

31177

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ KÖK YÜZEY PREPARASYONU TEKNİKLERİNİN
İNSAN PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLAST
ATAÇMANI ve ORYANTASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İN VİTRO İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Dt. Mihtikâr YÜCEL
Periodontoloji Anabilim Dalı

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Tamer ATAÖĞLU

KONYA-1993

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
KISALTMALAR.....	1
GİRİŞ.....	1
LİTERATÜR BİLGİ.....	3
MATERYAL ve METOT.....	9
BULGULAR.....	18
TARTIŞMA.....	29
SONUÇLAR.....	34
ÖZET.....	35
YABANCI DİLDE ÖZET.....	36
LİTERATÜR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	47
TEŞEKKÜR.....	48

KISALTMALAR

YDR	:	Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu
MEM	:	Minimum Essential Medium
PBS-M	:	Fosfat Buffer Saline - Medium
FDS	:	Fötal Dana Serumu
PBS-V	:	Fosfat Buffer Saline - Versen
T	:	Tetrasiklin
SiA	:	Sitrik Asit
EDTA	:	Etilendiamintetraasidik Asit
CHx	:	Klorhekzidin
SK	:	Sağlıklı Kontrol
HK	:	Hastalıklı Kontrol
AI	:	Ataçman İndeksi
OI	:	Oryantasyon İndeksi
MOI	:	Modifiye Oryantasyon İndeksi

GİRİŞ

İhtihabi periodontal hastalıkların en sık rastlanan tipi olan periodontitis, dişetinde başlayan iltihabi olayın dişin destek dokularına yayılması sonucu gelişmektedir. Destek doku kaybının ileri boyutlara vardığı olgularda dişin kaybı söz konusudur.

Etyopatogeneze yönelik yapılan çalışmalar periodontal hastalıklarda primer etyolojik ajanın mikrobiyal plak olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca mikrobiyal plağın proteaz, hyaluronidaz, kollajenaz, endotoksin gibi bakteriyel enzim ve ürünleri içerdiği, bunları ortama saldığı gösterilmiştir. Bu ürünlerin epitel ve bağ dokusuna doğrudan zarar verdikleri, kısmende dişeti lezyonlarında doku yıkımından sorumlu oldukları belirtilmiştir. Periodontal hastalıkların klasik periodontal cerrahi tedavisinde cep eliminasyonu için kök yüzeylerindeki eklentiler ve granülasyon dokuları uzaklaştırılır. Tedaviyi takiben iyileşme kayıp periodontal dokuların rejenerasyonundan çok tamiri şeklindedir.

Periodontal tedavinin asıl amacı yıkıcı periodontal hastalık sonucu kaybedilen dokuların fonksiyonel konumlarıyla rejenere olmasıdır. Periodontal dokuların rejenerasyonu ağız ortamına açılmış kök yüzeylerinde yeni sement oluşumu, bu dokuya insersiyon yapan yeni kollajen fibriller, yeni kemik dokusu ve periodontal ligamentin gelişmesi ile gerçekleşir. Günümüzde, periodontal tedavi sonrası yeni ataçman oluşturmak üzere iki yaklaşım üzerinde durulmaktadır;

1) Sementoblastlara farklılaşma potansiyeline sahip öncü hücrelerin sadece hastalıktan etkilenmeden kalan periodontal ligamentte mevcut olduğu teorisine

dayanarak, hastalıktan etkilenmiş kök yüzeyinin bu hücrelerce repopüle edilmesine olanak sağlamak,

2) Ağız ortamına açılmış kök yüzeyinin, hücre ataçmanı ve farklılaşması için daha iyi bir substrat oluşturması amacı ile modifiye edilmesidir.

Yeni ataçman oluşmasında kök yüzeyinin niteliğinin önemli bir rol oynadığı, hatta büyük ölçüde belirleyici faktör olduğu savunulmaktadır. Periodontal tedavi sonrası iyileşmede, kök yüzeylerinin içerdiği sitotoksik faktörlerin belirli tekniklerle kaldırılması, bu yüzeylerin biyolojik olarak uygun hale getirilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla, küretler ve ultrasonik aletlerle yapılan mekanik kök yüzeyi tedavisine ek olarak kök yüzeyini demineralize edici ajanlar kullanılmaktadır. Kök yüzeyinin demineralizasyonu ve bunun sonucunda organik matriksin açığa çıkması ile diş yüzeyine periodontal bağ dokusu ataçmanı artmaktadır.

Periodontal tedavide subgingival bakterileri elimine etmek için mekanik işlemlere ek olarak Klorhekzidin glukonat (CHx) gibi antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır. Hücre kültüründe sitotoksik olduğu gösterilen CHx' nin fibroblastlar üzerindeki bu etkisi rejenerasyonda önemli olabilir.

Bu çalışmada, *in vitro* olarak elde edilen insan periodontal ligament fibroblastlarının değişik kök yüzey tedavisi uygulanmış olan hastalıklı ve sağlıklı kök kesitlerine olan ataçmanını, oryantasyonunu araştırmak ve bu ajanları kıyaslamak amaçlanmıştır.

LİTERATÜR BİLGİ

Periodontitis, dişetinde başlayan iltihabi olayın dişi destekleyen dokulara yayılması ile gelişen, periodontal cep oluşumu ve alveolar kemik kaybına neden olan iltihabi bir hastalıktır [15, 29, 36, 60]. Hastalığın oluşumunda çeşitli etkenler rol oynamakla beraber primer etyolojik etkenin mikrobiyal plak olduğu çeşitli araştırmalar sonucu ortaya konmuştur [1,28,37,43,67]. Ancak yapılan çalışmalar, sadece mikroorganizmaların varlığının hastalığın patogenezi açıklamada yetersiz kaldığını, hastalığın gelişebilmesi ve ilerleyebilmesi için mikroorganizmalar ve konak savunma mekanizmaları arasında bazı etkileşim sistemlerinin bulunduğunu göstermektedir. Bu etkileşimler çeşitli yollarla oluşmaktadır;

1) Bazı bakteri endotoksinleri normal savunma mekanizmasının fonksiyon görmesini engellemektedirler.

2) Bakteri komponentleri konağın çeşitli hücreleri ve sistemleri ile etkileşime girerek akut iltihabi cevabı ve bunu takiben immunopatolojik olayı başlatmakta ve bazı patolojik doku değişikliklerinin oluşmasına neden olmaktadır.

3) Endotoksin gibi bazı bakteri komponentleri doğrudan, kemik hücrelerini etkileyerek rezorbsiyonun oluşmasına yol açmaktadır.

Konak savunma sistemi hücreleri mikrobiyal plak ile karşılaştığında hem doku yıkıcı hem de koruyucu mekanizmalar aynı zamanda aktive olmaktadır. İltihabi cevap sonucu gerçekleşen doku yıkımı, savunma ve tamir mekanizmaları yeterli olmadığında meydana gelmektedir [3, 48, 80].

Periodontal hastalıkların klasik periodontal cerrahi tedavisini takiben, yeterli plak kontrolü için uygun dokular elde edilebilmesine ve periodontal doku yıkımının durdurulabilmesine rağmen genellikle kayıp periodontal dokuların rejenerasyonu gerçekleşmez. Tedaviyi takiben iyileşme, kayıp periodontal dokuların rejenerasyonundan çok tamiri şeklindedir ve kök yüzeyine uzun birleşim epitelinin ataçmanı ve paralel dizilmiş kollajen fibril adezyonu ile sonuçlanır [20, 35, 68]. Kök yüzeyinde oluşan epitelyal ataçmanın daha zayıf bir bariyer olduğu, mikrobiyal plak ve ürünlerinin uzun birleşim epiteline penetre olabildiği gösterilmiştir [54, 55, 58]. Kök yüzeyinde oluşan bağ dokusu ataçmanı, bakteriyel penetrasyona, periodontal doku yıkımı ve cep oluşumuna direnç sağlar [2, 5, 78, 79].

Periodontal hastalığın patogenezinin ve dokuların cerrahi işlemlere olan cevabının daha iyi anlaşılması, periodontal tedavide önemli derecede gelişmeye neden olmuştur. Ayrıca, uygulanmakta olan tedavi modellerine eklenen yöntemler sürekli geliştirilmektedir [78]. İyileşme sırasında epitelin apikale göçünü geciktirerek, hastalıklı kök yüzeyine periodontal ligamentin öncü hücrelerinin göçüne ve bu yüzeyde bağ dokusu ataçmanının oluşmasına olanak sağlayacak çeşitli teknikler önerilmiştir [47]. Bunlar, bariyer membranların kullanılması (*Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu*), kemik defektlerine greftlerin yerleştirilmesi ve kök yüzeyinin yara iyileşmesi için daha uygun hale getirilmesidir. Yapılan *in vitro* çalışmalardan, kök yüzeyine yeni bağ dokusu ataçmanının oluşmasında fibroblastların kök yüzeyine göçünün, ataçmanının ve oryantasyonunun önemli olduğu anlaşılmıştır. Değişik ajanlar uygulanan kök yüzeylerinin fibroblast fonksiyonlarını etkilediği görülmüştür [23, 32, 57, 61].

Patolojik olarak değişmiş kök yüzeylerinden, plak ve diştaşının, köke bağlı toksinlerin ve kontamine sementin uzaklaştırılmasına ek olarak, kayıp periodontal ataçmanın rejenerasyonunu arttırmak için, periodontal tedavi sırasında kök yüzeyleri

demineralize edilmektedir . Pitaru ve Melcher [57], sement demineralizasyonunun oryante hücrelerin, kollajen fibrillerin gelişimini arttırdığını ve *in vitro* olarak, dişeti fibroblastlarının göçünü, ataçmanını , oryantasyonunu stimüle ettiğini göstermişlerdir. Periodontal yara iyileşmesinin erken safhalarında, sementin demineralizasyonu ile açığa çıkan kollajenin, bağ dokusu hücrelerinin fizyolojik organizasyonunu düzenlediğini ve fibroblastların diş ataçmanını arttırdığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, demineralizasyonun, yeni sentez edilen kollajenin, açığa çıkmış dentin veya semental kollajene yapışabildiği, böylece yeni sement ve sharpey fibrillerinin oluşumuna duyulan gereksinimin ortadan kalktığı belirtilmiştir.

