

284049

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PLAK, DİŞ TAŞI VE HASTALIKLI SEMENTİN  
PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARINA ETKİLERİNİN  
DOKU KÜLTÜRLERİNDE KİYASLAMALI İNCELENMESİ**

PERİODONTOLOJİ (DİŞ) PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ

**Dr. RAHİME MERAL NOHUTCU**

ANKARA — 1986

T.C.  
HACETTEPE ONİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTUSU

PLAK, DİŞ TAŞI VE HASTALIKLI SEMENTİN  
PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARINA ETKİLERİNİN  
DOKU KÜLTÜRLERİNDE KİYASLAMALI İNCELENMESİ

PERİODONTOLOJİ (DİŞ) PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ

Dt. RAHİME MERAL NOHUTÇU

Rahber Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Y. KENAN ERATALAY

ANKARA - 1986

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	4
MATERYAL VE METOD .....	17
BULGULAR .....	25
TARTIŞMA .....	60
SONUÇLAR .....	70
ÖZET .....	72
KAYNAKLAR .....	73

## GİRİŞ VE AMAÇ

Periodontitis, plak uyarılarının neden olduğu dişeti iltihabı ile başlayıp, olayın alveol kemiği, sement, periodontal ligament gibi dişi destekleyen diğer dokulara yayılması ile karakterize bir hastalıktır. Periodontitis erişkin popülasyonundaki diş kayıplarının primer nedenidir<sup>(9,21)</sup>.

Dişlerin kaybına neden olabilecek kadar ilerleyebilen bu iltihabi hastalığın nedenleri ve mekanizması şimdiye kadar yoğun bir araştırma konusu olmuştur.

Periodontal hastalıkların etyolojisi geleneksel olarak lokal ve sistemik faktörler olmak üzere ikiye ayrılır. Bu faktörlerin etkileri birbirleriyle ilişkilidir. Lokal faktörler, periodonsiyum ve çevresinde mevcut olan eklenilerdir. Sistemik faktörler ise hastanın genel durumundan kaynaklanıp hastalığa ortam hazırlarlar<sup>(9,49)</sup>.

Lokal faktörler periodontal hastalıkta esas patolojik olay olan iltihaba neden olurlar. Sistemik faktörler ise bu lokal irritana karşı doku cevabını düzenlerler. Bununla arzu edilmeyen sistemik durumlarda lokal irritana karşı cevap aşırı olabilir<sup>(9)</sup>.

Hastalığın lokal etyolojik faktörleri arasında diş plağı ve diş taşı daima primer önem taşımıştır<sup>(18)</sup>.

Bakteriyel diş plağının periodontal hastalıklarda primer etyolojik ajan olduğunu vurgulayan pek çok araştırma yapılmıştır. Plağın bu yıkıcı etkisinden plakta mevcut olan bakterilerden çok bakteriyel ürün-

ler, enzimler, endotoksinler ve antijenik özelliğe sahip yapılar sorumlu tutulmuşlardır<sup>(31,54,63)</sup>.

Diş plağının ekstrakte edilebilen komponenti plağın patojenik etkisinde önemli olabilir. Plağın diş eti dokularına toksik etkiye sahip bu tür yapıları içerdiği ileri sürülmüştür. Bu ürünler dişeti hücrelerine direkt toksik etki gösterirler veya lokal immün cevabı başlatırlar<sup>(31,54)</sup>.

Yapılan araştırmalarda periodontal cepteki bakteriler tarafından salgılanan toksik faktörler ve endotoksinlerin kök yüzeyine penetre olarak sitotoksik etki yarattıkları da ileri sürülmüştür<sup>(3,22)</sup>. Cep içine açılmış kök yüzeyindeki toksik faktörlerin sementin düzensiz alanlarında absorbe olup olmadığı bilinmez. Ancak hastalıklı kök yüzeyindeki endotoksin benzeri toksik maddeler periodonsiyumdaki yıkıcı etkinin sürmesinde önemli rol oynar<sup>(2,3,22,61)</sup>.

Periodontal tedavi sırasında uygulanan kök düzeltmesinin bakteriyel endotoksinleri uzaklaştırdığına, fakat tamamen elimine etmediğine inanılmaktadır. Bu nedenle çeşitli detoksifiye edici ajanlar kullanılarak yeni bağ dokusu ataçmanın hızlandırılması yoluna gidilmiştir<sup>(47,48)</sup>. Erken ve kalıcı yeni bağ dokusu ataçmanın sağlanması kök yüzeyi boyunca ve iyileşen flap altında epitelial migrasyonu azaltması açısından önemlidir. Çünkü böyle bir migrasyon, periodontal ligament, sement ve kemik rejenerasyonunu önleyebilir. Bu tür yapıların kaybı periodonsiyumu uygun bağ dokusu ataçmanından yoksun bırakır. Oysa bağ dokusu ataçmanı, uzun epitelial ataçmana göre patolojik değişikliklere karşı daha dirençli bir yapı oluşturur<sup>(34)</sup>.

Çalışmamızda periodontal hastalıktaki doku yıkımının önemli faktörlerinden biri olan fibroblast harabiyeti üzerinde, plak ve diş

taşı ekstraktlarının etkisinin incelenmesi düşünülmüştür. Ayrıca hastalıklı sementin, periodontal tedavinin önemli bir komponenti olan yeni ataçman oluşması için gerekli fibroblastik aktivite üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle plak, diş taşı ve hastalıklı sement ekstraktlarının doku kültürlerinde üretilen periodontal ligament fibroblastları ile etkileşimi sonucu meydana gelecek değişikliklerin incelenip, klinik yorum getirilmesi düşünülmüştür.

## GENEL BİLGİLER

Dişlerin sürmesinden sonra edinilen dişler üzerindeki eklentiler pelikül, diş plağı ve diş taşı olmak üzere üçe ayrılır. Kazanılmış pelikül ince (0.05 - 1 mikron), hücresiz ve esas olarak bakteriden yoksundur. Pelikül, mine veya semente seçici olarak adsorbe olmuş yüksek molekül ağırlıklı salya glikoproteinlerini içerir. Diş yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra hızla yeniden oluşur ve tüm diş yüzeyini kaplayabilir. Pelikül formasyonu plak oluşumu için gereklidir. Bu nedenle plak oluşumunun birinci basamağı olarak kabul edilir. Bazı bölgelerde pelikül bakterilerle kolonize olmaya başlar. Bu da plak formasyonunun ikinci basamağıdır (10,21,49).

Diş plağı,dişe sıkıca yapışmış yumuşak bakteriyel eklentileri içerir. Fırçalama veya kazıma ile diştten uzaklaştırılabilir. Plak, kompleks ve metabolik olarak birbirine bağımlı, iyi organize olmuş bakteriyel bir sistemdir. İntermikrobiale matrikse gömülmüş yoğun mikroorganizma yığıntılarını içerir. Esas olarak mikroorganizma ve mikrobiyal ürünlerden oluşur (9,21).

Yerleşim bölgesine göre diş plağı subgingival ve supragingival olmak üzere ikiye ayrılır. Pelikül formasyonundan sonra plak gelişiminin ikinci basamağı belli mikroorganizmaların seçici olarak bağlanmasıdır. Bu mikroorganizmaların büyümeleri, olgunlaşması ve salya glikoproteinlerinin intermikrobiale matrikse katılmasıyla plak gelişimi devam eder. Bu arada salya ve çevre dokulardan daha fazla mikroorganizma plak

formasyonuna katılır. Diş yüzeyinin kolonizasyonu iki mekanizma ile olmaktadır; 1- Tek mikroorganizma veya mikroorganizma kümeleri seçici olarak diş yüzeyine yapışarak çoğalırlar ve plak kolonilerini oluştururlar. 2- Diş yüzeyindeki fissur ve küçük çukurcuklardaki karışık mikroorganizma toplulukları gelişerek bu kolonizasyonu oluştururlar<sup>(21,49)</sup>.

Ağız bakımı işlemleri terkedildiğinde küçük, izole plak kolonileri 1-4 günde oluşur. İlk koloniler genellikle dişeti kenarı boyunca yerleşmiştir. 2-5 gün içinde bu koloniler birbirleriyle birleşerek sürekli bir eklenti oluştururlar. Ağız bakımının terkedildiği 10.günde plak maksimum uzanımına ve kalınlığına ulaşır<sup>(21)</sup>.

İlk 1 veya 2 hafta boyunca plak yapısında giderek ve sürekli bir değişim olur. Tek tek mikroorganizmler ve ayrı koloniler daha olgun ve kompleks bir yapı kazanarak diş yüzeyinin büyük bir kısmını kaplarlar. Bu olgunlaşma boyunca gram (+) aerobik çubukların baskın olduğu floradan, çubuk, filamentöz ve spiral mikroorganizmlerin oluşturduğu karışık bir floraya geçiş vardır. Gram negatif ve aerobik mikroorganizmlerin oranında belirgin bir artış izlenir<sup>(49)</sup>.

Plağın mikrobiyolojik içeriği kişiden kişiye ve aynı kişide bölgelere göre farklılık gösterir. Sağlıklı bölgelerde subgingival ve supragingival flora benzerlik gösterirken periodontal hastalıklı bölgelerde farklıdır. Son yıllardaki bulgulara göre ise değişik form periodontal hastalıklar farklı mikrobiyal etyolojiye sahiptir<sup>(9)</sup>.

Klinik olarak sağlıklı dişetinde supragingival plağın esas olarak streptokok ve aktinomiçes türlerini içeren gram (+) organizmlerden oluştuğu gözlenir. Gingivitis gelişimi ile gram (-) bakterilerin sayısında belirgin bir artış olur. Gingivitis örneklerinde gram (-) bakte-



riler total floranın % 45'ini oluştururlar. ilerlemiş erişkin periodontitiste ise flora esas olarak gram (-) çubuklardan oluşmuştur ve bu organizmlerin oranı % 75'e ulaşmıştır<sup>(40,59)</sup>.

