüre edilmiş dermal fibroblastlarda GSK-3'ü inhibe etmişler, Wnt sinyal yolunun aktive edildiğini ve fibroblastlardan tip I kolajen salınımının arttığını bulmuşlardır. Svegliati ve ark. (Svegliati ve ark., 2014) sistemik sklerozisli ve sağlıklı bireylerden kolun ön kısmından *punch* biyopsi olarak fibrozisi araştırdıkları çalışmada, fibroblastlarda Wnt antagonisti olan WIF-1'in salınımının azalmasıyla tip I kolajen miktarının artarak fibrozise sebep olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda da hgf-1 hücresinde tip I kolajen seviyesinde artış gözlenmiştir ve bu sonuç literatürdeki diğer fibroblast hücreleri ile yapılmış çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Tideglusib uygulanan hPdlf hücrelerinde tip I kolajen seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmadı. Wnt sinyal yolu aktivasyonunun dermal, kardiyak ve karaciğer fibroblastlarında tip I kolajen salınımını arttırdığını gösteren çalışmalar incelendiğinde bu sonuç literatür ile paralellik göstermemektedir (Bergmann ve ark., 2011; Beyer ve ark., 2012; Svegliati ve ark., 2014; Beljaars ve ark., 2017; Roh ve ark., 2017). Ancak literatürde hPdlf hücrelerinde Tideglusib'in araştırıldığı başka çalışma bulunmamaktadır.

Wnt sinyal yolunun osteoblast hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda kemik yapım belirteçleri olarak tip I kolajen, ALP, ON ve Runx2 salınımı ile mineralize nodül oluşumu değerlendirilmiştir (Morvan ve ark., 2006; Kim ve ark., 2007; Popelut ve ark., 2010). Çalışmamızda bu amaçla tip I kolajen seçildi. Çalışmamızda, hfob hücresine 50 nM Tideglusib uygulanmasının ardından tip I kolajen salınımı test edildiğinde, tip I kolajen seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gözlemlendi ($p=0,029$). Glass ve ark. β -kateninin stabilize edildiği farelerde kemik kütlesinde ve tip I kolajende artış gözlemlenmişlerdir (Glass ve ark., 2005). Kim ve ark. yaptıkları çalışmada, Wnt sinyal yolu aktive edildiğinde osteoblast farklılaşmasının hızlandığını artmış tip I kolajen seviyesi ile göstermişlerdir (Kim ve ark., 2007). Popelut ve ark. (Popelut ve ark., 2010) Wnt3a'nın implant osseointegrasyonundaki etkisini inceledikleri çalışmada, Wnt sinyal yolu aktivasyonunun ardından tip I kolajen seviyesinde artış gözlemlenmişlerdir. Wnt sinyal yolu aktivasyonunun kemik kütlesinde artış sağladığı ve osteoblast aktivitesini arttırdığı görülmektedir ve çalışmamızdaki veriler Tideglusib'in kemik kütlesi artışında rol oynayabileceğine dair bulguları desteklemektedir.

Literatürde Wnt sinyal yolunun tip III kolajen salınımı etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda tüm hücre grupları değerlendirildiğinde tip III kolajen salınımında anlamlı fark bulunmadı. Roh ve ark. (Roh ve ark., 2017) fibrozisli dokularda β -kateninin stabilizasyonunun fibroblastlarda tip III kolajen salınımına etkilerini araştırdıkları çalışmada çalışmamızla uyumlu olarak tip III kolajen seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlenmemişlerdir. Ge ve ark. (Ge ve ark., 2014) yaptıkları çalışmada hepatik fibroziste β -katenin'in aşırı salınımı sonucu tip III kolajenin arttığını, Wnt sinyal yolunun blokajı sonrası ise hepatik hücre proliferasyonunun azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonucu çalışmamızla

paralellik göstermemektedir ancak uygulanan yöntem ve hücre dizisinin çalışmamızdan farklı olması, bu sonuca sebep gösterilebilir.