Demineralizasyon amacı ile değişik ajanlar kullanılmaktadır. Kök yüzeylerinin demineralizasyonunda asitlerin kullanılması 19. yüzyılın son on yılında başlamıştır. Bu teropatik yaklaşıma, hayvanlarda 2-3 dakika sitrik asit uygulamanın en fazla ataçmanı, sonrasında sementogenezisi, minimal semental rezorbsiyonu oluşturduğunu, pulpal cevabın olmadığını ve çevre yumuşak dokuda en az koagülatif etkiyi oluşturduğunu belirten Register ve Burdick [65], Crigger ve arkadaşlarının [22] çalışmaları ile ilgi artmıştır.

Diştaşı temizliği ve kök düzeltmesine ek olarak, hastalıklı kök yüzeylerine pH'sı 1 olan sitrik asidin 3 dakika uygulanması ile yüzey demineralizasyonu, yeni periodontal ataçmanı şu mekanizmalarla etkilediği öne sürülmektedir [23];

- 1) Sementogenezisin hızlanması,
- 2) Bağ dokusunun girişine izin veren dentinal tübüllerin genişlemesi,
- 3) Endotoksin ve diğer toksik mikrobiyal plak ürünlerinin uzaklaştırılması,
- 4) Mezenşimal hücrelerin osteoblast veya muhtemelen sementoblastlara dönüşümünün başlaması,
- 5) Kök dentinal kollajenin açığa çıkması.

Sitrik asitin uygulanması ile ataçman kazancının, yumuşak doku flap fibrilleri ile açığa çıkan dentin matriks fibrillerinin birleşmesi sonucu olduğu düşünülmektedir [19, 25]. Bu birleşmeyi daha sonra sementogenez ve osteogenez takip eder [23, 48]. Boyko ve arkadaşları [11], açığa çıkmış fibrilleri olan demineralize kök yüzeylerinin, diş yüzeylerine fibroblast ataçmanı için daha uygun yüzeyler oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Pitaru ve arkadaşları [52, 56], yaptıkları *in vitro* çalışmalarda, diğer bir asidik ajan olan pH'sı 7,4 Etilendiamintetraasidik asidi (*EDTA*) kök yüzeyine 30 dakika uyguladıklarında fibroblastların migrasyonu, ataçmanı ve oryantasyonunun arttığını göstermişlerdir.

Demineralizasyonda asidik özelliklerinden dolayı antimikrobiyal bir ajan olan Tetrasiklin HCl'de kullanılmaktadır. Sistemik olarak uygulanan tetrasiklinler, dişeti cebi sıvısında potansiyel periodontopatojenleri öldürebilecek veya inhibe edebilecek yeterli konsantrasyonda bulunurlar [27, 40]. Tetrasiklinler, memeli nötrofil kollajenaz inhibitörü olduklarından, nötrofillerin eşlik ettiği lokal doku yıkımını azaltabilirler. Dentinal yüzeylere doğrudan bağlanan tetrasiklinler, yüzeyi demineralize edebilirler [40]. Terronova ve arkadaşları [70] tarafından yapılan *in vitro* bir çalışmada, tetrasiklin ile demineralize edilen dentin yüzeyinin fibronektin bağlanmasına elverişli hale geldiği ve fibronektinin de fibroblast ataçmanını arttırdığı gösterilmiştir. Demineralize köklerin, fibronektini mineralize köklerden iki kat fazla bağladığı ve bu bağlanmanın kök yüzey kollajeninden dolayı olduğu belirtilmiştir [38, 52]. *In vitro* çalışmalarla, fibronektinin epitelyal hücre ataçmanını ve büyümesini engellediği rapor edilmiştir [4,71,72].

Periodontal tedavide, bağ dokusu ataçmanını kolaylaştırmak için, yara alanında kök yüzeyinin demineralizasyonu [24, 64] ve sonrasında matriks kollajen fibrillerinin açığa çıkmasının ataçmanı arttırdığı savunulmuş [25, 64] ve bunun gerçekleşmesinde 3 olası mekanizma öne sürülmüştür;

1) Demineralizasyonla açığa çıkan, kollajen matriks fibrillerinin, yeni sentez edilen kollajen fibrillere eklenebildiği, böylece kök yüzeyine ataçman için sementogeneze gerek kalmadığı [24, 57].

2) Postoperatif fibrin pıhtısının demineralize köklere, mineralize köklere göre, daha iyi yapıştığı ve bu yapışmanın epitelin apikale göç etmesini önleyebileceği ve bağ dokusu hücrelerinin kök yüzeyine göç ve yapışması için yeterli zamanı sağladığı [53, 64].

3) Açığa çıkmış matriks kollajen fibrillerinin fibroblast ataçmanı ve gelişimi için mineralize diş yüzeylerinden daha uygun yüzeyler oluşturduğu, ayrıca semental yüzeylerin demineralizasyonunun oryante hücrelerin ve kollajen fibril sistemlerinin gelişimini arttırdığı ve dişeti fibroblastlarının göçünü, ataçmanını ve oryantasyonu *in vitro* olarak stimüle ettiği gösterilmiştir [53, 68].

Dentin veya sementin demineralize edilmesinin, insan dişeti fibroblastlarının göç, ataçman ve oryantasyonunu stimüle etmede, mineralize yüzeylerden ve de demineralize dentinin demineralize sementten daha etkili olduğu bildirilmiştir [52].

Periodontitisin geleneksel tedavisi, supragingival plağın olduğu kadar subgingival mikrobiyal popülasyonun kontrolünü de içerir. Mikrobiyal kontrol, mekanik olarak (*diştaşı temizliği, kök düzeltmesi ve iyi oral hijyen*) ve/veya antimikrobiyal ajanlarla yapılabilir. Son zamanlarda popüler olan antimikrobiyal ajanlardan biri, subgingival irrigasyon solüsyonu veya ağız gargarası olarak kullanılan, CHx' tir [1,9,17,30,63]. CHx, katyonik bir moleküldür. Ajanın bakterisid etkisi mikroorganizmaların osmotik dengesini değiştiren katyonik molekülündendir. Mikrobiyal plak kontrol ajanı olarak CHx gargaranın etkisi, büyük ölçüde gargaranın ağızda kalıcılığına bağlıdır. CHx oral yüzeylere adsorbe olur ve yavaşça aktif

formda salınır. Pek çok çalışmada, CHx gargaranın plak kontrolüne ve dişeti enflamasyonuna etkili olduğu gösterilmiştir [5,17, 33]. Lindhe ve arkadaşları [42], CHx ile tedavi edilen köpeklerde, gingivitisin azaldığını ve plak miktarında önemli derecede bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Bakaeen ve Strahan [8] yaptıkları bir çalışmada, plak indeksi, gingival indeks, dişeti cebi sıvısı veya cep derinliğinde önemli bir değişiklik görememelerine rağmen, periodontal cerrahiden sonra CHx kullanıldığında daha az postoperatif ağrı olabileceğini rapor etmişlerdir. Bunların tersine çeşitli çalışmalarda, CHx' nin insan hücreleri ve granülasyon dokuları üzerine toksik etkileri gösterilmiştir. Paunio ve arkadaşları [50] ile Basetti ve Tallenberger [10], CHx' nin granülasyon doku oluşumunu geciktirdiğini belirtmişlerdir. Helgeland ve arkadaşları [34], CHx' nin insan epitelyal hücrelerinin kültürüne toksik etkisi ve insan eritrositlerinin hemolizine neden olduğunu kanıtlamışlardır. Klinikte kullanılandan daha düşük CHx konsantrasyonlarının, insan fibroblast ve HELA hücre kültüründe hücre yaralanmasına, hücre ölümüne ve protein sentezinin inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir [30].

MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan periodontal ligament fibroblast kültürü için gerekli hücre, yaşları 9-15 arasında değişen, sistemik olarak sağlıklı bireylere ait, ortodontik tedavi öncesi çekim endikasyonu konulmuş dişlerin, çekim sonrası kök yüzeylerinde kalan periodontal ligament doku parçalarından Gracey küreti ile kazınarak elde edildi.

Çekilen dişler, konsantr antibiyotik (1.0mg/ml penisilin G, 0.05 mg/ml gentamisin ve 3.0 mg/ml fungizon) içeren Eagle Minimum Essential Medium* (MEM) vasatında muhafaza edilerek Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı, hücre kültürü laboratuvarına götürüldü (Resim 1).



Resim 1: Konsantr antibiyotik içeren Eagle MEM vasatına konan çekilmiş dişler.

* Gibco Ltd. P.O. Box 35, Paisley, Scotland, UK.

Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Periodontal ligament fibroblastları, *in vitro* koşullarda, hücre kültürü çalışmaları için uygun araç ve gerecin varlığında, steril şartlarda üretildiler.

Steril şartlarda Eagle MEM taşıyıcı vasatı içinde S.Ü.V. F. Viroloji Bilim Dalı, hücre kültürü laboratuvarına götürülen dişlerden, periodontal ligament doku parçaları Gracey küreti ile kazınarak alındı. Primer hücre kültürlerinin hazırlanması sırasında, kök yüzeylerinden elde edilen periodontal ligament doku parçaları, Fosfat Buffer Saline- Medium (*PBS-M*) ile yıkanarak hücrelerin şişe yüzeyine yapışmasını engelleyen faktörler ortamdaki uzaklaştırıldı.

Bir petri kutusu içinde, doku parçaları bistüri ile daha küçük parçalara ayrıldı. Hücre kültür şişelerine* birer damla Fötal Dana Serumu ** (*FDS*) konuldu. Her serum damlasının içine, bir doku parçası gelecek şekilde, periodontal ligament doku parçaları hücre kültürü şişelerine dağıtıldı. Şişe kapakları hafifçe kapatılarak, hücre kültürü şişeleri 37°C'ye ayarlı inkübatörlere kaldırıldı. Her doku parçasının üzerine, 24 saat inkübasyondan sonra, %20 oranında *FDS* içeren Dulbecco Modifiye Eagle MEM vasatından*** (*hücre üretme vasatı*) birer damla ilave edildi (*Resim 2*). Ertesi gün bütün hücre kültürü şişelerine, doku parçalarının üstünü kaplayacak kadar %15 *FDS* içeren hücre üretme vasatından konuldu. Doku parçacıkları hergün hücre kültürü mikroskopunda****, hücre üremeleri yönünden kontrol edildi.