Plak mikroorganizmleri organik bir matriksle bir arada tutulurlar. Bu intermikrobial yapı salya proteinlerini ve dişeti cebi sıvısını içerir. Bazı bakteri türlerinin ürettiği polisakkaritler de intermikrobial matriksin önemli bir komponentidir ve bakteri agregasyonunu kolaylaştırır<sup>(21)</sup>.

Intermikrobial yapı aynı zamanda çeşitli maddelerin diffüzyonunu da sağlar. Antijenler, enzimler, mukopeptidler ve metabolitler gibi mikrobial orijinli pek çok madde bu matriks içinde toplanır. Bu maddelerin çoğu toksik olabilirler veya iltihabı başlatabilirler<sup>(21,54)</sup>.

Epidemiyolojik çalışmalar diş plağı miktarı ile dişeti iltihabı arasında direkt bir ilişki göstermiştir. Diş plağının periodontal hastalığa neden olduğunu vurgulayan pek çok bulgu olmasına karşılık bu mikroorganizmlerin etki mekanizması tam bir açıklık kazanmamıştır. Isırma yaraları ve kontamine dental alet yaralarının şiddetli enfeksiyonlara neden olması plak mikrobiotasının patojenitesini ortaya koyar<sup>(9,21)</sup>.

Plak bakterilerinin patojenitesi plağın, plak mikroorganizmlerinin ve plaktan açığa çıkarılan maddelerin deney hayvanlarına enjeksiyonunun miks enfeksiyon ve apse oluşturması ile de gösterilmiştir<sup>(21)</sup>.

Plak mikroorganizmleri özellikle kronik periodontal hastalıklarda doku dışında yerleşmişlerdir. Böylece doku dışındaki bu organizmler zararlı etkilerini sulkus epitelinin ülserasyonları veya birleşim epiteli yoluyla oluştururlar. Mikroorganizmler doku dışında yerleştiklerinde fagositozla uzaklaştırılmayacakları için plak etkeni ortadan

kalkmadıkça bu organizmlerin etkisi sürer<sup>(21)</sup>.

Derin cep varlığında, ülsere ceplerde, ileri kemik kaybında, şiddetli mobilitede bakterilerin penetre olarak kemikle temas kurduklarına inanılır. Bu gibi durumlardaki kemik kaybı bakteri istilası ile ilgili bulunmuştur<sup>(9,16)</sup>.

Plak mikrobiotası son derece kompleks bir yapıya sahiptir. İltihabı başlatan tek bir ajan izole etmek şimdiye kadar mümkün olamamıştır. Mevcut olan organizmler; enzimler, sitotoksik metabolitler, lipopolisakkarit endotoksinler, mukopeptidler, kemotaktik maddeler ve anti-jenler gibi iltihabi cevaptan sorumlu tutulan çeşitli irritanları üretirler<sup>(17,21,24)</sup>.

Periodontal doku yıkımındaki muhtemel mekanizmalardan biri de bu yıkımın enzimler aracılığıyla olduğudur. Enzimler, periodontal dokularda hücreler arası yapı, sulkus epitel, kollagen lifler ve bağ dokusu ara maddesi üzerinde etkilerini gösterirler. Plakta, mukopolisakkaridaz, hyalüronidaz, proteaz, kondroidin sülfataz,  $\beta$  glukuronidaz ve nöraminidaz gibi enzimlerin varlığı çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir<sup>(9,21,49)</sup>.

Bu enzimler, birleşim epitel yüzeyinde veya sulkus epitel hücreler arası boşluğunda mukopolisakkarit ve proteinlerin yıkımına yol açarak çeşitli mikrobial irritanların dişeti bağ dokusuna girişine izin verirler<sup>(21)</sup>.

Plak mikroorganizmleri karbohidratları, amino asitleri ve proteinleri metabolize ederek çeşitli metabolitlerin plakta birikimine neden olurlar. Amonyak ve hidrojen sülfid gibi bu metabolitler de sitotoksik maddelerdir. Fakat bu tür maddeler dişeti cebinde doku yıkımı için

yeterli konsantrasyonda bulunamadığı için mikrobial metabolitlerin toksik etkileri kesinlik kazanmamıştır<sup>(21)</sup>.

Endotoksinler ve mukopeptidler gibi mikrobial hücre duvarı komponentlerinin de memeli dokularını etkiledikleri bilinir. Endotoksinler gram negatif bakteri hücre duvarının yapısına katılırlar. Yüksek molekül ağırlıklı ve iltihabı başlatma potansiyeli olan lipo-muko polisakkarit kompleksleridir. Endotoksinler çeşitli enzimler, fenol, eter ve diğer bazı ajanlarla ekstrakte edilebilir<sup>(21,66)</sup>.

Deney hayvanlarına endotoksinin enjeksiyonu ateş, nekrotik reaksiyonlar, diyare hatta bazen ölümlle sonuçlanır. Ağız mukozasındaki çok az miktarları bile iltihaba ve bitişik kemikte resorbsiyona neden olur<sup>(19,21)</sup>.

Diş plağı, iltihaplı dişeti ve dişeti cebi sıvısında endotoksinin mevcudiyeti gösterilmiştir<sup>(14,26,53,62)</sup>. Endotoksinler klinik olarak sağlıklı ve ülser dişeti epitelinden geçebilirler<sup>(50)</sup>. Böylece dişeti cebinden kolaylıkla absorbe olarak iltihabi olaya katılabilirler. Endotoksinler dişeti iltihabının başlamasında çok yönlü etki gösterirler. Bu etkilerini, primer toksisiteyi, C3 komponentinden başlayarak kompleman aktivasyonu ve antijenik özellikleri ile ortaya çıkarırlar<sup>(19,21)</sup>. Plak ve dişeti cebi sıvısındaki endotoksin aktivitesi ile dişeti iltihabının derecesi arasında yakın ilişki bulunmuştur<sup>(24,55,56,57)</sup>.

Mikrobial irritanlarla iltihabi cevabın direkt olarak başlatılmasına ek olarak periodontal inflamasyon mikrobial antijenlerin doku içine girmesiyle indirekt olarakda başlatılabilir. Periodontal hastalıklı dokuyla yakın ilişkide olan çok sayıda bakteri, dokuya antijen girişini sağlarlar. Bu bakteriyel antijenlere karşı oluşan konakçı immün cevabı periodontal hastalık patogeneğinde önemli rol oynar<sup>(21)</sup>.

Son yıllarda plak ürünlerinin toksisitelerinin tayininde hücre ve organ kültür sistemleri geliştirilmiştir. Memeli hücre kültürleri suda çözünür plak ürünlerinin patojenik etkilerinin araştırılmasında ve tayininde önemli bir yöntem oluşturur. Steril plak ekstraktlarının, memeli hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği çok sayıda in vitro araştırmada gösterilmiştir<sup>(31,32)</sup>.

Ayrıca plak ekstraktlarının organ kültürlerinde kemik demineralizasyonunu stimüle ettiği de ileri sürülmüştür<sup>(28)</sup>.

Diş plağı kalsifiye olduğunda ortaya çıkan yapı, diş taşı olarak isimlendirilir. Diş plağı ve diş taşı periodontal hastalıkların etyolojisinde daima primer etken olarak önem taşırlar<sup>(18)</sup>.

Diş taşı, klinik krona sıkıca yapışmış, sert ve kalsifiye olmuş kitledir. Protez veya diğer apareyler üzerinde de oluşabilir. Diş taşının primer etkisi daha önce düşünüldüğü gibi sadece mekanik irritasyonuna bağlı değildir. Yüzeyi daima kalsifiye olmamış plakla örtülüdür. Bu örtü aynı zamanda çeşitli mikroorganizma türlerini, dökülen epitel hücrelerini ve birleşim epitelinden kaynaklanan lökositleri de içerir. Bunların tümü birlikte yapışkan bir matriks oluşturur<sup>(9)</sup>.

Diş taşının periodontal hastalıklardaki önemi çeşitli özelliklerine bağlıdır. Bu özellikler; 1- Diş taşı düzgün olmayan bir yüzeye ve gözenekli bir yapıya sahiptir. Böylece diş plağının tutuculuğunu kolaylaştırır ve daima plakla örtülüdür. 2- Diş taşı geçirgendir ve toksik ürünleri barındırır. Böylece diş taşı hem fiziksel hem de kimyasal olarak zararlı etkiye sahiptir. Bu nedenle bu kalsifiye eklentiler, diş plağı için uygun bir zemin oluşturarak, uzaklaştırılmasını zorlaştırıp periodontal hastalığın sürmesinde ve hızlanmasında önemli rol oynayabilir. Diş taşı-

nın mevcut olduğu bölgelerde dişeti iltihaplıdır. Derin subgingival lezyonlarda diş taşı varlığında tamir ve yeni ataçman olayları engellenir. Bu nedenle diş taşının ve temasta olduğu nekrotik sementin uzaklaştırılması periodontal tedavinin çok önemli bir basamağıdır<sup>(9,21)</sup>.

Diş taşı yerleşim bölgesine göre subgingival ve supragingival olmak üzere ikiye ayrılır. Bu sınıflandırma serbest dişeti kenarı ile olan ilişkisine göre yapılır<sup>(9,21)</sup>.

Supragingival diş taşı, daha çok majör tükürük bezlerinin açılım bölgelerinde beyaz veya beyazımsı sarı kitleler olarak izlenir. Sert bir yapıya sahiptir ve uzaklaştırıldıktan sonra yeniden oluşumu hızlı olabilir<sup>(9)</sup>.

Subgingival diş taşı, dişeti kenarının altında yerleşmiş olan diş taşıdır. Normal ağız muayenesinde farkedilemeyebilir. Yoğun, sert, koyu kahverengi veya yeşilimsi siyah kitleler olup kronik periodontal hastalıklarda cep tabanına kadar uzanabildikleri gösterilmiştir<sup>(9,49)</sup>.

Diş taşı diş plağının mineralizasyonu sonucu oluşur. Yumuşak plak, mineral tuzlarının çökmesiyle sert bir yapı kazanır. Mineral tuzlarının çökmesi genellikle plak oluşumunun 1-14.günleri arasında başlar. Erken plakta inorganik içerik azdır. Plak gelişimi sürdükçe bu miktar artar ve diş taşı oluşur. Mikroorganizmler diş taşı oluşumunda her zaman yer almayabilir<sup>(9)</sup>.