Literatürde 24, 48 ve 72 saatlik zaman periyotlarında protein salınımı değerlendirilmiştir (Bowers ve ark., 1992; Kim ve ark., 2007; Popelut ve ark., 2010; Kook ve ark., 2016). Popelut ve ark. (Popelut ve ark., 2010) 24 saatlik protein salınımı testi sonrası kolajen miktarında artış gözlemlenmemişler ancak 48 saat sonunda anlamlı artış olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda ise 24 saatlik protein salınımı test edilmiş ve hPdlf hücrelerinde tip I kolajen salınımında anlamlı artış gözlenmemiştir. Aynı şekilde 24 saatlik tip III kolajen salınımında tüm hücrelerde anlamlı fark tespit edilememiştir. Bu nedenle, Tideglusib'in periodontal hücreler üzerine etkisini incelemek amacıyla daha uzun zaman periyotlarına ihtiyaç duyulduğu sonucuna varıldı.

Tideglusib'in hgf-1 ve hfob hücrelerindeki tip I kolajen artışına sebep olması öte yandan hPdlf üzerine anlamlı bir etki göstermemesi gibi sebeplerle Tideglusib molekülünün kemik rejenerasyonuna olumlu yönde etki gösterebileceği düşünülebilir. Ancak çalışmamız Tideglusib'in periodontal hücreler üzerindeki etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır bu nedenle periodontal rejenerasyondaki veya kemik rejenerasyonundaki olası etkilerinin inceleneceği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

İlerleyen çalışmalarda diğer kemik yapım belirteçlerinin de incelenmesi Tideglusib'in kemik yapımındaki etkisi üzerine daha net bir görüş elde edilmesini sağlayacaktır.

Tideglusib'in periodontal rejenerasyon veya kemik rejenerasyonundaki etkisinin greft-membran uygulaması, mine matriks proteinleri, büyüme faktörleri gibi diğer yöntemlerle kıyaslandığı başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

8.KAYNAKLAR

Adamowicz K, Wang H, Jotwani R, Zeller I, Potempa J, Scott DA. Inhibition of GSK3 abolishes bacterial-induced periodontal bone loss in mice. *Mol Med.* 2012;18:1190-1196.

Ainamo J, Talari A. The increase with age of the width of attached gingiva. *Journal of Periodontal research.* 1976;11(4):182-188.

Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, Horn A, Kireva T, Beyer C, Zwerina J, Schneider H, Sadowski A, Riener MO, MacDougald OA, Distler O, Schett G, Distler JH. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun.* 2012;3:735.

Akman AC, İlarlan YD, Yücel ÖÖ, Dursun E. Periodontal Rejenerasyonun Biyolojik Prensipleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Periodontology-Special Topics.* 2015;1(2):1-9.

Altınok B, Sunguroğlu A. WNT Sinyal Yolağı ve Kanser. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi.* 2016;2:27-38.

Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B, Marzolf J, Moran RA, Bex F. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res.* 2003;18(6):960-974.

Bahammam M, Black SA, Jr., Sume SS, Assaggaf MA, Faibish M, Trackman PC. Requirement for active glycogen synthase kinase-3beta in TGF-beta1 upregulation of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) levels in human gingival fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;305(6):C581-590.

Bartold P, Narayanan A, Schwartz Z, Dean D, Boyan B. The biology and physiology of the periodontium. *Fundamentals of Periodontics.* Chicago: Quintessence. 1996:61-107.

Bartold PM, Narayanan AS. *Biology of the periodontal connective tissues:* Quintessence Publishing Company; 1998.

Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. *Molecular and cell biology of the gingiva.* *Periodontol 2000.* 2000;24:28-55.

Bartold PM, Xiao Y, Lyngstaadas SP, Paine ML, Snead ML. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 2006;41:123-135.

Bassi A, Gough J, Zakikhani M, Downes S. Bone tissue regeneration. *Electrospinning for Tissue Regeneration*: Elsevier; 2011. p. 93-110.

Becker J, Schuppan D, Rabanus JP, Rauch R, Niechoy U, Gelderblom HR. Immunoelectron microscopic localization of collagens type I, V, VI and of procollagen type III in human periodontal ligament and cementum. *J Histochem Cytochem.* 1991;39(1):103-110.

Beljaars L, Daliri S, Dijkhuizen C, Poelstra K, Gosens R. WNT-5A regulates TGF β -related activities in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2017.

