

157766

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARININ
KÖK YÜZEYİNE YAPIŞMASININ KOLORİMETRİK
YÖNTEMLER VE SEM İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Periodontoloji (Dişhekimliği) Programı

Doktora Tezi

Dişhekimisi Sema ÇINAR

DANIŞMAN
Prof. Dr. Evren EVRENOSOĞLU

İZMİR-2004

İÇİNDEKİLER

Önsöz

Tablo ve şekil listesi

BÖLÜM I

Giriş ve amaç..... 1

Genel bilgiler..... 3

BÖLÜM II

Gereç ve yöntem..... 21

BÖLÜM III

Bulgular..... 30

BÖLÜM IV

Tartışma..... 47

Sonuç 59

Özet..... 61

Abstract 63

Kaynaklar 65

Özgeçmiş..... 75

ÖNSÖZ

Periodontolojide periodotal hastalık sebebiyle kaybedilen dokuların rejenerasyonu uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir konudur. Moleküler biyoloji ve biyomühendislik alanlarındaki gelişmeler periodontolojiye de yansımıştır ve periodontal iyileşme sırasında hücre fonksiyonlarının çeşitli büyüme faktörleri ile düzenlenmesine çalışılmıştır. Kök yüzeylerinin farklı ajanlarla demineralize edilmesinin ve trombosit kökenli büyüme faktörü-BB uygulanmasının, hücrelerin bu yüzeylere tutunmasına olan etkilerinin değerlendirilmesine yönelik yapılan bu *in vitro* çalışmanın *in vivo* çalışmalara ve uygulamalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen doktora yöneticim Sayın Prof. Dr. Evren Evrenosoğlu'na ve Sayın Prof. Dr. Şule Sönmez'e çok teşekkür ederim. Değerli fikirlerinden yararlandığım, tarama elektron mikroskop görüntüleme işlemlerini yürüten Sayın Prof. Dr. Hakan Bilge Şen'e, hücre kültürü işlemlerinin yürütülmesinde yol gösteren ve yardımcı olan Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Sayın İsmet Gürhan'a ve araştırma görevlisi Sayın Ayşe Nalbantsoy'a çok teşekkür ederim. Çalışmanın istatistik değerlendirmelerini yapan Mühendislik Fakültesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Yar. Doç. Dr. Timur Köse'ye ve bu çalışmanın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen tüm Periodontoloji Bölümü öğretim üyelerine, asistanlarına ve çalışanlarına en içten dileklerle teşekkür ederim. Çalışmayı destekleyen TÜBİTAK sağlık Bilimleri Araştırma Grubuna teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

<i>Tablo 1.</i>	Farklı gruplarda mm ² tutunan ortalama hücre sayısı ve standart sapmaları.....	31
<i>Şekil 1.</i>	Kültüre edilen PDL fibroblastlarının ışık mikroskop görüntüsü	22
<i>Şekil 2.</i>	Kullanılan frezler ve hazırlanan standart kök parçaları.....	23
<i>Şekil 3.</i>	Kök parçalarının parafilm içine gömülmesinden sonraki görüntüsü.....	25
<i>Şekil 4.</i>	Hücrelerin XTT solüsyonuyla muamelesinden sonra oluşan renk değişikliği	26
<i>Şekil 5.</i>	Demineralize edilmiş ve edilmiş kök yüzeylerinde mm ² 'de tutunan hücre sayısı	31
<i>Şekil 6.</i>	Farklı demineralizasyon uygulamalarına göre mm ² 'de tutunan hücre sayısı	32
<i>Şekil 7.</i>	PDGF-BB uygulanan ve uygulanmayan yüzeylerde mm ² 'de tutunan hücre sayısı	32
<i>Şekil 8.</i>	Farklı gruplarda mm ² ye tutunan hücre sayısı	34
<i>Şekil 9.</i>	KYD uygulanan kök yüzeyi	34
<i>Şekil 10.</i>	KYD + PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi	35
<i>Şekil 11.</i>	KYD + Sitrik asit uygulanan kök yüzeyi (Dentin).....	36
<i>Şekil 12.</i>	KYD + Sitrik asit uygulanan kök yüzeyi (Sement).....	36
<i>Şekil 13.</i>	KYD + Sitrik Asit + PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi	37
<i>Şekil 14.</i>	KYD + Sitrik Asit + PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi	37
<i>Şekil 15.</i>	KYD + T-HCl uygulanan kök yüzeyi.....	38
<i>Şekil 16.</i>	KYD + T-HCl uygulanan yüzeyi.....	38
<i>Şekil 17.</i>	KYD + T-HCl+ PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi	38

Şekil 18.	KYD + EDTA uygulanan kök yüzeyi.....	39
Şekil 19.	KYD + EDTA uygulanan kök yüzeyi.....	39
Şekil 20.	KYD + EDTA + PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi.....	39
Şekil 21.	KYD uygulanan hücreli kök yüzeyi	40
Şekil 22.	KYD uygulanan hücreli kök yüzeyi.....	40
Şekil 23.	KYD + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	41
Şekil 24.	KYD + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	41
Şekil 25.	KYD + Sitrik asit uygulanan hücreli kök yüzeyi	42
Şekil 26.	KYD + Sitrik Asit + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	42
Şekil 27.	KYD + Sitrik asit + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	42
Şekil 28.	KYD + T-HCl uygulanan hücreli kök yüzeyi	43
Şekil 29.	KYD + T-HCl uygulanan hücreli kök yüzeyi	43
Şekil 30.	KYD + T-HCl + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	44
Şekil 31.	KYD + T-HCl + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	44
Şekil 32.	KYD + T-HCl + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	44
Şekil 33.	KYD + EDTA uygulanan hücreli kök yüzeyi.....	45
Şekil 34.	KYD + EDTA uygulanan hücreli kök yüzeyi.....	45
Şekil 35.	KYD + EDTA + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	46
Şekil 36.	KYD + EDTA + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	46
Şekil 37.	KYD + EDTA + PDGF-BB uygulanan hücreli kök yüzeyi	46

GİRİŞ ve AMAÇ

Periodontal tedavinin hedefi periodontal hastalık kökenli doku yıkımının durdurulması ve kaybedilen dokuların geriye iadesi yani periodontal rejenerasyondur (80, 99, 111). Periodontal rejenerasyonun gerçekleşmesi için progenitör periodontal ligament (PDL) hücrelerinin hastalıklı kök yüzeylerine göç etmesi, tutunması, çoğalması, farklılaşması ve matris birleşenlerini sentezlemesi gerekmektedir (142). Bu nedenle periodontal hastalığa bağlı olarak ağız ortamına açılmış kök yüzeylerinin, progenitör hücrelerin tutunması ve çoğalması için biyouyumlu olmaları ve kemotaktik uyaran içermeleri gerekmektedir (90).

Periodontal rejenerasyonun gerçekleşmesi için, kök yüzeylerinin demineralizasyonu (90, 119, 121), yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (21, 111), büyüme faktörleri (GF) ve adezyon moleküllerinin uygulanması (39,91,92) gibi çeşitli yöntemler veya bu yöntemlerin kombinasyonları (83, 105) kullanılmıştır.

Kök yüzeylerinin demineralizasyonu amacıyla sitrik asit, tetrasiklin hidroklorür (T-HCL), ve etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) gibi çeşitli ajanlar kullanılmıştır. Kök yüzeylerinin demineralizasyonuyla kök yüzeyinde fibriler bir yapı oluşur, kollagen lif girişleri açığa çıkar ve genişler (121, 122). Kök yüzeylerinin demineralizasyonu sonucu PDL fibroblastların kök yüzeyine tutunması kolaylaşır (84, 88). Kök yüzeylerinde enstrümantasyon sonrası oluşan smear tabakasının da demineralizan ajanların kullanımıyla uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (119).

Moleküler biyoloji ve biyomühendislik alanlarındaki gelişmeler periodontolojiye de yansımıştır ve progenitör hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesi konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. PDL fibroblastları için güçlü kemotaktik ve mitojenik olan trombosit kökenli büyüme faktörü-BB (PDGF-BB) kullanımı ile ümit verici sonuçlar alınmıştır (34, 99). PDGF-BB'nin klinikte uygulanması amacıyla sığır kollajeni ve metil selüloz gibi çeşitli taşıyıcılar kullanılmıştır. Ancak taşıyıcıların, hücre yüzey

ilişkinin bozması, immunolojik reaksiyonlara sebep olması gibi çeşitli dezavantajları vardır. PDGF-BB'nin demineralize edilmiş kök yüzeylerine uygulanmasıyla, PDGF-BB'nin bu yüzeylere tutunabileceği ve yavaş salımının sağlanabileceği bildirilmiştir. Demineralizasyon sonucu kök yüzey alanı genişlemekte ve açığa çıkan kollajene PDGF-BB bağlanabilmektedir (39, 115).

PDGF-BB'nin demineralize edilmiş kök yüzeylerine uygulanmasının, hücre tutunmasına olan etkileri değerlendirilmiş ancak farklı demineralize edici ajanların PDGF-BB ile birlikte kullanımları karşılaştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, PDGF-BB kullanımının ve farklı demineralizasyon ajanlarıyla kombinasyonunun PDL fibroblastlarının kök yüzeylerine tutunmasına olan etkisinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi ve farklı muamele edilmiş kök yüzeylerinin ve bu yüzeylere tutunan PDL hücrelerinin taramalı elektron mikroskopta (SEM) incelenmesidir.

GENEL BİLGİLER

1. Periodontal tedavinin amacı

Periodontitis fibröz ataşman kaybı, alveoler kemik yıkımı ve periodontal cep oluşumuyla karakterize enflamatuvar bir hastalıktır. Periodontitisin tedavi edilmediği durumlarda periodontal dokulardaki yıkım episodik ataklarla devam eder. Artan destek doku kaybı dişte mobilite artışına ve dişin kaybına neden olur. (51, 63, 66, 67, 87).

Periodontal tedavinin amacı doku yıkımının durdurulması ve kaybedilen dokuların geriye iadesi, yani rejenerasyonudur (109, 110, 111, 114). Rejenerasyon, yıkıma uğramış bir dokunun yapı ve fonksiyon bakımından orijinal haline geri dönmesidir. Periodontal rejenerasyon, periodontitis nedeniyle açığa çıkmış kök yüzeylerinde yeni sement oluşumu, buna gömülen fonksiyonel kollagen lifler ve yine bu liflerin gömüldüğü yeni alveoler kemik yapımıyla olur (78, 81, 99).

Periodontal tedavinin temelini hastalığın primer etiyolojik ajanı olan mikrobiyal dental plak ve ürünlerinin uzaklaştırılmasına yönelik olan oral hijyen eğitimi, diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi oluşturur. Konvansiyonel tedavi yöntemleri ile enflamasyon elimine edilir; doku yıkımı durdurulur; ancak rejenerasyon sağlanamaz. İyileşme, epitelin kök yüzeyi düzleştirilmesi yapılan alan boyunca ilerleyip uzun bağlantı epiteli oluşturmasıyla yani periodontal dokuların tamiri şeklinde olur (38, 48). Temel olarak periodontal ceplerin eliminasyonuna yönelik olan periodontal flep operasyonları sonrasında ise iyileşme yine uzun bağlantı epiteli ile olmaktadır. Ancak kemik içi lezyonlarda, defektin morfolojisi, plak kontrolü gibi faktörlere bağlı olarak flep operasyonu sonrasında farklı miktarlarda kemik dolumu izlendiği bildirilmiştir (20, 32, 136). Yapılan histolojik çalışmalarda bu defektlerde de flep operasyonu sonrasında rejenerasyon oluşmadığı, yeni kemik ile kök arasında ince uzun bir bağlantı epitelinin uzandığı gösterilmiştir (37, 102).

2. Periodontal rejenerasyon

Periodontal rejenerasyonu sağlamak için farklı yöntemler denenmiştir. Bu yöntemler kök yüzeylerinin demineralize edilerek rejenerasyon için uygun hale getirilmesi (90, 119, 121, 122, 125, 126), kemik greftleri ile defektlerin doldurulması, adezyon molekülleri veya büyüme faktörleri ile periodontal hücrelerin cevabının düzenlenmesi (39, 91, 92, 94, 105) ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu şeklinde özetlenebilir (21, 111). Bu yöntemler ve kombinasyonlarının başarısını değerlendirmek için pek çok çalışma yapılmıştır (39, 83, 105).

Periodontal yara iyileşmesi temel bazı farklılıklar haricinde vücuttaki tüm diğer dokuların yara iyileşmesi ile aynıdır. Önce yara bölgesini kan pıhtısı kaplar ve enflamasyon başlar. Daha sonra kan pıhtısı geçici bir matris oluşturarak granülasyon dokusuna dönüşür ve bu granülasyon dokusu yerini skar dokusuna veya rejenerasyon dokusuna bırakır. Gerekli hücresele olaylar hücrelerin migrasyonu, kemotaksisi, adezyonu, proliferasyonu, diferansiyasyonu ve matris bileşenleri üretmeleridir. Hücrelerin bölgeye toplanmasında hücre tipi seçimi iyileşmenin rejenerasyonla mı, yoksa tamirle mi gerçekleşeceğini belirler (19, 111, 117).

Periodontal rejenerasyonun gerçekleşmesi için yara bölgesinde çoğalması istenilen hücrelerin hangi doku kaynaklı olması gerektiği üzerinde pek çok çalışma yapılmıştır. Epitelin bağ dokusunu engellediği (36), alveoler kemik kökenli hücrelerin kök yüzeylerinde rezorpsiyona veya ankiyoza neden olduğu gösterilmiştir (79, 83). Dişeti bağ dokusunun rejeneratif özelliği olduğunu öne süren çalışmalar olmasına karşın (97) bu doku kökenli hücrelerin kökte rezorpsiyona neden olduğu ve iyileşmenin bağ doku atışmanı şeklinde gerçekleştiği bildirilmiştir (72). Yeni sement, yeni alveoler kemik ve periodontal ligamentin rejenerasyonu potansiyeline sahip hücrelerin periodontal ligament hücreleri olduğu gösterilmiştir (99, 110, 111).

3. Periodontal ligament hücreleri

Periodontal ligament, hücreler, bağ dokusu fibrilleri, hücreler arası madde, kan ve lenf damarları ve sinirlerden oluşmuştur. Periodontal ligament hücreden zengindir ve en fazla bağ dokusu hücreleri olmak üzere epitel, savunma ve nörovasküler hücreleri içerir. Periodontal ligamentteki bağ dokusu hücreleri; fibroblastlar, osteoblastlar, osteoklastlar,

sementoblastlar, sementoklastlar ve dentinoklastlardır. Periodontal ligamentin ana hücreleri olan fibroblastlar tip I kollagen, kollagen olmayan protein ve proteoglikan sentezinden sorumludur. Fibroblastlar uzun aksları kollagen fibrillere paralel olacak şekilde konumlanmışlardır (23, 30, 57).

Periodontal ligament (PDL) fibroblastları farklı fenotipte alt tür içermeleriyle diğer bağ doku hücrelerinden ayrılırlar. Bu hücrelerin bir tipi klasik yumuşak doku fibroblastları gibidir; dermis ve gingiva fibroblastlarına benzer. İkinci tipi ise osteoblast benzeridir; yüksek alkalin fosfat içerir ve kültürde mineralize doku oluşturabilme yeteneğindedir. Osteoblastik fenotipte olanlar özellikle önemlidir, çünkü sementoblastlara dönüşüp Sharpey lifi üretebildikleri düşünülür (22, 65).

Periodontal rejenerasyonda, progenitör PDL hücrelerinin kök yüzeyine migrasyonu, ataşmanı, bu bölgede proliferasyonu ve organize fonksiyonel fibröz ataşmana farklılaşmaları gerekmektedir (142). Bu yüzden kök yüzeyleri bu hücreler için biyouyumlu olmalı ve hatta kemotaktik uyaran içermeli, hücrelerin ataşmanını ve proliferasyonunu desteklemelidir (90).

Periodontal tedavinin temelini oluşturan diş yüzeyi temizliği (DYT) ve kök yüzeyi düzleştirilmesi (KYD) işlemleri ile kök yüzeylerinden plak ve diş taşı uzaklaştırılır. Hastalıklı sement kazınarak yüzeyin pürüzsüz ve sert hale gelmesi sağlanır. Ayrıca bazı çalışmalarda endotoksinin kök yüzeyi düzleştirilmesi ile kök yüzeyinden uzaklaştırılabildiği gösterilmiştir (76, 104).

4. Periodontal rejenerasyonda kök yüzeylerinin özelliklerinin önemi

Maymunlarda yaptıkları bir çalışmada, periodontal yara iyileşmesinde periodonsiyumun ve kök yüzeylerinin etkilerini araştıran Polson ve Coton (118) santral dişlerden birinde deneysel periodontitis geliştirmişler ve dişleri çekip birbirlerinin yerine reimplante etmişlerdir. Kırk gün sonra yapılan histolojik incelemede sağlıklı periodonsiyuma yerleştirilen hastalıklı kök yüzeyinde iyileşme uzun bağlantı epiteli ile gerçekleşirken, periodontal hastalık nedeniyle azalmış periodonsiyuma yerleştirilen sağlıklı dişin kök yüzeyinde bağ dokusu ataşmanı oluştuğunu belirtmişlerdir.

Periodontal hastalık nedeniyle ağız ortamına açılan kök yüzeylerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde patolojik değişiklikler oluşur (131, 132, 133). Mikrobiyal plak

ve diştaşının birikmesi sonucu kök yüzeyi bakteri ve endotoksinler ile kontamine olur (1, 4, 5, 46, 49). Sement yüzeyinde hipermineralize (8, 9, 56, 132, 133) ve demineralize (56) alanlara rastlanır. Sementin organik matrisindeki kollagen çapraz bağlar ve kollagen fibril girişleri kaybolmuştur (131, 132, 133).

Aleo ve arkadaşları (4) gingival fibroblastları kullanarak yaptıkları bir çalışmada bu hücrelerin hastalığa maruz kalmış kök yüzeyine tutunmadığını göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada, kök yüzeyinden mekanik olarak sement kaldırıldığı zaman hücrelerin yüzeye tutunduğu gösterilmiş ve periodontal tedavinin başarisının hücreler için toksik olan materyalin veya sementin tamamen uzaklaştırılmasına bağlı olduğu bildirilmiştir.

Sementin tamamen kaldırılmasının gerekliliği ve klinik olarak bu işlem için gerekli küret hareketi sayısı konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. O'Leary ve Kafrawy (112) hastalığa maruz kalmış kök yüzeylerinden 50 küret darbesi ile sementin tamamen uzaklaştıramadığını göstermişlerdir. Caldiron ve arkadaşları (43) ise sağlıklı dişlerde sementin kaldırılması için en az 20 küret darbesi gerektiğini ancak 70 küret darbesine rağmen bazı bölgelerde sementin kalabildiğini göstermişlerdir. Sementin küretlerle tamamen kaldırılması klinik açıdan mümkün bulunmamıştır (56).

Yapılan çalışmalarda sement yüzeyindeki patolojik değişikliklerin yüzeysel tabakayla sınırlı olduğu ve tamamen kaldırılmasının gerekli olmadığı belirtilmiştir. Hatta sementin yara bölgesinde çoğalan hücrelerin sementoblastlara dönüşümünü indükleyebileceği, bu yüzden kök yüzeyinde orijinal sementin bırakılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir (56, 70, 154).

5. Kök yüzeylerinin demineralizasyonu

Kök yüzeyi dzleştirmesiyle kök yüzeyindeki çoğu toksik maddenin uzaklaştırılabilmesine karşın, hipermineralize alanlar ve demineralizasyon lakünleri sorun oluşturmaktadır. Hastalıklı kök yüzeylerindeki rezorpsiyon laknlerinin derinliği 15-60 μm arada değişmektedir (56) . Hipermineralize alanların derinliği ise 40-100 μm arasındadır (132, 133). Kök yüzeyi düzleştirilmesi işleminde 20 küret darbesi ile 40-50 μm derinliğe kadar kazıma yapıldığı gösterilmiştir (43). Kök yüzeylerindeki hipermineralize ve demineralize alanlarda hastalıklı sementin kaldırılması her zaman mümkün olmamaktadır (9, 10, 11, 56, 77). Ayrıca kök

yüzeylerinin düzleştirilmesi işlemi sonucunda kök yüzeylerinde sitotoksik materyal içeren smear tabakası oluşmaktadır (76, 77, 119). Bu nedenlerden dolayı mekanik tedaviye ek olarak kök yüzeylerinin kimyasal ajanlarla biyomodifikasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Periodontal tedavide kök yüzeylerinin asitlerle muamele edilerek demineralizasyonu 1800'lü yılların sonunda denenmiş çok eski bir yöntemdir (140, 153). 1970'li yıllarda Register ve Burdick'in (121, 122) kök yüzeylerinin demineralizasyonunun periodontal rejenerasyona etkilerini değerlendirdiği çalışmalarla yeniden gündeme gelmiştir. Kök yüzeylerinin demineralizasyonu amacıyla fosforik asit, sitrik asit (41, 42, 119, 121, 122), tetrasiklin hidroklorür (T-HCl) (2, 146, 150) gibi asidik ajanlar ve etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) (27, 28, 29) gibi şelasyon ajanları kullanılmıştır.

Kimyasal ajanlarla kök yüzeylerinin demineralizasyonu, kök yüzeylerinden endotoksini, diğer toksik maddeleri (52) ve smear tabakasını (119) uzaklaştırır. Demineralizasyon ile dentin kanal ağzları açığa çıkar ve genişler. Ayrıca sement ve dentinin kollagen içeriği olan tip I kollagenin açığa çıktığı (60) ve yüzeyin fibrilli bir yapı haline dönüştüğü bilinmektedir (69). Kök yüzeyinde kollagenin açığa çıkması fibronektin gibi proteinlerin kök yüzeyine bağlanmasını artırarak, erken yara iyileşmesinde önemli olan pıhtının oluşumuna ve stabilizasyonuna katkıda bulunur. Bu sayede demineralizasyon işlemi epitel hücrelerine karşı fiziksel bir bariyer oluşturup onları yavaşlatır ve bağ doku ataşmanı oluşumu için zaman sağlar (86, 117). Kök yüzeyinde tip I kollagenin açığa çıkması ile fibroblastların kök yüzeyine migrasyonu ve bağlanması kolaylaşır (84,88). İyileşmenin sonraki aşamalarında kök yüzeyinde açığa çıkan fibril girişleri ile flep içerisindeki fibriller karşılıklı gelip birleşirler. Demineralizasyon sonucu açığa çıkan matris proteinlerinin sement ve kemik formasyonu için temel olan mineralizasyon fazını başlattığı bildirilmiştir (48). Bu özelliklerine karşın demineralize kök yüzeylerinde rezorpsiyon ve ankiloz izlenebildiği bildirilmiştir (13, 93).

5.1. Sitrik asit

Kök yüzeyinin dağlanmasında kullanılan ajanlardan biri olan sitrik asitin kök yüzeyi düzleştirilmesi yapılmamış kök yüzeylerine uygulanmasının yüzey morfolojisinde

anlamli bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca kök yüzeyi düzleştirilmesi yapılmadan sadece diş taşlarının uzaklaştırıldığı kök yüzeylerinde sitrik asit, endotoksinin uzaklaştırılmasında çok az etkili ya da etkisiz bulunmuştur (61, 129). Kök yüzeyi düzleştirilmesi yapılmayan sitrik asit uygulanmış veya uygulanmamış kök yüzeylerine hücrelerin tutunmadıkları, ancak kök yüzeyi düzleştirilmesi yapılmış ve sitrik asit uygulanmış ya da uygulanmamış kök yüzeylerine hücrelerin tutunup, çoğaldığı gösterilmiştir (4, 42).

Sitrik asitin en etkili olduğu konsantrasyon ve uygulama süresi konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Register ve Burdick (122), pH'sı 1 olan sitrik asit solüsyonunun kök yüzeylerine 2-3 dakika uygulanmasının periodontal iyileşmeyi olumlu etkilediğini, sementin ve fonksiyonel kollagen liflerin restorasyonunu sağladığını bildirmiştir. Sitrik asitin 3 dakika uygulanmasının smear tabakasını uzaklaştırdığı, kök yüzeyinde 15-19 µm derinliğinde demineralizasyon oluşturduğu (85) ve dentin veya sement matrisindeki kollagen fibrilleri açığa çıkardığı diğer araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir (61, 124).

Sterrett ve arkadaşları (137), sitrik asit demineralizasyonunun zamana bağlı lineer olarak arttığını göstermiştir. Optimum dentin demineralizasyonunun, sitrik asitin %25-30 konsantrasyonunun kök yüzeylerine 1-3 dakika uygulanmasıyla elde edildiğini bildirmiştir.