Salya supragingival diş taşı için mineral kaynağıdır, dişeti cebi sıvısı ise subgingival diş taşı için mineral sağlar<sup>(9)</sup>.

Kalsifikasyon, kalsiyum iyonlarının organik matrikteki karbohidrat-protein komplekslere bağlanması ve kalsiyum fosfat tuz kristallerinin çökmesi ile başlar. Kristaller başlangıçta hücreler arası matrikste ve bakteri yüzeyinde, en son olarak da bakteri içinde oluşurlar. Kalsifikasyon önce-

likle supragingival plağın iç yüzeyi boyunca başlar. Bu arada plağın bakteriyel içeriği ve boyanma özelliklerindeki değişiklikler de sürer. Kalsifikasyon olayı gerçekleşirken filamentöz bakteri sayısında artış gözlenir<sup>(9,20)</sup>.

Plak ve diş taşının dişeti üzerindeki etkilerini ayırmak zordur. Çünkü diştaşı daima mineralize olmamış plakla örtülüdür. Gingivitis ile diş taşı arasında pozitif bir ilişki olmasına rağmen bu ilgi plak ve gingivitis arasında daima daha fazladır. Genç kişilerde plak ve periodontal durum ilişkisi diş taşından daha fazla iken artan yaşla birlikte bu ilişki değişir<sup>(9)</sup>.

Diş taşı, gingivitis ve periodontal hastalık yaşla birlikte artar. Erişkin kişilerde genellikle periodontal cep varlığında subgingival diş taşı da mevcuttur<sup>(21)</sup>.

Diş taşı yüzeyindeki mineralize olmamış plak daima primer irritandır. Fakat alttaki kalsifiye yapı da önemli olabilir. Bu sert eklentiler dişetini direkt olarak irrite etmese bile sürekli plak birikimi için bir yuva oluşturarak plak-dişeti ilişkisinin sürmesine neden olur<sup>(9)</sup>.

Subgingival diş taşı ise periodontal cep oluşumunun nedeninden çok sonucu olabilir. Oluşan bu cep bakteri ve plak birikimi için bir yuva oluşturur. Dişeti iltihabı ile birlikte artış gösteren dişeti sıvısının sağladığı mineraller de sürekli olarak biriken plağın subgingival diştaşına dönüşümüne neden olur<sup>(9)</sup>.

Cep oluşumunun primer veya sekonder nedeni olmasına bakmaksızın diş taşı periodontal hastalıkların önemli bir patojenik faktörü olarak kabul edilir<sup>(9)</sup>.

Periodontal cebin diş duvarı periodontal hastalık boyunca birtakım değişikliklere uğrar. Bu değişiklikler periodontal hastalığın devamı açısından önemlidir. Sementte oluşan bu değişiklikler yapısal, kimyasal ve toksik özelliklerde olabilir. Yapısal değişiklikler; patolojik granüllerin mevcudiyeti, mineralizasyonun artması ve demineralizasyon bölgelerinin oluşmasıdır. Patolojik granüller kollagen dejenerasyonunun olduğu bölgelerde izlenir. Bu granülleri hem ışık mikroskobunda hem de elektron mikroskopta görmek mümkün olmuştur. Granüllerin kolesterol ve steroid içerdiği bilinmesine rağmen önemleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Kollagen yıkımı bölgelerinin bir göstergesi olabilirler. Diğer bir görüş ise granüllerin bakterileri temsil ettiği ve bakterilerden veya salyadan kaynaklanan maddelerin penetrasyonu sonucu meydana geldiğidir<sup>(4,5,51)</sup>.

Selvig ve Zander periodontal hastalıklı köklerde sağlıklı köklere oranla mineralizasyon oranının artmış olduğunu bulmuşlardır. Bu hipermineralizasyon kök yüzeyinin cep içine veya ağız ortamına açılması sonucu mineral penetrasyonunun artışı ile ilgilidir. Hipermineralize bölgeleri elektron mikroskopta izlemek mümkündür<sup>(4,5)</sup>.

Periodontal hastalıklı sementte inorganik komponentten zengin bu bölgelerin yanısıra demineralize alanlara da rastlanır. Bakteriyel ürünlere ve ağız sıvılarına maruz kalması sonucu Sharpey liflerinin proteolizisi sonucu sement yumuşar ve bütünlüğünü kaybeder. Sementin etkilenmesini takiben dentin tübüllerine bakteri penetrasyonu ve dentin yıkımı söz konusu olabilir<sup>(9,60)</sup>.

Sementte kalsiyum, magnezyum, fosfor ve florid gibi mineral düzeylerinde yükselme ile karakterize olan bazı kimyasal değişiklikler de gözlenir<sup>(4,5,51)</sup>.

Periodontal cebe veya ağız ortamına açılmış sement, lokal çevreden kalsiyüm, fosfor ve florid absorbe edebilir. Böylece iyi kalsifiye olmuş bir tabaka gelişir ve çürüğe direnç gösterir. Fakat sementin çevreden bir takım maddeleri absorbe etme özelliği eğer bu maddeler toksik etkiliyse zararlı olabilir<sup>(9)</sup>.

Hastalıklı sementte sitotoksik değişiklikleri gözlemek mümkündür. Semente bakteri penetrasyonu sement-dentin bileşimine kadar uzanabilir. Ayrıca endotoksinler gibi bazı bakteri ürünlerinin periodontal cebin diş duvarında mevcudiyeti bildirilmiştir<sup>(2,3)</sup>.

Hatfield ve Baumhammers sağlıklı ve periodontal hastalıklı dişleri kullanarak yaptıkları in vitro çalışmada hastalıklı dişlere maruz kalan hücrelerde dönüşümsüz değişiklikler olduğunu kaydetmişlerdir. Böylece oral mikroorganizmler tarafından üretilen toksik faktörler veya endotoksinin kök yüzeyine penetre olduğunu ve daha sonra da salınarak sitotoksik etki yarattığını savunmuşlardır<sup>(22)</sup>. Periodontitisteki baskın flora gram (-)'tir ve bu mikroorganizmlerin çoğunluğu hücre duvarlarında kompleks lipopolisakkaritleri yani endotoksinleri içerir<sup>(17,19)</sup>.

Aleo ve arkadaşları tedavi edilmemiş periodontal hastalıklı dişlerde otoklavda steril edilmelerine rağmen toksik maddelerin mevcut olduğunu ve bu tür dişlere hücre kültürlerinde fibroblast ataçmanın olmadığını bildirmişlerdir. Ancak; periodontal hastalıklı dişlere uygulanan fenol-su ekstraksiyonundan sonra fibroblast ataçmanın sağlıklı kontrollere yakın olması nedeniyle ısıya dayanıklı bu toksik maddelerin endotoksin olduğunu savunmuşlardır<sup>(3)</sup>.

Yapılan in vitro çalışmalarda periodontal hastalıklı dişler ve bu dişlerden elde edilen ekstraktlar sağlıklı kontrollerle karşı-



laştırıldığında diş eti epitel ve fibroblast hücrelerine toksik etkiye sahip bulunmuşlardır<sup>(2,22)</sup>.

Fibroblastlar diş eti bağ dokusunun ana hücreleridir ve bağ dokusu için temel olan elementleri üretirler. Bağ dokusundaki toplam hücrelerin hacim olarak % 65'ini oluştururlar. Fonksiyonel olarak da fibroblastlar bağ dokusundaki en önemli hücre grubudur. Fibroblastlar kollagen, proteoglycan ve elastin gibi bağ dokusunun temel yapılarını sentezlerler. Bu nedenle diş eti dokularının bütünlüğünün sürmesinde ve yaralanmayı takiben yapının veya fonksiyonun restorasyonunda özel önem taşırlar. Fibroblastlar mezensimal orijinli hücrelerdir ve bağ dokusu ana hücrelerinden farklılaşır. Ana hücreler perivasküler bölgede, periostta ve lamina propriada çok bol miktarda bulunurlar<sup>(19)</sup>.

Yaralanma ve irritasyonu takiben farklılaşmamış hücreler mitozla giderek temel hücre popülasyonunu oluştururlar. Bunların önemli bir kısmı da fibroblastlara farklılaşır. Fibroblastlarda sitoplazma alanı ana hücrelere oranla daha geniştir. Ultrastrüktürel inceleme iyi gelişmiş bir protein sentez ve transport sistemini açığa çıkarır. Endoplazmik retikulum çok sayıda ribozom demetiyle birleşmiştir. Çok sayıda mitokondri mevcuttur ve mitokondrilerdeki krista sayısı fazladır. İyi gelişmiş Golgi kompleksi izlenir<sup>(19)</sup>.

DeneySEL deri yaralanmalarını takiben 4-5 gün içinde fibroblastlar yaralanma bölgesine gelirler. Kollagen ve diğer bağ dokusu yapılarının üretimi 5-7 gün içinde başlar<sup>(19)</sup>.

Bütün bu özellikleri nedeniyle fibroblastlar diş eti bağ dokusunun temel hücreleridir ve periodontal tedavi sonrası yara iyileşmesi, bağ dokusu yapılarının yenilenmesi ve yeni bağ dokusu ataçmanından büyük ölçüde sorumludurlar<sup>(19,49)</sup>.

Yeni ataçman terimi, tedaviyi takiben diş destek dokularının yenilenmesini, yeni oluşan periodontal ligament liflerinin yeni sement içine gömülmesini ve dişeti epitelinin önceden hastalıklı kök yüzeyine ataçmanını açıklayan bir terimdir. Marjinal periodonsiyumun restorasyonu söz konusudur<sup>(34)</sup>.

Epitelial adaptasyon reataçman olayından farklıdır ve tam bir cep eliminasyonu olmaksızın diş eti epitelinin diş yüzeyine yakın temasıdır. Cep içine bakteri penetrasyonu ve takiben daha fazla ataçman kaybı, hatta apse formasyonu olabileceği için bu durum tehlike oluşturabilir. Yeni ataçmanın kemik içi ceplerin tedavisinden sonra daha sıklıkla oluştuğu bildirilmesine rağmen kemik üstü ceplerin tedavisinden sonra da oluşabileceği gösterilmiştir<sup>(34)</sup>.