Tam hücre üremesi sağlanıncaya kadar, hücre üretme vasatı her 5 günde bir değiştirildi. Monolayer olarak üremesini tamamlayan hücre kültürleri subkültür için işleme alındı.

* Sigma Chemical CO, USA

** Paesel GmbH and Co, Frankfurt, Germany

*** Sigma Chemical CO, USA

**** Olympus C-K, Tokyo, Japan



Resim 2: Hücre kültüründe kullanılan vasatlar.

Monolayer olarak üremesini tamamlayan hücrelerin üzerindeki hücre üretme vasatı döküldü. Hücre yüzeyleri PBS-M ile yıkanarak ölü hücre ve vasat artıkları ortamdan uzaklaştırıldı. Monolayer olarak üreyen hücreleri yüzeyden kaldırmak için % 1'lik Tripsin* ve PBS-V (Versen) solüsyonlarından (1 kısım tripsin +19 kısım PBS-V olmak üzere) ilave edildi. Hücre kültürü şişeleri 37°C'ye ayarlı etüvde 10 dakika bekletildi. Bu süre sonunda Tripsin + PBS - V solüsyonunun içine geçen hücreler santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreleri tüpün dibine çöktürmek amacı ile, 800-1000 devir/dak da 10 dakika santrifüje edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti bir miktar hücre üretme vasatı ile resüspanse edildi ve Thoma lamında hücre sayımı yapıldı.

Süspansiyon, FDS (%15-20) ve konsantre antibiyotik içeren Dulbecco Modifiye

* Gibco Ltd. P.O. Box. 35, Paisley, Scotland, UK.

Eagle MEM ilave edilerek hücre kültürü şişelerine konuldu (*Resim 3*). Şişeler, 37°C'ye ayarlı etüve kaldırıldı. Hücrelerin üremesi 24 saat sonra başlamak üzere hergün kontrol edildi. Yeterli üreme gösteren hücre kültürlerinin tekrar subkültürleri yapıldı. Araştırmada, periodontal ligament hücre kültürlerinin 10. pasajı kullanıldı. Deneş öncesi tripan mavisi kullanılarak hücrelerde canlılık tespiti yapıldı.



Resim 3: Hücre kültür şişeleri.

Kök Kesitlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan kök kesitleri, son 6 aydır antibiyotik tedavisi uygulanmamış, sistemik olarak sağlıklı, yaşları 35-45 arasında değişen ve periodontal çekim endikasyonu konulmuş bireylerin anterior dişlerinden ve sistemik olarak sağlıklı, yaşları 10-15 arasında değişen ve ortodontik tedavi öncesi çekim endikasyonu konulmuş bireylerin premolar dişlerinden elde edildi (*Resim 4, 5*).



Resim 4: Otopolimerizan akril içine kronlarından gömülen periodontal olarak sağlıklı dişler



Resim 5: Otopolimerizan akril içine kronlarından gömülen periodontal hastalıklı dişler.

Çekilen dişler, konsantre antibiyotik içeren Eagle MEM vasatında, sonraki işlemler yapıncaya kadar +4°C'de saklandı. Dişler 1x1x3 cm boyutunda, otopolimerizan akril içine kronlarından gömüldüler. Daha sonra hastalıklı kök yüzeylerine dıştaşı temizliği ve kök düzeltmesi yapıldı. Kök düzeltmesi işlemini standartize edebilmek için, kesitlerin alınacağı bölgenin çevresi boyunca 30 Gracey küret darbesi uygulandı. Kök kesitleri, bu işlemlerin uygulandığı dişlerden, bilgisayar kontrollü cihaz ile (*Emco, Austuria*) elmas rotatif testere kullanılarak, hastalıklı köklerin cep ortamına açılmış kısımlarından olabilmeleri için, mümkün olduğunca dişin kolesine yakın bölgeden, 300 µm kalınlığında (*ilerleme hızı 4 mm/dak, devir sayısı 500 dev/dak*) elde edildiler. İşlem sırasında diş kökü, serum fizyolojik ile soğutuldu (*Resim 6, 7*). Taşıyıcı vasat içinde tutulan diş kökü kesitleri 3 kez konsantre antibiyotik solüsyonu ile yıkandı ve 37°C'ye ayarlı etüvde 24 saat bekletildi. Sonrasında antibiyotik solüsyonu içinden alınıp Eagle MEM vasatı ile 5 kez yıkandı ve %15 FDS ve %10 antibiyotik içeren Eagle MEM içinde 37°C'de bir gün daha bekletildi. Daha sonra kök kesitleri 6 gruba ayrılarak her bir gruba aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. grup Tetrasiklin (T): Periodontal hastalıklı kök kesitleri, 100 mg/ml şeklinde hazırlanan tetrasiklin HCl içinde 5 dakika bekletildi.

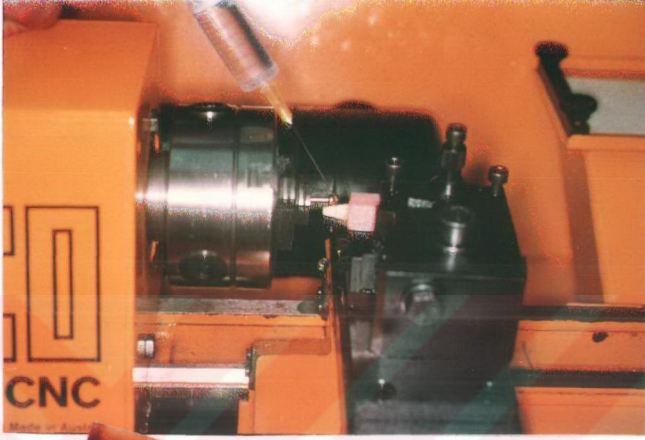
2. grup Etilendiamintetraasidik asit (EDTA) : Periodontal hastalıklı kök kesitleri, % 18'lik EDTA (*pH 7.2*) içinde 30 dakika tutuldu.

3. grup Sitrik Asit (SiA) : Periodontal hastalıklı kök kesitleri, pH'sı 1 olan sitrik asit içinde 3 dakika bekletildi.

4. grup Klorheksidin (CHx) : Periodontal hastalıklı kök kesitleri, % 0.2'lik CHx solüsyonu içinde 5 dakika bekletildi.

5. grup Hastalıklı Kontrol (HK): Hastalıklı kök kesitlerine sadece dıştaşı temizliği ve kök düzeltmesi yapıldı.

6. grup Sağlıklı Kontrol (SK) : Kök düzeltmesi yapılan sağlıklı kök kesitleri kontrol grubunu oluşturdu.



Resim 6: ...ü cihazda kesilirken.



Resim 7: 300 μm kalınlığında kök kesiti elde edilirken.

Kök Kesitlerine Hücre Kültürü Konulması

Canlılık tespiti yapılmış 10. pasaj periodontal ligament hücreleri, %15 FDS içeren Dulbecco Modifiye Eagle MEM vasatında süspansiyon edilerek sayımları yapıldı. Daha önce amaca uygun olarak hazırlanan tüm kök kesitleri, PBS ile iki kez yıkanarak çapları 3,5 cm olan steril petri kutularına yerleştirildiler. Üzerlerine $2,8 \times 10^5$ hücre/ml içeren vasattan 2 ml ilave edildi (*Resim 8*). Petri kutuları, 37°C'ye ayarlı CO₂ 'li etüvde 60 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde her 15 dakikada bir, vasat hafifçe pipete edilerek hücrelerin re-süspansiyonu sağlandı. Bu işlemlerin yapıldığı gün, araştırmanın başlangıç günü olarak kabul edildi.



Resim 8: Üzerine hücre ilave edilmiş kök kesitlerinin mikropilatte'deki görüntüleri.

Ölçüm yöntemi, Pitaru ve Melcher'in [56] yöntemlerine göre yapıldı. Buna göre, faz kontrast mikroskopunda iris diyafram kısmen kapalı tutulduğunda, köke oryante olan hücreler, oryante olmuş refraktif materyal görüntüsü sergilediler. Herbir kök kesitinin, 3., 7., 10. ve 14. günlerde x20 büyültmede fotoğrafı çekildi. Kök kesitlerinin

fotoğrafını bir bütün olarak almak mümkün olmadığından, ortalama 10-18 ayrı parça halinde fotoğraf çekildi ve bunlar birbirine eklenip montaj yapıldı. Fotoğrafların çekildiği günlerde ki Ataçman İndeksi (*AI*), Oryantasyon İndeksi (*OI*) ve Modifiye Oryantasyon İndeksi (*MOI*) hesaplandı.

AI : Hücrelerin kök çevresinde yapıştığı toplam mesafe uzunluğunun kökün tüm çevresine olan oranı,

OI : Kök kesitine yapışan hücrelerin oluşturduğu toplam refraksiyon yüzey alanının, hücrelerin kök çevresinde yapıştığı mesafe uzunluğuna oranı,

MOI : Kök kesitine yapışan hücrelerin oluşturduğu toplam refraksiyon yüzey alanının, kökün tüm çevresine olan oranı, olarak belirlendi.

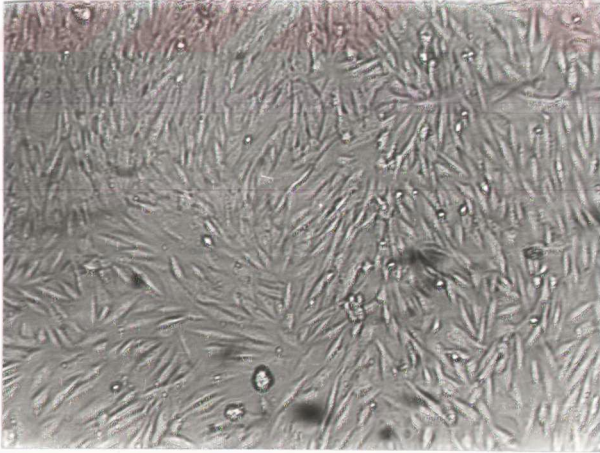
İndeks hesaplamaları için gerekli olan kök kesiti çevresi ve hücrelerin kök çevresinde yapıştığı mesafe uzunlukları, kök kesitleri üzerine yapıştırılan aydınlar kağıdına kopya edilerek, ince bir tel yardımı ile ölçüldü. Hücrelerin kök kesitleri etrafında oluşturduğu tabakaların yüzey alanı ise, planometre* ile hesaplandı.