Sitrik asitin uygulanmasında farklı teknikler denenmiş ve bu tekniklerin etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Miller (100); Register ve Burdick'in (122) 1975 yılında önerdiği teknikte bazı değişiklikler yaparak, sitrik asit emdirilmiş pamukların yüzeye yerleştirilmesinden çok, tekrarlayan hareketlerle yüzeyin pamuk peletle ovalanarak uygulanmasının yani *burnishing* tekniğinin daha etkin olduğunu ve pamuk peletlerin 20 saniyede bir yenilenmesinin sitrik asitin etkinliğini artırdığını bildirmiştir. Miller (100) sitrik asitin daha yüksek konsantrasyonda ve 5 dakika uygulanması gibi değişiklikleri de önermiştir. Bu teknik smear tabakasının uzaklaştırılmasında fark yaratmamakta ve yüzeyden daha fazla inorganik madde uzaklaştırıp daha etkin demineralizasyon sağlamaktadır (52, 100, 101, 137).

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, kök parçalarının sitrik asit solüsyonunda bekletilmesi, solüsyonun kıl fırçayla sürülmesi ve solüsyon emdirilmiş pamuk peletlerin kök

yüzeyine yerleştirilmesi veya *burnishing* tekniğiyle uygulanmasının kök yüzeylerinde meydana getirdiği değişiklikler karşılaştırılmıştır. *Burnishing* tekniğiyle sitrik asit uygulanan yüzeylerin daha fibriler, diğer gruplarda ise yüzeyin daha düz olduğu izlenmiştir (138, 139, 150).

Sitrik asit demineralizasyonu ile kök yüzeyi detoksifiye edilir ve yüzey antibakteriyel özellik kazanır (47, 52). Wikesjö ve arkadaşları (151) 1991 yılında köpeklerde yaptıkları çalışmada sitrik asitle muamele edilmiş kök yüzeylerinde, serum kullandıkları kontrol grubuna oranla daha fazla bağ dokusu tamiri olduğunu göstermişlerdir. Her iki grupta da kök rezorpsiyonu aynı oranda izlenmiştir.

Köpeklerde yapılan histolojik çalışmalarda, furkasyon defektlerinde sitrik asit uygulaması başarılı bulunmuştur. Defektlerin %55-71'inde rejenerasyonun gerçekleştiği, paralel ve dikey kollagen fibrillerin yeni oluşmuş sement içine gömüldüğü bildirilmiştir. Demineralizasyon uygulanmayan kontrol grubunda ise iyileşme epitelyal ataşman oluşumuyla gerçekleşmiştir (45, 106, 107).

Ririe ve arkadaşları (124), yaptıkları histolojik çalışmada köpeklerde oluşturulan deneysel defektlerde sitrik asit demineralizasyonu uygulamışlar ve iyileşmenin, asit uygulanmamış defektlere oranla daha hızlı ve önceden tahmin edilebilir bir rejenerasyon şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Deney grubunda iyileşme 14 günde tamamlanmış ve 42 günde yeni sement oluşmuştur. Asit uygulamasının neden olduğu pulpal reaksiyon veya gingival yumuşak dokuların iyileşmesinde herhangi bir yan etki izlenmemiştir.

Bogle ve arkadaşları (31) köpeklerde yaptıkları çalışmada sitrik asit uygulaması sonucunda rejenerasyonun sadece % 8-7 defektte gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Sitrik asitin kullanıldığı *in vivo* insan çalışmalarında bazı araştırmacılar histolojik olarak yeni sement, kemik ve ataşman oluştuğunu bildirmişlerdir (3, 44). Ancak, Kashani ve arkadaşları (82), sitrik asit uyguladıkları dişlerle kontrol grubu arasında histolojik açıdan hiçbir fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Stahl ve Froum (135) ise sitrik asit uygulanan dişlerde iyileşmenin uzun bağlantı epiteli ile olduğunu göstermişlerdir.

Kontrol grubuna flep operasyonu, deney grubuna flep ve sitrik asit uyguladıkları bir klinik çalışmada, Renvert ve Egelberg (123) deney grubunda 2 mm daha fazla anlamlı ataşman kazancı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Fuentes ve arkadaşları, (54) sınıf II furkasyon lezyonlarında koronere yerleştirilen flep ve test grubunda bu operasyona ek olarak sitrik asit kullandıkları klinik çalışmada kemik dolumu ve klinik ataşman seviyesi kazancı açısından iki grup arasında fark bulamamışlardır.

5.2. Tetrasiklin hidroklorür (T-HCl)

Kök yüzeylerinin demineralizasyonunun klinik başarısını artırabilmek için *in vitro* çalışmalarda alternatif ajanlar denenmiştir. Periodontal patojenlere karşı etkili bir antibiyotik olan T-HCl' nin solüsyonlarının kök yüzeylerinin demineralizasyonunda da etkili olduğu gösterilmiştir. T-HCl'nin konsantrasyonlarının pH'ı düşüktür ve kalsiyum şelasyonu yaparak mine, dentin ve sementte demineralizasyona neden olur (2, 12). Kök yüzeylerine 100 mg/ml T-HCl solüsyonunun ile 4 dakika demineralizasyonu sonucu kollagen lif girişleri açığa çıkar ve yaklaşık 7 µm derinliğinde demineralizasyon oluşur (85).

Wikesjö ve arkadaşları (150), yaptıkları elektron mikroskop çalışmasında T-HCl'nin %10-100 mg/ml'lik solüsyonlarının smear tabakasını uzaklaştırdığını, dentin kanal ağzlarını açığa çıkardığını ve fibriler yüzey oluşturduğunu göstermişlerdir.

Trombelli ve arkadaşları (146), sement ve dentin yüzeyine 1 dakika süreyle 62,5-125 mg/ml T-HCl solüsyonu uygulamışlar ve uygulama sonrasında her iki yüzeyde de smear tabakasının uzaklaştırılmış olduğunu ve kollagen matrisin açığa çıktığını bildirmişlerdir.

Sitrik asitte olduğu gibi T-HCl uygulamasında da konsantrasyon, uygulama süresi ve tekniği önemlidir. Solüsyona emdirilmiş peletlerin kök yüzeyine yerleştirilmesi ve kök parçalarının solüsyonda bekletilmesi tekniklerine kıyasla T-HCl'in uygulanmasında *burnishing* tekniğinin daha etkin ve dentin kanal ağzları ile intertübüler fibrilleri açığa çıkarmada daha başarılı olduğu bulunmuştur (73).

Işık ve arkadaşları (74), *burnishing* tekniği ile 10-150 mg/ml arasında değişen T-HCl solüsyonlarını sağlıklı dişlerin dentin yüzeylerine 1-5 dakika sürelerle uygulamışlar ve dentin yüzeylerini taramalı elektron mikroskopunda (SEM)

incelemişlerdir. Sonuç olarak, T-HCl'nin 50-125 mg/ml konsantrasyonlarının smear tabakasını uzaklaştırdığını ve dentin tübül kanal ağzlarını genişlettiğini göstermişlerdir.

T-HCl ve türevleri diş yüzeylerine sıkıca adsorbe olur ve antimikrobiyal aktivitelerini korurlar (14). Kök yüzeylerinin T-HCl ile demineralizasyonu biyolojik olarak aktif konsantrasyonda T-HCl'nin diş yüzeyine bağlanmasını sağlar. Oral bakteriler için patojenik olan minimal inhibitör konsantrasyonun üzerindeki T-HCl, 48 saat boyunca kök yüzeylerinden salınır. T-HCl'nin aktif ve etkin konsantrasyonda yavaş salımı için dentinin bir rezervuar rolünü üstlendiği gösterilmiştir (150).

Tetrasiklinlerin antimikrobiyal özelliklerinin yanı sıra polimorf nüveli lokositler üzerinde baskılayıcı etkileri vardır. Doku kollagenaz üretimini ve kemik rezorpsiyonunu baskılayıcı özelliklerinden dolayı T-HCl'nin yara iyileşmesinde sitrik asite oranla daha faydalı olabileceği düşünülmüştür (50, 62).

Claffey ve arkadaşları (40) köpeklerde yaptıkları çalışmada T-HCl'nin sitrik asite göre daha yüzeysel demineralizasyon yapmasına rağmen yeterli kollagen matrisi açığa çıkardığını ve hatta iyileşme için daha uygun yüzey sağladığını bildirmişlerdir. Sitrik asit uygulanan yüzeylerde kök rezorpsiyonu ve ankiloz izlenirken T-HCl uygulanmış yüzeylerde rezorpsiyona rastlanmamış ancak ankiloz, koronere yakın bölgelerde sıkça izlenmiştir.

Frantz ve Polson (53) yaptıkları hayvan çalışmasında 100-200 mg/ml T-HCl solüsyonu uyguladıkları ve demineralize etmedikleri kök yüzeylerini subkutan olarak yerleştirmişler ve operasyon sonrasında 1. ve 10. günlerde deney bölgesini histolojik olarak incelemişlerdir. Araştırmacılar, demineralizasyonun smear tabakasını uzaklaştırdığını ve T-HCl uygulanmayan yüzeylere oranla fibroblastların kök yüzeyine bağlanmasını ve çoğalmasını artırdığını göstermişler, ancak sitrik asit uygulanan yüzeylerde izlenen bağ dokusu fibröz ataşmanın T-HCl uygulanan yüzeylerde görülmediğini vurgulamışlardır.

5.3. Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA)

Periodontal rejenerasyonda PDL kökenli hücrelerin defekt bölgesine göçü ve çoğalması istendiği için, defekte komşu periodontal ligamentin canlılığı çok önemlidir. Hücreler canlılıklarını ancak dar bir pH aralığında (6,8-7,4) koruyabilmektedirler (116).

Düşük pH'ya sahip demineralizan ajanlar çevre periodontal dokuların canlılığını olumsuz yönde etkileyebilir ve dokuların nekrozuna neden olabilirler (25, 26).

Blomlöf ve arkadaşları (26), maymunlarda yaptıkları marjinal iyileşme modeli çalışmasında %31 konsantrasyonda fosforik asiti farklı sürelerde kök yüzeylerine uygulamışlar ve düşük pH'ya sahip bu ajanın kök yüzeylerine 20 saniye uygulanmasının epitelin migrasyonunu engelleyerek bağ doku oluşumunu arttırdığını göstermişlerdir. Buna karşın aynı ajanın 3 dakika uygulanması periodontal iyileşmenin bozulmasına, kemik kazancının azalmasına ve dişeti çekilmesine sebep olmuştur.

Kalsiyumla şelasyon oluşturarak kök yüzeylerinde demineralizasyon etkisi gösterebilen ve nötral pH'ya sahip EDTA'nın düşük pH'lı ajanlara üstünlük sağlayabileceği düşünülmüştür. EDTA düşük pH'lı ajanlara oranla dokular ve periodontal iyileşme ile daha uyumludur (25). EDTA kollagen fibrilleri seçici olarak açığa çıkartır ve PDL hücreleri için uyumlu yüzey oluşturur (28). Mekanik tedavi ile birlikte EDTA jel uygulanması smear tabakasını uzaklaştırır ve kök yüzeyinde kollajeni açığa çıkartır. Ancak kök yüzeyi düzleştirilmesi yapılmadan EDTA kullanımı etkili bulunmamıştır. EDTA jel klinik olarak kök yüzeyi düzleştirilmesi işlemi sonrasında iyileşmeyi destekleme amaçlı kullanılabilir (29).

Blomlöf ve arkadaşları (27) yaptıkları maymun çalışmasında EDTA ve sitrik asit uygulamalarını histolojik olarak karşılaştırmışlardır. Demineralizasyon uygulamadıkları kontrol grubuna oranla EDTA ve sitrik asit uygulanan gruplarda daha az uzun bağlantı epiteli ve daha fazla bağ doku atışmanı oluştuğunu göstermişlerdir ve sitrik asit uygulamasının kontrol grubuna oranla iyileşmeyi olumlu yönde etkilemesine rağmen EDTA'ya oranla daha fazla dişeti çekilmesine neden olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Mayfield ve arkadaşları (96) yaptıkları klinik çalışmada 36 kemik içi defektin yarısını flep operasyonu ve EDTA jel uygulamasıyla, diğer yarısını ise sadece flep operasyonu ile tedavi etmişlerdir. 6 ay sonunda her iki grupta da başlangıç değerlerine göre anlamlı klinik atışman seviyesi kazancı elde edilmiştir. Ancak iki grup birbirleriyle karşılaştırıldığında klinik parametreler arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

6. Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF)

Periodontal rejenerasyon tedavilerinde diğer bir yöntem büyüme faktörleri (GF) ile periodontal hücrelerin cevabının düzenlenmesidir. Vücutta doğal olarak oluşan ve birer hücre polipeptit olan GF'ler, hücre aktivitelerini düzenleyip modifiye edebilirler. GF'ler doku tamiri sırasında gerçekleşen hücre çoğalması, migrasyonu, farklılaşması, belirli hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması ve matris sentezi gibi pek çok olayı düzenleyen medyatörlerdir. Bu olumlu özellikleri nedeniyle GF'lerin periodontal rejenerasyona da katkılarının olabileceği düşünülmüş ve bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır (34, 98, 120, 127).

PDGF, periodontolojide en çok ilgi çeken ve üzerinde çalışılan GF'lerden biridir. PDGF özellikle doku hasarı ve kemik kırıklarında trombositlerden salgılanır. PDGF salgılayabilen diğer hücreler makrofajlar, vasküler düz kas ve endotel hücreleridir (98, 55). Molekül ağırlığı 30,000 Da olan PDGF dimerik bir moleküldür. PDGF, A ve B olmak üzere iki farklı zincirden oluşabilir. Bu zincirlerin homo ve heterodimerler oluşturmasıyla 3 farklı formda PDGF meydana gelir; PDGF-AA, PDGF-AB ve PDGF-BB. PDGF'nin α ve β olarak iki ayreseptörü vardır (68). PDGF - α her 3 izoforma da bağlanabilirken PDGF- β sadece PDGF-B zincirine bağlanabilmektedir (130).

PDGF'nin PDL hücrelerinin *in vitro* koşullarda proliferasyonuna olan etkisi bir çok çalışmada gösterilmiştir (155, 58, 59). Farklı PDGF formlarının PDL hücreleri üzerindeki mitojenik etkilerine bakılmış ve tüm formlarının hücre çoğalmasını etkin bir şekilde artırdığı gösterilmiştir (113, 127). PDGF, PDL fibroblastları için kemotaktik özellik taşır ve kollagen ve total protein sentezini artırıcı etkisi vardır (95). PDGF fare periodontal ligament hücreleri için nötral epidermal büyüme faktöründen iki kat daha fazla mitojeniktir (24).

PDGF'nin dişeti fibroblastları üzerindeki etkileri konusunda da pek çok çalışma yapılmıştır. PDGF'nin bu hücrelerde hiyalüranat sentezini uyararak ekstraselüler matris oluşumuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (95). Ayrıca PDGF lipopolisakkaritlerin dişeti fibroblastları üzerindeki inhibe edici etkisini azaltır (18).

PDGF kemik hücreleri üzerinde de etkilidir. PDGF'nin *in vitro* çalışmalarda kemik hücrelerinin DNA sentezini, migrasyonunu, ve kollagen ve kollagen olmayan protein sentezini artırdığı gösterilmiştir (64).

Wang ve arkadaşları (148) köpeklerde yaptıkları çalışmada yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (GTR) ve PDGF'yi kombine olarak uygulamışlar, başarılı sonuçlar elde etmişler ve PDGF'nin membranın altındaki yara bölgesinde fibroblast proliferasyonunu artırdığını göstermişlerdir. GTR ve PDGF'nin birlikte kullanımının kemik seviyesi ve ataşman kazancını artırdığı köpeklerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (39, 115).

Nevins ve arkadaşları (105) PDGF-BB'yi kemik allogrefti ile birlikte interproksimal kemik içi ve sınıf II furkasyon defektlerine uygulamışlar ve kombine tedavi sonucunda periodontal rejenerasyon oluştuğunu histolojik olarak göstermişlerdir.

Lynch ve arkadaşları (92) yaptıkları köpek çalışmasında PDGF ve ensülin benzeri büyüme faktörünü (rh IGF-I) birlikte kullanmışlar ve kombinasyonun yeni ataşman oluşumunu uyardığını göstermişlerdir. Howell ve arkadaşları (71) bu kombinasyonu insanda uygulamışlar ve kemik dolununun kontrol grubuna oranla daha fazla oluştuğunu bildirmişlerdir.

Değişik konsantrasyondaki PDGF'nin etkilerinin değerlendirilmesi için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Canalis ve arkadaşları (35) PDGF'nin en etkili olduğu konsantrasyonun 10-100 ng/ml olduğunu bildirmişlerdir. Alvares ve arkadaşları (7), 4 ve 20 ng/ml PDGF-AA ve BB'nin PDL fibroblastları için mitojenik olduğunu göstermişlerdir. Bartold ve arkadaşları (18) 2,5-5 ve 10 ng/ml konsantrasyonlardaki PDGF'nin doza bağımlı olarak dişeti fibroblastları için mitojenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Matsuda ve arkadaşları (95) 1 ng/ml'nin altında PDGF konsantrasyonlarının fare PDL fibroblastları üzerinde hiçbir mitojenik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Gamal ve Mailhot (59), en az 50 ng/ml konsantrasyondaki PDGF-BB'nin PDL fibroblastlarının kök yüzeyine ataşmanını artırdığını ileri sürmüşlerdir.

GF'nin klinik olarak uygulanmasında iki ana sorunla karşılaşmaktadır (24). Birinci sorun kullanılan GF'nin veya birden fazla GF'nin kombinasyonunun belli bir dokunun çoğalmasını seçici olarak stimüle etmesinin sağlanmasıdır. Nishimura ve arkadaşları (108), PDGF ve diğer GF'leri kullandıkları çalışmada bu faktörlerin PDL

hücreleri için olduğu kadar dişeti hücreleri için de kemotaktik etkili olduğunu göstermişlerdir. GF'lerin geniş spektrumlu aktivitelerine bağlı olarak istenmeyen hücrelerin de yara bölgesine göçüne neden olabileceğini bildirmiştir. Daha çok pratiğe dayalı olan diğer sorun ise GF'lerin periodonsiyuma taşınmasıdır. GF'lerin klinikte kök yüzeylerine uygulanabilmesi için biyolojik olarak parçalanabilen jeller veya membranlardan yararlanabileceği düşünülmüştür. Lynch (91) ve arkadaşları PDGF-BB'yi taşıyıcı sistem olarak metil sellülozü kullanmışlardır. Rutherford ve arkadaşları (128) PDGF-BB'nin taşınmasında deksametazon ve çözünmeyen sığır kemik kollagenini kullanmışlardır. Mailhot ve arkadaşları (94) ise gözenekli polisülfona PDGF-BB'nin farklı solüsyonlarını emdirerek kullanmışlardır.

GF'lerin periodonsiyuma taşınmasında önerilen diğer bir yöntem kök yüzeylerinin demineralizasyonudur. Kök yüzeylerinin demineralizasyonu ile toplam yüzey alanı artar ve açığa çıkan kollagen, GF'ler gibi biyolojik aktif maddeler için retansiyon oluşturabilir. Cho ve arkadaşları (39), demineralize yüzeylere GF uygulanmasının GF için taşıyıcı olarak görev yapabileceğini ve kök yüzeylerinden GF'nin yavaş salınabileceğini bildirmiştir.

Köpeklerin III. sınıf furkasyon defektlerinde yapılan çalışmalarda sitrik asitle demineralize edilmiş kök yüzeylerine PDGF uygulanmış ve defekt bölgesi bariyer membranla örtülmüştür. Kontrol grubunda ise sadece bariyer membran, yani yönlendirilmiş doku rejenerasyonu uygulanmıştır. Sonuç olarak, deney grubunda daha fazla kemik dolumu ve periodontal ligament olduğu histolojik olarak izlenmiştir. Köpeklerin III. sınıf furkasyon defektlerinde demineralize edilmiş kök yüzeylerine PDGF uygulanması ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu uygulamalarının kombine kullanımı periodontal rejenerasyonda etkili bulunmuştur (39, 115).

Yapılan az sayıdaki *in vitro* çalışmada demineralize edilmiş ve edilmemiş kök yüzeylerine PDGF uygulanmasının, periodontal rejenerasyonun gerçekleşmesinde çok önemli olan progenitör hücrelerin kök yüzeylerine tutunmasına olan etkileri değerlendirilmiştir (58, 59, 154). Ancak hangi demineralize edici ajanının PDGF ile birlikte kullanımının daha başarılı olduğu konusunda *in vitro* veya *in vivo* bir çalışma yapılmamıştır.

7. Hücre kültürü çalışmaları

İnsanda ve hayvanda periodontal rejenerasyona yönelik yapılan uygulamaların periodontal rejenerasyonla sonuçlandırıldığı belirlenmesi için yeni oluşan dokuların histolojik olarak gösterilmesi gerekmektedir. Günümüzde gerek insanda, gerekse hayvanda histolojik çalışma yapmak etik açıdan pek mümkün olmamaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde kamuoyunun tercihi *in vitro* tekniklerinin kullanılmasından yanadır (17, 116).

Hücre kültürü, bir dokudan spontan migrasyonla ya da mekanik veya enzimatik yöntemlerle ayrılmış, *in vitro* yaşatılan ve üretilen hücreler topluluğudur ve izole hücre popülasyonlarının pek çok fiziko-kimyasal ve fizyolojik değişkenlerden uzak olarak incelenebildiği bir araçtır. Isı, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit tansiyonu gibi çevre şartları kontrol altındadır. Aynı pasaj düzeyindeki hücreler kullanılarak homojen materyal kaynağı sağlanır. Hücre kültürlerinin bir diğer avantajı ise düşük dozda ve kesin konsantrasyondaki test edilen ajanla hücrenin doğrudan temas etmesidir. *In vivo* şartlarda ise test edilen ajanı direkt olarak belli bir hücre tipine, belli bir konsantrasyonda uygulamak ve cevabını değerlendirmek zor, neredeyse imkansızdır (116). Ancak, hücre kültürü yöntemlerinin de bazı dezavantajları vardır. *In vivo* hücreler diğer tip hücrelerle ilişki ve etkileşim içindeyken *in vitro* şartlarda bu hücrelerden izole edilmişlerdir. Büyük miktarda materyal üretmek çok zaman alır ve pahalıdır. Hücre kültürlerinin bakteriler tarafından kontamine olmaması için belirli kurallara uyularak çok titiz çalışılması gerekir (116).

Periodontolojide yapılan hücre kültürü çalışmalarında PDL, dişeti, alveoler kemik ve sement hücrelerinin biyolojik özellikleri incelenmiş, karakterizasyonları yapılmış ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır (16, 17, 30, 31). PDL hücrelerinin *in vitro* üretilmesinde 2 temel teknik vardır. Birinci teknikte hücrelerin yüzeyden enzimle ayrılması sağlanır; ikinci teknikte ise kök yüzeylerinden kazınan biyopsi materyalinden çoğaltılırlar (31). Bu hücrelerin periodontal tedavi amaçlı uygulanan yöntemlere ve ajanlara verdikleri cevabı değerlendiren pek çok çalışma yapılmıştır (33, 58, 59, 154, 155).

Periodontal rejenerasyonda PDL fibroblastlarının kök yüzeylerine tutunmaları çok önemlidir. Bu hücrelerin kök yüzeylerine tutunma oranlarının belirlenmesi amacıyla farklı hücre kültürü teknikleri geliştirilmiş ve kullanılmıştır.

7.1. Kök yüzeyine tutunan hücrelerin sayılarının değerlendirilmesinde kullanılan teknikler

7.1.1. Kök yüzeylerinin boyanması

Hücreler kök yüzeylerine tutunduktan ve tutunmayan hücreler ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kök yüzeyi vital boyalarla boyanır ve bu boya yardımıyla hücrelerin tutundukları alan gözle görülebilir hale gelir ve değerlendirilir. Ancak bu yöntem tutunan hücrelerin sayısını belirlemez, yüzeylerin hücrelerin tutunmasına uygunluğu hakkında fikir verir (41, 42).

7.1.2. Işık mikroskobunda inceleme

Kök yüzeyine tutunmayan hücreler uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin tutunduğu kökler, çeşitli işlemlerden geçirilerek fikse edilir ve daha sonra histolojik kesitleri alınır. Kesitler ışık mikroskobunda incelenir ve rasgele seçilen belli büyüklükteki alanlarda grid yardımıyla hücre sayımı yapılır (41, 155). Ancak bu yöntemde kesitlerin hazırlanması işlemi tutunan bazı hücrelerin yüzeyden kaybına neden olur, çok sınırlı bir alandaki hücre sayısı belirlenebilir ve hücrelerin üst üste konumlanmaları doğru bir sayım yapılmasını engeller.

7.1.3. SEM’de inceleme

Hücrelerin tutunduğu kök yüzeyi SEM’de incelenerek, rasgele seçilen belli büyüklükteki alana düşen hücreler sayılır (58, 59). Bu yöntemde hücrelerin üst üste konumlanmaları doğru sayım yapılmasını engeller ve kök yüzeyinin tamamı değil oldukça sınırlı rastgele seçilen bölgeleri incelenebilir. SEM ile incelenen alanın üç boyutlu görüntüsü elde edilebildiğinden hücrelerin morfolojileri ve yüzeye tutunma özellikleri de incelenebilir. SEM farklı muamele edilmiş kök yüzeylerinin morfolojisinin incelenmesi amacıyla da kullanılır. (11, 29, 51).