Periodontal tedaviden sonra periodontal dokuların yeni ataçman oluşturma potansiyeli çeşitli hayvan modellerinde araştırılmıştır.

Periodontal cerrahi sırasında insizyon ve granülasyon dokularının temizlenmesini takiben kürete edilmiş kök yüzeyinde 4 ayrı tip hücre popülasyonu izlenir. Bu hücreler; epitelial hücreler, dişeti bağ dokusu hücreleri, kemik hücreleri ve periodontal ligament hücreleridir<sup>(34)</sup>.

Ağız epitelinden kaynaklanan epitelial hücreler kök yüzeyi boyunca apikale proliferer olduklarında cep epiteli cerrahi öncesi seviyesinin apikaline uzanır. Böylece uzun bir epitelial ataçman oluşur. Bu epitelle diş yüzeyi arasındaki temas kütiküler yapılar, bazal membran ve hemidesmozomlarla sürdürülür<sup>(34)</sup>.

Eğer dişeti bağ dokusu hücreleri kök yüzeyinde birikirse sert ve yumuşak doku arasında bağ dokusu adezyonu veya ataçmanı gerçekleşir<sup>(34)</sup>.

iyileşmenin ideal modeli periodontal ligamentten kaynaklanan hücrelerin koronal yönde daha önceden hastalıklı olan kök yüzeyini kaplayarak proliferasyon olmasıdır. Bu tür hücreler aynı zamanda sement ve periodontal ligament liflerini oluşturma kapasitesine de sahiptirler<sup>(34)</sup>.

Çeşitli nedenlerin yanısıra diş eti bağ dokusu ve periodontal ligamentin esas hücre grubu olan fibroblastlarda meydana gelecek yapısal ve fonksiyonel bozukluklar bu dokulardaki iyileşmeyi geciktirir ve bağ dokusu ataçmanından önce uzun epitelial ataçman oluşumuna zemin yaratır. Uzun epitelial ataçman gelişimi ise dış irritanlara daha dayanıklı ve arzu edilen ataçman tipi olan bağ dokusu ataçmanı oluşumunu engeller<sup>(9,34)</sup>.

Bu tür epitelial proliferasyon kemik içi defektlerin tedavisinden sonra da önem kazanır. Çünkü defekt içine proliferasyon olan epiteliyal bölgeye kemik uzanımını engeller<sup>(9,34)</sup>.

Periodontal yara iyileşmesi sırasında proliferasyon olan epiteliyal hücreler cerrahi tedavi sonrası 1 hafta içinde tedavi öncesi epitel seviyesine ulaşırlar. Bu hızlı proliferasyon bağ dokusunun kök yüzeyi ile yakın temasını engeller. Bu nedenle erken bağ dokusu ataçmanı daima arzu edilir<sup>(9,34)</sup>.

## MATERYAL VE METOD

### Plak Toplanması :

Hücre kültürlerinde kullanılmak üzere plak ekstraktlarının hazırlanması için oldukça fazla miktarda plağın toplanması gerekmektedir.

Kliniğimize başvuran değişik yaş gruplarındaki, gingivitis ve periodontitis tanısı konulan hastalardan Gracey (1/2) küret kullanılarak ulaşılabilir tüm diş yüzeylerinden plak toplandı. Enfeksiyöz hepatit hikayesi veya sistemik hastalığı olan ve ağız boşluğunda ülserasyonları bulunan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Plak mümkün olduğunca bütünlüğü bozulmamaya çalışılarak toplandı. Bu arada salya ve kan kontaminasyonu olmamasına özen gösterildi. Kontamine olan örnekler çalışma dışı bırakıldı. Toplanan plak materyali ağırlığı saptanmış, buz içinde bulunan küçük cam şişelere alınarak 2 saat içinde donduruldu ve çalışma gününe kadar  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

### Plak Ekstraktlarının Hazırlanması :

Toplanan plak örnekleri kullanılmadan önce tartılarak yaş plak ağırlığı tayin edildi. Stok salin solüsyonu (68.0 gr/lit NaCl, 4.0 gr/lit KCl, 2.0 gr/lit  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve 3.93 gr/lit.  $\text{CaCl}_2$ ) hazırlanarak kullanma öncesi 1:9 oranında dilüe edildi. Yaş ağırlığı tayin edilen plak, ağırlığının 7 katı hacimdeki salinle karıştırılarak cam-teflon sistem ve Medingen homojenizatör yardımıyla homojenize edildi.

Karışım  $+4^{\circ}\text{C}$  de 15 000 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. (Sorvall, superspeed RC2-B) Berrak supernatan alınarak 0.022  $\mu$  gözenekleri

olan milipore filtreden (Milipore Corpn. Bedford, Mass. U.S.A.) geçirildi. Böylece steril plak ekstraktı elde edildi. Yaklaşık olarak plak yağ ağırlığının, % 6'sının salin içerisinde çözünür madde olarak geçtiği kabul edildi (32).

#### Dış Taşı Örneklerinin Toplanması :

Çalışmamızda kullanılan dış taşı örnekleri kliniğimize başvuran hastalardan sağlandı. Periodontal tedavi öncesinde, hastaların ağızları su ile iyice çalkalatıldıktan sonra subgingival ve supragingival dış taşları steril kaplarda toplandı. Bu işlem sırasında salya ve kan kontaminasyonundan kaçınıldı. Toplanan örnekler kullanılincaya kadar -20°C de saklandı. Yeterli materyal elde edildikten sonra dış taşları porselen bir havanda toz haline getirildi, ağırlığı saptanmış bir kapta tartılarak miktarı tayin edildi ve ekstraksiyon işlemlerine kadar -20°C de saklandı.

#### Dişlerin Toplanması :

Periodontal hastalıklı ve gömülü 20 yaş dişleri Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Cerrahi bölümünden sağlandı.

Toplam olarak 163 periodontal hastalıklı ve 35 gömülü 20 yaş dişi kullanıldı.

Periodontal hastalıklı grup, 5 mm.den fazla ataçman kaybı olan, tek köklü ve çürüksüz dişlerden oluşturuldu. Çekimden sonra kök yüzeyindeki tüm materyal temizleninceye kadar PBS (Phosphate Buffered Saline, Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile dikkatlice yıkandı. Steril gazlı bezle kurulandıktan sonra, periodontal hastalıklı dişlerde mine-sement bileşimi ile ataçman seviyesi arasındaki bölgeden, düşük devirli turla

dönen rond frezle 1 mm derinliğe kadar sement örnekleri toplandı. Kontrol olarak kullanılan gömülü 20 yaş dişlerinde örnekleme tüm kök yüzeyinden yapıldı. Toplanan örnekler darası alınan kaplarda tartılarak miktarı tayin edildi. Ekstraksiyon işlemleri uygulanıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

Toplanan örneklerin Ekstraksiyon işlemleri :

Periodontal hastalıklı ve sağlıklı gömülü 20 yaş dişlerinden elde edilen sement örnekleri ile diş taşı örnekleri Westphal ve Jann'ın endotoksin ekstraksiyonu için tanımladıkları yöntemle göre ayrı ayrı muamele edildiler (66). Toplanan örneklerin her biri % 45 fenol içeren 40 ml lik fenol-su karışımında  $65^{\circ}\text{C}$ 'de 1.5 saat sürekli karıştırıldı. (%45'lik fenol, % 90'lık likit fenolün eşit hacimdeki distile su ile karıştırılmasıyla elde edilmiştir.) Bundan sonra karışım alınarak  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 6000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatan, dializ torbalarına alınarak 96 saat distile suya karşı dializ edildi. (Resim 1). Dializat alınarak  $+4^{\circ}\text{C}$  de 6000 rpm de 15 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Supernatan steril ve darası alınmış cam kaplara koyuldu. Kuru ekstrakt elde etmek amacıyla  $80^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat buharlaştırıldı ve kap yeniden tartılarak kuru ekstrakt ağırlığı tayin edildi. Deney gününe kadar ekstraktlar  $+5^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Daha sonra hücre kültürlerinde PBS ile uygun konsantrasyonda karıştırılarak kullanıldı.



Resim 1 : *Ekstraktı hazırlanacak materyalin distile suya karşı dializ edilmesi.*

#### Hücrelerin Kaynağı ve Kültürlerin Hazırlanması :

Hücreler, Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Cerrahi bölümüne başvuran kişilerden, ortodontik çekim endikasyonu konulmuş dişlerin periodontal ligamentinden elde edildi. Aseptik şartlarda çekimi sağlanan dişler 100 ü/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin (Gibco, Europe Ltd.) içeren Minimum Essential Medium (MEM) (Flow Laboratories, Rockville, Md.) içinde muhafaza edildi. En fazla 2 saat içerisinde dişler bu ortamdan alınarak kök yüzeyinde kalan periodontal ligament steril Gracey (1/2) küretle kazındı ve elde edilen doku 3-4 kez MEM ile yıkandı, pastör pipe-





tiyle plastik doku kültür kaplarına aktarıldı (Corning Tissue Culture Flasks, New York, U.S.A.). Üzerine %25 Fetal Buzağı Serum (Fetal Calf Serum-FCS, Gibco, Europe Ltd.), 100ü/ml. penisilin, 100 µg/ml streptomisin içeren MEM ilave edilerek kültür kapları 37°C sıcaklıkta, %95 hava, %5 CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı. Kültürler 3-4 gün parçaların yapışması için hiç hareket ettirilmeden bekletildi. Daha sonra üreme olup olmadığı doku kültürü mikroskobunda incelendi. 3-4 gün ara ile kültürlerin ortamları değiştirilerek, hücreler kap yüzeyini tek tabaka halinde tamamen kapladıklarında tripsinize edildi. Tripsinizasyon işlemi için önce kültür kabının ortamı pipetle tamamen uzaklaştırıldı ve 1 cc. tripsin-EDTA (%0.005 tripsin, %0.002 EDTA, Fisher Scientific Company New Jersey, U.S.A.) solüsyonu ilave edildi. Kültür kabı çalkalandıktan sonra solüsyon atıldı. İkinci kez aynı işlem tekrarlanarak kültür kabı 37°C'de 5 dakika bekletildi ve mikroskopta hücrelerin birbirinden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Daha sonra hücrelerin üzerine tekrar ortam ilave edilerek iyice pipetlendi. Böylece hücrelerin kap yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Hücre süspansiyonunun yarısı bir başka kaba aktarıldı. Hücreler yeniden üreyerek kap yüzeyini tek tabaka halinde doldurduklarında aynı işlem tekrarlandı.