AI, OI ve MOI değerlerinin gruplar arasındaki farklılığını test etmek için ANOVA Varyans Analizi [69] uygulandı.

* Kozumi Japan (No: 26147)

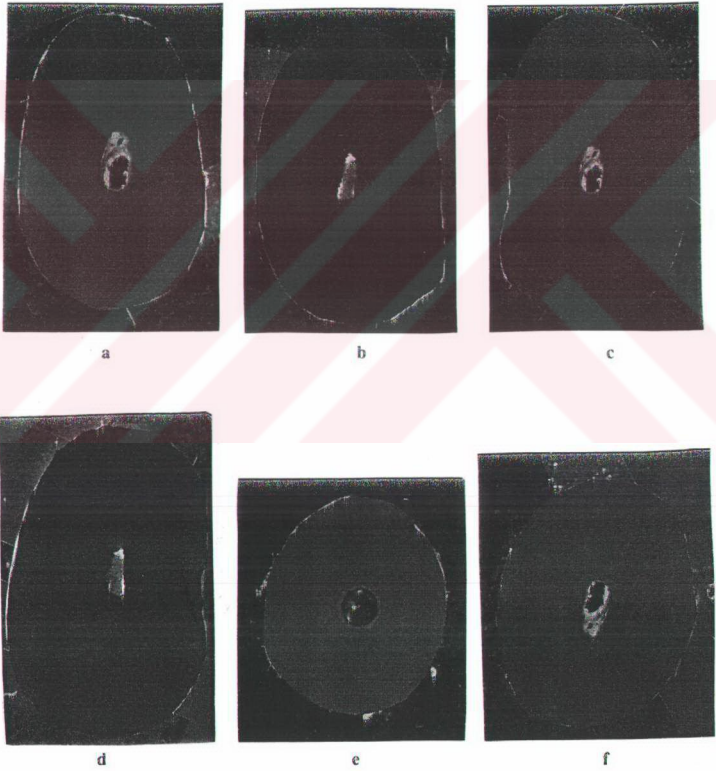
BULGULAR

Hücre kültürünün yapılmasından 14-18 gün sonra, doku parçaları etrafında fibroblastik özellik taşıyan hücreler mikroskopik olarak saptandı. Ortalama 4-5 hafta sonra doku parçası etrafındaki hücreler yoğun bir şekilde artış göstererek doku kültürü şişesinin bazı kısımlarında birbirleri ile birleşen tek tabaka hücre kültürü oluşturdular. Böylece primer olarak elde edilen periodontal ligament hücre kültürü, tripsinizasyon yöntemi ile subkültüre edildi. % 20 oranında FDS' nin kullanılması, hücrelerin maksimum üremesi için en iyi sonucu verdi. Birinci pasaj sonunda sağlıklı bir şekilde tipik fibroblastik morfoloji gösteren hücreler, ortalama 4-6 günde tek tabaka oluşturdular. Elde edilen periodontal ligament kültürleri 10. pasaja kadar sağlıklı bir şekilde üreme gösterdiler (*Resim 9*).



Resim 9: İnsan periodontal ligament fibroblastlarının 10. pasajdaki görünümü (x200).

Örneklerden çekilen fotoğraflar, 3. gün incelendiğinde, hücrelerin tüm kök kesitlerine değişik oranlarda yapıştığı ancak, bu yapışmanın AI, OI, MOI değerlerini hesaplayabilecek kadar yeterli olmadığı gözlemlendi (*Resim 10*). Bu nedenle sadece 7., 10. ve 14. günlerdeki değerler hesaplandı ve değerlerin istatistiksel analizinde gruplar arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$), (*Tablo 1,2,3*).



Resim 10: Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinin 3. gündeki Faz Kontrast Mikroskopundaki görüntüleri. a) T, b) SiA, c) ETDA, d) CHx, e) SK, f) HK

Tablo 1. Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinde Ataçman İndeksinin günlere göre dağılımı ve Ataçman İndeks değerlerinin altı grupta değişiminin Varyans Analizi sonuçları.

Günler	T	SiA	EDTA	CHx	SK	HK
7	0.925	0.692	0.638	0.804	0.907	0.576
10	0.646	0.691	0.564	0.951	0.842	0.368
14	0.634	0.175	0.526	0.191	0.440	0.164

Değişim Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	p
Gruplar Arası	5	0.299	0.060	0.892	>0.05
Gruplar İçi	12	0.805	0.067	-	-
Genel	17	1.104	-	-	-

Tablo 2. Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinde Oryantasyon İndeksinin günlere göre dağılımı ve Oryantasyon İndeks değerlerinin altı grupta değişiminin Varyans Analizi sonuçları.

Günler	T	SiA	EDTA	CHx	SK	HK
7	1.040	0.948	1.008	0.765	0.961	0.421
10	2.115	0.859	0.957	0.627	1.043	0.308
14	0.411	0.394	0.623	0.352	0.489	0.301
Değişim Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	p	
Gruplar Arası	5	1.216	0.243	1.441	>0.05	
Gruplar İçi	12	2.026	0.169	-	-	
Genel	17	3.242	-	-	-	

Tablo 3. Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinde Modifiye Oryantasyon İndeksinin günlere göre dağılımı ve Modifiye Oryantasyon İndeks değerlerinin altı grupta değişiminin Varyans Analizi sonuçları.

Günler	T	SiA	EDTA	CHx	SK	HK
7	0.962	0.652	0.643	0.616	0.872	0.242
10	1.368	0.594	0.540	0.597	0.879	0.113
14	0.261	0.083	0.328	0.067	0.215	0.062

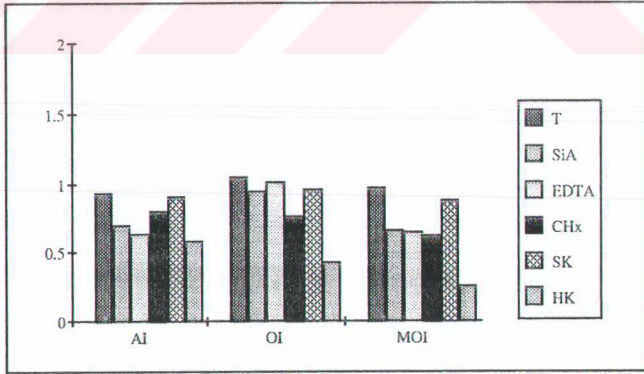
Değişim Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	p
Gruplar Arası	5	0.889	0.178	1.525	>0.05
Gruplar İçi	12	1.399	0.117	-	-
Genel	17	2.289	-	-	-

ANOVA Varyans Analizine göre gruplar arasında anlamlı fark olmamakla beraber, 7., 10. ve 14. günlerde gruplara göre değerlendirme şu şekilde idi.

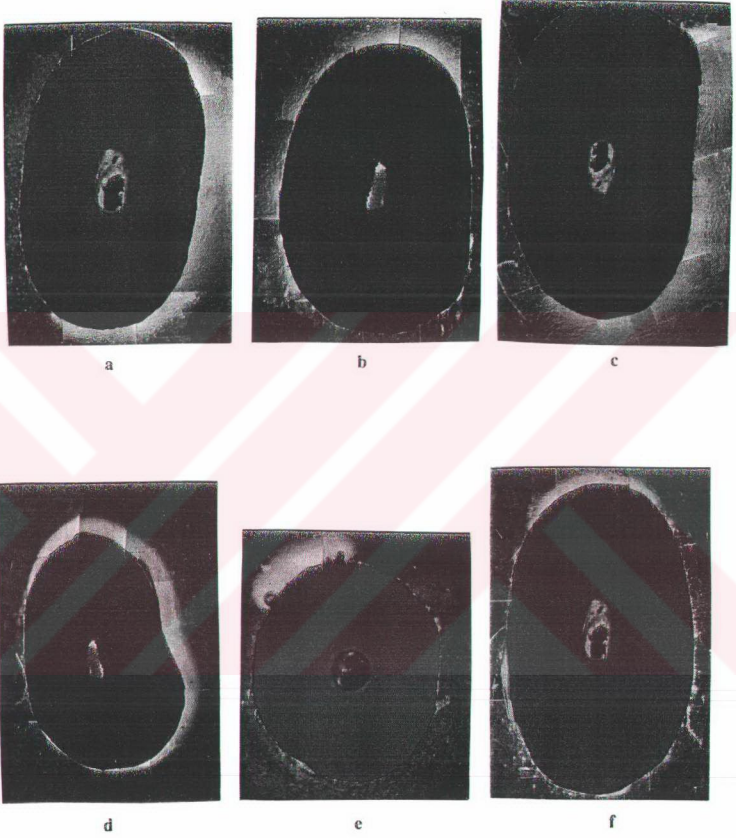
7. GÜN; T grubundaki kök kesitleri, diğer tüm kök kesitlerine oranla en yüksek AI değerini gösterirken, HK grubundaki kesitler ise en düşük değeri gösterdiler. SiA ve EDTA grubundaki kök kesitlerinde değerler birbirine yakındı. Kök kesitlerinde AI değeri en büyük değerden en küçüğe doğru T, SK, CHx, SiA, EDTA, HK olarak saptandı.

Tutunan hücre oryantasyonu açısından, en yüksek OI değeri, T grubundaki kök kesitlerine, en düşük değer de HK grubuna aitti. En yüksek OI değerinden en düşük değere doğru sıralama T, EDTA, SK, SiA, CHx, HK şeklinde idi.

En yüksek MOI değeri T grubundaki kök kesitlerinde görülürken, en düşüğü HK grubunda görüldü. Kök kesiti gruplarında MOI değeri en büyükten küçüğe doğru T, SK, SiA, EDTA, CHx, HK olarak saptandı (Grafik 1),(Resim 11).



Grafik 1: Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinde 7. güne ait Ataçman , Oryantasyon ve Modifiye Oryantasyon İndeks değerleri.