7.1.4. Tripsinle hücrelerin uzaklaştırılması

Tutunan hücreler enzimatik yolla, tripsin kullanılarak kök yüzeylerinden ayrıldıktan sonra tripan mavisi ile boyanır ve mikroskopta sayılır. Sayım işlemi için hemositometre veya elektronik sayıcılar kullanılmaktadır. Bu yöntem subjektiftir ve tutunan hücre sayısını kesin olarak vermemektedir (33). Bu yöntemle, hücreler kök yüzeylerinden tam olarak uzaklaştırılmaz ve bu durum da tutunan hücre sayısının kesin olarak belirlenmesini engeller. Ayrıca ışık mikroskopta hücrelerin hemositometre ya da elektronik sayıcılar kullanılarak sayılması işlemi sırasında da hücrelerin kümelenmeleri gibi nedenlerden kesin hücre sayısına ulaşamamaktadır.

7.1.5. Radyoizotop çalışmaları

Hücreler radyoaktif maddelerle işaretlenir. İşaretlenen hücreler kök yüzeylerine ekilir ve test için belirlenen süre sonrasında tutunmayan hücreler yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Hücrelerin tutunduğu kök yüzeyleri dondurulup çeşitli işlemlerden geçirilir. Son olarak spektrometrik ölçüm yapılır ve ekilen hücrelerin yüzde kaçının tutunduğu belirlenir (125, 143). Radyoizotop çalışmaları özel laboratuvar, izin gerektiren ve çok pahalı olan çalışmalardır. Bu çalışmalarda radyoaktif maddeler kullanıldığı için çevre ve çalışan kişiler için risk taşırlar.

7.1.6. Enzimatik yöntem

Tutunan hücrelerin sayısının belirlenmesinde metabolik faaliyetlerinden faydalanan yöntemler de vardır. Bu yöntemler ile hücrelerin salgıladığı bir enzimin miktarı ya da belli bir süre sonundaki metabolik ürün miktarı ölçülür. Örneğin laktad dehidrogenaz (LDH) testi belli yüzeylere hücre ataşmasının değerlendirilmesinde kullanılan enzimatik bir testtir. Periodontolojide mekanik kuvvetlerin veya çeşitli ilaçların, PDL fibroblastlarının ataşmanına olan etkisini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır (144, 147). LDH özel kit ve laboratuvar gerektiren bir testtir.

7.1.7. Kolorimetrik Yöntem

Hücre sayısının belirlenmesinde çeşitli tetrazolyum tuzları kullanılarak kolorimetrik ölçüm yapılmaktadır. 3-(4,5-dimetil thiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT), testlerinde vital hücrelerin tetrazolyum tuzunu metabolize etmeleri sonucu oluşan formazan tuzu miktarı kolorimetrik olarak değerlendirilir (75). Bu yöntemle kök yüzeyine tutunan hücreler uzaklaştırılmadan doğrudan ölçüm yapılabilmektedir. Tetrazolyum tuzları, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından parçalanarak ortama sarı-turuncu renkte tetrazolyum formazan yan ürünü salmaktadır ve bu sayede metabolik olarak aktif hücrelerin miktarı hesaplanabilmektedir. Bilinen miktarlarda hücrelerin belli süre MTT ile muamele edildikten sonra bekletildikleri ortamın absorbansı ölçülerek absorbans eğrisi elde edilir. Kök yüzeylerine tutunmuş olan hücreler de yine bu tuzlarla muamele edilerek bekletildikleri vasatın absorbans değeri ölçülür ve absorbansa karşılık gelen hücre sayısı hesaplanarak kök yüzeyine tutunan hücre sayısı belirlenir. MTT metabolizasyonu sonucu çözünmeyen bir formazan kristali oluşur ve spektrofotometrik ölçüm öncesi bu kristali çözücü işlemlerin yapılması gerekmektedir. Son yıllarda geliştirilen (2,3)-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamin)-karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit (XTT) tuzunun koenzim-Q ile hazırlanan solüsyonunun metabolizasyonu sonucu oluşan formazan, ek işlemler gerektirmeden suda çözünebilir yapıdadır ve çok daha kısa sürede ölçüm yapılmasına olanak sağlar. Test sonucunda diğer yöntemlerin aksine hücreler zarar görmez ve morfolojilerinde değişiklik olmaz. (6, 141). Yeni bir yöntem olan XTT'yi kullanarak Şen (141) ve arkadaşları dentin yüzeyine *Candida albicans* ataşmanını incelemişlerdir.

Literatürde XTT'nin periodontal ligament hücrelerinin kök yüzeyine ataşmanının değerlendirilmesi amacıyla kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Daha önce de belirtildiği gibi periodontal rejenerasyonda başarısı gösterilen PDGF-BB'nin periodonsiyuma taşınması çözümlenememiş bir sorundur (24, 105). Periodontolojide yıllardır üstünde çalışılan bir konu olan kök yüzeylerinin demineralizasyonu, yüzey alanını artırır ve kollagenin açığa çıkmasını sağlar. Demineralize edilmiş kök yüzeylerinin PDGF-BB için rezervuar olabileceği ve PDGF-BB'nin yavaş salımını sağlayabileceği düşünülmüştür (39). PDGF-BB'nin kök yüzeyleri demineralize edildikten sonra kök yüzeylerine uygulanmasının hücre tutunmasına olan etkileri

değerlendirilmiş ancak farklı demineralize edici ajanların PDGF-BB ile birlikte kullanımları karşılaştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, PDGF-BB kullanımının ve farklı demineralizasyon ajanlarıyla kombinasyonunun PDL fibroblastlarının kök yüzeylerine tutunmasına olan etkisini XTT yöntemiyle değerlendirmek ve farklı muamele edilmiş kök yüzeyleri ve bu yüzeylere tutunan PDL hücrelerinin morfolojilerini SEM’de incelemektir.



GEREÇ ve YÖNTEM

1. Hücre kültürlerinin hazırlanması

Bu çalışmada dişlerin çekimi ve kök parçaların hazırlanması işlemleri Ege Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı'nda, PDL fibroblastlarının üretilmesi, kök parçalarının çeşitli solüsyonlarla muamelesi ve XTT testi Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda ve çalışmadaki SEM incelemeleri ve görüntülemeleri Ege Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Anabilim Dalı'nda yürütüldü.

Araştırmada kullanılan insan PDL hücreleri, 14 yaşındaki sağlıklı bireylerin ortodontik çekim endikasyonu konulmuş sağlıklı premolar dişlerinden, Helsinki Bildirgesi uyarınca hastaya ve velisine açıklama yapıp yazılı onayları alındıktan sonra elde edildi. Hücrelerin elde edilmesinde bazı ufak değişiklikler yapılarak Somerman'ın 1988 yılında kullandığı yöntem uygulandı (134). Çekim öncesi hastanın oral hijyenin iyi seviyede olması sağlandı ve çekim mümkün olduğunca kök yüzeyine zarar vermeden yapıldı. Çekilen dişler *Dulbecco's modified Eagle medium/F-12* (DMEM/F-12)*, NaHCO₃ (%0,1), penisilin (400 U/ml)/streptomisin (400 µg/ml)[†] ve amfoterisin B[‡] içeren taşıma solüsyonuna konuldu. En geç 2 saat içinde laminar akışlı kabin[§] içerisinde kökün orta 1/3'lük kısmından periodontal ligament dokuları steril cerrahi bistüri ile kazındı ve 35 mm çaplı kültür petrilere alındı. Üzerine 0,5 ml fetal dana serumu (FBS)[‡] ilave edilerek rutubetli % 5 CO₂'li inkubatörde** 37°C' de inkube edildi. 2 günlük periyotlarla FBS (%20), NaHCO₃ (%2), penisilin (400 U/ml)/streptomisin (400 µg/ml) ve amfoterisin B (0.25 µg/ml) içeren DMEM F/12 kullanılarak vasat değişikliği yapıldı. Ortalama 30 gün içerisinde fibroblastlar kültür kabının yüzeyini kapladı. Bu süre

* Biochrom, Almanya

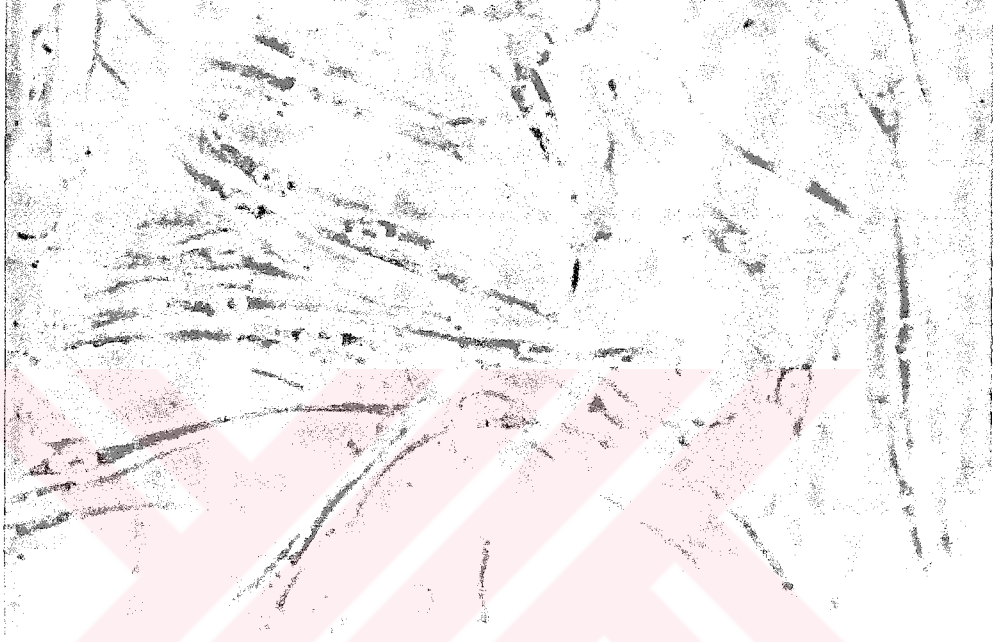
† Biochrom, Almanya

‡ Biochrom, Almanya

§ Heraeus, Almanya

** Heraeus, Almanya

sonunda tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak hücreler yüzeyden ayrıldı ve 25 cm² kültür flasklarına aktararak pasajlandı. Pasajlama işlemine 5. pasaja kadar devam edildi, 3. ve 5. pasajlarda hücreler -196°C'de sıvı azot içinde dondurularak saklandı. Çalışmada 5. pasaj hücreleri kullanıldı (16) (Şekil 1).

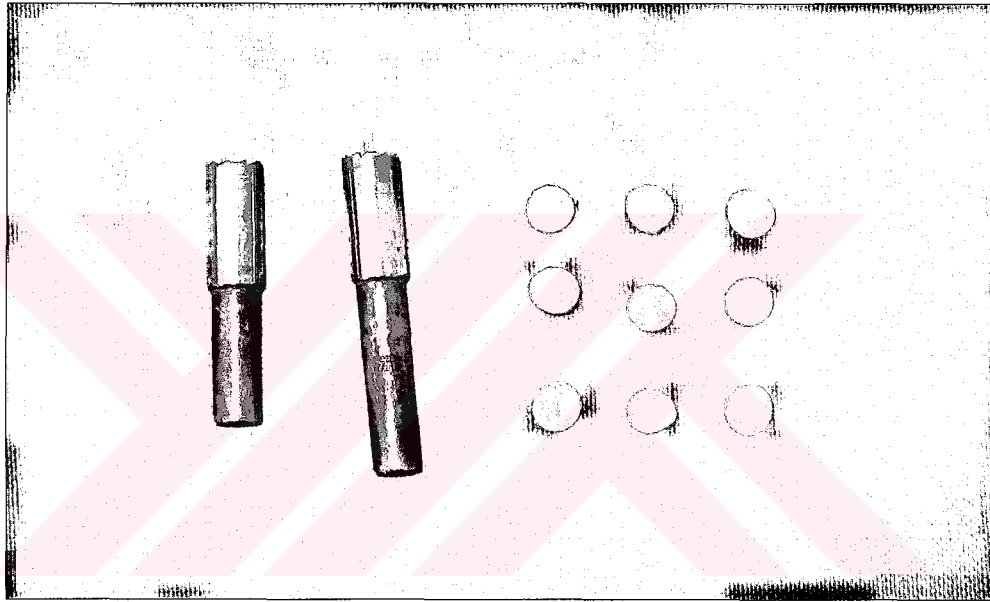


Şekil 1. Kültive edilen PDL fibroblastlarının ışık mikroskop görüntüsü.

2. Kök parçalarının hazırlanması

Dentin bloklarının hazırlanmasında periodontal çekim endikasyonu konulmuş apikal 1/3'ten az periodontal desteği kalmış, çürüksüz, restorasyonsuz dişler hastaların yazılı onayı alınarak kullanıldı. Çekimden önce dişin 6 bölgesinden ataşman kaybı belirlendi. Çekimden sonra steril serum fizyolojik ile yıkanan dişler timol (%0,1 sol.) içerisinde saklandı. Deney öncesinde dişlerin üzerindeki diş taşları ve eklentiler ultrasonik alet kullanılarak uzaklaştırıldı. Her bölgeye *Gracey 5/6* küretlerle 15 küret darbesi uygulanacak şekilde tüm dişlere kök yüzeyi düzleştirilmesi yapıldı. Küretlerin keskinliğinin standardizasyonu için her 15 küret darbesinden sonra aletler bilendi. Toplam 40 dişten 80 kök parçası elde edildi. Çekim öncesi kaydedilen ataşman kaybı değerlerine göre periodontal cebin koronere en yakın taban noktası kriter alınarak yatay

bir kesim ile kökün apikal ucu uzaklaştırıldı. Dişlerin, mine sement sınırının 1 mm apikalinden geçen düzlemden ikinci bir yatay kesim yapılarak kron kökten ayrıldı. Periodontal patojenlere maruz kalmış olan kökler, kök kanalının içinden geçen ve kökün uzun aksına paralel bir düzlemden kesilerek ikiye ayrıldı. Pulpal yüzeye bir oluk açılarak kökün dış yüzeyiyle karışması engellendi. Özel olarak yaptırılan silindirik iç çapı 5mm olan frezler kullanılarak bu köklerden 5 mm çaplı standart kök parçaları elde edildi (Şekil 2) (15, 151).



Şekil 2. Kullanılan frezler ve hazırlanan standart kök parçaları.

Hazırlanan kök parçaları 8 gruba ayrılarak aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Yalnızca kök yüzeyi düzleştirilmesi (KYD)
2. KYD + PDGF-BB uygulanması
3. KYD + sitrik asitle dağlama
4. KYD + sitrik asitle dağlama + PDGF-BB uygulanması
5. KYD + T-HCL ile dağlama
6. KYD + T-HCL ile dağlama + PDGF-BB uygulanması
7. KYD + EDTA ile dağlama
8. KYD + EDTA ile dağlama + PDGF-BB uygulanması

3. Sitrik asit uygulaması

50 ml distile suya anhidroz sitrik asit yavaş yavaş eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım doygunluk noktasına ulaşana kadar, yani distile su daha fazla kristal alamayacak duruma gelene kadar, sitrik asit eklemeye devam edildi. Mikro filtreden süzöldükten sonra solüsyon kullanıma hazır hale getirildi. Sonuçta pH'ı 1 olan sitrik asit solüsyonu elde edildi. Pamuk peletlere emdirilen solüsyon kök yüzeylerine 4 dk uygulandı. Uygulama süresince dakikada 2 kez peletler yenilendi. İşlem tamamlanınca dişler fosfat tamponlu serumda (PBS) ile 30 saniye yıkandı (137).

4. T-HCl uygulaması

125 mg/ml'lik T-HCl solüsyonu, 250 mg'lık tetrasiklin kapsülünün 2 ml steril serum fizyolojik içinde eritilmesi ile elde edildi. Pamuk peletlere emdirilen solüsyon kök yüzeylerine 4 dk uygulandı. Uygulama süresince dakikada 2 kez peletler yenilendi. İşlem tamamlanınca dişler PBS ile 30 saniye yıkandı (146).

5. EDTA uygulaması

%24'lük, pH'sı 7 olan EDTA solüsyonu kullanıldı. Pamuk peletlere emdirilen solüsyon kök yüzeylerine 4 dk uygulandı. Uygulama süresince dakikada 2 kez peletler yenilendi. İşlem tamamlanınca dişler PBS ile 30 saniye yıkandı (27).

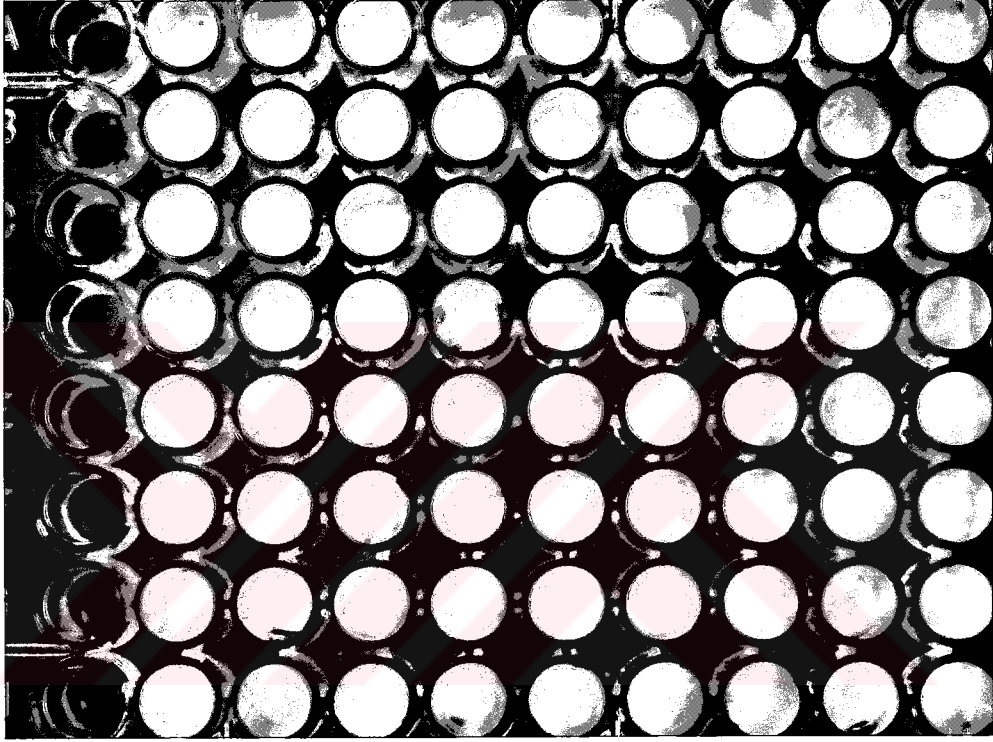
Daha sonra demineralizasyon uygulanan ve uygulanmayan kök yüzeyleri ayrı gruplar halinde 1000 U/ml penisilin ve 1000 µg/ml streptomisin solüsyonunda bir gece bekletildi.

6. PDGF solüsyonunun hazırlanması

10 µg/ml *recombinant human* PDGF-BB^{††}, %0,1 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren 20 ml minimum essential medium (MEM) solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyonun içinde kök parçaları 10 dakika bekletildi. PDGF-BB uygulanmayan gruplardaki kök parçaları ise 10 dakika PBS'te bekletildi. Daha sonra tüm kök parçaları çıkartılıp steril ortamda 10 dakika kurutuldu (154).

^{††} Sigma-Aldrich, Amerika

96 gözlü kültür kabı kullanılarak her göze katlanmış steril parafilm konuldu ve üzerine bir kök parçası pulpal yüzeyi ve yan yüzeyleri parafilm içerisine gömülecek şekilde yerleştirildi. Böylece ekilecek hücrelerin tutunabilmesi için sadece kök yüzeyi düzleştirilmesi yapılan ve farklı solüsyonlarla muamele edilen kök yüzeyleri açık kaldı (Şekil 3).



Şekil 3. Kök parçalarının 96 gözlü mikro pleytinde parafilm içine gömülmesinden sonraki görüntüsü.

Çalışmada kullanılacak olan 5. pasaj hücreleri, tripsin-EDTA solüsyonu ile tutundukları flasklardan kaldırılarak bir santrifüj tüpünde toplandı. Tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 10 ml DMEM eklendi. Eklenecek DMEM solüsyonundan 50 µl alınarak tripan mavisini ile boyandı. Boyanan hücreler ışık mikroskopunda sayıldı. Sayımdan elde edilen sonuç kullanılarak toplam hücre sayısı hesaplandı ve kök yüzeylerine ekilmek üzere mililitresinde 10^6 PDL fibroblastı içeren PBS hazırlandı.

Her gruba ait 10 kök parçasının yerleştirildiği gözlerden 7'sine 10^6 PDL fibroblastı/ml PBS solüsyonundan 100µl eklendi. Gruplara ait diğer 3 göze ise hücre içermeyen PBS'den 100µl eklendi. Tüm kök parçaları 2 saat etüvde inkübe edildi. 2 saat sonunda her gözdeki solüsyon çekildi ve tutunmamış hücrelerin uzaklaştırılması için fazla basınç uygulanmadan kök yüzeyleri 100µl PBS ile yıkandı. Aynı işlem hücre ekilmeyen gözlerle de uygulandı. Gözlerdeki PBS uzaklaştırıldıktan hemen sonra XTT^{††} solüsyonu eklendi.

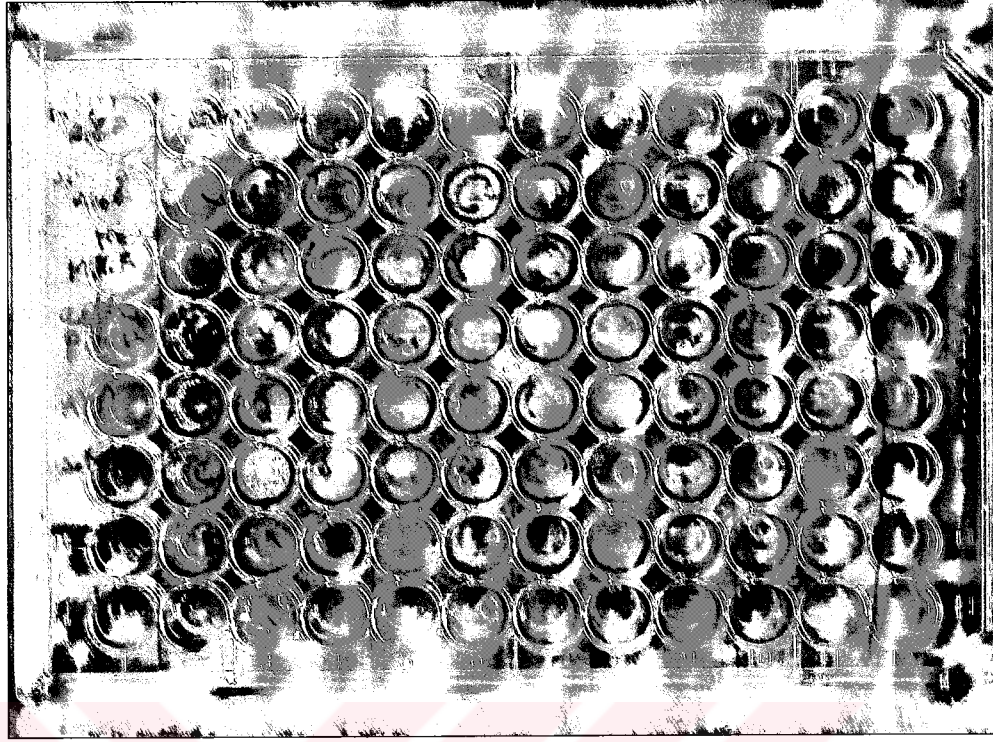
7. XTT testi

Solüsyonda kullanılması gereken XTT ve XTT'yi aktif hale getiren ko-enzim Q₀'ın oranları yapılan ön çalışmalarda belirlendi. XTT solüsyonu stabil olmayan bir solüsyon olduğu için hücrelerin tutunması için beklenen 2 saatlik sürede taze olarak hazırlandı. 10 ml PBS içerisinde 8 mg XTT çözdürüldü ve mikro filtreden geçirilerek steril edildi. Bir başka tüpte yine 10 ml PBS içerisinde 0,8 mg ko-enzim Q₀ çözdürülüp mikrofiltreden süzülerek steril edildi. İki solüsyon da karanlıkta bekletildi ve kullanımdan hemen önce karıştırılarak XTT + ko-enzim Q₀ solüsyonu elde edildi (141).