Bergmann C, Akhmetshina A, Dees C, Palumbo K, Zerr P, Beyer C, Zwerina J, Distler O, Schett G, Distler JH. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β induces dermal fibrosis by activation of the canonical Wnt pathway. *Annals of the rheumatic diseases.* 2011;70(12):2191-2198.

Beyer C, Schramm A, Akhmetshina A, Dees C, Kireva T, Gelse K, Sonnylal S, de Crombrughe B, Taketo MM, Distler O. β -catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2012;71(5):761-767.

Birkedal-Hansen H, Butler WT, Taylor RE. Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calcif Tissue Res.* 1977;23(1):39-44.

Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res.* 2005;84(5):390-406.

Bosshardt DD, Sculean A. Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontol 2000.* 2009;51:208-219.

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7(3):302-310.

Bright R, Hynes K, Gronthos S, Bartold PM. Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review. *J Periodontal Res.* 2015;50(2):160-172.

Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1993;2:57-71.

Brugmann SA, Goodnough LH, Gregorieff A, Leucht P, ten Berge D, Fuerer C, Clevers H, Nusse R, Helms JA. Wnt signaling mediates regional specification in the vertebrate face. *Development*. 2007;134(18):3283-3295.

Burgy O, Königshoff M. The WNT signaling pathways in wound healing and fibrosis. *Matrix Biology*. 2018.

Cabrini RL, Carranza FA. Histochemical study on alkaline phosphatase in normal gingivae, varying the pH and the substrate. *J Dent Res*. 1951;30(1):28-32.

Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 3):395-402.

Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*. 2007;32(2):103-110.

Canhão H, Fonseca J, Queiroz M. Epidemiologia da osteoporose, mecanismos de remodelação óssea e factores protectores do osso. *Acta reum port*. 2005;30:225-240.

Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, Nadesan P, Wei Q, Poon R, Alman BA. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med*. 2007;4(7):e249.

Cho MI, Garant PR. Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat. *Anat Rec*. 1996;245(2):342-360.

Clark RA. Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin*. 1993;11(4):647-666.

Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149(6):1192-1205.

Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(4):309-315.

Dacic S, Kalajzic I, Visnjic D, Lichtler AC, Rowe DW. Colla1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression. *J Bone Miner Res*. 2001;16(7):1228-1236.

Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology*. 2007;22(5):303-309.

Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*. 2001;45(5-6):695-706.

Eisenmann DM. Wnt signaling. *WormBook*. 2005:1-17.

Fedde KN, Cole DE, Whyte MP. Pseudohypophosphatasia: aberrant localization and substrate specificity of alkaline phosphatase in cultured skin fibroblasts. *Am J Hum Genet*. 1990;47(5):776-783.

Foster BL, Somerman MJ. Regenerating the periodontium: is there a magic formula? *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(4):285-291.

Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*. 2001;359(Pt 1):1-16.

Frame S, Cohen P, Biondi RM. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell*. 2001;7(6):1321-1327.

Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, Shen Z, Patel N, Tai YT, Chauhan D, Mitsiades C, Prabhala R, Raje N, Anderson KC, Stover DR, Munshi NC. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(2):371-379.

Furseth R. The fine structure of the cellular cementum of young human teeth. *Arch Oral Biol*. 1969;14(10):1147-1158.

Garrett S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Annals of Periodontology*. 1996;1(1):621-666.

Gartner L, Hiatt J. *Connective tissue. Color textbook of histology, second edition*. New York: WB Saunders Company. 2001:109-128.

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*. 2005;280(39):33132-33140.

Ge W-S, Wang Y-J, Wu J-X, Fan J-G, Chen Y-W, Zhu L. β -catenin is overexpressed in hepatic fibrosis and blockage of Wnt/ β -catenin signaling inhibits hepatic stellate cell activation. *Molecular medicine reports*. 2014;9(6):2145-2151.

Gelişim SN. *Büyüme*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları. 1993:33-99.

Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. 2005;8(5):751-764.

Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(6):474-484.

Gurley KA, Rink JC, Sanchez Alvarado A. Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science.* 2008;319(5861):323-327.

Güzel EE, Atilla P, Dağdeviren A. Fibroblast ve Fibroblast Benzeri Hücreler. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.* 2006;26(4):421-429.