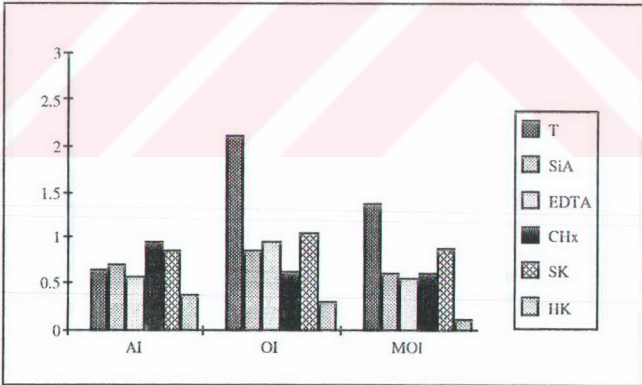


Resim 11: Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinin 7. gündeki Faz Kontrast Mikroskopundaki görüntüleri. a) T, b) SiA, c) ETDA, d) CHx, e) SK, f) HK

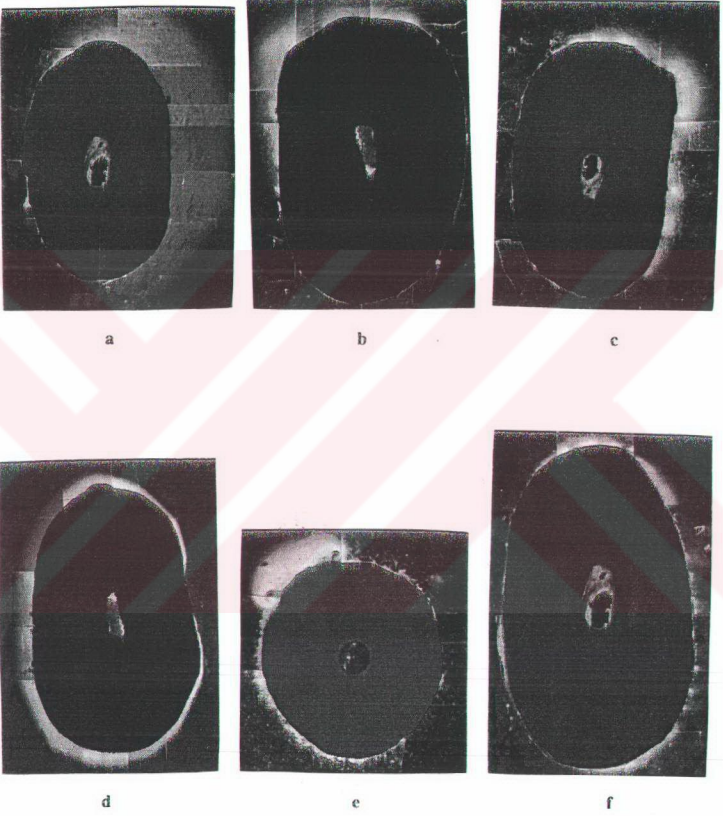
10. GÜN; CHx grubundaki kök kesitlerinde AI değeri çok az artarken, SiA grubundaki kök kesitlerinde değişmedi. Diğer gruplarda ise genelde düşme eğiliminde idi. En büyük AI değerinden en küçük değere doğru sıralama şu şekilde idi : CHx, SK, SiA, T, EDTA, HK.

T grubundaki kök kesitlerinde OI değeri belirgin bir şekilde artarken, SK grubunda az bir artış gösterdi. Diğer gruplarda ise azalma oldu. En yüksek OI değerinden en düşüğe doğru T, SK, EDTA, SiA, CHx, HK şeklinde sıralandı.

T ve SK grubunu oluşturan kök kesitlerinde MOI değeri artarken diğer kök kesitlerinde azaldı. En yüksek MOI değerinden en düşüğe doğru sıralama T, SK, CHx, SiA, EDTA, HK şeklinde idi (Grafik 2) . (Resim 12).



Grafik 2: Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinde 10. güne ait Ataçman , Oryantasyon ve Modifiye Oryantasyon İndeks değerleri.

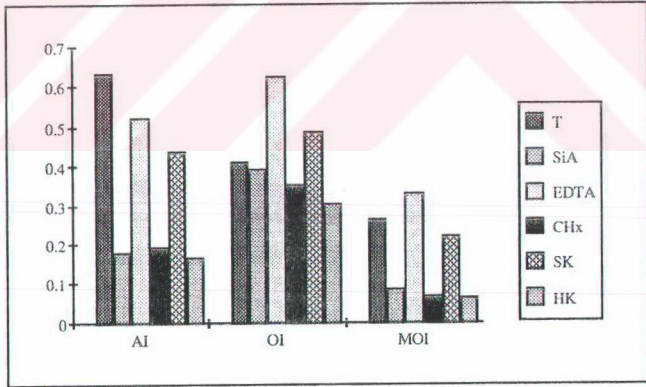


Resim 12: Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinin 10. gündeki Faz Kontrast Mikroskopundaki görüntüleri. a) T, b) SiA, c) ETDA, d) CHx, e) SK, f) HK

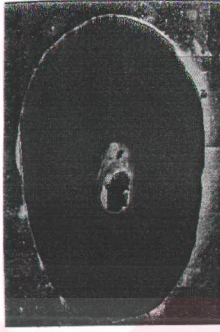
14. GÜN : En büyük AI değeri T grubunda görülürken, en küçük HK grubunda idi. En yüksek AI değerinden en düşüğe doğru sıralama T, EDTA, SK, CHx, SiA, HK şeklinde oldu.

EDTA uygulanmış kök kesitlerinde en büyük OI değeri görülürken, en küçük değer HK grubunda görüldü. En büyük değerden en küçük değere doğru EDTA, SK, T, SiA, CHx, HK şeklinde sıralandı.

En büyük MOI değeri EDTA uygulanmış kök kesitlerine, en küçük değer ise HK grubuna aitti. En büyük değerden en küçük değere doğru sıralama EDTA, T, SK, SiA, CHx, HK olarak belirlendi (Grafik 3), (Resim 13).



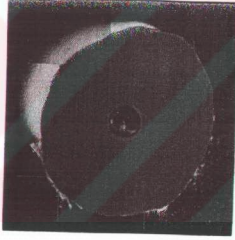
Grafik 3: Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinde 14. güne ait Ataçman , Oryantasyon ve Modifiye Oryantasyon İndeks değerleri.



a



b



c



d

Resim 13: Değişik ajanların uygulandığı kök kesitlerinin 14. günde Faz Kontrast Mikroskopundaki görüntüleri. a) T, b) ETDA, c) SK, d) HK

TARTIŞMA

Periodontal doku rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda ilerideki araştırmaların aşağıdaki 3 konuya yönelmesi gerektiği belirtilmiştir[47]; (1) kök yüzeyinde iyileşmekte olan yaranın korunması (*koronale repozisyone flap*), (2) bariyer membranlar kullanılarak periodontal ligamentten köken alan hücrelerin kök yüzeyini repopüle etmelerini sağlamak (*YDR*) [6, 14,16,41,44,46,47,59,75], (3) kök yüzeyinde pıhtının olgunlaşmasını hızlandırmak ve adezyonunu arttırmaya yönelik girişimler (*kök yüzeyine çeşitli ajanların uygulanması*) [11, 22, 71]. Sonucuda uygulanan ajanlar, periodontal ligament hücrelerini kök yüzeyini repopüle edebilmeleri için stimüle eder veya repopülasyon için kök yüzeyini uygun hale getirir. Yapılan birçok çalışmada [7,11, 18,62,66], kök yüzeyleri demineralize edildiğinde bağ dokusu ataçmanının arttığı gösterilmiştir. Bu çalışma , farklı ajanların uygulandığı hastalıklı kök yüzeylerine, *in vitro* olarak elde edilen insan periodontal ligament fibroblastlarının ataçmanını ve oryantasyonunu değerlendirmek amacı ile yapılmıştır.

Demineralizasyonun hücre ataçmanını arttırmadaki rolü hakkında çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Boyko ve arkadaşları [11], asit demineralizasyonu ile dentinal tübüllerin genişlemesi ve kollajen fibrillerin açığa çıkmasının fibroblast ataçmanı için daha uygun bir ortam oluşturduğunu belirtmişlerdir. Polson ve Proye [62] fibrin pıhtının demineralize köklere daha iyi yapıştığını ve bu nedenle epitelin apikale göçünü önlemede etkili bir bariyer olduğunu savunurken, Garrett ve arkadaşları [25], eski ve yeni kollajen fibriller arasında bir yapışma olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *in vitro* sistemde kollajenin fibroblastlar için kemoatraktan olduğu kanıtlanmıştır [26, 56, 57].

Ririe ve arkadaşları [66] ile Polson ve Proye [62], hayvanlarda sitrik asit uygulanmış köklerde bağ dokusu ataçmanını gözlemişlerdir. Fibrin bağlantının bağ dokusu ataçmanını arttırdığını, bunun demineralizasyon sırasında açığa çıkmış kollajen fibrillere fibronektinin bağlanması sonucu oluştuğunu belirtmişlerdir. Demineralize köklerin, fibronektini, demineralize olmayan köklerden iki kat fazla bağladığı ve bu bağlanmanın kök yüzey kollajeninden dolayı oluştuğu rapor edilmiştir [38, 52]. Köpeklerde yapılan çalışmalarda köklere sitrik asidi takiben fibronektin uygulanmasının yeni ataçmanı % 66 oranında arttırdığı gösterilmiştir [12]. Fibroblast ve periodontal ligament hücreleri için kemoatraktan olduğu gösterilen fibronektinin, kök yüzeyine bağlandığında epitelyal hücre ataçmanını ve epitelin apikale göçünü engellediği belirtilmiştir [13, 39, 45, 72]. Bu bulgular köke fibronektinin bağlanmasını arttıran işlemlerin, yeni ataçman ile iyileşmeyi olumlu yönde etkileyeceğini gösterir.