Hücre ekilen ve ekilmeyen kök parçalarının bulunduğu her göze 100µl hazırlanan XTT + ko-enzim Q₀ solüsyonu eklendi ve inkubatörde 30 dakika inkübe edildi. Bu süre içerisinde canlı hücreler mitokondriyal dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla XTT'yi metabolize ettiği için ortama sarı-turuncu renkli, suda çözünebilen tetrazolyum formazan yan ürününü saldı. Gözlerdeki renklenmiş solüsyon farklı 96 gözlü pleyte aktarılarak mikropleyt okuyuculu spektrofotometre^{§§} kullanılarak 450 nanometre dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı (Şekil 4).

^{††} Appli Chem, Almanya

^{§§} Moleculer Devices, Amerika



Şekil 4. Hücrelerin XTT solüsyonuyla muamelesinden sonra oluşan renk değişikliği

Absorbans ile hücre sayısı arasındaki ilişkiyi bulmak için biri deney test gününde olmak üzere 3 ayrı günde, ışık mikroskopta bahsedilen teknikle sayım yapılarak ml'de 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 PDL fibroblastı içeren PBS solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonların ve hücre içermeyen PBS solüsyonunun, her birinden en az 3 örnek olacak şekilde $100 \mu\text{l}$ 'si 96 gözlü kültür kabının gözlerine yerleştirildi ve hücrelerin tutunması için 2 saat inkubatörde inkübe edildi. Daha sonra gözlerdeki solüsyon uzaklaştırıldı ve her göze $100 \mu\text{l}$ XTT solüsyonu eklendi ve yarım saat inkübe edildi. Yarım saat sonunda gözlerdeki renklenmiş solüsyon farklı 96 gözlü kültür kabına aktarılarak mikropleyt okuyuculu spektrofotometre kullanılarak 450 nanometre dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Aynı miktarda hücre içeren gözlerden ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı. Yukarıda verilen miktarlardaki hücre sayılarıyla bunlara karşılık gelen ortalama absorbans değerlerinden Curve Expert adlı istatistik programı kullanılarak absorbans-hücre sayısı eğrisi elde edildi.

Farklı gruptaki hücre ekilmeyen kök yüzeylerine karşılık gelen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değerler aynı gruptaki hücreli kök yüzeylerine

karşılık gelen absorbans değerinden çıkartıldı. Bu sayede kullanılan demineralizan ajanların ya da diğer solüsyonların renge etkileri elimine edildi. Her gruptaki hücreli kök yüzeyleri için ayrı ayrı hesaplanan bu absorbans değerlerinin, Curve Expert adlı programda elde edilen absorbans eğrisiden karşılık geldiği hücre sayıları hesaplandı. Her kök yüzeyine ait toplam fibroblast sayısı bu şekilde belirlendikten sonra bu sayı kök yüzeyinin alanına bölünerek mm^2 'deki hücre sayısı hesaplandı (6, 141).

8. SEM incelemesi

XTT testi bittikten hemen sonra 8 grubun her birinden 2' si hücresiz 3'ü hücreli olmak üzere 5'er kök yüzeyi SEM taraması için hücre ataşmanının ayrıntılı görüntülenmesine olanak sağlayan bir teknikle hazırlandı. Kök yüzeylerine tutunan hücrelere zarar vermeden kök parçaları buldukları gözlerden çıkarıldı ve 30 saniye PBS ile yıkandı.

İşlemler 4°C buz üstünde yapıldı. Kök parçaları grup farklılıklarına dikkat edilerek hücreli ve hücresiz kökler ayrı olacak şekilde 24 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Her göze kök yüzeylerini tamamen örtecek miktarda 0,1 M kakodilat ve %5 glutaraldehit içeren tampon A çözeltisi (pH 7,2) eklendi ve kökler bu tampon içerisinde 4°C 'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra kök yüzeyleri 0,1 M kakodilat ve %7 sukroz içeren tampon B ve arkasından 0,1 M kakodilat ve % 2 ozmiyum tetroksit^{***} içeren tampon C çözeltilerinde 30'ar dakika bekletildi. Örnekler oda sıcaklığına alınıp 5'er dakika sırasıyla %35, %70, %85, %95, %100'lük etanol solüsyonlarında bekletilerek kurutuldu. Hekzametildisilazan^{†††} solüsyonunda 5 dakika bekletilen örnekler oda sıcaklığında 30 dakika kurutuldu. Pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilen ve karbon boya ile yapıştırılan örnekler yaklaşık 200 Å kalınlığında altınla kaplanarak JSM-5200 taramalı elektron mikroskopunda^{†††} incelendi. Sadece KYD uygulanmış ve farklı ajanlarla demineralize edilmiş kök yüzeylerinin özellikleri ve bu yüzeylere hücrelerin tutunması, tutunan hücrelerin morfolojileri değerlendirildi. Hücrelerin ekildiği ve ekilmediği her kök yüzeyinin farklı büyütmelerde fotoğrafları çekildi.

^{***} Sigma-Aldrich, Amerika

^{†††} Sigma-Aldrich, Amerika

^{†††} JEOL, Tokyo, Japonya

9. İstatistiksel analizler

Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümünde SPSS paket programı kullanılarak 4x2 (yüzey modifikasyonları+PDGF-BB uygulaması) faktöriyel tesadüf parselleri modeline göre varyans analizi uygulanarak farklı gruplara ait kök yüzeylerinde mm^2 'ye düşen hücre sayıları karşılaştırıldı.



BULGULAR

1. XTT testi sonuçları

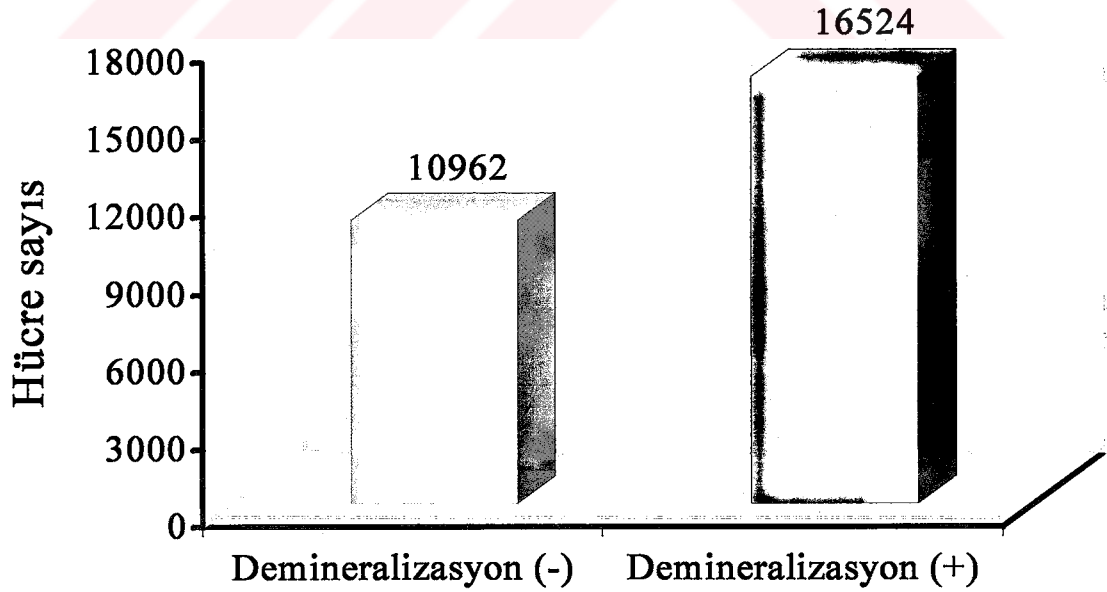
1.1. Kök yüzeylerinin demineralizasyonunun değerlendirilmesi

Yapılan varyans analizine göre demineralizasyon uygulanan ve uygulanmayan kök yüzeylerinde mm^2 'ye düşen hücre sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$). Ancak ortalamalara bakıldığında demineralize edilmemiş kök yüzeylerinde mm^2 tutunan ortalama hücre sayısı 10962 iken demineralize edilen kök yüzeylerinde mm^2 tutunan ortalama hücre sayısının 16524'e yükseldiği görüldü (Şekil 5). Yüzey demineralizasyonlarına göre mm^2 'ye düşen ortalama hücre sayısı tablo 1'de verilmiştir.

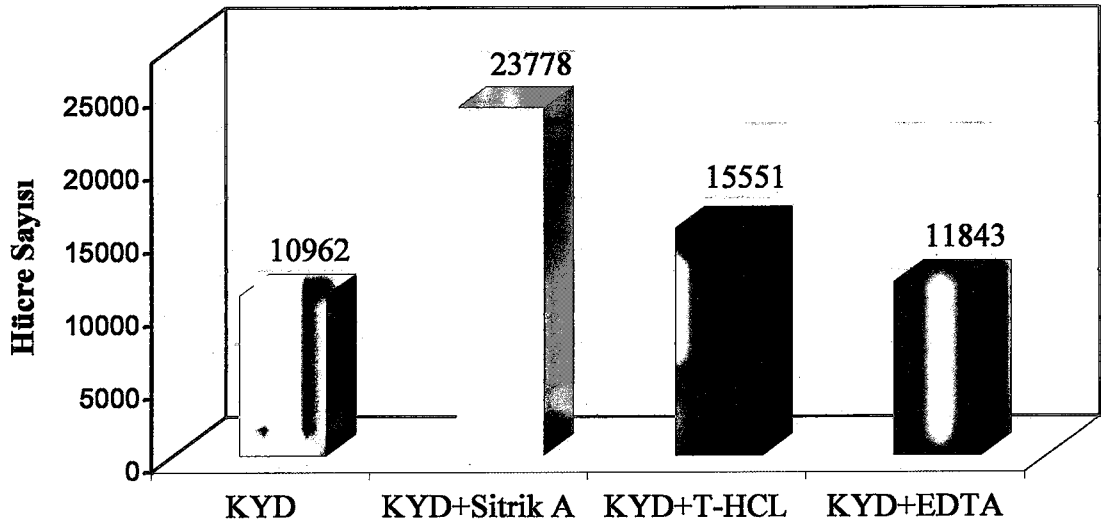
Ortalamalara bakıldığında en fazla hücre tutunan yüzeylerin mm^2 'ye düşen hücre sayısının 23778 olduğu sitrik asit uygulanan yüzeyler, en az hücre tutunan yüzeylerin de mm^2 'ye düşen hücre sayısının 10962 olduğu demineralizasyon uygulanmayan yüzeylerde olduğu görüldü (Şekil 6). Farklı demineralizan ajanların uygulandığı kök yüzeylerinde mm^2 'ye tutunan hücre sayıları arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,005$).

Gruplar	PDGF-BB	Ortalama	Standart Sapma
1. KYD	Yok	11821	9728
2. KYD	Var	10225	5894
3. KYD + Sitrik Asit	Yok	11401	11977
4. KYD + Sitrik Asit	Var	32030	30288
5. KYD + T-HCl	Yok	23678	28324
6. KYD + T-HCl	Var	7423	3765
7. KYD + EDTA	Yok	11679	5284
8. KYD + EDTA	Var	11984	10165
1 + 3 + 5 + 7 Toplam	Yok	14940	16453
2 + 4 + 6 + 8 Toplam	Var	15084	16657

Tablo 1. Farklı gruplarda mm² tutunan ortalama hücre sayısı ve standart sapmaları



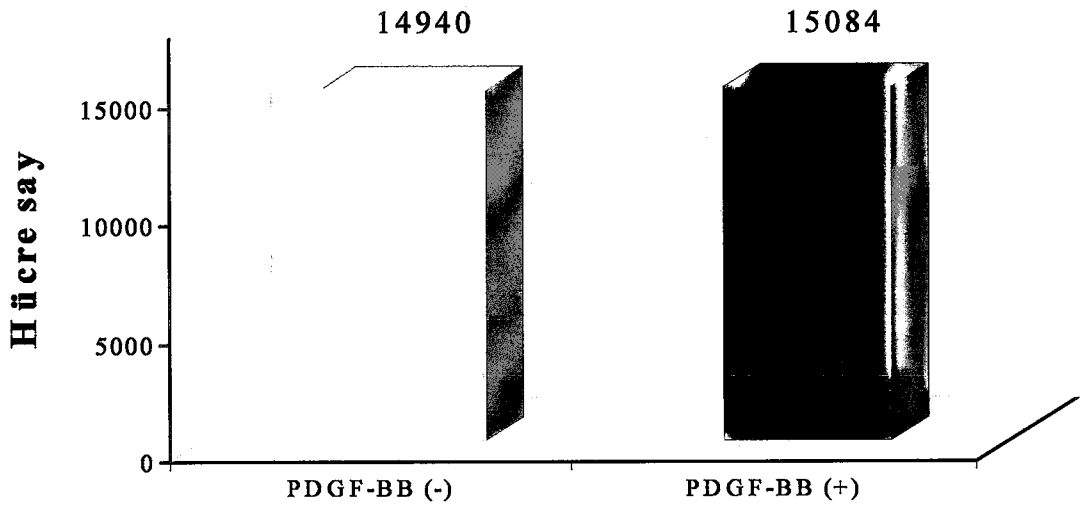
Şekil 5. Demineralize edilmiş ve edilmemiş kök yüzeylerinde mm²'de tutunan hücre sayısı.



Şekil 6. Farklı yüzey demineralizasyon uygulamalarına göre mm²'de tutunan hücre sayısı.

1.2. PDGF-BB uygulanmasının değerlendirilmesi

Yapılan varyans analizine göre PDGF-BB uygulanan ve uygulanmayan kök yüzeylerinde mm²'ye düşen hücre sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı (P>0,05). Ortalamalara bakıldığında PDGF-BB uygulanan tüm yüzeylerde mm²'ye düşen ortalama hücre sayısı 14940 ve PDGF-BB uygulanmayan yüzeylerde ise bu sayının 15084 olduğu belirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. PDGF-BB uygulanan ve uygulanmayan yüzeylerde mm²'de tutunan hücre sayısı.

1.3. Gruplar Arası Değerlendirmeler

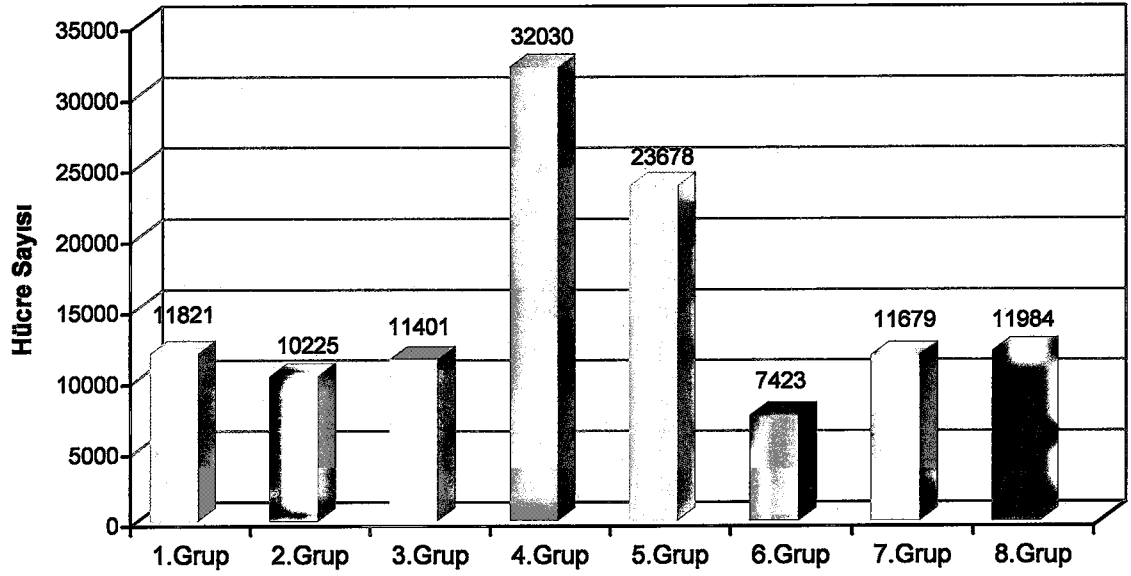
Yapılan 4x2 (yüzey modifikasyonları + PDGF-BB uygulaması) faktöriyel tesadüf parselleri modeline göre varyans analizinde farklı işlemler uygulanan 8 gruptaki kök yüzeylerine tutunan hücrelerin mm^2 'de tutunan hücre sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$). Ortalamalara bakıldığında en fazla hücrenin mm^2 'ye 32030 hücre tutunan sitrik asit + PDGF-BB uygulanan 4. grup olduğu ve en az hücrenin tutunduğu grubun ise mm^2 'ye 7423 hücre tutunan T-HCL + PDGF-BB uygulanan 6. grup olduğu görüldü (Şekil 8).

KYD uygulanan ve demineralize edilmeyen 1. grupla KYD + PDGF-BB uygulanan 2. grup arasında mm^2 'ye düşen hücre sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$). Ancak ortalamalara bakıldığında 1. grupta mm^2 'ye düşen ortalama hücre sayısı 11821 iken PDGF-BB uygulandıktan sonra bu sayı 10225'e düşmüştür (Şekil 8).

Sitrik asitle demineralize edilen 3. grupla sitrik asit + PDGF-BB uygulanan 4. grup arasında mm^2 'ye düşen hücre sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$). Ancak ortalamalara bakıldığında 3. grupta mm^2 'ye düşen ortalama hücre sayısı 11401 iken PDGF-BB uygulandıktan sonra bu sayı büyük bir artışla 32030'a yükselmiştir (Şekil 8).

T-HCL ile demineralize edilen 5. grupla T-HCL + PDGF-BB uygulanan 6. grup arasında mm^2 'ye düşen hücre sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$). Ancak ortalamalara bakıldığında 5. grupta mm^2 'ye düşen ortalama hücre sayısı 23678 iken PDGF-BB uygulandıktan sonra bu sayı büyük bir düşüş göstererek 7423 olmuştur. (Şekil 8)

EDTA ile demineralize edilen 7. grupla EDTA + PDGF-BB uygulanan 8. grup arasında mm^2 'ye düşen hücre sayısında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$). Ancak ortalamalara bakıldığında 7. grupta mm^2 'ye düşen ortalama hücre sayısı 11679 iken PDGF-BB uygulandıktan sonra bu sayı 11 983'e yükselmiştir. (Şekil 8)



Şekil 8. Farklı gruplarda mm² ye tutunan hücre sayısı

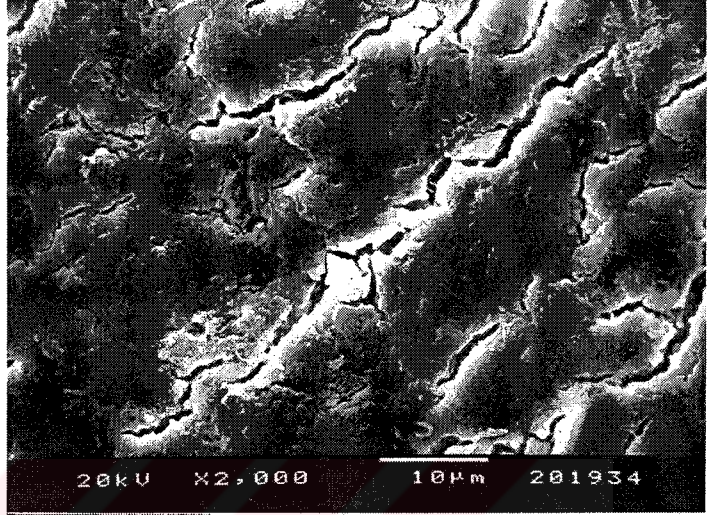
1. Grup: KYD
2. Grup: KYD + PDGF-BB
3. Grup: KYD + Sitrik Asit
4. Grup: KYD + Sitrik Asit +PDGF-BB
5. Grup: KYD + T-HCL
6. Grup: KYD + T-HCL +PDGF-BB
7. Grup: KYD + EDTA
8. Grup: KYD + EDTA + PDGF-BB

2. SEM Bulguları

2.1. Farklı gruptaki hücre ekilmeyen kök yüzeylerinin SEM görüntüleri

1. Grup:

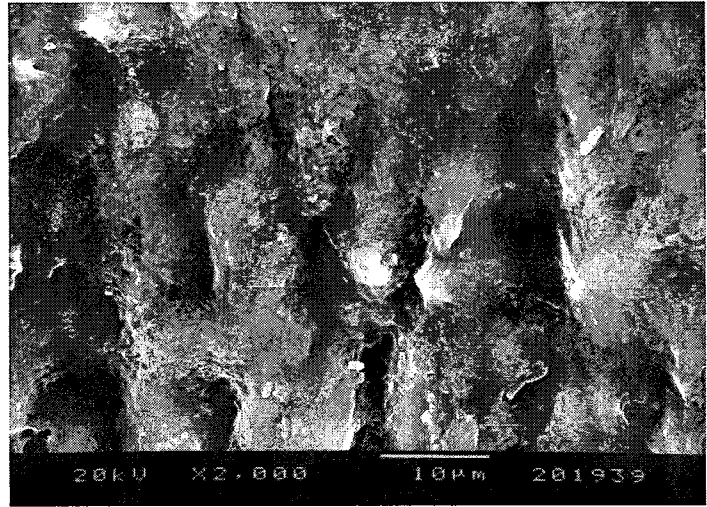
Sadece KYD uygulanan kök yüzeylerinde tipik smear tabakası görüntüsü izlendi. Yüzeyin düzensiz tabakayla kaplı olduğu görüldü. Kollagen lif girişi izlenmedi. Kök yüzeylerinde kurutma işlemleri sırasında oluşan çatlaklara sıklıkla rastlandı (Şekil 9).



Şekil 9. KYD uygulanan kök yüzeyi.

2. Grup:

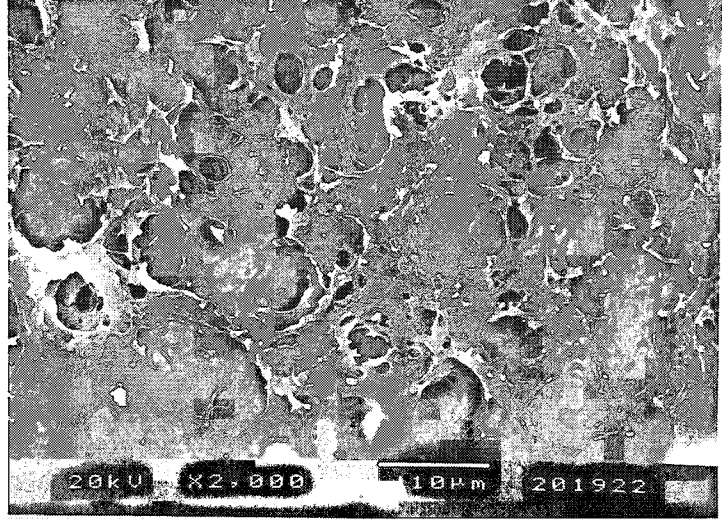
KYD + PDGF-BB uygulanan gruptaki kök yüzeylerinin görüntüsü 1. gruba benzer şekilde smear tabakası ile kaplıydı. Kollagen lif girişi izlenmedi ancak, 1. gruba göre smear tabakasının net olmayan görüntüsü dikkat çekti (Şekil 10).



Şekil 10. KYD + PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi.

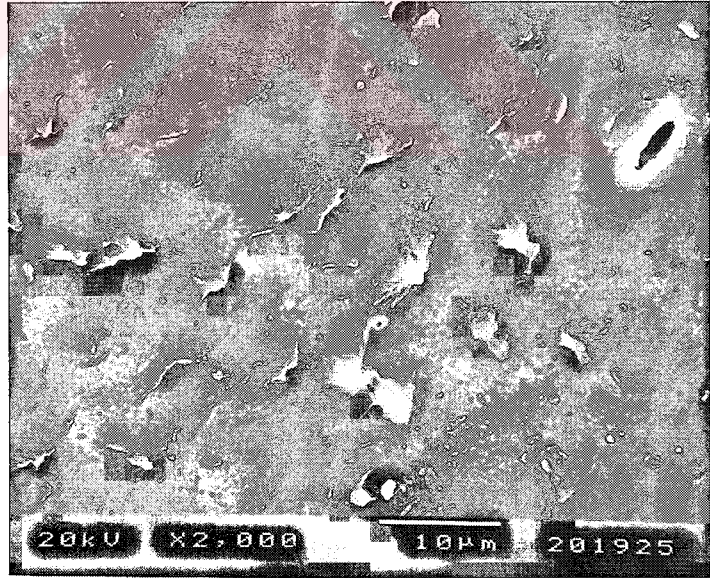
3. Grup:

KYD + Sitrik Asit uygulanmış kök yüzeylerinde bazı bölgelerde dentinin açığa çıkmış olduğu görüldü. Dentinin ekspoze olduğu bölgelerde derin bir demineralizasyon olduğu, çok fazla sayıda dentin kanal ağzının açığa çıktığı ve intertübüler bölgenin fibriler görüntüsünün olduğu izlendi (Şekil 11).