#### Hazırlanan Ekstraktların Hücre Kültürlerinde Kullanılması :

Çalışmanın tümünde 5. pasaj hücreleri kullanıldı. Bu pasaja kadar gelmiş ve kültür kabının yüzeyini doldurmuş hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı ve tek kapta toplandı. İyice pipetlenerek hücrelerin homojen dağılımı sağlandı. Tripan mavisi ile canlılık testi yapıldı ve hemositometre ile toplam hücre sayısı tayin edildi. Hücreler %96-98 oranında canlı bulunarak doku kültürüne özel, 35 x 10 mm. plastik petri kaplarına (Falcon Labware, Oxnard, U.S.A.) eşit sayıda dağıtıldı. 24 saat inkübas-

yondan sonra, petri kapları alınarak ortamları uzaklaştırıldı. Hazırlanan periodontal hastalıklı sement, sağlıklı sement ve diş taşı ekstraktları herbir petride 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml olacak şekilde petrilere dağıtıldı. Bu konsantrasyonlar daha önceki benzer çalışmalara dayanılarak saptandı. %10 FCS içeren ortamla her bir petrideki hacim 2 ml'ye tamamlandı. Kontrol petrilere ise sadece %10 FCS kapsayan ortam eklendi.

Plak ekstraktları ise her bir petride 0.8 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml ve 4 mg/ml olacak şekilde dağıtıldı. Plak ekstrakt konsantrasyonları da daha önceki benzer çalışmalara dayanılarak saptandı<sup>(31,32)</sup>. Düşük konsantrasyonlardaki salin miktarı 4 mg/ml. örneklerindeki salin miktarına eşitlendi. Toplam hacim %10 FCS içeren ortamla 2 ml'ye tamamlandı. Kontrol petrilere ise plak ekstrakt örnekleriyle eşit miktarda salin ve ortam koyuldu.

Diğer bir grup petriye ise 500 µg/ml ve 1000 µg/ml olacak şekilde endotoksin (E.Coli 026 :B6 Difco, Detroit, Mich. U.S.A.) eklenerek hacim %10 FCS içeren ortamla 2 ml'ye tamamlandı. Endotoksin dozu daha önce yaptığımız standardizasyon sonucuna göre saptandı. 96. saatin sonunda petri kaplarının yarısı alınarak tripsinize edildi ve hücreler toplandı. Hemositometre ile her bir petrideki toplam canlı hücre sayıldı. Kalan petrilere çeşitli etkin madde konsantrasyonlarını içeren ortam uzaklaştırılarak etkin madde içermeyen %10 FCS konuldu. Bu petrilere sayım işlemleri ise ikinci 96. saatin sonunda yapıldı.

#### Radyoaktif [<sup>3</sup>H] Timidin Alınımı (Timidin İnkorporasyonu)

Yöntemi :

##### a. Kültür İşlemleri :

Canlılığı tripan mavisi ile kontrol edilen hücreler hemositometre ile sayılarak ml de  $0.7 \times 10^5$  hücre olacak şekilde hücre kültür tüplerine

(Corning, New York, U.S.A.) dağıtıldı. Kültürlerde inkübasyon için %10 FCS içeren ortam kullanıldı. 24 saat inkübasyondan sonra hücre sayımı işlemlerine benzer şekilde tüplere sement, diştaşı, plak ekstraktları ve endotoksin eklendi. Kültürler tekrar 72 saat etüvde bekletildikten sonra, tüplerin yarısı alınarak 0,1 ml [<sup>3</sup>H] timidin (25 Ci/ml, Amersham, England) 1 µCi/ml olacak şekilde üzerine eklendi. Kalan tüplerin ortamı uzaklaştırılarak taze ortam koyuldu. Radyoaktif [<sup>3</sup>H] timidin eklenen tüpler 24 saat sonra etüvden alınarak ekstraktların eklenmesinden sonraki toplam 96. saatin sonunda tripsinizasyon ve yıkama işlemlerine geçildi.

b. Yıkama işlemleri :

Tüplerdeki hücreler tripsinle kaldırılarak 1 ml. ortam içinde toplandı. Her bir kültür tüpündeki hücre suspansiyonundan 3 kez 0.1 ml t çekilerek Whatman filtre kağıdından hazırlanmış (Whatman no 3, Philadelphia, U.S.A.) 2.4 cm çapındaki disklere emdirildi. Böylece her bir tüpten 3 cpm (count per minute) değeri saptandı. Diskler oda sıcaklığında kurutulurak içinde soğuk timidin (Sigma, St.Louis, U.S.A.) bulunan % 10'luk Triklor-asetik asit (TCA)'e atıldı ve buzdolabında 1 saat bekletildi. Sonra sırasıyla %5'lik TCA (15 dakika), 1:1 oranındaki aseton-%99.9'luk absöü alkol karışımı (30 dakika) ve saf asetonla (15 dakika) diskler ikişer kez yıkandı. Diskler iyice kurutularak bir pensle sayım şişelerine yerleştirildi. Deneyde sayım sıvısı 1 lt toluene, 0.360 gr. POPOP, 5.075 gr. PPO olacak şekilde hazırlandı.

Şişeler Ankara Doğumevi LKB 1210 Ultra Beta Sıvı Sintilasyon Sayıcısında sayıldı.

Aynı işlemler 8.gün sonunda kalan tüpler için tekrarlandı.

Elektron Mikroskop İşlemleri :

Etkin maddelerin belirli hücre organelleri üzerine olan etkileri inceleneceği için orijinal hücre yapısına daha yakın olacağı düşüncesiyle erken pasaj (3. pasaj) hücreleri kullanıldı. Elektron mikroskop inceleme için 50 µg/ml hastalıklı sement ve 2 mg/ml plak örnekleri seçildi. 50 µg/ml hastalıklı sement, 2 mg/ml plak ekstraktı uygulanmış ve kontrol kültürlerindeki hücreler 4.gün (96. saat) sonunda tripsinize edilerek kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 2.5 cc gluteraldehit içine atılarak fikse edildiler.

## B U L G U L A R

Çalışmamızda sağlıklı ve periodontal hastalıklı dişlerden elde edilen sement, diş taşı ve plak ekstraktlarının, hücre kültürlerindeki periodontal ligament fibroblastları üzerine etkileri incelendi. Hücre sayısı ile hücre morfolojisi kontrol kültürleri ve iki farklı konsantrasyonda endotoksin uygulanmış kültürlerle karşılaştırıldı. Bulgular 4. gün (96. saat) ve 8.gün (192.saat) sonunda değerlendirildi. Deneyin ilk yarısında (4.gün) hücreler, etkisi incelenen maddeyi değişik konsantrasyonlarda içeren ortamla inkübe edildiler. İkinci yarıda (8.gün) ise bu maddeler uzaklaştırılarak inkübasyon taze ortamla sürdürüldü.

### Hücre Sayımı Bulguları :

Tüm çalışmalarda başlangıçta kullanılan hücre sayısı  $0.85 \times 10^5/ml$  idi.

### A. 4. gün Bulguları :

#### Plak ekstraktı uygulanan kültürler :

Fibroblast hücre kültürlerinde 0.8,1,1.5,2 ve 4 mg/ml olmak üzere 5 ayrı konsantrasyonda plak ekstraktı denendi. 0.8 mg/ml örneklerinde hücre morfolojisi kontrol örneklerine benzer olarak gözlendi. 1 mg/ml'lik konsantrasyondan başlamak üzere hücre morfolojisinde giderek bozulma kaydedildi. 2 ve 4 mg/ml örneklerinde bu bozulma ve hücre sıklığında azalma belirgin olarak izlendi. 4 mg/ml örneklerinde hücrelerde parçalanma gözlendi (Resim 2).



Resim 2: 4 mg/ml. plak ekstraktı uygulanan kültürlerde 4.günde fibroblastların görünümü (X78.75)

4.gün sonunda plak ekstraktı uygulanan kültürlerdeki ortalama hücre sayısı, 0.8 mg/ml örneklerinde  $1.68 \times 10^5$ /ml, 1 mg/ml örneklerinde  $1.35 \times 10^5$ /ml, 1.5 mg/ml örneklerinde  $0.91 \times 10^5$ /ml, 2 mg/ml örneklerinde  $0.52 \times 10^5$ /ml ve 4 mg/ml örneklerinde  $0.42 \times 10^5$ /ml olarak kaydedildi. 2 ve 4 mg/ml konsantrasyonlarındaki hücre sayısı başlangıçta konulan hücre sayısından daha az bulundu. 4.gün sonunda, plak örneklerine ait hücre dağılımı Tablo 1'de görülmektedir.