Pitaru ve arkadaşları [52, 56, 57], yara iyileşmesinde bağ dokusu ataçmanının gerçekleşmesi için kök yüzeyine bağ dokusu hücrelerinin göçünün, ataçmanının ve kök yüzeyi üzerinde kollajen sekresyonunun gerektiğini ve bu durumun yeni sentezlenen kollajen ile kök yüzeyi arasında devamlılığı sağlayacağını rapor etmişlerdir. Pitaru ve Melcher [51], demineralize yüzeylerde başlangıçta oluşan hücresel köprülerin, oryante yapıların gelişmesi için, bir çatı oluşturduğunu, oluşan hücresel köprülerin devamlılığı ve bu yüzeylere hücrelerin göçünde, demineralize olmayan yüzeylerden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bunların da *in vivo* yara iyileşmesine katkıda bulunabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca insan [20, 25] ve hayvan çalışmaları [22, 64], kök yüzey demineralizasyonunun periodontal yara iyileşmesini olumlu etkilediğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada deney süresince (7., 10. ve 14. gün) kimyasal ajanların uygulandığı tüm kök yüzeylerine fibroblast ataçmanının ve oryantasyonunun belirgin bir şekilde

arttığı, hesaplanan AI ve OI değerlerinin hastalıklı kontrol grubunu oluşturan kök kesitlerine ait değerlerden, gruplar arasında anlamlı bir fark olmamakla beraber ($p>0.05$), daha yüksek olduğu saptanmıştır. Elde edilen veriler benzer çalışmaların bulguları ile uyumludur. Bu çalışma ile demineralizasyonun, fibroblastların ataçman ve oryantasyonunu arttırdığına dair ek kanıt elde edilmiştir.

Hücre ataçmanı bakımından, SiA grubundaki kök kesitlerinde EDTA uygulanmış kök kesitlerine oranla 7. ve 10. günlerde AI nin daha büyük ancak aradaki farkın az olduğu gözlemlendi. Hücre oryantasyonu, EDTA ve SiA grubundaki kök kesitlerinde birbirine yakındı. Bu bulgu, sitrik asitin *in vitro* olarak erken ataçman için tercih edilebilecek bir ajan olduğunu fakat 2 haftalık periyottan sonra bu iki ajan arasında çok az tercih farkı olduğunu gösteren Fardal ve arkadaşlarının [23] bulgularına benzemektedir.

T ve SiA gruplarındaki kök kesitleri karşılaştırıldığında, T uygulanmış kök kesitlerinin fibronektini daha fazla oranla bağladığı ve aynı çalışmada tetrasiklinin antimikrobiyal etkinliğinin 48 saat süreyle devam ettiği rapor edilmiştir [77]. Terranova ve arkadaşları da [70] tetrasiklin uygulanmış kök kesitlerine, fibronektinin maksimum bir şekilde bağlandığını göstermişlerdir. Parlar ve arkadaşları [49] farklı özelliklerdeki kök kesitlerini hayvanların sırtına implante ettiklerinde sitrik asit ile demineralize edilen kök kesitlerinde hücre ve fibril ataçmanı oluştuğunu, tetrasiklin uygulanmış kök kesitlerinde ise bu yönde bir gelişme olmadığını belirlemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, T grubundaki kök kesitlerinin 7. ve 10. günlerde en büyük OI ve MOI, 7. ve 14.günlerde de en büyük AI değerlerine sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, bazı çalışmalarla [4, 49] çelişkili olmasına rağmen tetrasiklin uygulanmış köklerin fibronektini sitrik asit uygulanmış köklerden daha fazla bağladıklarını gösteren çalışmalarla tutarlıdır [70,77].

CHx' nin klinik kullanımının yanı sıra yara iyileşmesinde fibroblastlara olan etkisini test etmek amacı ile, CHx uygulanmış kök kesitleri çalışmadaki bir diğer değişkeni oluşturdu. Kök düzeltmesinden sonra subgingival irrigasyonda CHx kullanıldığında, bakteri sayısında azalma olduğu ve daha uzun süre mevcut mikroorganizmaların baskılandığı rapor edilmiştir [21, 31, 73, 74, 76]. Ağız gargarası olarak etkili ve güvenilir olmasına rağmen, *in vitro* olarak fibroblastlara oldukça sitotoksiktir. CHx' nin *in vitro* şartlarda sitotoksik konsantrasyonunun *in vivo* olarak bakterisidal bir aktivite sağladığı ve yara iyileşmesine faydalı olduğu belirtilmiştir. Bu durum çeşitli şekillerde açıklanabilir. *In vitro* hücre kültürleri bakteriden yoksun olmasına rağmen, ağız bakteriden yana zengindir ve ağız ortamında CHx bakterilere bağlandığından konak hücrelerine bağlanma miktarı azalır. Keratinize epitel CHx' nin zararlı etkilerinden bağ dokusu hücrelerini koruyan bir tabaka görevi görebilir. Ayrıca, CHx serum ve tükrük ile presipite olduğundan bazı sitotoksik etkilerinin engellendiği ve ajanın antimikrobiyal etkinliğinin, periodontal cerrahi sonrası yara iyileşmesindeki sitotoksik yan etkilerine ağır basabileceği belirtilmiştir [63].

Baloş ve arkadaşları [9], *in vitro* bir çalışmada CHx' nin çeşitli konsantrasyonlarının farklı sürelerle direk insan periodontal ligament hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini araştırmışlar ve % 0,2 lik CHx konsantrasyonunun 30, 60 ve 120 dakikalık uygulamalarından 3 gün sonra hücre sayımı yaptıklarında canlı hücre sayısında bir azalma olduğunu saptamışlardır. Allevy ve arkadaşları [5], yaptıkları *in vitro* bir çalışmada CHx' nin, fibroblastların kök yüzeyine ataçmanını zayıflattığını göstermişlerdir.. Bu çalışma da ise hastalıklı köklere kök düzeltmesi ve sonrasında % 0,2 CHx uygulandığında hücrelerin kök kesitine yapışabildiği görülmüştür. CHx uygulanmış kesitler için AI 10. gün 7. günden daha fazla iken, OI ve MOI değerleri 10. ve 14. günlerde bir azalma gösterdiler. Diğer ajanlarla kıyaslandığında CHx hücrelere ek bir sitotoksik

etki göstermedi. CHx' nin %0,2 konsantrasyonu *in vitro* koşullarda sitotoksik olmasına rağmen bu çalışmada sitotoksik etkinin görülmemesinin bir nedeni, kök kesitlerine CHx uygulandıktan sonra birkaç kez antibiyotikli solüsyonlarla yıkanması sonucu konsantrasyonun düşmesi olabilir. Cline ve arkadaşları da [17] *in vitro* bir çalışmada %0,12 ye kadar olan CHx konsantrasyonlarının kök yüzeylerine periodontal ligament hücrelerinin morfolojisi ve ataçmanını olumsuz etkilemediğini göstermişlerdir. Klinik araştırmalar, CHx ile subgingival irrigasyonun, periodontal tedaviye ek olarak uygulanmasının iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir [8,10]. Ancak, iyileşmenin ilk dönemlerinde belirli bir CHx konsantrasyonu periodontal ligament hücreleri ile karşılaştığında hücrelerin ataçmanını olumsuz etkileyebileceğinden yara iyileşmesinin geç dönemlerine kadar oral irrigatörler ve enjektörler kullanarak CHx ile kuvvetli irrigasyondan kaçınmak gerektiği de belirtilmiştir [17].

Yapılan bu *in vitro* çalışmanın sonuçlarına göre kök yüzeylerinin demineralizasyonu, demineralize edilmeyen köklere oranla bağ dokusu ataçmanını ve oryantasyonunu olumlu yönde etkilediğinden, periodontal cerrahi terapide klinik açıdan fayda sağlayabilir. Veriler tetrasiklinin demineralizasyon amacı ile kullanılan diğer ajanlardan sitrik asit ve EDTA'ya oranla hücre ataçmanı ve oryantasyonu üzerindeki etkisinin daha belirgin olduğunu ortaya koymaktadır. CHx 'nin % 0.2 konsantrasyonu bu çalışma koşullarında hücrelere ek sitotoksisite göstermemiştir. *İn vitro* çalışmaları, *in vivo* şartları yansıtmadığından, bu çalışmada elde edilen sonuçların klinik önemini belirlemek üzere insan ve hayvan çalışmaları yapılmalıdır.

SONUÇLAR

1) Demineralize edici ajanların uygulandığı tüm kök yüzeylerine fibroblast ataçmanının ve oryantasyonunun arttığı, Ataçman ve Oryantasyon İndeks değerlerinin hastalıklı kontrol grubunu oluşturan kök kesitlerine ait değerlerden, deney süresince, daha yüksek olduğu saptanmıştır.

2) Tetrasiklin HCl uygulanmış kök kesitlerinde hücre ataçmanı ve oryantasyonu, sitrik asit ve EDTA uygulanmış kök kesitlerinden daha yüksekti.

3) Hücre ataçmanı bakımından sitrik asit ve EDTA gruplarına ait kök kesitlerinde değerler birbirine yakındı.

4) Bu çalışma dizaynına göre % 0.2 CHx konsantrasyonunun , diğer ajanlarla kıyaslandığında hücrelere ek bir sitotoksik etkisinin olmadığı, hücre ataçman ve oryantasyonunu olumsuz etkilemediği belirlendi.

ÖZET

Bu çalışmada, *in vitro* olarak elde edilen insan periodontal ligament fibroblastlarının değişik kök yüzey tedavisi uygulanmış hastalıklı ve sağlıklı kök kesitlerine olan ataçmanını ve oryantasyonunu incelemek amaçlanmıştır. Periodontal ligament hücre kültürü için, ortodontik olarak çekim endikasyonu konulmuş dişlerin kök yüzeylerindeki doku parçaları kazındı ve kültüre edilen hücrelerin 10. pasajı kullanıldı. Çekim endikasyonu konulmuş sağlıklı ve periodontal hastalıklı dişlerden, dıştaşı temizliği ve kök düzeltmesini takiben 300 µm kalınlığında kök kesitleri elde edildi. Kök kesitleri 6 gruba ayrılarak, hastalıklı kök kesitlerinden birinci gruba tetrasiklin, ikinci gruba sitrik asit, üçüncü gruba EDTA, dördüncü gruba klorheksidin glukonat uygulandı. Son iki grup hastalıklı kontrol ve sağlıklı kontrol gruplarını oluşturdu. Daha sonra kök kesitleri 14 gün süreyle hücre kültüründe tutuldu. Araştırmanın 3., 7., 10. ve 14. günlerinde faz kontrast mikroskopunda fotoğrafları çekilen kök kesitlerinin Ataçman İndeksi (AI), Oryantasyon İndeksi (OI) ve Modifiye Oryantasyon İndeksleri (MOI) hesaplandı. Bu çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizinde gruplar arasında farklılık olmadığı ($p>0.05$), ancak kök yüzey demineralizasyonunun, fibroblast ataçman ve oryantasyonunu arttırdığı görüldü. AI değeri sitrik asit ve EDTA uygulanmış kök kesitlerinde birbirine yakınken, AI ve OI değerleri tetrasiklin uygulanmış kök kesitlerinde diğer iki gruptan daha yüksekti. Diğer ajanlarla kıyaslandığında, % 0.2 CHx hücrelere ek bir sitotoksik etki göstermedi.