Şekil 11. KYD + Sitrik asit uygulanan kök yüzeyi (Dentin).

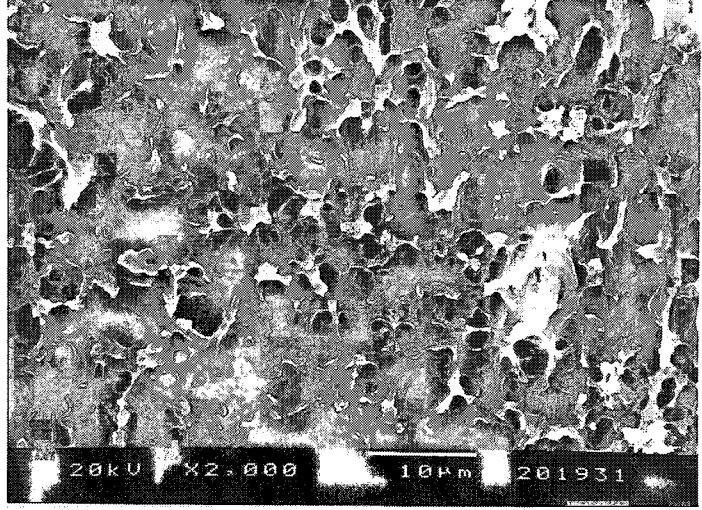
Sementin yüzeyde kaldığı bölgelerin, dentin yüzeyine oranla demineralizasyondan daha az etkilendiği görüldü. Kök yüzeyinin fibriler ve tanecikli görüntüsünün olduğu ve kollagen lif girişlerinin açığa çıktığı izlendi (Şekil 12).



Şekil 12. KYD + Sitrik asit uygulanan kök yüzeyi (Sement).

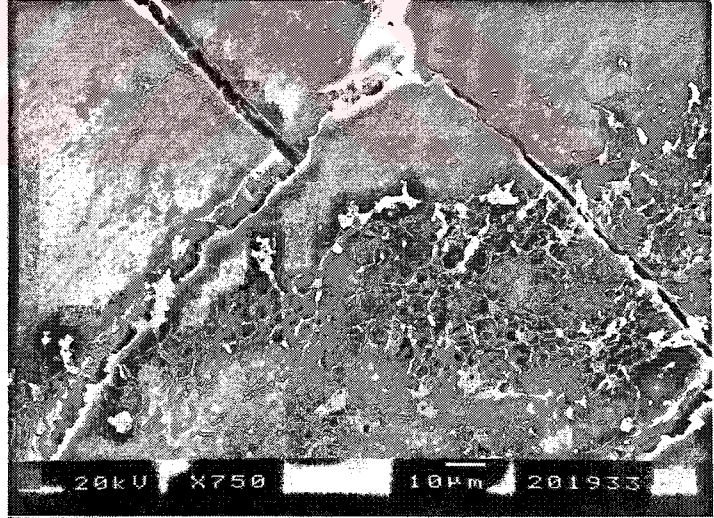
4. Grup :

KYD + Sitrik Asit + PDGF-BB uygulanan kök yüzeylerinin görüntüsünün 3. gruba benzer olduğu görüldü. Kök yüzeyinin fibriler yapıda olduğu ve kollagen lif girişlerinin açığa çıktığı izlendi (Şekil 13).



Şekil 13. KYD + Sitrik Asit + PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi.

Bazı bölgelerin demineralizasyondan çok fazla etkilenmediği görüldü. Bu bölgelerin hipermineralize sement yüzeyleri olabileceği düşünüldü (Şekil 14).



Şekil 14. KYD + Sitrik Asit + PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi. Sağ alt yüzeyde fibriler yapı izlenirken sol üst köşenin demineralizasyondan daha az etkilendiği görüldü.

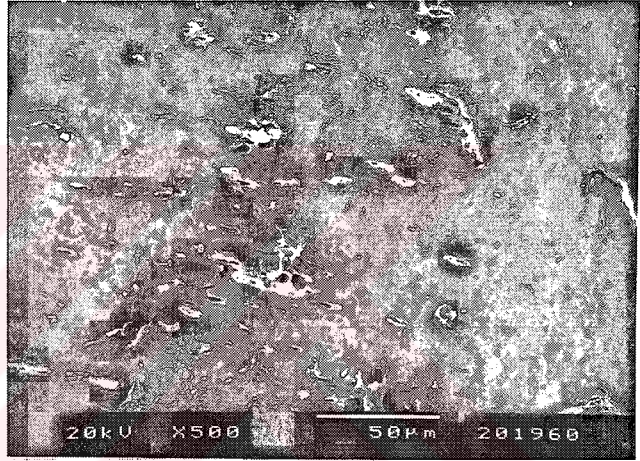
5. Grup :

KYD + T-HCl

uygulanan yüzeylerde, sitrik asit uygulanan yüzeylere benzer şekilde bazı bölgelerde dentinin açığa çıktığı ve bu bölgelerin demineralizasyondan daha çok etkilendiği izlendi. Ancak genel olarak demineralizasyonun sitrik asit uygulanan yüzeyler kadar derin olmadığı görüldü. Kök yüzeyinin fibriler yapıda olduğu ve kollagen lif girişlerinin açığa çıktığı izlendi (Şekil 15, 16).



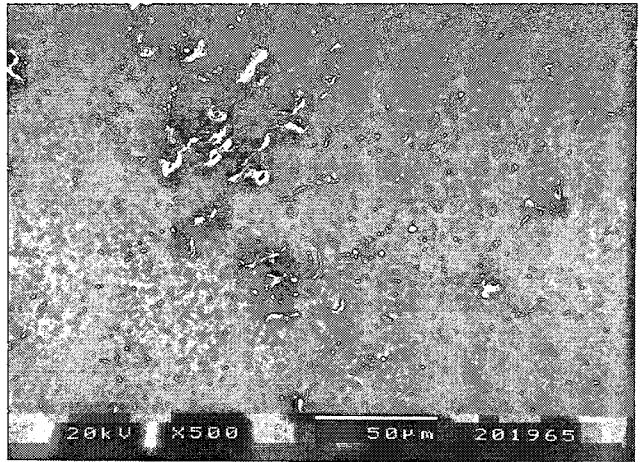
Şekil 15. KYD + T-HCl uygulanan kök yüzeyi.



Şekil 16. KYD + T-HCl uygulanan yüzeyin demineralizasyondan fazla etkilenmediği izlendi.

6. Grup :

KYD + T-HCl + PDGF-BB uygulanan yüzeylerin 5. gruptaki yüzeylere benzemekle birlikte net olmayan bir görüntüsünün olduğu dikkat çekti (Şekil 17).



Şekil 17. KYD + T-HCl+ PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi.

7. Grup :

KYD + EDTA

uygulanmış yüzeyler

diğer gruplara benzer

özellikler gösterdi.

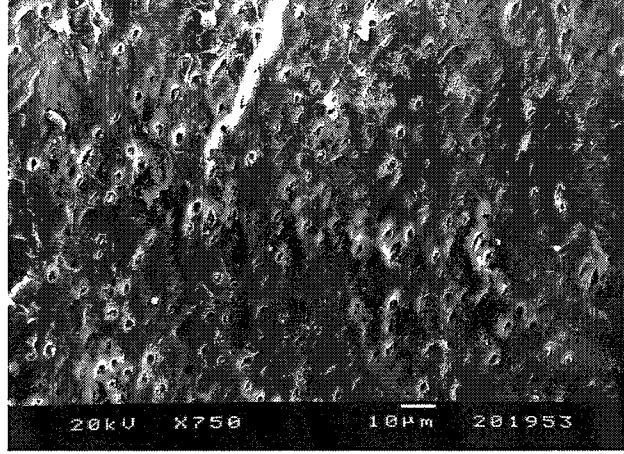
Kollagen lif girişlerinin

açığa çıktığı ve kök

yüzeyinin fibriler yapıda

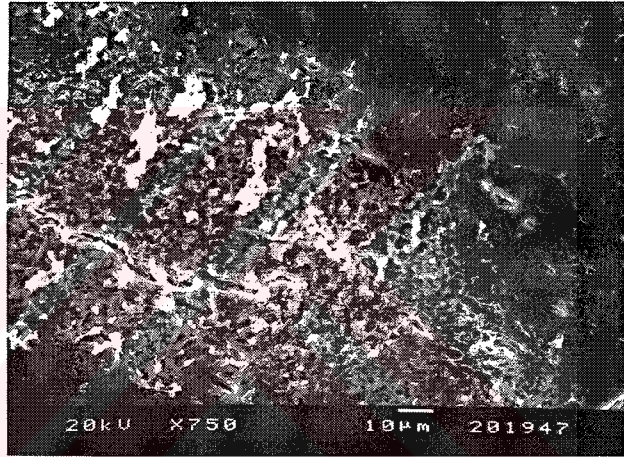
olduğu izlendi

(Şekil 18).



Şekil 18. KYD + EDTA uygulanan yüzeyde açığa çıkan kollagen lif girişlerinin görüntüsü.

Demineralizasyonun tüm yüzeyde eşit olmadığı bazı bölgelerin daha az etkilendiği görüldü (Şekil 19).



Şekil 19. KYD + EDTA Sol alt yüzeyde fibriler yapı izlenirken sağ üst bölgenin demineralizasyondan daha az etkilendiği izlendi.

8. Grup :

KYD + EDTA + PDGF-

BB uygulanan

yüzeylerin 7. gruptaki

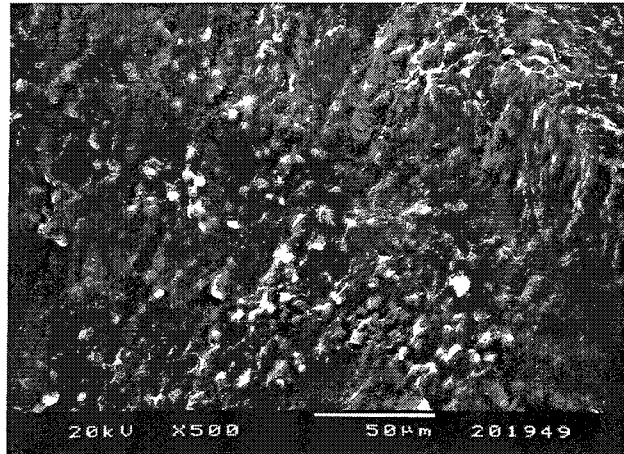
yüzeylere benzer olduğu

ancak yüzeyin net

olmayan bir görüntüye

sahip olduğu dikkat

çekti (Şekil 20).

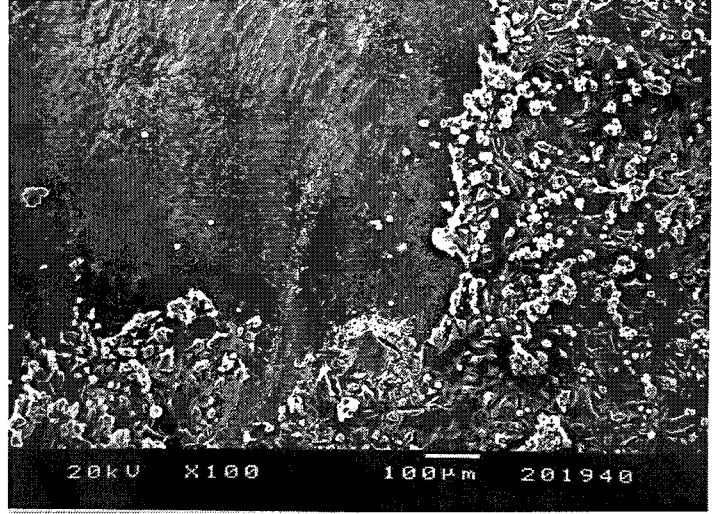


Şekil 20. KYD + EDTA + PDGF-BB uygulanan kök yüzeyi.

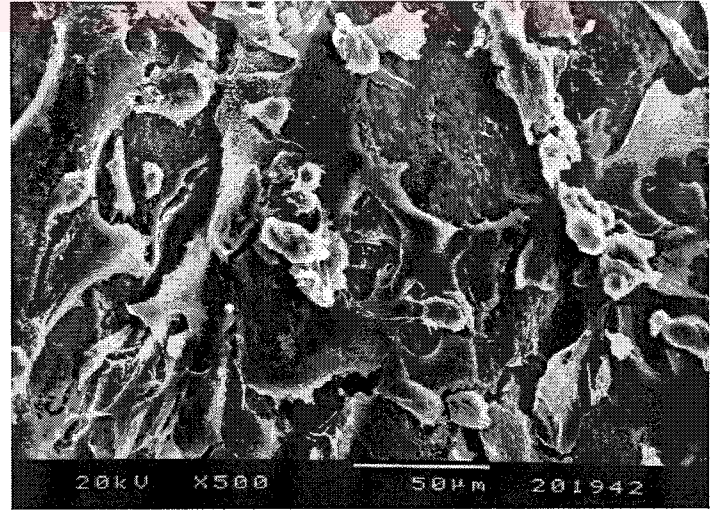
2.2. Farklı Gruplardaki Hücre Ekilen Kök Yüzeylerinin SEM Görüntüleri:

1. Grup:

KYD uygulanan yüzeylerde hücreli ve hücreli alanların olduğu izlendi. Hücreli alanlarda ve hücreler arası boşlukta yüzeyin smear tabakasıyla kaplı olduğu görüldü. Kök yüzeyine tutunan bazı hücrelerin düz, bazılarının ise küresel olduğu izlendi; her iki tip hücre yüzeye uzantılarla (filopodia) tutunmaktaydı. Küresel hücreler yüzeye tutunmuş ancak henüz yayılmamış olan hücrelerdir (Şekil 21, 22).



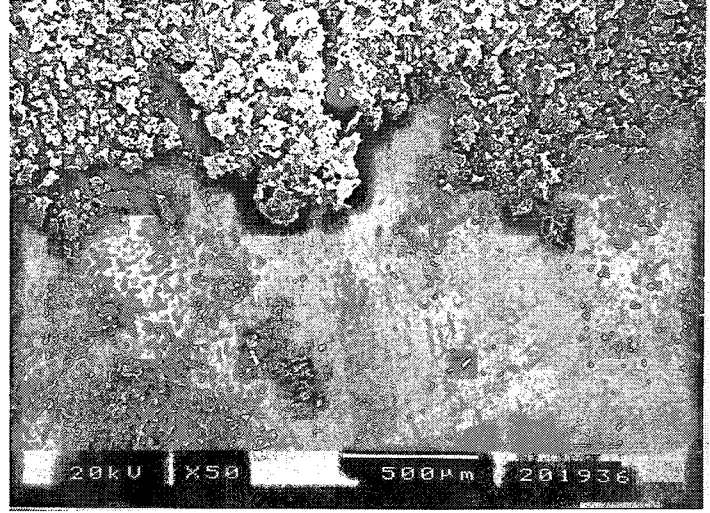
Şekil 21. KYD uygulanan kök yüzeyinde hücreli ve hücreli alanların görüntüsü.



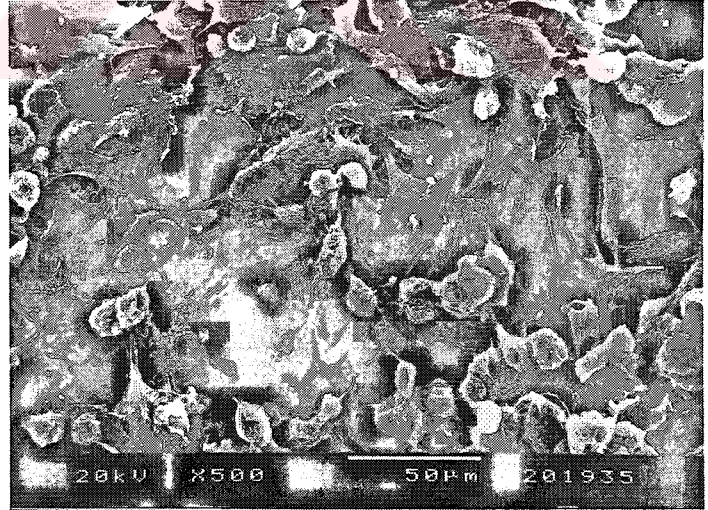
Şekil 22. KYD uygulanan kök yüzeyi. Hücreler arası boşlukta görülen smear tabakası.

2. Grup:

KYD + PDGF-BB uygulanan yüzeyler 1. gruba benzer görünümdeydi. Yüzeylerde hücreli ve hücreless alanlar ve hücreless alanlarda smear tabakası görüldü. Hücreler yaygın, düz veya küresel olarak farklı morfolojiler gösterdi (Şekil 23, 24).



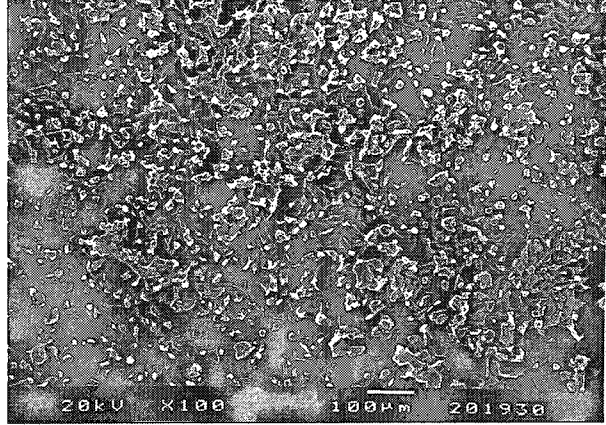
Şekil 23. KYD + PDGF-BB uygulanan yüzeyde hücreli ve hücreless alanlar izlenmekte.



Şekil 24. KYD + PDGF-BB uygulanan yüzeye tutunan hücrelerin görüntüsü.

3. Grup:

KYD + Sitrik Asit uygulanan yüzeylerde çok tabakalı yoğun hücreler izlendi. Alt tabakadaki hücreler yayılmış ve bu hücrelerin üzerinde henüz yayılmamış küresel şekilli hücrelerin olduğu görüldü. 1. gruba göre daha az oranda da olsa bazı yüzeylerde hücre boşlukları izlendi (Şekil 25).



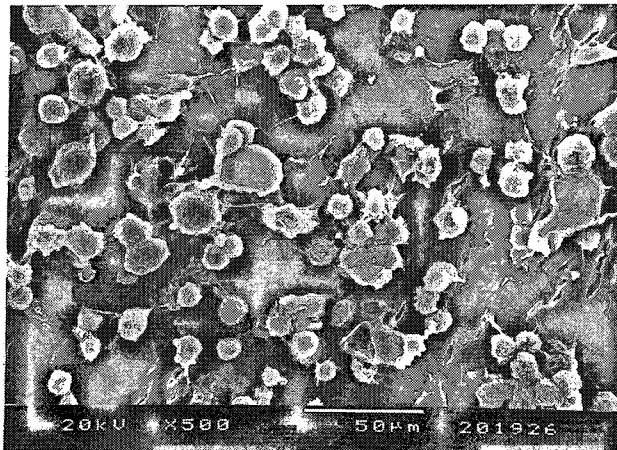
Şekil 25. KYD + Sitrik asit uygulanan yüzeylerde hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bir bölgenin görüntüsü.



Şekil 26. KYD + Sitrik Asit + PDGF-BB uygulanan yüzeyde küresel hücreler ve uzantıları.

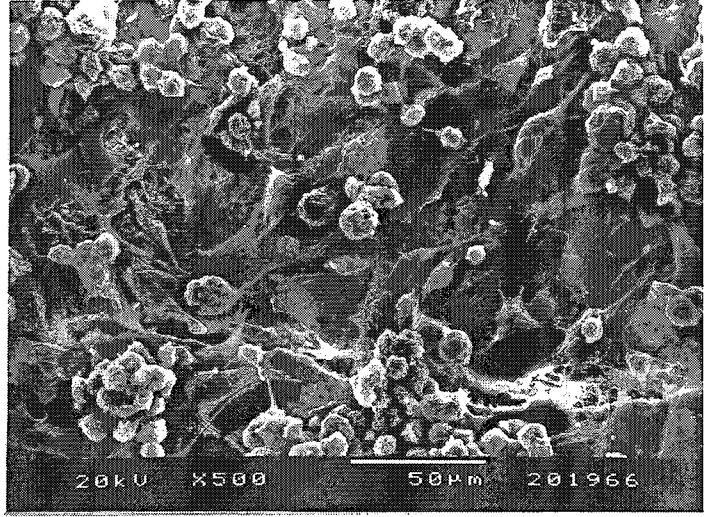
4. Grup:

KYD + Sitrik Asit + PDGF-BB uygulanan yüzeylerde yoğun hücreli alanlar izlendi. Hücre morfolojileri önceki gruplarda olduğu gibi küresel ve yaygın değişiklik gösterdi (Şekil 26, 27).

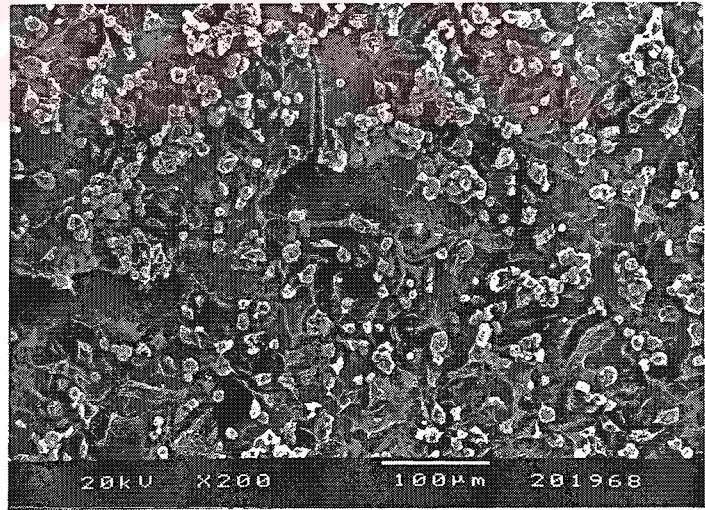


Şekil 27 KYD + Sitrik asit + PDGF-BB uygulanan yüzeydeki hücreler.

5. Grup:
KYD + T-HCl
uygulanan
yüzeylerde yoğun
hücreli alanlar
olduğu izlendi. Alt
tabakadaki yaygın
hücrelerin üstünde
kümelenmiş küresel
hücreler olduğu
görüldü
(Şekil 28, 29).



Şekil 28. KYD + T-HCl uygulanan yüzeyde tabakalar halinde yoğun hücrelerin görüntüsü.



Şekil 29. KYD + T-HCl uygulanan yüzeyde tabakalar halinde yoğun hücrelerin görüntüsü.

6. Grup:

KYD + T-HCl +

PDGF-BB

uygulanan

yüzeylerde hüresiz

alanların daha fazla

olduğu izlendi.

Demineralize

olmasına rağmen

bazı yüzeylerde

hücrelerin

tutunmadığı

görüldü. Hücre

morfolojilerinin

diğer gruplara

benzer şekilde

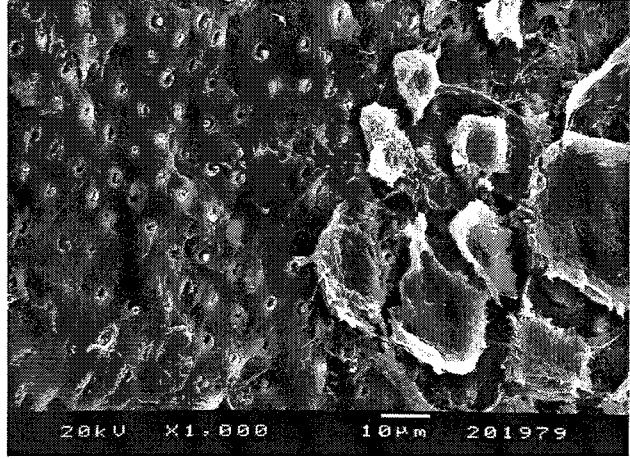
değişiklikler

gösterdiği ve

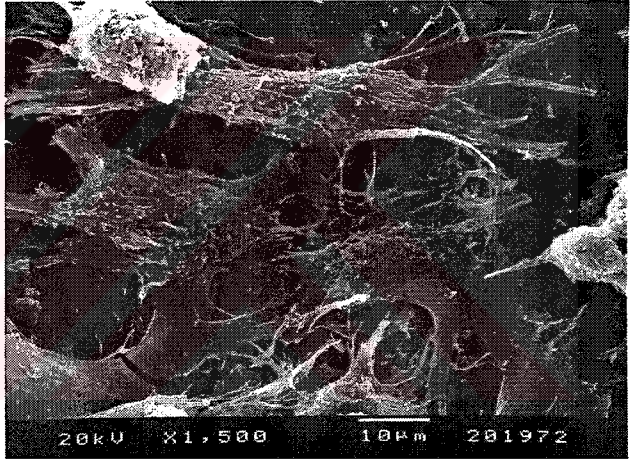
hücresel uzantılar

izlendi

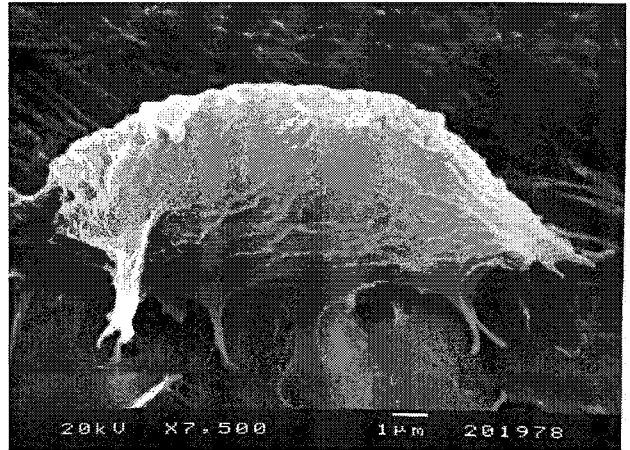
(Şekil 30, 31, 32).