Hamburg EJ, Atit RP. Sustained beta-catenin activity in dermal fibroblasts is sufficient for skin fibrosis. *J Invest Dermatol.* 2012;132(10):2469-2472.

Han P, Ivanovski S, Crawford R, Xiao Y. Activation of the Canonical Wnt Signaling Pathway Induces Cementum Regeneration. *J Bone Miner Res.* 2015;30(7):1160-1174.

Han PP, Wu CT, Chang J, Xiao Y. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway by Li⁺ ions released from bioactive scaffolds. *Biomaterials.* 2012;33(27):6370-6379.

He M, Herr AE. Polyacrylamide gel photopatterning enables automated protein immunoblotting in a two-dimensional microdevice. *J Am Chem Soc.* 2010;132(8):2512-2513.

Hou LT, Yaeger JA. Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 1993;64(12):1209-1218.

Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE, Cotsarelis G. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature.* 2007;447(7142):316-320.

Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(2):95-102.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic histology: text & atlas: McGraw-Hill New York; 2003.*

Kawakami Y, Rodriguez Esteban C, Raya M, Kawakami H, Marti M, Dubova I, Izpisua Belmonte JC. Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev.* 2006;20(23):3232-3237.

Kim JB, Leucht P, Lam K, Luppen C, Ten Berge D, Nusse R, Helms JA. Bone regeneration is regulated by wnt signaling. *J Bone Miner Res.* 2007;22(12):1913-1923.

Ko JS, Bernard GW. Osteoclast formation in vitro from bone marrow mononuclear cells in osteoclast-free bone. *Am J Anat.* 1981;161(4):415-425.

Kocher T, Konig J, Dzierzon U, Sawaf H, Plagmann HC. Disease progression in periodontally treated and untreated patients--a retrospective study. *J Clin Periodontol.* 2000;27(11):866-872.

Kook SH, Lee D, Cho ES, Heo JS, Poudel SB, Ahn YH, Hwang JW, Ji H, Kim JG, Lee JC. Activation of canonical Wnt/beta-catenin signaling inhibits H₂O₂-induced decreases in proliferation and differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2016;411(1-2):83-94.

Kubo F, Takeichi M, Nakagawa S. Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development.* 2003;130(3):587-598.

Kulkarni NH, Onyia JE, Zeng Q, Tian X, Liu M, Halladay DL, Frolik CA, Engler T, Wei T, Kriauciunas A, Martin TJ, Sato M, Bryant HU, Ma YL. Orally bioavailable GSK-3alpha/beta dual inhibitor increases markers of cellular differentiation in vitro and bone mass in vivo. *J Bone Miner Res.* 2006;21(6):910-920.

Kurien BT, Scofield RH. Other notable protein blotting methods: a brief review. *Methods Mol Biol.* 2015;1312:487-503.

Kurtiş B. Rejeneratif periodontal tedavide doku mühendisliği yaklaşımları. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.* 2008;25(1):51-57.

Lang NP, Lindhe J. *Clinical periodontology and implant dentistry, 2 Volume Set:* John Wiley & Sons; 2015.

Lerner UH, Ohlsson C. The WNT system: background and its role in bone. *J Intern Med.* 2015;277(6):630-649.

Leucht P, Minear S, Ten Berge D, Nusse R, Helms JA. Translating insights from development into regenerative medicine: the function of Wnts in bone biology. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):434-443.

Lim WH, Liu B, Cheng D, Williams BO, Mah SJ, Helms JA. Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):751-759.

Majeska RJ. *Cell biology of bone. Bone mechanics handbook, 2nd ed.* Boca Raton: CRC Press. p. 2001:2-1.

Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol 2000.* 1993;3:39-63.

- Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol.* 1990;61(2):103-111.
- Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol.* 2005;6(8):777-784.
- McCauley LK, Somerman MJ. Biologic modifiers in periodontal regeneration. *Dent Clin North Am.* 1998;42(2):361-387.
- McKee MD, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec.* 1996;245(2):293-312.
- Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(9):471-480.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976;47(5):256-260.
- Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene.* 2006;25(57):7461-7468.
- Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 2002;3(1):REVIEWS3001.
- Minear S, Leucht P, Jiang J, Liu B, Zeng A, Fuerer C, Nusse R, Helms JA. Wnt proteins promote bone regeneration. *Sci Transl Med.* 2010;2(29):29ra30.
- Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics.* 2017;14(11):1037-1053.
- Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssiere B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G. Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res.* 2006;21(6):934-945.
- Murphy RM, Lamb GD. Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. *J Physiol.* 2013;591(23):5823-5831.
- Nanci A. Dentin-pulp complex. Ten Cate's oral histology development, structure, and function. 2003:192-239.