SUMMARY

IN VITRO ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF VARIOUS ROOT SURFACE PREPARATION TECHNIQUES ON THE ATTACHMENT AND ORIENTATION OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS.

In this *in vitro* study, assessment of the attachment and orientation of human periodontal ligament fibroblasts to periodontally diseased and non-diseased human root slices was aimed.

Teeth extracted from healthy individuals were used for periodontal ligament cell cultures. Portions of the roots affected by periodontal disease and portions of the non-diseased roots were then cut transversely into slices of similar thickness ($300\mu\text{m}$) using a rotary bur with water coolant. The fibroblasts were incubated with periodontally diseased and non-diseased root slices which had been treated in the following manner ; 1) Root planed and tetracycline demineralized diseased root (*T*), 2) Root planed and citric acid demineralized diseased root (*SiA*), 3) Root planed and EDTA demineralized diseased root (*EDTA*), 4) Root planed and chlorhexidine washed diseased root (*CHx*), 5) Root planed diseased root (*HK*), 6) Root planed non-diseased root (*SK*). All of the root slices were photographed in phase contrast microscopy and three parameters Attachment Index (*AI*), Orientation Index (*OI*) and Modified Orientation Index (*MOI*) were calculated at days 3, 7, 10, and 14. Although there were no statistically significant differences between groups ($p > 0.05$), data obtained from this study indicated that demineralization of root surface increased periodontal ligament fibroblast attachment and orientation. While *AI* values were similar in the citric acid and EDTA groups, *AI* and *OI* values for tetracycline HCl were greater than both of them. When compared with other agents, % 0.2 CHx had no additional cytotoxic effect on cells.

LITERATÜR

- 1) Addy, M. (1986) : Chlorhexidine Compared With Other Locally Delivered Antimicrobials. A Short Review. J. Clin. Periodontol. 13: 957-964 .
- 2) Albair, W. B., Cobb, C. M., Killoy, W. J. (1982) : Connective Tissue Attachment to Periodontally Diseased Roots After Citric Acid Demineralization. J. Periodontol. 53: 515-526.
- 3) Aleo, J.J, De Renzis, F.A., Farber, P.A. (1975) : In Vitro Attachment of Human Gingival Fibroblast to Root Surface. J. Periodontol. 46 : 639-645.
- 4) Alger, F.A., Solt, C.W., Vuddhakanok, S., Miles, K. (1990) : The Histologic Evaluation of New Attachment in Periodontally Diseased Human Roots Treated With Tetracycline-Hydrochloride and Fibronectin. J. Periodontol. 61:447-455.
- 5) Alleyn, C.D., O'Neal R.B., Strong, S.L., Scheidt, M.J., Van Dyke, T.E., McPherson, J.C. (1991) : The Effect of Chlorhexidine Treatment of Root Surfaces on the Attachment of Human Gingival Fibroblast In Vitro. J. Periodontol. 62: 434-438 .
- 6) Anderegg, C.R., Martin, S.J., Gray, J.L., Mellonig, J.T., Gher, M.E. (1991) : Clinical Evaluation of the Use of Decalcified Freeze-Dried Bone Allograft With Guide Tissue Regeneration in the Treatment of Molar Furcation Invasion. J. Periodontol. 62: 264-268 .

- 7) Assad, D.A., Dunlap, R.M., Weinberg, S.R., Ahl, D.R.(1987) : Biologic Preparation of Diseased Root Surfaces: An In-Vitro Study. J. Periodontol. 58 : 30-33.
- 8) Bakaeen, G. Strahan, J. (1980) : Effects of a 1% Chlorhexidine Gel During the Healing Phase After Inverse Bevel Mucogingival Flap Surgery. J.Clin Periodontol. 7:20.
- 9) Baloş, K., Özcan, G., Baran, C., Yalım, M., Gürhan, İ. (1988) : Çeşitli Kon-santrasyonlardaki Chlorhekzidinin İnsan Periodontal Ligament Fibroblastları Üzerine Etkisi. Otorinolarenoloji ve Stomatoloji Dergisi. 100-104.
- 10) Bassetti, C, Tallenburger, A. (1980) : Influence of Chlorhexidine Rinsing on the Healing of Oral Mucosa and Osseous Lesions. J. Clin. Periodontol. 7 : 443.
- 11) Boyko, G.A., Brunette, D.M., Melcher, A.M.,(1980) : Cell Attachment to Demineralized Root Surfaces In vitro. J. Periodont. Res. 15 : 297-303.
- 12) Caffesse, R.G., Holden, M.J., Kon, S., Naşjleti, C.E.(1985) : The Effect of Citric Acid and Fibronectin Application on Healing Following Surgical Treatment of Naturally Occuring Periodontal Disease in Beagle Dogs. J. Clin. Periodontol. 12 : 578-590.
- 13) Caffesse, R.G., Kerry, G.J., Chaves, E.S., McLean, T.N., Morrison, E.C., Lopatin, D.E., Caffesse, E.R., Stulto, D.L.(1988) : Clinical Evaluation of the Use of Citric Acid and Autologous Fibronectin in Periodontal Surgery. J. Periodontol. 59 : 565-569.
- 14) Caffesse, R.G., Smith, B.A., Duff, B., Morrison, E.C., Merrill, D., Becker, W. (1990) : Class II Furcations Treated by Guided Tissue Regeneration in Humans : Case Reports. J. Periodontol. 61 : 510-514.

- 15) Carranza, F.A.(1984) : Glickman's Clinical Periodontology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 6 ed., p : 192 .
- 16) Chung, K.M., Salkin, L.M., Stein, M.D., Freedman, A.L.(1990) : Clinical Evaluation of a Biodegradable Collagen Membrane in Guided Tissue Regeneration. J. Periodontol. 61 : 732-736 .
- 17) Cline, N.V., Layman, D.L.(1992) : The Effects of Chlorhexidine on the Attachment and Growth of Cultured Human Periodontal Cells. J. Periodontol. 63 : 598-602.
- 18) Cogen, R.B., Al-Joburi, W., Gantt, D.G., Denys, F.R.(1984) : Effect of Various Root Surface Treatments on the Attachment and Growth of Human Gingival Fibroblast: Histologic and Scanning Electron Microscopic Evaluation. J. Clin. Periodontol. 11 : 531-539 .
- 19) Cogen, B.R., 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.
- 20) Cole, R.T., Crigger, M., Bogle, G., Egelberg, J., Selvig, K.A.(1980) : Connective Tissue Regeneration to Periodontally Diseased Teeth. J. Periodont. Res. 15 : 1-9.
- 21) Collaert, B., Edwardsson, S., Attström, R., Hase, J.C., Aström, M., Mover, R. (1992) : Rinsing With Delmopinol 0,2 % and Chlorhexidine 0,2 % : Short-Term Effect on Salivary Microbiology, Plaque and Gingivitis. 63 : 618-625.
- 22) Crigger, M., Bogle, G., Nilveus, R., Egelberg, J., Selvig, K.(1978) : The Effect of Topical Citric Acid Application on the Healing of Experimental Furcation Defects in Dogs. J. Periodont. Res. 13 : 538-549 .

- 23) Fardal, O., Lowenberg, B.F.(1990) : A Quantitative Analysis of the Migration, Attachment and Orientation of Human Gingival Fibroblast to Human Dental Root Surface In-Vitro. *J. Periodontol.* 61 : 529-535 .
- 24) Frank, R.M., Fiero-Donno, G., Cimasoni, G. (1983) : Cementogenesis and Soft Tissue Attachment After Citric Acid Treatment in a Human : An Electron Microscopic Study. *J. Periodontol.* 54 : 389-401 .
- 25) Garrett, J.S., Crigger, M., Egelberg, J. (1978) : Effects of Citric Acid on Diseased Root Surface. *J. Periodont. Res.* 13 : 155-163 .
- 26) Gauss-Müller, V., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Schiffmann, E. (1980) : Role of Attachment Factors and Attractants in Fibroblast Chemotaxis. *J. Lab. Clin. Med.* 96 : 1071-1080.
- 27) Genco, J.R.(1981) : Antibiotics in the Treatment of Human Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 52 : 545-556.
- 28) Goene, R.J., Winkel, E.G., Abbas, F., Rodenburg, J.P., Van Winkelhoff, A.J., De Graaf, J.(1990) : Microbiology in Diagnosis and Treatment of Severe Periodontitis. A Report of Four Cases. *J. Periodontol.* 61 : 61-64 .
- 29) Goldman, H.M., Cohen, W.D. (1979) : Periodontal Therapy. C.V. Mosby Co.,
- 30) Goldschmidt, P., Cogen, R., Taubman, S.(1977) : Cytopathologic Effects of Chlorhexidine on Human Cells. *J. Periodontol.* 48 : 212-215 .
- 31) Greenstein, G. : Supragingival and Subgingival Irrigation : Practical Application in the Treatment of Periodontal Diseases. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, Vol XII, No : 12, 1098-1125.

- 32) Hanes, P.J., Polson, A.M., Ladenheim, S. (1985) : Cell and Fiber Attachment to Demineralized Dentin from Normal Root Surfaces. *J. Periodontol.* 56 : 752-765.
- 33) Haskel, E., Esquenasi, J., Yussim, L.(1986) : Effects of Subgingival Chlorhexidine Irrigation in Chronic Moderate Periodontitis. 57 : 305-310.
- 34) Helgeland, K, Heyden, G., Rolla, G. (1971) : Effects of Chlorhexidine on Animal Cells In vitro. *Scand J. Dent. Res.* 79 : 209 .
- 35) Hou, L.T., Kollar, E.J., Yaeger, J.A.(1993) : Epithelial Cell-Fibroblast Interactions: Modulation of Extracellular Matrix Proteins in Cultured Oral Cells. *J. Periodont. Res.* 28 : 102-114 .
- 36) Hurt, C.W.(1976) : *Periodontics in General Practice.* Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- 37) Kahnberg, K.E., Lindhe, J., Hellden, L.(1976) : Initial Gingivitis Induced by Topical Application of Plaque Extract. A Histometric Study in Dogs With Normal Gingiva. *J. Periodont. Res.* 11 : 218-225 .
- 38) Karp, W., Sodek, J., Aubin, J.E., Melcher, A.H.(1986) : A Comparison of Fibronectin and Laminin Binding to Undemineralized and Demineralized Tooth Root Surfaces. *J. Periodont. Res.* 21 : 30-38.
- 39) Knox, P., Crooks, S., Rimmer, C.S.(1986) : Role of Fibronectin in the Migration of Fibroblasts into Plasma Clots. *J of Cell Biology.* Vol : 102, 2318-2323.
- 40) 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 .