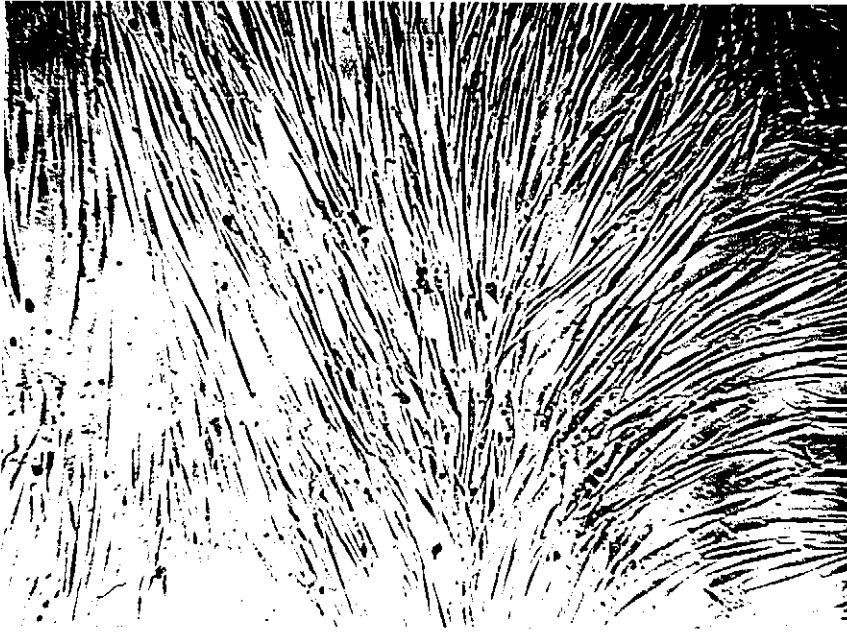
Tablo 1: Plak ekstraktı uygulanan kültürlerde 4. ve 8.gün sonundaki ortalama hücre sayısı.(Başlangıç hücre sayısı  $0.85 \times 10^5$ /ml)

Plak Konsantrasyonu	0.8 mg/ml	1 mg/ml	1.5 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml
4. gün	$1.68 \times 10^5$	$1.35 \times 10^5$	$0.91 \times 10^5$	$0.52 \times 10^5$	$0.42 \times 10^5$
8. gün	$1.72 \times 10^5$	$1.68 \times 10^5$	$1.53 \times 10^5$	$0.66 \times 10^5$	$0.57 \times 10^5$

Grafik 1'de 4. gün sonunda plak örneklerindeki hücre sayısı ve konsantrasyon ilişkisi belirtilmiştir.

Plak Kontrol Kültürleri :

Etkin madde konsantrasyonlarındakilere eşit miktarda salin eklenmesi gerektiğinden plak ekstrakt örnekleri ayrı bir grup olarak incelendi. Saline bağılı olarak hücrelerde morfolojik bir değişme izlenmedi (Resim 3).



Resim 3 : 4. gün sonunda plak kontrol kültürlerinde Fibroblast hücreleri görülmektedir. (X78.75)

4. gün sonunda plak kontrol örneklerindeki ortalama hücre sayısı  $2.56 \times 10^5$ /ml olarak kaydedildi (Tablo 2).

Tablo 2: 4. ve 8. gün sonunda endotoksin uygulanan ve kontrol kültürlerinde ml deki ortalama hücre sayısı (Başlangıç hücre sayısı  $0.85 \times 10^5/\text{ml}$ ).

	Kontrol	Plak Kontrol	Endotoksin 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Endotoksin 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
4. gün	$2.68 \times 10^5$	$2.56 \times 10^5$	$0.69 \times 10^5$	$0.71 \times 10^5$
8. gün	$2.8 \times 10^5$	$2.66 \times 10^5$	$0.71 \times 10^5$	$0.65 \times 10^5$

**Diş Taşı Ekstraktı Uygulanan Kültürler :**

Diş taşı ve sement ekstraktları kültürlere 5, 10, 20, 50 ve 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konsantrasyonlarda eklendi. Diş taşı ekstraktı eklenen kültürlerde ilk 4 konsantrasyonda hücre morfolojisinde belirgin bir bozulma kaydedilmedi. Hücre sıklığında azalma 50 ve 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  örneklerinde gözlemlendi. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  örneklerinde hücre morfolojisinde bozulma kaydedildi (Resim 4).





Resim 4: 100 µg/ml diş taşı ekstraktı uygulanan kültürlerde 4. günde fibroblast hücrelerinin dağılımı (X78.75).

4. gün sonunda bu kültürlerdeki hücre sayımları ortalama; 5 µg/ml örneklerinde  $1.71 \times 10^5$ /ml, 10 µg/ml örneklerinde  $1.68 \times 10^5$ /ml, 20 µg/ml örneklerinde  $1.68 \times 10^5$ /ml, 50 µg/ml örneklerinde  $1.54 \times 10^5$ /ml ve 100 µg/ml örneklerinde  $0.89 \times 10^5$ /ml olarak kaydedildi (Tablo 3).

Tablo 3: 4. ve 8. gün sonunda sağlıklı sement, diş taşı, hastalıklı sement ekstraktı uygulanan kültürlerde ml.'deki hücre sayısı (Başlangıç hücre sayısı  $0.85 \times 10^5$ /ml.).

KONSANT- RASYON	Sağlıklı Sement		Hastalıklı Sement		Diş Taşı	
	4.gün	8.gün	4.gün	8.gün	4.gün	8.gün
5µg/ml	$2.1 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.96 \times 10^5$	$1.71 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$
10µg/ml	$1.81 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$1.37 \times 10^5$	$1.85 \times 10^5$	$1.68 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$
20µg/ml	$1.78 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$1. \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.68 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$
50µg/ml	$1.75 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$0.92 \times 10^5$	$1.26 \times 10^5$	$1.54 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
100µg/ml	$1.71 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$0.5 \times 10^5$	$0.68 \times 10^5$	$0.89 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$

4. gün sonunda diş taşı ekstraktı uygulanan kültürlerde hücre sayısı ve konsantrasyon ilişkisi Grafik 2'de görülmektedir.

Hastalıklı Sement Ekstraktı Uygulanan Kültürler :

Bütün konsantrasyonlarda (5,10,20,50,100 µg/ml) hücre sıklığında azalma izlendi. 5 µg/ml konsantrasyonda hücre morfolojisinde belirgin bir bozulma kaydedilmedi (Resim 5).



Resim 5: 5 µg/ml hastalıklı sement ekstraktı uygulanan kültürlerde 4.gün sonunda fibroblast hücreleri (X78.75).

50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda hücre sıklığında azalma belirgin olarak gözlemlendi. 10 ve 20 µg/ml örneklerinde hücrelerde granülleşme, 50 ve 100 µg/ml örneklerinde ise hücre morfolojisinde bozulma kaydedildi (Resim 6).





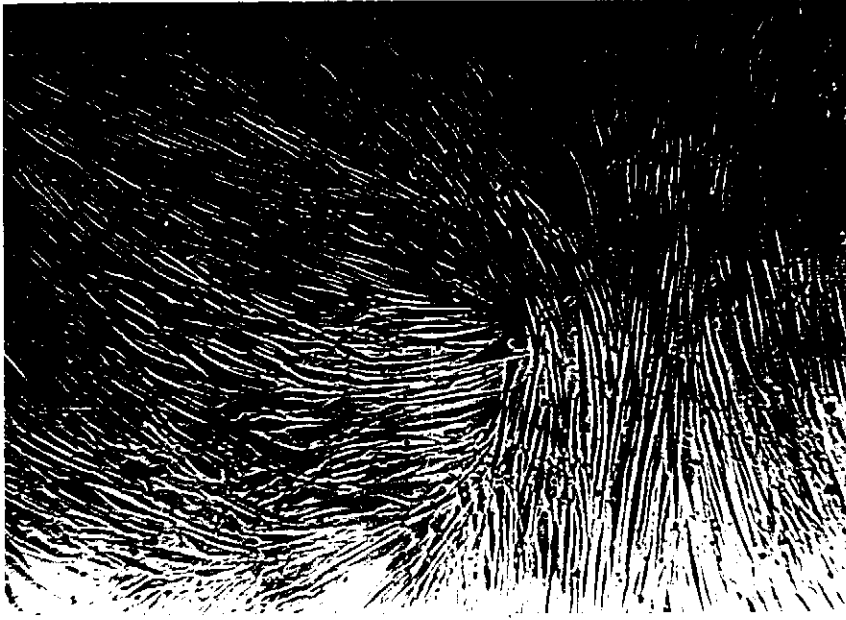
Resim 6: 4. gün sonunda 50 µg/ml hastalıklı sement ekstraktı uygulanan kültürlerde fibroblast hücrelerinin dağılımı (X78.75)

4. gün sonunda hastalıklı sement ekstraktı uygulanan kültürlerde ortalama hücre sayısı; 5 µg/ml örneklerinde  $1.6 \times 10^5$ /ml, 10 µg/ml örneklerinde  $1.37 \times 10^5$ /ml, 20 µg/ml örneklerinde  $1 \times 10^5$ /ml, 50 µg/ml örneklerinde  $0.92 \times 10^5$ /ml ve 100 µg/ml örneklerinde  $0.5 \times 10^5$ /ml olarak kaydedildi (Tablo 3). 100 µg/ml örneklerinde hücre sayısı başlangıç hücre sayısından az bulundu. 4. gün sonunda hastalıklı sement örneklerinde hücre sayısı ve konsantrasyon ilişkisi Grafik 2'de görülmektedir.

Sağlıklı Sement Ekstraktı Uygulanan Kültürler :

Bütün konsantrasyonlarda (5,10,20,50,100 µg/ml) hücre sıklığında belirgin bir azalma ve hücre morfolojilerinde bozulma gözlenmedi (Resim 7). Bununla beraber etkin madde konsantrasyonuna bağlı olarak hücre sayısında azalma bulundu (Tablo 3).

4. gün sonunda sağlıklı sement ekstraksiyonu uygulanan kültürlerde ortalama hücre sayısı 5 µg/ml örneklerinde  $2.1 \times 10^5$ /ml, 10 µg/ml örneklerinde  $1.81 \times 10^5$ /ml, 20 µg/ml örneklerinde  $1.78 \times 10^5$ /ml, 50 µg/ml örneklerinde  $1.75 \times 10^5$ /ml ve 100 µg/ml örneklerinde  $1.71 \times 10^5$ /ml olarak sayıldı.



Resim 7 : 5 µg/ml sağlıklı sement ekstraktı uygulanan kültürlerde 4. günde fibroblast hücrelerinin görünümü (X78.75).

Grafik 2'de 4.gün sonunda sağlıklı sement ekstraktı uygulanan kültürlerdeki hücre sayısı ve konsantrasyon ilişkisi görülmektedir.

#### Endotoksin Uygulanan Kültürler :

Endotoksin, kültürlere daha önceki çalışmamızda saptanan 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda eklendi. Her iki konsantrasyonda da hücre sıklığında belirgin azalma ve hücre morfolojisinde bozulma gözlemlendi (Resim 8).