Şekil 30. KYD + T-HCl + PDGF-BB uygulanan yüzeyin sol kısmına hücreler tutunmadığı ve dentin tübül girişleri izlenmekte.

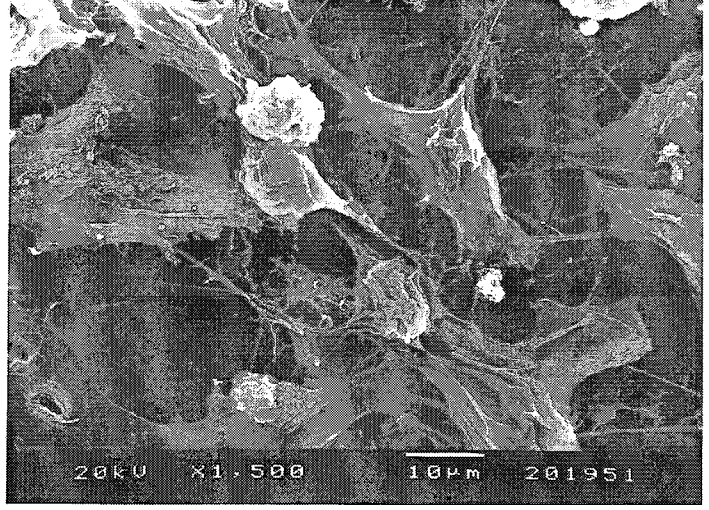


Şekil 31. KYD + T-HCl + PDGF-BB uygulanan yüzeyde hücreler ve uzantıları.

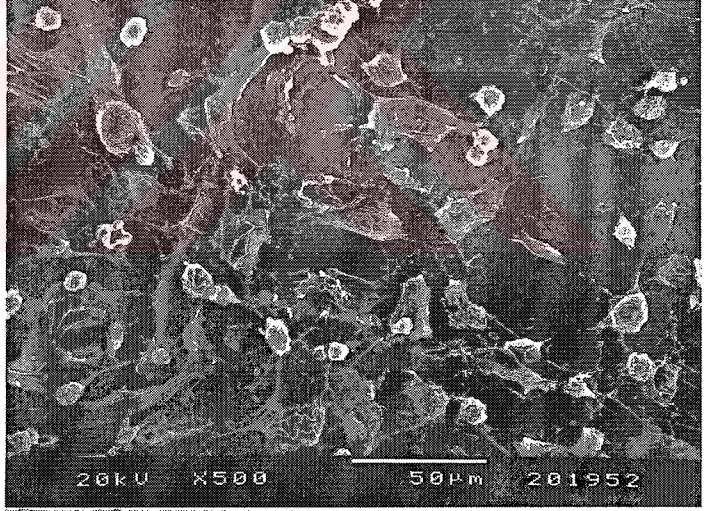


Şekil 32. KYD + T-HCl + PDGF-BB uygulanan yüzeye tutunan hücre ve uzantıları.

7.Grup:
KYD + EDTA
uygulanan
yüzeylerde diğer
gruplara benzer
şekilde hücreli ve
hücretsiz alanlar
izlendi ve hücre
morfolojilerinin
küresel ve yaygın
şekillerde değişiklik
gösterdiği görüldü
(Şekil 33, 34)



Şekil 33. KYD + EDTA uygulanan yüzeyde yayılmış hücreler ve uzantıları.



Şekil 34. KYD + EDTA uygulanan yüzeyde farklı morfolojiler gösteren hücreler.

8. Grup:

KYD + EDTA +
PDGF-BB

uygulanan

yüzeylerde hücreli
ve hücreli alanlar

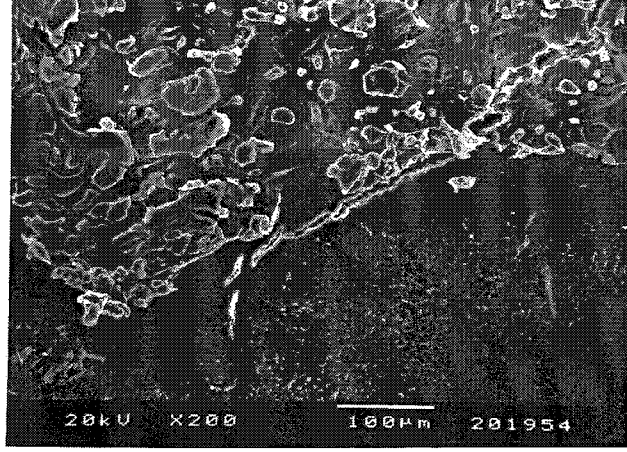
izlendi. Hücre

morfolojilerinin

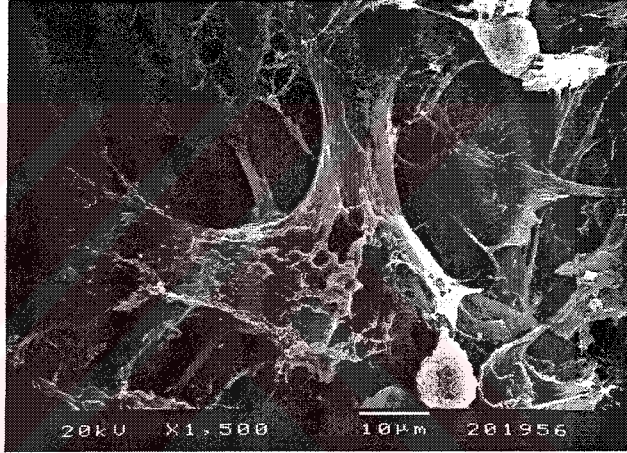
diğer gruplarla aynı

olduğu görüldü.

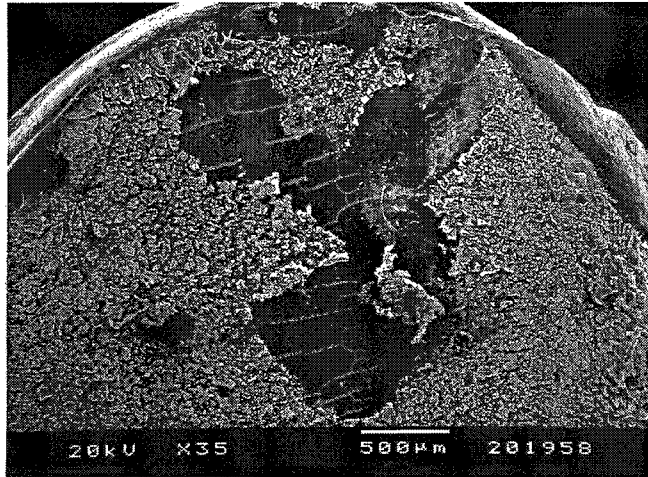
(Şekil 35, 36, 37)



Şekil 35. KYD + EDTA + PDGF-BB uygulanan yüzeyde hücreler sol üst yüzeye tutunurken sağ alt bölgeye tutunmadıkları izlendi.



Şekil 36. KYD + EDTA + PDGF-BB uygulanan yüzeyde hücreler ve uzantıları.



Şekil 37. KYD + EDTA + PDGF-BB uygulanan yüzeyde küçük büyütmede hücrelerin tutundukları ve tutunmadıkları alanların görüntüsü.

TARTIŞMA

Periodontal rejenerasyonun gerçekleşebilmesi için periodontitisten etkilenmiş kök yüzeylerinin progenitör hücrelerin göçü, tutunması, çoğalması ve farklılaşmasına olanak tanıyacak bir yüzey haline getirilmesi gerekmektedir (118, 119, 139). Yara iyileşmesinde hücrel faaliyetlerin düzenlenmesinde rol alan GF'lerin periodontal rejenerasyonda kullanımıyla ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (39, 103, 105). Periodontolojide en çok çalışılan GF olan PDGF-BB'nin PDL fibroblastları üzerinde güçlü kemotaktik ve mitojenik etkileri vardır. (94, 113). PDGF'nin üç farklı izoformu vardır. PDGF-BB izoformu hem $-\beta$, hem de $-\alpha$ reseptör alt ünitelerine bağlanabilmektedir (68) ve dermal fibroblastlar için PDGF-AA'dan 10 kat fazla mitojenik etkiye sahiptir (130). İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan klinik çalışmalarda PDGF-BB kullanımının periodontal rejenerasyon sağlamada etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir (39, 105).

Yapılan klinik çalışmalarda PDGF-BB'nin uygulanmasında genellikle metil selüloz, sığır kollajeni, deksametazon gibi çeşitli taşıyıcılar kullanılmıştır (91, 94, 128). Ancak taşıyıcı kullanımının yol açtığı çeşitli olumsuzluklar vardır. Taşıyıcılar erken hücre tutunması ve çoğalması için esas olan hücre-yüzey ilişkisine zarar verebilirler. Vücut için yabancı bir maddeden yapılmış olan taşıyıcı iltihabi ve immünolojik reaksiyonlara neden olabilir. Klinik olarak taşıyıcının yerleştirilmesi ve stabilizasyonu bazı bölgelerde zor olabilir (83). Demineralize edilmiş kök yüzeylerinin yabancı bir taşıyıcı kullanmayı gerektirmeyerek PDGF-BB gibi büyüme faktörleri için rezervuar oluşturabileceği ve bu faktörlerin yavaş salınımı sağlayabileceği bildirilmiştir (39, 115). Bu çalışmada PDGF-BB'nin demineralizan ajanlarla birlikte kullanımı ve hangi demineralizan ajanla daha başarılı olduğu *in vitro* olarak değerlendirildi.

1.Kullanılan *in vitro* Sistemin Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan *in vitro* sistemi mümkün olduğu kadar klinik şartlara yaklaştırmak amaçlandı. Bu nedenle periodontal hastalık nedeniyle çekilen dişlerin ağız ortamına açılan kök yüzeyleri çalışmaya dahil edildi. Periodontal hastalığın primer etiyolojik ajanı olan mikrobiyal dental plak ve yan ürünleri ultrasonik alet yardımıyla uzaklaştırıldı ve *Gracey 5/6* küretler kullanılarak KYD uygulandı. Mekanik tedavinin gerekliliği ve hücre kültürü çalışmaları için sterilitenin çok önemli olduğu bilinmektedir. Withlin ve Hancock (152) fibroblastların tedavi edilmemiş hastalıklı kök yüzeylerine tutunmadıklarını bildirmişlerdir. Garrett ve arkadaşları (61) KYD uygulanmamış kök yüzeylerine sitrik asit uygulanmasının etkili olmadığını göstermişlerdir. Bu nedenlerden dolayı çalışmada kullanılan tüm kök yüzeylerine KYD uygulanması gerekli görüldü.

Çoğu *in vitro* çalışmada rotasyonlu aletler ve elmas frezler yardımıyla sementin tamamı uzaklaştırılmış ve açığa çıkan dentin yüzeyine hücrelerin tutunması değerlendirilmiştir. Ancak sementin içerdiği ataşman proteinleri ve GF'lerin PDL hücrelerinin göçünü ve tutunmasını artıracak ve yeni sement oluşumunu olumlu etkileyebileceği gösterilmiştir. Hastalıklı yüzeysel sement kaldırılıp, kök yüzeyinde sementin bırakılmasının periodontal rejenerasyonu olumlu etkileyeceği bildirilmiştir (56, 70, 155). Bu çalışmada da, sement tamamıyla kaldırılmaya çalışılmadı, her bölgeye *Gracey 5/6* küretlerle 15 küret darbesi uygulanarak hastalıklı sementin uzaklaştırılması ve yüzeyin düz hale getirilmesi sağlandı.

Daha önce de belirtildiği gibi sadece hastalığa maruz kalmış kök yüzeylerine hücrelerin tutunmasının değerlendirilmesi hedeflendi. Bu amaçla kullanılan kültür kabının gözlerine mümkün olduğunca uyumlu kök parçaları elde edebilmek için silindirik frezler yaptırıldı. Bu frezler ve elmas frezler yardımıyla çapı 5 mm olan ve pulpal yüzeyine oluk açılmış kök parçaları elde edildi. Pulpal ve yan yüzeylere hücrelerin tutunmasının engellenmesi için kültür kabının gözlerine yerleştirilen katlanmış parafilm içine kök parçaları sadece hastalığa maruz kalan yüzeyi açık kalacak şekilde gömüldü. Gamal ve arkadaşları (58, 59) yaptıkları çalışmalarda kök parçalarını aynı amaçla yapışkan mum içerisine gömmüşlerdir. Ancak bu çalışmada hücre kültürü

işlemi bittikten sonra SEM incelemesi için hücrelere zarar vermeden kök parçalarının çıkarabilme kolaylığı sağlaması nedeniyle parafilm kullanımı tercih edildi.

Demineralizan ajan olarak güçlü bir asit olan ve derin demineralizasyon sağlayan sitrik asit (61, 122, 129, 137), demineralizan etkisi yanında antibakteriyel, antikollagenaz olan ve dişlere tutunabilen T-HCL (2, 73, 150, 146) ve nötr pH'a sahip olmasına rağmen etkili demineralizasyon yapabilen EDTA'nın (25, 27, 28, 29, 96) kullanılmaları ve karşılaştırılmaları tercih edildi. Demineralize edici ajanların uygulanmasında diğer tekniklere üstünlüğü gösterilmiş olan *burnishing* tekniği kullanıldı (52, 100, 139). Farklı ajanların etkili konsantrasyonları ve uygulama süresiyle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (25, 27, 61, 73, 100, 124, 145, 146). Bu çalışmalardan hareketle her solüsyonun etkin olduğu konsantrasyonlar seçildi ve pH'ı 1 olan sitrik asit (100, 101, 122), 125 mg/ml'lik T-HCL (146) ve %24'lük EDTA (25, 27) kök yüzeylerinin demineralizasyonunda kullanıldı. Kullanılan ajanların herbirinin etkinliği için yeterli olan 4 dakika demineralizasyon süresi tercih edildi ve tüm ajanlar 30 saniyede bir uygulanan pamuk pelet değiştirilerek 4 dakika *burnishing* tekniği ile kök yüzeylerine uygulandı.

Literatürde etkin PDGF-BB konsantrasyonuyla ilgili 2,5 ng/ml den 1 µg/ml ye kadar değişen farklı sonuçlar bulunmaktadır (7,35,59,92). PDGF-BB'nin demineralize edilmiş kök yüzeylerine uygulanmasında PDGF-BB'nin yavaş salımı ve uzun süre etkinliği hedeflendiği için bu uygulamalarda tercih edilen yüksek konsantrasyonda (0,5 µg/ml) PDGF-BB bu çalışmada kullanıldı. Zaman ve arkadaşlarının (155) önerdikleri teknik kullanılarak 0,5 µg/ml PDGF-BB solüsyonunda kök parçaları 10 dakika bekletildi.

Literatür gözden geçirildiğinde, her çalışmada kök yüzey alanının sabit olması konusunda titiz davranılmadığı dikkati çekmiştir. Boyko ve arkadaşları (33) çalışmalarında kullandıkları standart olmayan kök yüzeylerinin alanlarını folyo ile ölçerek mm²'ye düşen hücre sayısını hesaplamışlardır. Gamay ve arkadaşları (58, 59) ise standart olmayan kök yüzeylerinde SEM'de kendi belirledikleri sabit büyüklükteki birim alana düşen hücre sayısını hesaplamışlardır. Bu çalışmada ise özel olarak yaptırılan frezler yardımı ile kullanılan kültür kabına uyumlu ve standart büyüklükte kök parçaları hazırlandı. Ayrıca, her yüzeye ekilmesi gereken hücre sayısının belirlenmesi amacıyla, daha önce yapılmış çalışmalar kaynak alınarak ön çalışmalar

yapıldı ve kullanılan kök yüzeyi alanının genişliği nedeniyle her kök yüzeyine, diğer çalışmalardaki hücre sayısından daha yüksek olan 10^5 hücre ekildi. Bu sayede hücre kültürü çalışmalarının avantajı olan çevre şartlarının kontrolü ve standardizasyonu sağlanmaya çalışıldı.

PDL fibroblastlarının yüzeye tutunması için gerekli süre, diğer memeli fibroblastlarında da olduğu gibi ortalama 2 saattir. Bu çalışmada PDGF-BB'nin, demineralizan ajanların ve birlikte kullanılmalarının hücrelerin kök yüzeylerine erken tutunmasına olan etkilerini değerlendirmek amaçlandığı için hücreler ekildikten sonra inkubatorde 2 saat bekletildi (33).

Yapılan literatür incelemesinde, kök yüzeylerine tutunan hücre sayılarının belirlenmesinde XTT yönteminin kullanıldığı başka bir çalışma bulunmamıştır. XTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından XTT tuzunun parçalanmasıyla açık sarı veya portakal renge sahip tetrazolyum formazan ürünü açığa çıkar ve yapılan kolorimetrik ölçümle canlı hücrelerin sayısı belirlenir (6,141). XTT yönteminin kök yüzeyine tutunan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanımının histolojik, ışık ve elektron mikroskopik yöntemlere göre önemli avantajları vardır. XTT yöntemiyle kök yüzeyine tutunan hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılmasına gerek kalmadan doğrudan ve kısa sürede sayımları yapılabilmektedir. Bu sayede kök yüzeylerinden hücrelerin tripsin kullanılarak kaldırılmasına gerek kalmaz. XTT yöntemi sadece metabolik olarak aktif hücrelerin sayısının belirlenmesini sağlar. Kök yüzeylerinin ışık mikroskop incelemelerine hazırlanması, kesit alınması sırasında oluşan hücre kayıpları elimine edilir. Işık ve SEM mikroskopunda sınırlı, $0,02 \text{ mm}^2$ gibi oldukça küçük alanlara düşen hücre sayısı belirlenirken XTT yönteminde tüm kök yüzeyine tutunan hücre sayısı belirlenebilmektedir. Ayrıca mikroskop incelemelerinde hücrelerin üst üste konumlanması sayımı zorlaştırmakta ve yanıltıcı olmaktadır; XTT yönteminde ise bu durum fark yaratmaz. Radyo izotopla hücrelerin işaretlenip sayılması ise radyo izotop çalışmaları özel izin ve laboratuvar gerektirmesi, çok pahalı olması ve çevre için taşıdığı riskler nedeniyle XTT yöntemine oranla daha az avantajlı bulunmuştur. Bir başka tetrazolyum tuzu olan MTT ise, XTT'den daha uzun süren laboratuvar işlemleri gerektirmesine rağmen iki yöntemin hassasiyetleri arasında fark yoktur (6, 141). Bahsedilen nedenlerden dolayı XTT yönteminin PDL fibroblastlarının

kök yüzeylerine tutunmasının değerlendirilmesinde diğer yöntemlere tercih edilebilecek bir yöntemdir.

2. Kök yüzeylerinin demineralizasyonunun PDL fibroblastlarının tutunmasına etkilerinin değerlendirilmesi

Cogen ve arkadaşları (42), yaptıkları çalışmada KYD yapılmış ve yapılmamış kök yüzeylerine 3 dakika sitrik asit (pH 1,0) uygulamışlar ve insan gingival fibroblastlarının bu kök yüzeylerine tutunmasını değerlendirmişlerdir. Hücreler tutunduktan 72 saat sonra vital boya ile kök yüzeylerini boyayıp hücrelerin tutundukları alanın görülebilir olmasını sağlamışlardır. Sonuç olarak KYD yapılmamış kök yüzeylerine sitrik asit uygulansa bile hücrelerin tutunmadığını, buna karşın, KYD yapılan kök yüzeylerine hücrelerin tutunduğunu ve sitrik asit uygulamasının fark yaratmadığını bildirmişlerdir. Yine Cogen ve arkadaşları (41) yaptıkları benzer bir çalışmada hücreler yüzeye tutunduktan 72 saat sonra kök parçalarını SEM’de ve kesitler alıp ışık mikroskobunda incelemişlerdir. Hücre morfolojileri ve büyüme oranları açısından, KYD yapılmış ve sitrik asitle demineralize edilmiş veya edilmemiş kök yüzeyleri arasında fark bulamamışlardır. Kök yüzeylerinin demineralizasyonundan çok KYD işleminin önemini vurgulamışlardır. Bu çalışmanın sonuçları Cogen ve arkadaşlarının bahsedilen çalışmalarının sonuçlarıyla uyumludur. Ancak Cogen ve arkadaşlarının çalışmalarında kök yüzeylerinin boyanarak hücrelerin tutundukları alan veya mikroskopta seçilen alanlardaki hücre sayıları belirlenmiştir. Bu değerler kök yüzeyine tutunan toplam hücre sayısını kesin olarak yansıtmamaktadır. Bu çalışmada ise kullanılan XTT yöntemi ile tüm kök yüzeyindeki toplam hücre sayısı belirlenebilmiştir.

Boyko ve arkadaşları (33), sağlıklı domuz dişlerini kullandıkları çalışmalarında enzim solüsyonunda bekletilerek üzerindeki yumuşak dokuların uzaklaştırıldığı ve farklı ajanlarla demineralize edilmiş kök yüzeylerine, maymun PDL fibroblastlarının tutunmasını değerlendirmişlerdir. Kök yüzeylerine 0,5 M EDTA, 0,6 N HCL veya sitrik asiti (pH 1,0) 3 veya 60 dakika uygulayarak demineralize etmişlerdir. Hücreler ekildikten 2 saat sonra tripsin kullanılarak kök yüzeylerinden tutunan hücreler uzaklaştırıp hemositometrede sayıları belirlenmiştir. Sonuçta demineralize edilmemiş kök yüzeylerine oranla demineralize edilmiş kök yüzeylerine daha fazla hücre tutunduğunu ve farklı ajanlar kullanılan gruplar arasında fark olmadığını bildirmişlerdir.

Fernhough ve Page (51), sağlıklı ve periodontitisten etkilenmiş kök yüzeylerine KYD uygulayıp 3 dakika sitrik asitle demineralize etmişler ve bu yüzeylere insan PDL fibroblastlarının tutunmasını değerlendirmişlerdir. Hücreler ekildikten 4 saat sonra tripsinle kök yüzeylerinden uzaklaştırılmış ve kültür sayacı kullanılarak sayılmıştır. Sonuç olarak sadece KYD uygulanmış kök yüzeylerine hücrelerin tutunduğu ve bu yüzeylerin demineralize edilmesinin tutunan hücre sayısını artırdığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada Boyko (33) ve arkadaşlarının ve Fernhough ve Page'in yaptıkları çalışmalardan farklı olarak demineralize edilmiş kök yüzeylerine tutunan hücre sayısı demineralizasyon uygulanmamış kök yüzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır. Ancak ortalamalara bakıldığında demineralizasyon uygulanan yüzeylere daha fazla hücre tutunduğu görülmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarının diğer iki çalışmadan farklı olmasının sebebi hücre sayılarının belirlenmesinde farklı yöntemin kullanılması olabilir. Diğer araştırmacılar kök yüzeylerinden hücreleri tripsin kullanarak uzaklaştırmışlar ve daha sonra sayılarını belirlemişlerdir. Lowenberg ve arkadaşları (89), tripsin kullanımıyla, kök yüzeylerine tutunan hücrelerin tamamının uzaklaştırılmadığını bildirmişlerdir. Özellikle kök yüzeyindeki çatlaklara ve oluklara tutunan hücrelerin uzaklaştırılması zordur. Ayrıca kültür sayacı ve hemositometrede hücre sayımı yapılarak kesin hücre sayısına ulaşamamaktadır. Belirtilen nedenlerden dolayı tripsin kullanılarak yapılan çalışmaların güvenilirliği tartışmalıdır. Bu çalışmada ise hücreler kök yüzeyinden uzaklaştırılmadan doğrudan sayımları yapılmış tripsin kullanımından kaynaklanan hataların önüne geçilmiştir.