- 41) Lekovic, V., Kenney, E.B., Carranza, F.A., Danilovic, V.(1990) : Treatment of Class II Furcation Defects Using Porous Hydroxylapatite in Conjunction With a Polytetrafluoroethylene Membrane. *J. Periodontol.* 61 : 575-578 .
- 42) Lindhe, J., Hamp, S., L e, H., Rindom-Schiott C.(1970) : Influence of Topical Application of Chlorhexidine on Chronic Gingivitis and Gingival Wound Healing in the Dog. *Scand. J. Dent. Res.* 78 : 471 .
- 43) Listgarten, M. A.(1992) : Microbiological Testing in the Diagnosis of Periodontal Diseases. *J. Periodontol.* 63 : 332-337 .
- 44) Mariotti, A., Cochran, D.L.(1990) : Characterization of Fibroblasts Derived from Human Periodontal Ligament and Gingiva. *J. Periodontol.* 61 : 103-111.
- 45) Mendieta, C., Caravana, C., Fine, D.H.(1990) : Sorption of Fibronectin to Human Root Surfaces In-Vitro. *J. Periodontol.* 61 : 254-259 .
- 46) Metzler, D.G., Seamons, B.C., Mellonig, J.T., Gher, M.E., Gray, J.L.(1991): Clinical Evaluation of Guided Tissue Regeneration in the Treatment of Maxillary Class II Molar Furcation Invasions. *J. Periodontol.* 62 : 353-360 .
- 47) Minabe, M.(1991) : A Critical Review of the Biologic Rationale for Guided Tissue Regeneration. *J. Periodontol.* 62 : 171-179 .
- 48) Page, R.C., Schroder, H.E.(1981) : Current Status of the Host Response in Chronic Marginal Periodontitis. *J. Periodontol.* 52 : 477-487 .
- 49) Parlar, A., Taner, L.İ., Oyg r, T.(1990) : Farklı  zellikteki K k Y zeylerine Karşı Doku Cevaplarının Deneysel Olarak İncelenmesi. *A.  Diş. Hek. Fak. Derg.* 17 (3) : 307-315

- 50) Paunio, K., Knuttila, M., Mielityinen, H.(1978) : The Effects of Chlorhexidine Gluconate on the Formation of Experimental Granulation Tissue. *J. Clin. Periodontol.* 49 : 92.
- 51) Pitaru, S., Aubin, J.E., Gray, A., Metzger, Z., Melcher, A.H.(1984) : Cell Migration Attachment and Orientation In-Vitro are Enhanced by Partial Demineralization of Dentine and Cementum and Inhibited by Bacterial Endotoxin. *J. Periodont. Res.* 19: 661-665 .
- 52) Pitaru, S., Gray, A., Aubin, J.E., Melcher, A.H.(1984) : The Influence of the Morphological and Chemical Nature of Dental Surfaces on the Migration, Attachment and Orientation of Human Gingival Fibroblasts In-Vitro. *J. Periodont. Res.* 19 : 408-418.
- 53) Pitaru, S., Hekmati, M., Geiger, S., Savion, N.(1988) : The Effects of Partial Demineralization and Fibronectin on Migration and Growth of Gingival Epithelial Cells on Cementum In-Vitro. *J. Dent. Res.* 67 : 1386-1391.
- 54) Pitaru, S., Hekmati, M., Metzger, Z., Savion, N.(1991) : Epithelial-Connective Tissue Interaction on the Tooth Surface: An In Vitro Model. *J. Periodont. Res.* 26 : 461-467.
- 55) Pitaru, S., Hekmati, M., Solding, M., Savion, N.(1988) : Growth and Migration of Gingival Epithelial Cells on Mineralized and Partially Demineralized Root Surfaces in an In vitro System. *J. Periodontol.* 59 : 531-534.
- 56) Pitaru, S., Melcher, A.H. (1983) : Orientation of Gingival Fibroblast and Newly-Synthesized Collagen Fibers In Vitro *J. Periodont. Res.* 18 : 483-500.

- 57) Pitaru, S., Melcher, A.H.(1987) : Organization of an Oriented Fiber System In-Vitro by Human Gingival Fibroblasts Attached to Dental Tissue: Relationship Between Cells and Mineralized and Demineralized Tissue. *J. Periodont. Res.* 22 : 6-13.
- 58) Pitaru, S., Noff, M., Grosskopf, A., Moses, O., Savion, N.(1991) : Heparan Sulfate and Fibronectin Improve the Capacity of Collagen Barriers to Prevent Apical Migration of the Junctional Epithelium. *J. Periodontol.* 62 : 598-601.
- 59) Polson, A.M.(1986) : The Root Surface and Regeneration ; Present Therapeutic Limitations and Future Biologic Potentials. *J. Clin. Periodontol.* 13 : 995-999.
- 60) Polson, A.M., Caton, J. (1982) : Factors Influencing Periodontal Repair and Regeneration. *J. Periodontol.* 53 : 617-625.
- 61) Polson, A.M. Ladenheim, S., Hanes, P.J.(1986) : Cell and Fiber Attachment to Demineralized Dentin from Periodontitis-Affected Root Surfaces. *J. Periodontol.* 57 : 235-246.
- 62) Polson, A.M., Proye, M.P. (1983) : Fibrin Linkage ; A Precursor for New Attachment. *J. Periodontol.* 54 : 141-147.
- 63) Pucher, J.J., Daniel, J.C. (1992) : The Effects of Chlorhexidine Digluconate on Human Fibroblast In-Vitro. *J. Periodontol.* 63 : 526-532 .
- 64) Register, A.A.(1973) : Bone and Cementum Induction by Dentin, Demineralized In situ. *J. Periodontol.* 44 : 49-54 .
- 65) Register, A.A., Burdick, F.A. (1975) : Accelerated Reattachment with Cementogenesis to Dentin, Demineralized in situ I. Optimum Range. *J. Periodontol.* 46 : 646-655.

- 66) Ririe, C.M., Crigger, M., Selvig, K.A.(1980) : Healing of Periodontal Connective Tissue Following Surgical Wounding and Application of Citric Acid in Dogs. J. Periodont. Res. 15 : 314-327.
- 67) Socransky, S.S. (1977) : Microbiology of Periodontol Disease-Present Status and Future Considerations. J. Periodontol. 48 : 497-504.
- 68) Stahl, S.S.(1977) : Repair Potential of the Soft Tissue-Root Interface. J.Periodontol. 48 : 545-552 .
- 69) Sümbülođlu, K. (1978) : Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik. Matis Yayınları - 3. Ankara.
- 70) Terronova, V.P., Franzetti, L.C., Hic, S., Difloria, R.M., Lyall, R.M., Wikesjö, U.M.E., 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.
- 71) Terronova, V.P., Hic, S., Franzetti, L., Lyall, R.M., Wikesjo, U.M.E.(1987) : A Biochemical Approach to Periodontal Regeneration AFSCM : Assays for Specific Cell Migration. J. Periodontol. 58 : 247-257 .
- 72) Terronova, V.P., Odziemiec, C., Tweden, K.S., Spadone, D.P.(1989) : Repopulation of Dentin Surfaces by Periodontal Ligament Cells and Endothelial Cells. J. Periodontol. 60 : 293-301
- 73) Vaughan, M.E. Garnick, J.J. (1989) : The Effects of a 0,125% Chlorhexidine Rinse on Inflammation After Periodontal Surgery. J. Periodontol. 60 : 704-708.

- 74) Veksler, A.E., Kayrouz, G.A., Newman, M.G. (1991) : Reduction of Salivary Bacteria by Pre - Procedural Rinses With Chlorhexidine 0.12%. J. Periodontol. 62 : 649-651.
- 75) Von Swol, R.L., Ellinger, R., Pfeifer, J., Borton, N.E., Blumenthal, N. (1993): Collagen Membrane Barrier Therapy to Guide Regeneration in Class II Furcations in Humans. J.Periodontol. 64 : 622-629 .
- 76) Wade, W.G. Addy, M. (1989) : In Vitro Activity of a Chlorhexidine-Containing Mouthwash Against Subgingival Bacteria. J. Periodontol. 60 : 521-525.
- 77) Wikesjö, U.M.E., Baker, P.J., Christersson, L.A.(1986) : A Biochemical Approach to Periodontal Regeneration -Tetracycline Treatment Conditions Dentin Surfaces. J. Periodont. Res. 21 : 322.
- 78) Wikesjö, U.M.E., Nilveus, R.E., Selvig, K.A. (1992) : Significance of Early Healing Events on Periodontal Repair : A Riview. J. Periodontol. 63 : 158-165 .
- 79) Wirthlin, M.R.(1981) : The Current Status of New Attachment Therapy. J. Periodontol. 52 : 529-543 .
- 80) Zafiropoulos, G.G.K. Flores-de-Jacoby, L. Hungerer, K.D. Nissengard, R.J.(1992): Humoral Antibody Responses in Periodontal Disease. J. Periodontol. 63: 80-86.

ÖZGEÇMİŞ

1966 yılı Hatay doğumluyum. Sırasıyla Mithat Paşa İlkokulu, Beş Temmuz Ortaokulu ve İskenderun Lises i'ni bitirdim. 1982 yılında girdiğim A.Ü. Dişhekimliği Fakültesi'nden 1987 yılında mezun oldum. 1988'de S.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen aynı Anabilim dalında doktora öğrencisi ve araştırma görevlisi olarak görevime devam etmekteyim.

TEŞEKKÜR

Çalışma boyunca ilgi ve yardımlarından ötürü S.Ü.V.F. Viroloji Bilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Sibel Yavru'ya ve örneklerin, Faz Kontrast Mikroskopunda fotoğraflarının çekilmesindeki yardımlarından dolayı Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlilerinden Kenan Çınar'a teşekkür ederim.