Resim 8: 1000 µg/ml endotoksin uygulananmış kültürlerde 4. gün sonunda fibroblast hücreleri görülmekte (X78.75).

4. gün sonunda bu kültürlerde ortalama hücre sayısı; 500 µg/ml örneklerinde  $0.69 \times 10^5$ /ml, 1000 µg/ml örneklerinde  $0.71 \times 10^5$ /ml olarak kaydedildi (Tablo 2).

Grafik 3'de 4.günde endotoksin konsantrasyonu ve hücre sayısı arasındaki ilişki görülmektedir.

Kontrol Kültürleri :

4. gün sonunda hücre morfolojisinde herhangi bir bozulma kaydedilmedi. Kontrol kültürlerinde ortalama hücre sayısı  $2.68 \times 10^5$ /ml olarak bulundu (Tablo 2).

B- 8.gün (192. saat) Bulguları :

Plak Ekstraktı Uygulanan Kültürler :

Hücre morfolojisi açısından özellikle 4 mg/ml örneklerinde 4. güne oranla düzelme kaydedildi. Hücrelerin kap yüzeyine daha iyi tutunarak yayılma gösterdikleri izlendi (Resim 9).



Resim 9: 4 mg/ml plak ekstraktı uygulanan kültürlerde 8. gün sonunda fibroblast hücrelerinin görünümü (X78.75).

8. gün sonunda plak ekstrakt örneklerinde ortalama hücre sayıları, 0.8 mg/ml örneklerinde  $1.72 \times 10^5$ /ml, 1 mg/ml  $1.68 \times 10^5$ /ml, 1.5 mg/ml örneklerinde  $1.53 \times 10^5$ /ml, 2 mg/ml örneklerinde  $0.66 \times 10^5$ /ml ve 4 mg/ml örneklerinde  $0.57 \times 10^5$ /ml olarak kaydedildi (Tablo 1).

2 ve 4 mg/ml örneklerinde 8. gün sonunda da hücre sayısı başlangıç hücre sayısından az bulundu.

8. günde plak ekstrakt konsantrasyonu ve hücre sayısı arasındaki ilişki Grafik 1'de görülmektedir.

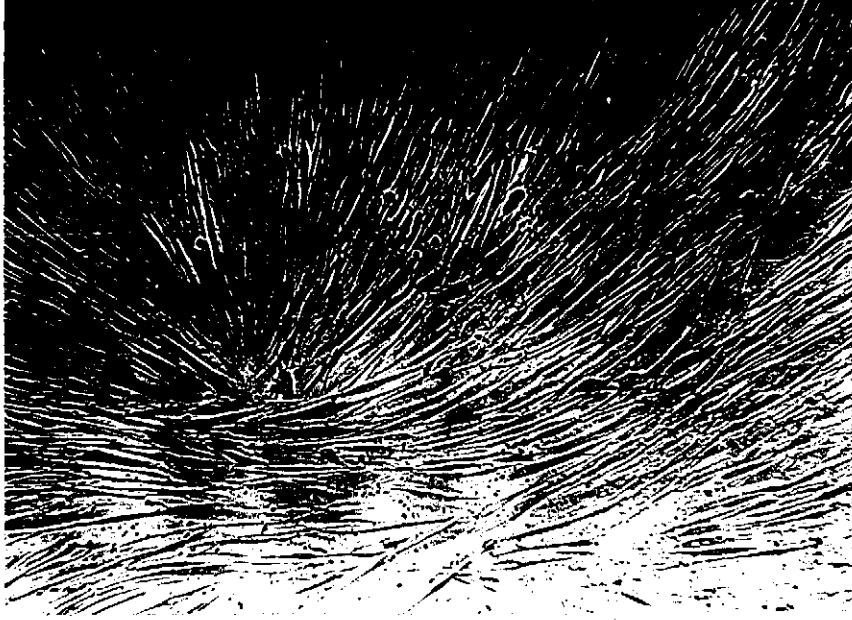
Plak Kontrol Kültürleri :

Hücre morfolojisi 4. güne göre değişmemiş olarak izlendi. Hücre sıklığında ise artış kaydedildi. 8. gün sonunda bu kültürlerdeki ortalama hücre sayısı  $2.66 \times 10^5$ /ml olarak bulundu (Tablo 2).



Diş Taşı Ekstraktı Uygulanan Kültürler :

Hücrelerde 4. güne göre morfolojik bir değişim izlenmedi (Resim 10).



Resim 10 : 5 µg/ml diş taşı ekstraktı uygulanan kültürlerde 8. gün sonunda fibroblast hücreleri görülmekte (X78.75).

Hücre sayım sonuçları 8. gün sonunda 5 µg/ml örneklerinde  $2.1 \times 10^5$ /ml, 10 µg/ml örneklerinde  $1.9 \times 10^5$ /ml, 20 µg/ml örneklerinde  $1.8 \times 10^5$ /ml, 50 µg/ml örneklerinde  $1.5 \times 10^5$ /ml ve 100 µg/ml örneklerinde  $1.3 \times 10^5$ /ml olarak bulundu (Tablo 3). 8. gün sonunda diş taşı ekstrakt konsantrasyonu ve hücre sayısı arasındaki ilişki Grafik 4'te görülmektedir.

Hastalıklı Sement Ekstraktı Uygulanan Kültürler :

4. güne göre hücre morfolojilerinde belirgin bir fark izlenmedi (Resim 11).

8. gün sonunda ortalama hücre sayısı ise; 5 µg/ml örneklerinde  $1.96 \times 10^5$ /ml, 10 µg/ml örneklerinde  $1.85 \times 10^5$ /ml, 20 µg/ml örneklerinde  $1.6 \times 10^5$ /ml, 50 µg/ml örneklerinde  $1.26 \times 10^5$ /ml ve 100 µg/ml örneklerinde  $0.68 \times 10^5$ /ml olarak kaydedildi (Tablo 3).

100 µg/ml örneklerindeki hücre sayısı başlangıç hücre sayısından az bulundu.



Resim 11 : 100 µg/ml hastalıklı sement ekstraktı uygulanan kültürlerde 8. gün sonunda fibroblast hücrelerinin görünümü (X78.75).

Grafik 4'de 8. gün sonunda hastalıklı sement ekstrakt konsantrasyonu ile hücre sayısı arasındaki ilişki görülmektedir.

Sağlıklı Sement Ekstraktı Uygulanan Kültürler :

Hücre morfolojisi tüm konsantrasyonlarda normal olarak gözlemlendi (Resim 12). Hücre sayım sonuçları ortalama, 5 µg/ml örneklerinde  $2.4 \times 10^5$ /ml,

10  $\mu\text{g/ml}$  örneklerinde  $2.1 \times 10^5/\text{ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$  örneklerinde  $2.1 \times 10^5/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  örneklerinde  $1.9 \times 10^5/\text{ml}$  ve 100  $\mu\text{g/ml}$  örneklerinde  $1.9 \times 10^5/\text{ml}$  olarak kaydedildi (Tablo 3).



Resim 12 : 100  $\mu\text{g/ml}$  sağlıklı sement ekstraktı uygulanmış kültürlerde 8. gün sonunda fibroblast hücrelerinin görünümü (X78.75).

8. gün sonunda sağlıklı sement ekstrakt konsantrasyonu ve hücre sayısı ilişkisi Grafik 4'te görülmektedir.

Endotoksin Uygulanan Kültürler :

Hücre morfolojileri 4. güne benzer gözlendi (Resim 13 ve 14). Hücre sayımı, 500  $\mu\text{g/ml}$  örneklerinde  $0.71 \times 10^5/\text{ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$  örneklerinde  $0.65 \times 10^5/\text{ml}$  olarak kaydedildi (Tablo 2). Her iki konsantrasyonda da hücre sayısı başlangıç hücre sayısından az bulundu.



Resim 13 : 500 µg/ml endotoksin uygulanmış kültürlerde 8. gün sonunda fibroblast hücrelerinin görünümü (X78.75).

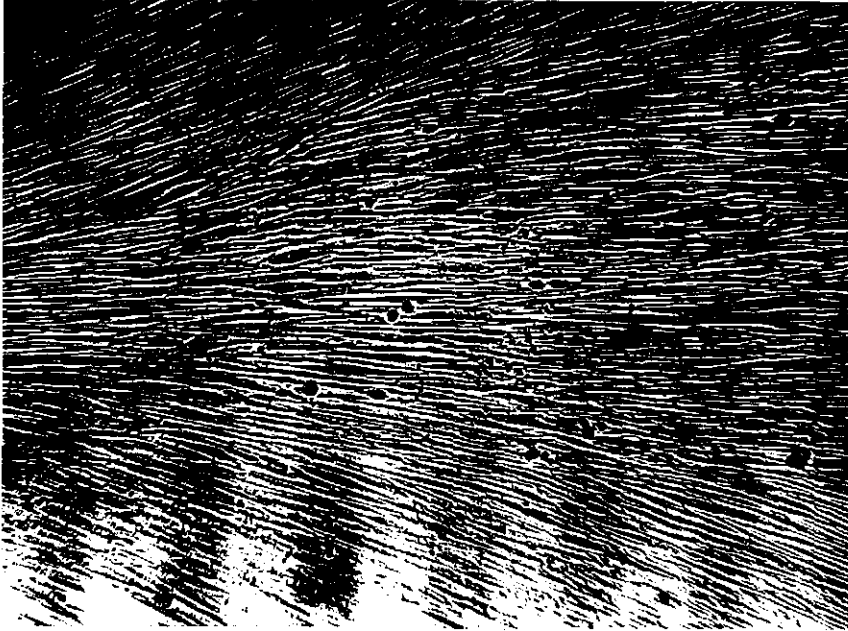


Resim 14: 1000 µg/ml endotoksin uygulanmış kültürlerde 8.gün sonunda fibroblast hücrelerinin görünümü (X78.75).

8. gün sonunda endotoksin konsantrasyonu ve hücre sayısı ilişkisi Grafik 3'de görülmektedir.