Narayanan AS. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. Collagen and related research. 1983;3(1):25-31.

Narayanan AS, Page RC. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. Coll Relat Res. 1983;3(1):33-64.

Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, Shimauchi H. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. Bone. 2009;44(5):805-812.

Neves VC, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. Scientific reports. 2017;7:39654.

Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology-e-book: Expert consult: Online: Elsevier health sciences; 2014.

Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. Anal Biochem. 2007;366(2):197-206.

Noble ME, Endicott JA, Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. Science. 2004;303(5665):1800-1805.

Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackelford G, McMahon A, Moon R, Varmus H. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. Cell. 1991;64(2):231.

Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell. 1982;31(1):99-109.

Nyman S, Gottlow J, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation by guided tissue regeneration. J Periodontal Res. 1987;22(3):252-254.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. Journal of clinical periodontology. 1982;9(4):290-296.

Oringer RJ. Biological mediators for periodontal and bone regeneration. Compend Contin Educ Dent. 2002;23(6):501-504, 506-510, 512 passim; quiz 518.

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. Journal of Cell Science. 1999;112(8):1237-1245.

Osborn JW, Price DG. An autoradiographic study of periodontal development in the mouse. *J Dent Res.* 1988;67(2):455-461.

Öztürk M, Bozkurt Y. PERİODONTAL REJENERASYONDA YENİ BİR YAKLAŞIM: TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.* 2005;8(2):119-126.

Parfitt AM. Recent developments in bone physiology. *Henry Ford Hosp Med J.* 1983;31(4):209-210.

Petersen CP, Reddien PW. A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(40):17061-17066.

Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000.* 2006;41:30-47.

Popelut A, Rooker SM, Leucht P, Medio M, Brunski JB, Helms JA. The acceleration of implant osseointegration by liposomal Wnt3a. *Biomaterials.* 2010;31(35):9173-9181.

Popelut A, Rooker SM, Leucht P, Medio M, Brunski JB, Helms JA. The acceleration of implant osseointegration by liposomal Wnt3a. *Biomaterials.* 2010;31(35):9173-9181.

Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1978;75(2):871-875.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005;4(3):138-144.

Ramseier CA, Abramson ZR, Jin Q, Giannobile WV. Gene therapeutics for periodontal regenerative medicine. *Dent Clin North Am.* 2006;50(2):245-263, ix.

Ramseier CA, Rasperini G, Batia S, Giannobile WV. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontol 2000.* 2012;59(1):185-202.

Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res.* 2003;18(10):1842-1853.

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell.* 1987;50(4):649-657.

Riss T, Moravec R. Introducing the CytoTox-ONE homogeneous membrane integrity assay. *Cell Notes*. 2002;4:6-9.

Roh MR, Kumar R, Rajadurai A, Njauw C, Ryoo UH, Chung KY, Tsao H. Beta-catenin causes fibrotic changes in the extracellular matrix via upregulation of collagen I transcription. *Br J Dermatol*. 2017;177(1):312-315.

Rooker SM, Liu B, Helms JA. Role of Wnt signaling in the biology of the periodontium. *Dev Dyn*. 2010;239(1):140-147.

Saito M, Tsuji T. Extracellular matrix administration as a potential therapeutic strategy for periodontal ligament regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(3):299-309.

Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000*. 2000;24:73-98.

Schroeder HE. *The periodontium*: Springer Science & Business Media; 2012.

Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000*. 1997;13:91-120.

Schroeder HE, Theiade J. Electron microscopy of normal human gingival epithelium. *Journal of periodontal research*. 1966;1(2):95-119.

Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodontal Res*. 1997;32(1 Pt 2):166-171.

Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 2001;22(19):2581-2593.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746.