Zaman ve arkadaşları (154), yaptıkları çalışmada periodontal hastalık nedeniyle çekilen dişlere KYD uygulamışlar ve dikey olarak her dişin bir yarısında sementi kaldırarak dentini açığa çıkartmışlardır. Daha sonra dişlerin köklerinde 200 kalınlığında yatay kesitler elde etmişler ve %24 EDTA, sitrik asit (pH 1,0) ve 100 mg/ml T-HCL solüsyonlarında 3'er dakika bekletmişlerdir. Kök parçaları üzerine 10^5 hücre ekerek 1., 2. ve 3. günlerde ışık mikroskobunda incelemişlerdir. Hazırladıkları kesitlerin inceliği sayesinde sement ve dentin yüzeylerini ve bu yüzeylere tutunan hücreleri ışık mikroskobunda inceleyebilmişlerdir. Zaman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hücre sayısını belirlenmemiş, hücrelerin tutunduğu dentin veya sement yüzeyinin uzunluğunun toplam sement veya dentin yüzeyine oranını hesaplayarak elde ettikleri değeri ataşman indeksi olarak kabul etmişler ve değerlendirmelerini bu indekse

göre yapmışlardır. Sonuçta, 1. günde EDTA ve sitrik asit uygulanan yüzeylerdeki ataşman indeksi kontrol ve T-HCl uygulanan gruptan anlamlı olarak farklı bulunmuştur. T-HCl grubu ise kontrole oranla fark göstermemiştir. 3. ve 7. günlerde ise tüm gruplardaki ataşman indeksi değerleri birbirine yaklaşmış ve gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu çalışmanın sonucunda Zaman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadan farklı olarak EDTA ve sitrik asit uygulanan gruplarda da tutunan hücre sayılarında anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak iki çalışmada hücrelerin tutunması için beklenen sürenin çok farklı olması birebir karşılaştırma yapmayı engellemektedir. Zaman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada aynı grup içerisindeki ataşman değerleri arasındaki farklar bu çalışmada da olduğu gibi oldukça yüksektir. Bu durum kök yüzeylerinin demineralizasyonundan çok hastalıklı kök yüzeylerindeki hipermineralizasyon ve rezorpsiyon alanlarının yarattığı farklılığı ve KYD işleminin önemini vurgulamaktadır.

Rompen ve arkadaşları (125, 126), yaptıkları çalışmalarda sağlıklı dişlerin sement yüzeylerini elmas frezlerle tamamen uzaklaştırdıktan sonra havanda parçalayıp 44-76 µm büyüklüğünde dentin parçaları elde etmişlerdir. Bu parçaları %3 sitrik asit ve %2,5 minosiklin HCl'de bekleterek demineralize etmişler, bir gruba ise demineralizasyon uygulamamışlardır. H-timidin ile işaretlenmiş PDL fibroblastlarını dentin parçaları üzerine ekip 2 saat bekletmişlerdir. Daha sonra tutunmayan hücreleri uzaklaştırıp spektrometrede radyoaktivite ölçümü yaparak tutunan hücre sayılarını yüzde olarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak hem sitrik asit hem minosiklin uygulanan grupta erken hücre tutunmasının kontrol grubundan fazla olduğunu bildirmişlerdir. Dentin parçaları kullanarak araştırmacılar toplam yüzey alanını artırmayı ve hücreler için 3 boyutlu tutunma imkanı sağlamayı hedeflemişlerdir. Ancak araştırmacıların sağlıklı dişlerin sement yüzeyini kaldırıp dentini küçük parçalara ayırıp kullanmaları, periodontal hastalık klinik özelliklerden uzaklaşmalarına yol açmıştır. Zaman ve arkadaşlarının ve bu yapılan çalışmadan farklı olarak Rompen ve arkadaşlarının çalışmalarında aynı grup içerisinde yüksek varyasyonlar izlenmemiştir. Bunun nedeni sağlıklı kök yüzeyleri ve birbiriyle aynı özelliklere sahip kök parçaları içeren gruplar kullanılması ve hastalıktan etkilenen kök yüzeyindeki farklılıkların elimine edilmesi olabilir.

Gamal ve arkadaşları (58) yaptıkları çalışmada periodontal hastalık nedeniyle çekilen dişlerden elde etikleri kök parçalarında elmas frezlerle sementi kaldırıp dentin yüzeyine KYD uygulamışlardır. Standart bir büyüklüğe sahip olamayan kök parçalarını T-HCL ile demineralize ederek veya etmeden, PDGF-BB, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) veya iki büyüme faktörünü birlikte içeren solüsyonlarda bekletmişlerdir. Her kök yüzeyine 5×10^4 PDL fibroblastı ekerek 24 saat etüvde bekletip, SEM’de inceledikleri bu kök parçalarının her birinden rastgele seçtikleri $0,02 \text{ mm}^2$ alana tutunan hücre sayısını belirlemişler ve morfolojilerini incelemişlerdir. Her gruptaki bazı örneklerle hiç hücrenin tutunmadığını, bunun sebebinin sterilitenin yeterli olmaması, uygulanan solüsyonlar ve hücre tipine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Kontrol grubuna oranla PDGF-BB uygulanan yüzeylere daha fazla hücre tutunduğunu, IGF-1’in hücre tutunmasını etkilemediğini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmaya benzer olarak T-HCL uygulanan yüzeylere tutunan hücre sayısının kontrolden farklı olmadığını bildirmişlerdir. Yine bu çalışmayla uyumlu olarak T-HCL ile büyüme faktörlerinin birlikte kullanıldığı gruplarda sadece büyüme faktörü uygulananlara oranla daha az hücre tutunduğunu, bunun nedeninin kök yüzeylerine tutunan T-HCL’ün büyüme faktörünün fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Gamal ve arkadaşlarının (58) bulguları bu çalışmayla karşılaştırıldığında T-HCL uygulanan yüzeylerin kontrol grubundan farklı olmaması ve T-HCL’ün PDGF-BB’nin etkinliğini azaltması açısından uyumludur. Ancak Gamal ve arkadaşlarından farklı olarak bu çalışmada PDGF-BB’nin tek başına uygulanması kontrole göre daha fazla hücre tutunmasına sebep olmasına rağmen bu fark anlamlı değildir. Gamal ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hücre sayısını SEM’de rastgele seçtikleri $0,02 \text{ mm}^2$ alanda sayarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise SEM incelemeleri ile aynı kök yüzeyinin farklı bölgelerine tutunan hücre sayılarında çok büyük farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bu durum resimlerde de izlenmektedir; kimi bölgelerde yoğun hücreler varken bazı bölgelere hiç hücre tutunmamıştır. Ayrıca bazı bölgelerde hücrelerin birbirlerinin üstlerine tutunması tam sayılarının belirlenmesine engel olmaktadır. Bu yüzden kök yüzeyinden seçilen dar bir alandaki hücre sayısı o kök yüzeyine tutunan toplam hücre sayısını belirlemede yeterli değildir. SEM incelemelerinin hücre morfolojileri ve tutunma özelliklerinin değerlendirilmesi ve diğer sayım yöntemlerini desteklemek amacıyla kullanımı daha uygundur.

3. Demineralize edilmiş kök yüzeylerine PDGF-BB uygulanmasının PDL fibroblastlarının tutunmasına etkilerinin değerlendirilmesi

Gamal ve arkadaşları (59) yaptıkları benzer bir çalışmada demineralizasyon uygulamadıkları kök yüzeylerine 0-300 ng/ml konsantrasyonlarda PDGF-BB uygulamışlar ve yine SEM'de inceleyerek hücre sayısını belirlemişlerdir. Sonuç olarak 50 ng/ml ve üzeri konsantrasyonlarda PDGF-BB'nin tutunan hücre sayısını artırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada 0,5µg/ml gibi daha fazla konsantrasyonda PDGF-BB kullanılmasına rağmen kontrol grubuyla anlamlı fark bulunamamıştır. Çalışmalar arasındaki bu farklılık yukarıda belirtildiği gibi yöntemdeki farklılıktan ve Gamal ve arkadaşlarının çalışmasında tüm sement uzaklaştırılmışken bu çalışmada uzaklaştırılmamış olmasından kaynaklanmış olabilir.

Zaman ve arkadaşları (155) yaptıkları çalışmada periodontal hastalık sebebiyle çekilen dişlerden sement yüzeyini frez yardımıyla tamamen kaldırarak standart büyüklükte dentin blokları hazırlamışlar ve %24 EDTA sol ile demineralize etmişlerdir. EDTA uygulanmamış dentin bloğu çalışmaya dahil edilmemiştir. Dentin blokları 1 µg/ml PDGF-BB veya kontrol grubu olarak antibiyotik solüsyonunda bekletilmiştir. Kök yüzeylerine hücreler ekildikten sonra 2., 4. ve 7. günlerde dentin blokları ışık mikroskopunda incelenerek her blokta seçilen 3 bölgeye tutunan hücre sayısı grid yardımıyla sayılmıştır. Sonuç olarak PDGF-BB uygulanan yüzeylere sadece EDTA uygulanan yüzeylere oranla daha fazla hücre tutunduğu, PDGF-BB'nin EDTA ile demineralize edilmiş yüzeylere uygulanmasının periodontal tedavide kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada EDTA uygulanan kök yüzeylerine PDGF-BB uygulanmasının tutunanan hücre sayısını artırmadığı belirlenmiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın sebebi Zaman ve arkadaşlarının dentin yüzeyi kullanması ve hücre sayılarının belirlenmesinde farklı yöntemlerin kullanılmasına bağlı olabilir. Işık mikroskopta yapılan sayımda tüm kök yüzeyindeki hücre sayısı değil seçilen alanlardaki hücre sayısı belirlenmektedir, bu çalışmada kullanılan XTT yöntemi ile tüm kök yüzeyine tutunan hücrelerin sayısı belirlenebilmektedir.

Yapılan literatür incelemesinde PDGF-BB'nin ve demineralizan ajanlarının birlikte kullanıldığı yalnızca 2 adet *in vitro* çalışmaya rastlanmıştır. Bu 2 çalışmadan biri olan Zaman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada demineralize edilmemiş kök yüzeyi kullanılmamış, tüm kökler EDTA ile demineralize edilmiştir. Bu çalışmada PDGF-BB uygulanan tüm yüzeylere tutunan hücre sayısı istatistiksel anlamlı olmamakla beraber PDGF-BB uygulanmayan yüzeylerden fazladır. Ancak T-HCl'nin PDGF-BB ile birlikte kullanımı yine anlamlı olmamakla beraber tutunan hücre sayısında diğer tüm gruplara oranla düşüş göstermiştir. Gamal ve arkadaşları (58), kök yüzeylerine tutunan T-HCl'nin PDGF-BB'nin fiziksel ve kimyasal yapısını değiştirebileceğini ve bu nedenle PDGF-BB ve T-HCl'nin birlikte kullanımının tutunan hücre sayısını azaltabileceğini bildirmiştir. Çalışmada kullanılan T-HCl piyasada bulunan Tetra kapsüllerin serum fizyolojik içerisinde eritilmesi ile elde edilmiştir. Ancak bu kapsüller oral kullanım için hazırlandığından içerisinde mikrodoldurucular ve diğer bazı maddeler bulunmaktadır. PDGF-BB ile T-HCl'nin ters etkileşiminin nedeni etkinliği tam olarak bilinmeyen bu maddelerden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle saf T-HCl'nin PDGF ile birlikte kullanımının ileriki çalışmalarda denenmesi faydalı olacaktır (74).

4. SEM İncelemelerinin Değerlendirilmesi

Hüresiz kök yüzeylerinde yapılan SEM incelemelerinde sadece KYD yapılan grupta smear tabakasının tüm yüzeyi kapladığı ve her 3 demineralizan ajanın uygulanmasının smear tabakasını kaldırabildiği gözlenmiştir (85, 119). Kök yüzeylerinin demineralizasyonuyla kollagen lif girişleri açığa çıkmıştır (74, 75) ve tüm kök yüzeyi fibriler bir yapı sergilemektedir. En derin demineralizasyon sitrik asitle demineralize edilen kök yüzeylerinde izlenmiştir (85). Kök yüzeylerindeki demineralizasyonun her bölgede eşit olmadığı; bazı bölgelerin demineralizasyondan daha fazla etkilenirken bazı bölgelerin ise çok az etkilendiği görülmüştür. Özellikle dentinin açığa çıktığı bölgelerde daha derin demineralizasyon elde edilmiştir. Demineralizasyondan az etkilenen bölgelerin hipermineralize sement alanları olduğu düşünülmektedir (11).

Hücreli kök yüzeylerinde yapılan SEM incelemelerinde her gruptaki kök yüzeylerine hücrelerin tutunduğu izlenmiştir ve hücrelerin tutunamadığı hiç bir örneğe rastlanılmamıştır. Bazı hücrelerin kök yüzeylerine daha fazla yayıldığı hücre

kültüründeki fibroblastik görüntüye benzer şekilde yassı ve düz olduğu izlendi. Hücrelerin birbirlerine ve kök yüzeyine çok sayıda ince hücresele uzantılarla (filopodia) tutunduğu net olarak izlendi. Bazı hücrelerin ise küresel olduğu ve henüz kök yüzeylerine yayılmamış oldukları izlendi. Bu hücrelerin kök yüzeylerine ve diğer hücrelere çok sayıda hücresele uzantıyla tutunmuş oldukları özellikle yayılmış hücrelerin üzerlerine kümeler halinde tutunarak katlı bir yapı sergiledikleri görüldü. Kök yüzeylerinde bazı alanlarda yoğun hücre izlenirken aynı kök yüzeyindeki bazı bölgelere hücrelerin tutunmadığı gözlenmiştir ve hücresiz alanların çoğunlukla demineralizasyondan etkilenmeyen hipermineralize alanlar olduğu görüldü. Ancak kollagen lif girişlerinin açığa çıktığı demineralize bazı alanlara da hücrelerin tutunmadığı belirlendi. Bu durum yüzey enerjisindeki ya da aynı pasaj grubundan olmasına rağmen hücre tipindeki farklılıktan, veya o bölgelerde yeterli sterilizasyonun sağlanamamasından kaynaklanmış olabilir (58). Demineralize edilen ve edilmeyen kök yüzeylerindeki hücre morfolojileri arasında ve farklı ajanların demineralizan ajanların uygulandığı kök yüzeylerindeki hücre morfolojilerinde Rompen ve arkadaşlarının (125) yaptığı çalışmanın 2 saatlik sonuçlarıyla uyumlu olarak değişiklik izlenmemiştir. Tüm PDGF-BB uygulanmış yüzeylerin, uygulanmamış gruplara kıyasla puslu bir tabakayla kaplanmış görüntüsü vardır. Ancak PDGF-BB uygulanan yüzeylerde de hücre morfolojilerinde farklılık izlenmemiştir.

Bu çalışmada farklı ajanlarla demineralizasyonun, demineralize edilmemiş yüzeylere oranla tutunan hücre sayısını anlamlı olarak artırmadığı izlendi; ancak anlamlı olmamakla birlikte demineralize yüzeylere daha fazla hücre tutunduğu belirlendi. PDGF-BB uygulaması demineralize edilen ve edilmeyen yüzeylerde hücre tutunmasını anlamlı olarak arttırmadı; ancak en fazla hücre tutunması en derin demineralizasyonun sağlandığı sitrik asit + PDGF-BB uygulanan grupta oldu. Bunun nedeni derin demineralizasyon sonucu PDGF-BB'nin tutunabilmesi için daha fazla alanın ve kollagenin açığa çıkması olabilir. Tüm gruplar içerisinde en az hücre T-HCl + PDGF-BB uygulanan grupta izlenmiştir. T-HCl'in PDGF-BB ile birlikte kullanımının ileriki çalışmalarda değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

Yapılan SEM incelemesinde hücrelerin demineralize edilmiş veya edilmemiş KYD uygulanmış tüm kök yüzeylerine tutunabildiği ve morfolojilerinde fark olmadığı görülmüştür.

Aynı grup içerisinde tutunan hücre sayılarında büyük farklılıklar izlenmiştir. Varyasyonların bu kadar yüksek olması istatistiksel değerlendirme sonuçlarında anlamlı fark olmasını engellemiştir. Hücrelerin kök yüzeylerine tutunmasında demineralizasyondan çok KYD işlemi ile kök yüzeylerindeki düzensizliklerin giderilmesi ve hipermineralize alanların kaldırılması önem taşımaktadır. PDGF-BB'nin uygulanmasında özellikle sitrik asitle demineralizasyonun faydalı olacağı ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.



SONUÇLAR

Periodontitisten etkilenmiş kök yüzeylerinin farklı demineralizan ajanlarla dağlanmasının ve PDGF-BB uygulanmasının PDL fibroblastlarının kök yüzeyine tutunmalarına olan etkilerinin XTT ile değerlendirildiği bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir:

- 1) Demineralize edilen ve edilmeyen kök yüzeylerine tutunan hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ancak ortalamalara bakıldığında demineralize edilen kök yüzeylerine daha fazla hücre tutunduğu görüldü (şekil 5).
- 2) Farklı demineralizan ajanların uygulandığı kök yüzeylerine tutunan hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (şekil 6).
- 3) PDGF-BB uygulanan ve uygulanmayan kök yüzeylerine tutunan hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ancak, ortalamalara bakıldığında PDGF-BB uygulanan kök yüzeylerine daha fazla hücre tutunduğu görüldü (şekil 7).
- 4) PDGF-BB'nin farklı ajanlarla demineralize edilmiş veya demineralize edilmemiş kök yüzeylerine uygulanması kök yüzeylerine tutunan hücre sayısında istatistiksel anlamlı fark yaratmadı. Ancak ortalamalara bakıldığında en fazla hücrenin PDGF-BB'nin sitrik asitle birlikte kullanıldığı kök yüzeylerine, en az hücrenin ise PDGF-BB'nin T-HCL ile birlikte kullanıldığı kök yüzeylerine tutunduğu gözlendi (şekil 8).
- 5) Yapılan SEM incelemesinde hücrelerin demineralize edilmiş veya edilmemiş KYD uygulanmiş tüm kök yüzeylerine tutunabildiği ve morfolojilerinde fark olmadığı görüldü.

Periodontal rejenerasyonda hastalıklı kök yüzeylerinin PDL hücrelerinin tutunmasına elverişli bir yüzey haline getirilmesinde periodontal tedavinin temelini

oluşturan KYD işlemi en 6nemli basamaktır. Periodontal rejenerasyonda PDL h6crelerinin tutunmasının desteklenmesinde PDGF-BB kullanılabilir. PDGF-BB'nin klinik olarak uygulanmasında sitrik asitle demineralize edilmiş k6k y6zeyleri taşıyıcı olarak kullanılabilir.



ÖZET

Büyüme faktörleri (GF) periodontal ligament (PDL) hücrelerinin çeşitli hücresel fonksiyonlarını düzenleme yeteneklerinden dolayı son yıllarda ilgi odağı olmuştur. Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF-BB) periodontolojide en çok çalışılan ve ümit verici sonuçlar veren GF'lerden biridir. Bu çalışmanın amacı, PDGF-BB'nin farklı ajanlarla demineralize edilmiş kök yüzeylerine uygulanması sonrasında PDL hücrelerinin kök yüzeylerine tutunmasının değerlendirilmesidir. Periodontal hastalık nedeniyle çekim kararı verilmiş alt anterior dişlerden hazırlanan 80 kök parçasına şu işlemler uygulandı: 1)Yalnızca kök yüzeyi düzleştirilmesi (KYD) 2) KYD + PDGF-BB 3) KYD + sitrik asitle dağlama 4) KYD + sitrik asitle dağlama + PDGF-BB 5) KYD + tetrasiklin hidroklorür (T-HCl) ile dağlama 6) KYD + T-HCl ile dağlama +PDGF-BB 7) KYD + diamin tetraasetik asit (EDTA) ile dağlama 8) KYD + EDTA ile dağlama + PDGF-BB. Her grupta bulunan toplam 10 kök parçasından 7'sinin yüzeyine, ortodontik nedenle çekilen premolar dişlerin kök yüzeylerinden elde edilerek üretilen PDL hücreleri ekilerek inkübe edildi. Diğer 3 kök parçasına hücreler ekilmeden aynı işlemlere tabi tutuldu. 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda her kök parçasının bulunduğu göze (2,3)-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamin)-karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit (XTT) + ko-enzim Q₀ konularak ikinci bir inkübasyon uygulandı. Her gözden elden edilen solüsyon, mikro pleyt okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü. Absorbans eğrisi kullanılarak kök yüzeyine tutunan metabolik olarak aktif hücreler sayısal olarak belirlendi ve mm²'ye düşen hücre sayısı hesaplandı. Her gruptan hücre ekilmemiş 2 kök ve hücre ekilmiş 3 kök parçası taramalı elektron mikroskopta (SEM) incelendi ve farklı büyütmelerde görüntülendi. Sonuç olarak 8 farklı gruptaki kök yüzeylerine tutunan hücre sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı. Ancak tutunan hücre sayılarının ortalamalarına bakıldığında en fazla hücrenin KYD + sitrik asitle dağlama + rPDGF-BB uygulanan kök yüzeylerine, en az hücrenin de KYD + T-HCL ile dağlama + rPDGF-BB uygulanan kök yüzeylerine

tutunduğu görüldü. Periodontal hastalığa maruz kalmış kök yüzeylerinin PDL hücrelerinin tutunması için biyouyumlu hale getirilmesinde KYD en önemli uygulamadır. PDGF-BB uygulaması ncesinde kk yüzeylerinin sitrik asitle demineralizasyonu periodontal rejenerasyonu desteklemek amacıyla kullanılabilir.



ABSTRACT

Several growth factors (GF) have recently received attention because of their ability to regulate various cellular functions of periodontal ligament (PDL) cells and have been used for the regeneration of the periodontal tissues. Platelet derived growth factor (PDGF) has been the most thoroughly described growth factor and promising results have been obtained by using this GF. The aim of this study was to evaluate the effects of PDGF-BB application to the root surfaces demineralized with different agents, on the periodontal cell attachment. Eighty root slices obtained from the lower anterior teeth that had been extracted due to the periodontal disease and was subjected to one of the following treatments: 1) Only root planing 2) root planing + PDGF-BB 3) root planing + citric acid demineralization 4) root planing + citric acid demineralization + PDGF-BB 5) root planing + tetracyclin HCl (T-HCl) demineralization 6) root planing + T-HCL demineralization + PDGF-BB 7) root planing + ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) demineralization 8) root planing + EDTA demineralization + PDGF-BB. Human PDL cells acquired from extracted first premolars due to orthodontical means were seeded and incubated on the root surfaces of 7 of the 10 roots in each group. The remaining 3 roots were subjected to the same procedures except seeding of PDL cells on. Following the 2 hour incubation, 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) + Co-enzyme Q₀ solution was added to each well containing a root slice and incubated for a second time. The medium obtained from each well, was read by using a microplate reader spectrophotometer. The number of metabolically active cells attached to the root surfaces, was calculated from the standart curve. 3 root slices with attached cells and 2 root slices without cells, from each group processed for SEM viewing and photographed at different mgnifications. As a result no significant intergroup differences were found regarding the number of attached cells. But the mean number of the attached cells was highest in the 4th group roots subjected to root planing + citric acid

demineralization + PDGF-BB and the mean number of the attached cells was lowest in the 6th group roots subjected to planing + T-HCL demineralization + PDGF-BB. Root planing is the most important treatment in an attempt to converse the diseased root surfaces to a surface which is biocompatible to PDL cell adherence. PDGF-BB application to citric acid root surfaces demineralized with citric acid could be used to enhance periodontal regeneration.