Singh SP, Tao S, Fields TA, Webb S, Harris RC, Rao R. Glycogen synthase kinase-3 inhibition attenuates fibroblast activation and development of fibrosis following renal ischemia-reperfusion in mice. *Disease models & mechanisms*. 2015;8(8):931-940.

Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res*. 1988;67(1):66-70.

Svegliati S, Marrone G, Pezone A, Spadoni T, Grieco A, Moroncini G, Grieco D, Vinciguerra M, Agnese S, Jungel A, Distler O, Musti AM, Gabrielli A, Avvedimento EV. Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression

of the Wnt inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis. *Sci Signal*. 2014;7(341):ra84.

Taba M, Jr., Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(4):292-302.

Tanır HG, Demirezen Ş. Wnt Sinyal Yolunun Biyolojisi ve Bu Yolda Görev Alan Biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2009;29(5):1292-1297.

ten Berge D, Brugmann SA, Helms JA, Nusse R. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*. 2008;135(19):3247-3257.

Tolosa E, Litvan I, Hoglinger GU, Burn D, Lees A, Andres MV, Gomez-Carrillo B, Leon T, Del Ser T, Investigators T. A phase 2 trial of the GSK-3 inhibitor tideglusib in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord*. 2014;29(4):470-478.

van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev*. 1994;8(22):2691-2703.

van Ooyen A, Nusse R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell*. 1984;39(1):233-240.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 2003;5(3):367-377.

Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, Oriss T, Gibson KF, Feghali-Bostwick C, Kaminski N. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(5):583-589.

Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*. 2004;341:19-39.

Whyte JL, Smith AA, Helms JA. Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(8):a008078.

Whyte JL, Smith AA, Helms JA. Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(8):a008078.

Wikesjo UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000. 1999;19:21-39.

Willert K, Nusse R. beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1998;8(1):95-102.

Xiang FL, Fang M, Yutzey KE. Loss of beta-catenin in resident cardiac fibroblasts attenuates fibrosis induced by pressure overload in mice. *Nat Commun*. 2017;8(1):712.

Yaccoby S, Ling W, Zhan F, Walker R, Barlogie B, Shaughnessy JD, Jr. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood*. 2007;109(5):2106-2111.

Yazawa S, Umesono Y, Hayashi T, Tarui H, Agata K. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(52):22329-22334.

Yin X, Li J, Chen T, Mouraret S, Dhamdhare G, Brunski JB, Zou S, Helms JA. Rescuing failed oral implants via Wnt activation. *J Clin Periodontol*. 2016;43(2):180-192.

Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res*. 1992(281):275-294.

Zhang R, Yang G, Wu X, Xie J, Yang X, Li T. Disruption of Wnt/beta-catenin signaling in odontoblasts and cementoblasts arrests tooth root development in postnatal mouse teeth. *Int J Biol Sci*. 2013;9(3):228-236.

Zhao J, Kim KA, De Vera J, Palencia S, Wagle M, Abo A. R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2331-2336.

Zhou P, Byrne C, Jacobs J, Fuchs E. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev*. 1995;9(6):700-713.

9.ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Buse	Soyadı	ÖNCÜ
Doğum Yeri	MUĞLA	Doğum Tarihi	05.04.1991
Uyruğu	T.C.	Tel	555 593 55 54
E-mail	busedhf@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	-
Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2014
Lisans	-	
Lise	Muğla Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı	2016-2019

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
56,25								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MICROSOFT OFFICE PROGRAMLARI	İyi
SPSS İSTATİSTİK PROGRAMI	İyi
ENDNOTE	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

ÖZET BİLDİRİLER
ULUSLARARASI

1. **ÖNCÜ BUSE**, KIRALI BAHADIR, AĞRALI BİRKAN Ö., GÜNEŞ PEMBEGÜL, KURU LEYLA, Periodontal treatment of desquamative gingivitis as a symptom of mucous membrane pemphigoid: report of 2 cases, Euro Perio 9, Rai Amsterdam 2018, Netherlands

2. **ÖNCÜ BUSE**, YILDIRIM SELİN H., UYSAL OKAN, KURU LEYLA, Endodontik Perforasyona bağlı oluşan kemik içi defektin multidisipliner tedavisi, TDB 24. Uluslararası Dişhekimliği Kongresi, Ankara, Türkiye