KAYNAKLAR

1. Adriaens P.A., Edwards C.A., DeBoever S.A., Loeshe W.J. (1988). Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth, *J Periodontol*, 59: 493- 503
2. Al-Ali W., Bissada N.F., Greenwell H. (1989). The effect of local doxycycline with and without tricalcium phosphate on regenerative healing potential of periodontal osseous defects in dogs, *J Periodontol*, 60: 582-590
3. Albair W.B., Cobb C.M., Koloy W.J. (1982). Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization, *J Periodontol*, 53: 515-525
4. Aloe J.J., De Renzis F.A., Farber P.A. (1975). In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces, *J Periodontol*, 46: 639-645
5. Aloe J.J., De Renzis F.A., Farber P.A., Varboncoeur A.P. (1974). The presence and biologic activity of cementum- bound endotoksin, *J Periodontol*, 45: 672-675
6. Alpar B., Leyhausen G., Günay H., Geurtsen W. (2000). Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells, *Clin Oral Invest*, 4: 219-225
7. Alveres O., Klabe R., Grant G., Cochran D.L. (1995). Growth factor effects on expression of collagenase and TIMP-in periodontal ligament cell, *J Periodontol*, 66: 552-558
8. Armitage G.C., Christie J.M. (1973). Structural changes in exposed human cementum: Electron microscopic observations, *J Periodont Res*, 8: 356-365
9. Atilla G., Baylas H. (1996). Electron probe analysis of cementum surfaces, *J Marmara UDF*, 2: 510-514
10. Atilla G., Baylas H., Öztop F. (1993). Periodontitisli sement ve dentin yüzeyinde kök planlamasından sonra sitrik asit uygulamasının tkileri, *A. Ü. Diş. Hek. Fak. Derg*, 20: 121-126
11. Atilla G., G, Baylas H. (1996). Effects of various demineralizing agents on mineral contents of cementum surfaces (An electron probe analysis), *J Marmara UDF*, 2: 515-519
12. Atilla G., Öztop F., Baylas H. (1993). Tetrasiklin HCL ve Minosiklin HCL demineralizasyonunun epitel ve bağ dokusu yanıtına etkileri, *A. Ü. Diş. Hek. Fak. Derg*, 20: 239-245
13. Aukhil J., Simpson P.M., Schaberg T.V. (1983). An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs, *J Periodontal Res*, 18: 643-654

14. Baker P.J., Evans R.T., Coburn R.A., Genco R.J. (1983). Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form, *J Periodontol*, 54: 580-585
15. Baker P.J., Rotch H.A., Trombelli L., Wikesjö U.M. (2000). An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures, *J Periodontol*, 71: 1139-1143
16. Baloş K., Özcan G., Baran C.C., Gürhan İ. (1987). Dişeti ve periodontal ligament fibroblastlarının değişik özelliklerinin incelenmesi, *Otorinolarenoloji ve Stomatoloji Dergisi*, 3: 151-155
17. Baran C.C., Özcan G., Yalım M., Gürhan İ., Baloş K. (1990). İnsan periodontal ligament fibroblastlarının hastalıklı kök yüzeyine ataşmanı (In Vitro Çalışma), *A. Ü. Diş. Hek. Fak. Derg.*, 17: 423-430
18. Bartold P.M. (1992). Narayanan A.S., Page R.C.: Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation, *J Periodont Res*, 27:499-505
19. Bartold P.M., Narayanan A.S. (1998). Biology of the periodontal connective tissues, *Quintessence publishing CO*, 11: 241-287
20. Becker W., Becker B.E., Berg L. (1986). Clinical and volumetric analysis of three-wall intrabony defects following open flap debridement, *J Periodontol*, 57: 277-285
21. Becker W., Becker B.E., Prichard J.F., Caffesse R., Rosenberg E., Gian-Grasso J. (1987). Root isolation for new attachment procedures. A surgical and suturing method: Three case reports, *J Periodontol*, 58: 819-826
22. Beertsen W. (1975). Migration of fibroblasts in the periodontal ligament of the mouse incisor as revealed by autoradiography, *Arch Oral Biol*, 20: 659-666
23. Berkovitz B.K.B., Shore R.C., Cells of periodontal ligament .In: Berkovitz BKB, Newman HN (eds) *The periodontal ligament in health and disease*, Pergamon Press, Oxford pp 25-50
24. Blom S., Holmstrup P., Dabelsteen E. (1994). A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast like cells'DNA synthesis and morphology, *J Periodontol*, 65: 373-378
25. Blomlöf J., Lindskog S. (1995). Periodontal tissue vitality after different etching modalities, *J Clin Periodontol*, 22: 464-468
26. Blomlöf J., Jansson L., Blomlöf L., Lindskog S. (1995). Long time etching at low pH jeopardizes periodontal healing, *J Clin Periodontol*, 22: 459-463
27. Blomlöf J., Jansson L., Blomlöf L., Lindskog S. (1996). Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing, *J Clin Periodontol*, 23: 50-55
28. Blomlöf J., Lindskog S. (1995). Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities, *European Journal of Oral Sciences*, 103: 17-24

29. Blomlöf J.P.S., Blomlöf L.B., Lindskog S.F. (1996). Smear removal and collagen exposure after non surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation, *J Periodontol*, 67: 841-845
30. Blomlöf L., Otteskog P. (1981). Composition of human periodontal ligament cells in tissue culture, *Scand J Dent Res*, 89: 43-47
31. Bogle G., Adams D., Crigger M., Klinge B., Egelberg J. (1981). New attachment after surgical treatment and acid conditioning of roots in naturally occurring periodontal disease in dogs, *J Periodont Res*, 16: 130-133
32. Bowers G.M., Granet M., Stevens M. (1985). Histologic evaluation of new attachment in humans. A preliminary report, *J Periodontol*, 56:381-396
33. Boyko G.A., Brunette D.M., Melcher A.H. (1980). Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro, *J Periodontol Res*, 15: 297-303
34. Caffesse R.G., Quinones C.R. (1993). Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration, *Periodontology 2000*, 1: 69-79
35. Canalis E., McCarthy T.L., Centrella K. (1989). Effects of platelet derived growth factor on bone formation in vitro, *J Cellular Physiology*, 140: 530-537
36. Caton J., Nyman S., Zander H.A. (1980). Histometric evaluation of periodontal surgery 2: Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures, *J Clin Periodontol*, 7: 224- 231
37. Caton J.G., Zander H.A. (1976). Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue, *J Clin Periodontol*, 3:54-58
38. Caton J.G., Zander H.A. (1979). The attachment between tooth and soft tissues after periodic root planning and soft tissue curettage, *J Periodontol*, 50: 462-466
39. Cho M., Lin W.L., Genco R.J. (1995). Platelet derived growth factor modulated guided tissue regenerative therapy, *J Periodontol*, 66: 522-530
40. Claffey N., Bogle G., Bjorvatn K., Selvig K.A., Egelberg J. (1987). Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. *Acta Odontol Scand*, 45: 141-416
41. Cogen R.B., Al-Joburi W., Gantt D.G., Denys F.R. (1984). Effects of various root surface treatments on the attachment and growth of human gingival fibroblasts: histologic and scanning electron microscopic evaluation, *J Clin periodontol*, 11: 531-539
42. Cogen R.B., Garrison D.C., Weatherford T.W. (1983). Effect of various root surface treatments on the viability and attachment of human gingival fibroblast, *J Periodontol*, 54: 277-282
43. Coldiron N.M., Yukna R.A., Weir J., Caudill R.F. (1990). A quantitative study of cementum removal with hand curettes, *J Periodontol*, 61:293-299
44. Cole R.T., Crigger M., Bogle G., Egelberg J., Selvig K.A. (1980). Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth, A histological study, *J Periodont Res*, 15:1-9
45. Crigger M., Bogle G., Nilveus R., Egelberg J., Selvig K.A. (1978). The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs, *J Periodont Res*, 13: 538-549

46. Daly C.G., Seymour G.J., Kieser J.B. (1982). Corbet E.F., Histological assessment of periodontally involved cementum, *J Clin Periodontol*, 9: 266- 274
47. Daly C.G. (1982). Anti-bacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces in vitro, *J Clinical Periodontol*, 9: 386-392
48. Egelberg J. (1987). Regeneration and repair of periodontal tissues, *J Periodont Res*, 22: 233- 242
49. Eide B., Lie T., Selvig K.A. (1983). Surface coatings on dental cementum incident to periodontal disease. I. A scanning electron microscopic study, *J Clin Periodontol*, 10:157-171
50. El Attar J.M.A., Lin H.S., Shultz R.(1988). Effect of minocycline on prostoglandin formation in gingival fibroblasts, *J PeriodontolRes*, 23: 285-286
51. Fernhough W., Page R.C. (1983). Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots, *J Periodontol*, 54: 141-147
52. Fine D., Morris M.L., Tabak L., Cole J. (1980). Preliminary charecterizations of material eluded from roots of periodontally diseased teeth, *J Periodont Res*, 9: 386-392
53. Frantz B., Polson A. (1988). Tissue inter actions with dentin specimens after demineralization using tetracycline, *J Periodontol*, 59: 714-721
54. Fuentes P., Garrett S., Nilveus R., Egelberg J. (1993). Treatment of periodontal furcation defects. coronally positioned flap with or without citric acid conditioning in class II defects, *J Clin Periodontol*, 20: 425-430
55. Fuji H., Kitazawa R., Maede S., Mizuno K., Kitazawa Z. (1999). Expression of platelet derived growth factor proteins and their receptor alpha and beta mRNAs during fracture healing in the normal Mouse, *Histochem Cell Biol*, 112: 131-138
56. Fukazawa E., Nishimura K. (1994). superficial cemental curettage : Its Efficacy in promotting improved cellular attachment on human root surfaces previously damaged by periodontitis, *J Periodontol*, 65:168-176
57. Fullmer H.M. Connective tissue components of the periodontium. In: Miles AEW (eds) Structural and chemical organization of the teeth, vol 2 Academic Press, New York p349
58. Gamal A.Y., Mailhot J.M., Newhouse R., Sharawy M.M. (1998). Human periodontal ligament fibroblasts response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces, *J Clin Periodontol*, 25: 404-412
59. Gamal A.Y., Mailhot J.M. (2000). The effect of local delivery of PDGF-BB on attachment of human periodontal ligament fibroblasts to periodontitis-affected root surfaces-in vitro, *J Clin Periodontol*, 27: 347-353
60. Garberoglio R., Brannström M. (1976). Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules, *Arch Oral Biol*, 21: 355-362
61. Garrett J.S., Crigger M., Egelberg J. (1978). Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J Periodont Res*, 13: 155-163
62. Gomes B.C., Golub L.M., Ramamurthy N.S. (1984). Tetracyclines inhibit parathyroid hormone- induced bone resorption in organ culture, *Experientia*, 40: 1273-75

63. Goodson J.M., A.C.R. (1982). Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease, *J Clin Periodontol*, 9: 472-481
64. Graves D.T., Valentin –Opran A., Delgado R. (1993). Platelet derived growth factor isoforms on calcium release from neonatal mouse calvaria, *Bone*, 4: 53-54
65. Groeneveld M.C., Everts V., Beertsen W. (1993). A quantitative enzyme histochemical analysis of the distribution of alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament of the rat incisor, *J Dent Res*, 72: 1344-1350
66. Haffajee A.D., Socransky S.S., Goodson J.M. (1983). Comparison of different data analysis for detecting changes in attachment level, *J Clinical Periodontol*, 10: 298-310
67. Haffajee A.D., Socransky S.S. (1986). Attachment level changes in destructive periodontal disease, *J Clinical Periodontol*, 13: 461-472
68. Helden C.H., Backstrom G., Ostman A. (1988). Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types, *Embryology Journal*, 7: 1387-1393
69. Heritier M. (1984). Effects of phosphoric acid on root dentin surface. A scanning and transmission electron microscopic study, *J Periodont Res*, 19: 168-176
70. Hou L.T., Liu C.M., Lei J.Y., Wong M.Y., Chen J.K. (2000). Biological effects of cementum and bone extracts on human periodontal fibroblasts, *J Periodontol*, 71: 1100-1109
71. Howell T.H., Fiorellini J., Paquette D., Offenbacher S., Antoniades H., Lynch S. (1997). A phase I/II trial to evaluate a combination of recombinant platelet derived growth factor BB and human insulin like growth factor in patients with periodontal disease, *J Periodontol*, 68: 1186-1193
72. Isidor F., Karring T., Nyman S., Lindhe J. (1985). New attachment-reattachment following reconstructive periodontal surgery, *J Clin Periodontol*, 12: 728-735
73. Işık G., İnce S., Sağlam F., Onan U. (1997). Comparative SEM study on the effect of different demineralization methods with tetracycline HCL on healthy root surfaces, *J Clin Periodont*, 24: 589-594
74. Işık G.A., Tarim B., Hafez A.A., Yalçın I.S., Onan U. (2000). Cox C.F., A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCL concentrations and application times, *J Periodontol*, 71: 219-225
75. James J.A., Sayers N.M., Drucker D.B., Hull P.S. (1999). Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts, *J Periodontol*, 70, 518-525
76. Jones S.J., Lozdan J., Boyde A. (1972). Tooth surfaces treated insitu with periodontal instruments SEM studies, *Br Dent*, 132:57-64
77. Jones W.A., O'leary T.J. (1978). The effectiveness of invivo root planning in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth, *J Periodontol*, 49: 337-342
78. Karring T., Isidor F., Nyman S., Lindhe J. (1985). New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament, *J Clin Periodontol*, 12: 51-60

79. Karring T., Nyman S., Gottlow J. (1993). Development of the biological concept of guided tissue regeneration- animal and human studies, *Periodontology 2000*, 1: 26-35
80. Karring T., Nyman S., Lindhe J. (1980). Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue, *J Clin Periodontol*, 7: 96-105
81. Karring T. Repair or regeneration, does it matter? Ed: Guggenheim B (ed) *Periodontology today* Basel, Karger (1988), 271-280
82. Kashani H.G., Magner A.W., Stahl S.S. (1984). The effect of root planing and citric acid applications on flap healing in humans a histological evaluation, *J Periodontol*, 55: 679-683
83. King G.N., King N., Hughes F.J. (1998). Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo, *J Periodont Res*, 33: 226-236
84. Kleinman H.K., Klebe R.J., Martin G.R. (1981). Role of collagen matrices in the adhesion and growth of cells, *J Cell Biol*, 88: 473-485
85. Labahn R., Fahrenbach W.H., Clark S.M., Lie T., Adams D.F. (1992). Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning, *J Periodontol*, 63: 303-309
86. Larjawa H., Salonen J., Hakkinen L., Narhi J. (1988). Effect of citric acid treatment on the migration of epithelium on root surfaces in vitro, *J Periodontol*, 59: 95-99
87. Lindhe J., Haffajee A.D., Socransky S.S. (1983). Progression of periodontal disease in adult subject in absence of periodontal therapy, *J Clin Periodontol*, 10:433-422
88. Lopez N.J. (1984). Connective tissue regeneration to periodontally diseased root , planed and conditioned with citric acid and implanted into the oral mucosa, *J Periodontol*, 55: 381-390
89. Lowenberg B.F., Aubin J.E., Pitaru S., Melcher A.H. (1984). A new chromium assay for accurate measurement of cell attachment to demineralized and non-demineralized dentin in vitro, *J Periodont Res*, 19: 40-50
90. Lowenguth R.A., Blieden T.M. (1993). Periodontal regeneration: root surface demineralization, *Periodontology 2000*, 1: 54- 68
91. Lynch S.E., Ruiz D.E., Castella G., Williams R.C. (1991). The effect of short term application of a combination of platelet derived growth factor and insulin like growth factor on periodontal wound healing, *J Periodontol*, 62: 458-467
92. Lynch S.E., Williams R.C., Polson A.M. (1989). A combination of platelet derived and insulin like growth factors enhances periodontal regeneration., *J Clin Periodontol*, 16: 545-548
93. Magnusson I., Claffey N., Bogle G., Garrett S., Egelberg J. (1985). Root resorption following periodontal flap procedures in monkeys, *J Periodont Res*, 20: 79-85
94. Mailhot J.M., Sharawy M.M.Galal M. (1996). Porous polysulfone coated with platelet derived growth factor-BB stimulates proliferation of human periodontal ligament fibroblasts, *J Periodontol*, 67: 981-985

95. Matsuda N., Lin W.L., Kumar N.M., Cho M.I., Genco R.J. (1992). Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament cells to polypeptid growth factors in vitro, *J Periodontol*, 63:515-525
96. Mayfield L., Soderholm G. (1998). Norderyd O., Attstrom R., Root conditioning using EDTA gel as an adjunct to surgical therapy for the treatment of intraosseous periodontal defects, *J Clin Periodontol*, 25: 707-714
97. Mc Hugh W.D. (1988). The affect of exclusion of epithelium from healing periodontal pockets, *J Periodontol*, 59: 750-757
98. McGeachie J., Tennant M. (1997). Growth factors and their implications for clinicians: A brief review, *Australian Dental Journal*, 42: 375-380
99. Melcher A.H. (1976). On the repair potential of periodontal tissues, *J Periodontol*, 47:256-260
100. Miller P.D. (1982). Root coverage using a free soft tissue autograft following citric acid application (I). Tecnique, *J Rest Dent*, 2: 65-70
101. Miller P.D. (1983). Root coverage using a free soft tissue autograft following citric acid application (II). Treatment of carious root, *J Res Dent*, 3:38-51
102. Moskow B.S., Karsh F., Stein S.D. (1979). Histological assesment of autogenous bone graft: A case report and clinical evaluation, *J Periodontol*, 50: 291-300
103. Murakami S., Takayama S., Ikezawa K., Shimabukuro Y., Kitamura M., Nozaki T., Terashima A., Asano T., Okada H. (1999). Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor, *J Periodont Res*, 34: 425-430
104. Nakib N.M., Bissada N.F., Simmelink J.W., Goldstine S.N. (1982). Endotoksin penetration of periodontally healthy and diseased human teeth, *J Periodontol*, 368-378
105. Nevins M., Camelo M., Nevins M.L., Schenk R.K., Lynch S.E. (2003). Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet derived growth factor BB (rh PDGF-BB) and allogenic bone, *J Periodontol*, 74: 1282-1292
106. Nilveus R., Bogle G., Crigger M., Egelberg J., Selvig K.A. (1980). The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. (II) Healing after repeated surgery, *J Periodont Res*, 15: 544-550
107. Nilveus R., Egelberg J. (1980). The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. (III) The relative importance of coagulum support, flap design and systemic antibiotics, *J Periodont Res*, 15: 551-560
108. Nishimura F., Terranova V.P. (1996). Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors, *J Dent Res*, 75: 986-992
109. Nyman S., Karring T., Lindhe J. (1980). Planten S., Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue, *J Clin Periodontol*, 7: 394-401
110. Nyman S., Lindhe J., Karring T. (1982). Rylander H., New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, *J Clin Periodontol*, 9: 290-296

111. Nyman S., Gottlow J., Lindhe J., Karring T., Wennstrom J. (1987). New attachment formation by guided tissue regeneration, *J Periodont Res*, 22: 252-254
112. O'leary T.J., Kafrawy A.H. (1983). Total cementum removal: A realistic objective?, *J Periodontol*, 221-226
113. Oates T.W., Rouse C.A., Cochren D.L. (1993). Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro, *J Periodontol*, 64: 142-148
114. Özcan N.G., Kurtiş B., Baloş K. (1997). Combined use of root conditioning, fibrin-fibronectin system and a collagen membrane to treat a localized gingival recession. A 10-Case report, *J Marmara UDF*, 2: 588-598
115. Park J.B., Matsuura M., Han K.Y., Norderyd O., Lin W.L., Genco R.J., Cho M.I. (1995). Periodontal regeneration in clas III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor, *J Periodontol*, 66: 462-467
116. Paul J., Cell and tissue culture 5th edition Edinburg: Churchill Livingstone pp 57-91
117. Polson A.M., Proye M.P. (1983). Fibrin Linkage: A precursor for new attachment, *J Periodontol*, 54: 141-147
118. Polson A.M., Caton J. (1982). Factors influencing periodontal repair and regeneration, *J Periodontol*, 53: 617-625
119. Polson A.M., Frederick G.T., Ladenheim S., Hanes P.J. (1984). The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid, *J Periodontol*, 55: 443-446
120. Position Paper. (1996). The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration, *J Periodontol*, 67:545-553
121. Register A.A., Burdick F.A. (1976). Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. II. Defect repair, *J Periodontol*, 47: 497-505
122. Register A.A., Burdick F.A. (1975). Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range, *J Periodontol*, 46: 646-655
123. Renvert S., Egelberg J. (1981). Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid conditioning on the root surface, *J Clin Periodontol*, 8: 459-473
124. Ririe C.M., Crigger M., Selvig K.A. (1980). Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs, *J Periodont Res*, 15:314-327
125. Rompen E.H., Goffinet G.H., Nusgens B. (1999). Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: An in vitro study, *J Periodontol*, 70: 1144-1152
126. Rompen E.H., Nusgens K.B., Lapiere C.M. (1993). Kinetic aspects of gingival and periodontal ligament fibroblast attachment to surface-conditioned dentin, *J Dent Res*, 72: 607-612
127. Rutherford R.B., Niekrash C.E., Kennedy J.E. (1992). Charette M.F., Platelet derived and insulin like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontol Res*, 27: 258-290

128. Rutherford R.B., Ryan M.E., Kennedy J.E. (1993). Platelet derived factor dexamethasone combined with collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys, *J Clin Periodontol*, 20: 537-544
129. Sarbinoff J.A., O'Leary T.J., Miller C.H. (1983). The comparative effectiveness of various agents in detoxifying diseased root surfaces, *J Periodontol*, 54: 77-80
130. Seifert R.A., Hart C.E., Phillips P.E., Fostrom J.W., Ross R., Murray M.J. (1989). Two different subunits associate to create isoform specific platelet derived growth factor receptors. *J Biol Chem*, 264: 8771-8778
131. Selvig K.A. (1996). Ultra structural changes in cementum and adjacent connective tissue in periodontal disease, *Acta Odontol Scan*, 24: 459-500
132. Selvig K.A., Hals E. (1977). Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and microscopy, *J Periodont Res*, 12: 419-429
133. Selvig K.A. (1969). Biological changes at the tooth saliva interface, *J Dent Res*, 48: 846-855
134. Somerman M.J., Archer S.Y., Imm G.R., Foster R.A. (1988). A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, *J Dent Res*, 67: 66-70
135. Stahl S.S., Froum S.J. (1977). Human clinical and histological repair responses following the use of citric acid in periodontal therapy, *J Periodontol*, 48: 261-266
136. Stahl S.S. (1977). Repair potential of the soft tissue-root interface, *J Periodontol*, 48: 545-552
137. Sterrett J.D., Bankey T., Murphy N.J. (1993). Dentin demineralization, the effects of citric acid concentration and application time, *J Clin Periodontol*, 20: 366-370
138. Sterrett J.D., Dhillon M., Murphy H.J. (1995). Citric acid demineralization of cementum and dentin: the effect of application pressure, *J Clin Periodontol*, 22: 434-441
139. Sterrett J.D., Murphy H.J. (1989). Citric acid burnishing of dentinal root surfaces, *J Clin Periodontol*, 16: 98-104
140. Steward H.T. (1985). Partial removal of cementum and decalcification of tooth in treatment of pyorrhea alveolaris, *Dent Cosmos*, 41: 617-626
141. Şen H.B., Chugal N.M., Liu H., Fleischmann J. (2003). A new method for studying the adhesion of *Candida albicans* to dentin in the presence or absence of smear layer, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 96: 201-206
142. Takayama S., Murakami S., Miki Y., Ikezawa K., Tasaka S., Terashima A., Asano T., Okada H. (1997). Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells, *J Periodont Res*, 32: 667-675
143. Terranova V.P., Franzetti L.C., Hic S., Diflorio R.M., Lyall R.M., Wikesjö U.M., Baker P.J., Christersson L.A., Genco R.J. (1986). A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth, *J periodont Res*, 21: 330-337
144. Theilig C., Bernd A., Leyhausen G., Kaufman R., Geurtsen W. (2001) Effects of mechanical force on primary human fibroblasts derived from the gingiva and the periodontal ligament, *J Dent Res*, 80: 1777-80

145. Trombelli L., Scabbia A., Zangari F., Griselli A., Wikesjö U.M., Claura G. (1995). Effects of tetracycline HCL on periodontally-affected human root surfaces, *J Periodontol*, 66: 685-691
146. Trombelli L., Scabbia N., Claura M. (1994). Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of solution concentration and application time, *Int J Periodont Res Dent*, 14: 461-470
147. Tsukuda N., Gabler W.L. (1993). The influence of doxycycline on the attachment of fibroblasts to gelatin-coated surfaces and its cytotoxicity, *J Periodontol*, 64: 1219-24
148. Wang H.L., Pappert J.D., Castelli W.A., Chiego D.J.J., Shyr Y., Smith B.A. (1994). The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: An autoradiographic study on dogs, *J Periodontol*, 65: 429-436
149. Wen C.R., Caffesse R.G., Morrison E.C., Nasjleti C.E., Parikh U.K. (1992). In vitro effects of citric acid application techniques on dentin surfaces, *J Periodontol*, 63: 883-899
150. Wikesjö U.M., Baker P.J., Christersson L.A. (1986). A biochemical approach to periodontal regeneration; tetracycline treatment conditions dentin surfaces, *J Periodont Res*, 21: 322-329
151. Wikesjö U.M.E., Claffey N. (1991). Nilveus R., Egelberg J.; Periodontal repair in dogs : Effect of root syrface treatment with stannous Fluoride or citric Acid on root resorption, *J Periodontol*, 62:180-184
152. Wirthlin M.R., Hancock E.B. (1980). Biologic preparation of diseased root surfaces, *J Periodontol*, 51: 291-297
153. Younger W.J. (1983). Some of the latest phases in implantation and other operations, *Dent Cosmos*, 35: 102-108
154. Zaman K.U., Sugaya T., Hongo O., Kato H. (2000). A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralizing with neutral and low pH etching solution, *J Periodontol*, 71: 1094-1099
155. Zaman K.U., Sugaya T., Kato H. (1999). Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-bb and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response, *J Periodont Res*, 34: 244-250

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılı Menemen/İZMİR doğumluyum. İlk öğrenimimi Cumhuriyet ilkokulunda tamamladım. Daha sonra İzmir Özel Türk Koleji'nde öğrenimime devam ettim ve 1994 yılında Manisa Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nde üniversite eğitimime başladım. 2000 yılında Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji ABD'nda doktora programına başladım, halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.