Kontrol Kültürleri :

4. gün örneklerine göre hücre sıklığında artış gözlemlendi. Hücre morfolojisi açısından 4. güne göre bir değişiklik izlenmedi (Resim 15). 8. günde kontrol kültürlerindeki hücre sayısı ortalama  $2.8 \times 10^5$ /ml bulundu (Tablo 2).



Resim 15: Kontrol kültürlerindeki fibroblast hücrelerinin 8.gün sonunda görünümü (X78.75).

4. ve 8. gün sonunda sağlıklı sement, hastalıklı sement ve diş taşı ekstraktları uygulanan kültürlerde etkin madde gruplarına göre ortalama hücre sayısı Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4 : 4. ve 8. gün sonunda etkin madde gruplarına göre ml.deki hücre sayılarının istatistiksel dağılımı (Başlangıç hücre sayısı  $0.85 \times 10^5$ /ml).

Değişkenler	$\bar{X}$ *
Sağlıklı Sement	2.153 $\pm$ 0.08 hücre/ml
Hastalıklı Sement	1.290 $\pm$ 0.10 hücre/ml
Diş Taşı	1.670 $\pm$ 0.09 hücre/ml
Plak	1.155 $\pm$ 0.12 hücre/ml

\*Değerler  $\bar{X}$  ortalama hücre sayısı  $\times 10^5$  ve  $\pm$  standart hata olarak ifade edilmiştir.

Tüm gruplar üzerinde yapılan varyans analizi sonucunda hücre sayısı açısından kontrol grubu ile diğer etkin gruplar arasında ve sağlıklı sement ile diğer gruplar arasındaki fark önemli bulundu (p < 0.05).

#### II- Timidin İnkorporasyonu Deney Bulguları :

Güvenilir bir yöntem olması nedeniyle timidin inkorporasyonu hücre sayım çalışmalarına ilave olarak kullanıldı. Sonuçlar cpm (count per minute, dakikada sayım) olarak değerlendirildi.

#### Plak Ekstraktı Uygulanan Kültürler :

Plak ekstraktlarına ait 4. ve 8. gün sayım sonuçları Tablo 5'te görülmektedir. Plak ekstrakt konsantrasyonu arttıkça sayım sonuçlarında

düşme gözlenmiş, tüm konsantrasyonlarla kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Konsantrasyonlar arasındaki farkın önemlilik düzeyleri Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 5: Plak ekstraktlarına ait 4. ve 8. gün sayım sonuçlarının istatistiksel dağılımı.

Plak ekstrakt konsantrasyonu	4. gün*	8. gün*
0.8 mg/ml	653.54 ± 108	823.87 ± 40.40
1 mg/ml	572.88 ± 45.36	465.45 ± 47.02
1.5 mg/ml	512 ± 43.73	435.16 ± 24.24
2 mg/ml	315.37 ± 21.44	193.33 ± 17
4 mg/ml	123.88 ± 23.62	172.125 ± 12.77

\*Değerler ± standart hata ve cpm olarak ifade edilmiştir.

Tablo 6: Plak ekstrakt konsantrasyonları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemlilik düzeyleri.

	4 mg/ml	2 mg/ml	1.5 mg/ml	1 mg/ml
0.8 mg/ml	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.0$
1 mg/ml	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	
1.5 mg/ml	$p < 0.05$	önemsiz		
2 mg/ml	$p < 0.05$			

4. ve 8. günde plak ekstrakt konsantrasyonu ve sayım sonuçlarının ilişkisi Grafik 5'de belirtilmiştir.

Endotoksin, kontrol ve plak kontrol gruplarına ait 4. ve 8. gün sayım sonuçlarının istatistiksel dağılımı Tablo 7'de görülmektedir.

Tablo 8'de ise endotoksin konsantrasyonları ile plak konsantrasyonları arasındaki farkın 4. ve 8. günde istatistiksel açıdan önemlilik düzeyleri gösterilmiştir.

Tablo 7 : Endotoksin ve kontrol guruplarına ait 4. ve 8. gün sayım sonuçlarının istatistiksel dağılımı.

Gün	Kontrol *	Plak Kontrol *	Endotoksin * 500 µg/ml	Endotoksin* 1000 µg/ml
4.gün	1963 ± 55.60	1137.21 ± 275.39	246.41 ± 25.86	105.12 ± 22.75
8.gün	1114.46 ± 28.19	883.42 ± 30.35	223.79 ± 40.18	118.70 ± 20.81

\*Değerler ± standart hata ve cpm olarak ifade edilmiştir.

Endotoksin konsantrasyonları ile 4. ve 8. gün sayım sonuçları arasındaki ilişki Grafik 6'da görülmektedir.



Tablo 8 : Plak ekstraktı ve endotoksin konsantrasyonları arasındaki farkın 4. ve 8. gün sonunda istatistiksel açıdan önemlilik düzeyleri.

Plak ekstraktı konsantrasyonu	Endotoksin 500 µg/ml		Endotoksin 1000 µg/ml	
	4. gün	8.gün	4.gün	8.gün
0.8 mg/ml	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05
1 mg/ml	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05
1.5 mg/ml	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05
2 mg/ml	önemsiz	önemsiz	p < 0.05	p < 0.05
4 mg/ml	p < 0.05	önemsiz	önemsiz	önemsiz

Sağlıklı Sement,Hastalıklı Sement ve Diş Taşı Ekstraktlarına Ait Bulgular :

Sağlıklı sement, hastalıklı sement ve diş taşı ekstraktlarına ait sayım sonuçlarının istatistiksel dağılımı Tablo 9'da görülmektedir.

Tablo 9: Sağlıklı sement,hastalıklı sement ve diş taşı ekstraktlarına ait 4. gün sayım sonuçlarının istatistiksel dağılımı.

Konsantrasyon	Sağlıklı Sement*	Hastalıklı Sement*	Diş Taşı*
5 µg/ml	1383.71 ± 22.68	909.71 ± 50.29	1013 ± 39.96
10 µg/ml	925.37 ± 176.46	516.79 ± 25.82	516.08 ± 21.58
20 µg/ml	895.66 ± 21.62	468.45 ± 24.88	506.58 ± 58.38
50 µg/ml	892.25 ± 7.97	365.21 ± 29.02	477.62 ± 31.68
100 µg/ml	626.66 ± 18.21	187.54 ± 32.50	193.54 ± 15.11

\*Değerler ± standart hata ve cpm olarak ifade edilmiştir.

Her üç grupta da konsantrasyon artışına bağlı olarak sayım sonuçlarında düşme gözlemlendi.

4. gün sonunda sağlıklı sement, hastalıklı sement ve diş taşı grupları ele alındığında bütün konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ). 4. gün sonunda sağlıklı sement, hastalıklı sement ve diş taşı ekstrakt konsantrasyonları ile sayım sonuçları arasındaki ilişki Grafik 7'de görülmektedir.

Tablo 10'da 4.gün sonunda etkin madde konsantrasyonları ve endotoksin konsantrasyonları arasındaki farkların istatistiksel önemlilik düzeyleri gösterilmiştir.

Tablo 10: Sağlıklı sement, hastalıklı sement ve diş taşı ekstraktlarına ait 4. gün sayım sonuçlarının endotoksin değerlerine göre istatistiksel açıdan önemlilik düzeyleri.

	Endotoksin 500 µg/ml			Endotoksin 1000 µg/ml		
	Sağlıklı Sement	Hastalıklı Sement	Diş Taşı	Sağlıklı Sement	Hastalıklı Sement	Diş Taşı
5 µg/ml	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
10 µg/ml	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
20 µg/ml	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
50 µg/ml	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
100 µg/ml	$p < 0.05$	önemsiz	önemsiz	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

8. gün sonunda sağlıklı sement, hastalıklı sement ve diş taşı ekstraktlarına ait sayım sonuçları Tablo 11'de görülmektedir. Tüm gruplarda konsantrasyon artışına bağlı olarak sayım sonuçlarında azalma gözlemlendi.

Tablo 11: Sağlıklı sement, hastalıklı sement, diş taşı ekstraktlarına ait 8.gün sayım sonuçlarının istatistiksel dağılımı.

Konsantrasyon	Sağlıklı Sement*	Hastalıklı Sement*	Diş Taşı*
5 µg/ml	997.37 ± 98.49	878.29 ± 51.12	826.50 ± 117.82
10µg/ml	845.08 ± 86.59	482.75 ± 10.0	661.33 ± 29.81
20 µg/ml	785.33 ± 28.48	470.75 ± 45.74	595.50 ± 72.90
50 µg/ml	761.25 ± 52.08	402.87 ± 97.44	456.04 ± 26.27
100 µg/ml	587.37 ± 53.07	172.58 ± 25.50	410.87 ± 27.27

\*Değerler ± standart hata ve cpm olarak ifade edilmiştir.

8. gün sonunda 5 µg/ml sağlıklı sement ekstraktına ait sayım sonuçları ile kontroller arasındaki fark önemsiz bulundu. Diğer bütün konsantrasyonlarda ve hastalıklı sement, diş taşı gruplarında bu fark önemli olarak kaydedildi ( $p < 0.05$ ).

8. güne ait sayım sonuçları ile etkin madde konsantrasyonları arasındaki ilişki Grafik 8'da görülmektedir.

8. gün sonunda sağlıklı sement, hastalıklı sement ve diş taşı ekstraktları ile endotoksin konsantrasyonlarına ait sayım sonuçları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemlilik düzeyleri Tablo 12'de belirtilmiştir.

Tablo 12: Sağlıklı sement, hastalıklı sement ve diş taşı ekstraktlarına ait 8. gün sayım sonuçlarının endotoksin sayım sonuçlarına göre istatistiksel açıdan önemlilik düzeyleri.

Konsantrasyon	Endotoksin 500 µg/ml			Endotoksin 1000 µg/ml		
	Sağlıklı Sement	Hastalıklı Sement	Diş Taşı	Sağlıklı Sement	Hastalıklı Sement	Diş Taşı
5 µg/ml	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
10 µg/ml	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
20 µg/ml	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
50 µg/ml	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
100 µg/ml	p<0.05	önemsiz	p<0.05	p<0.05	önemsiz	p<0.05

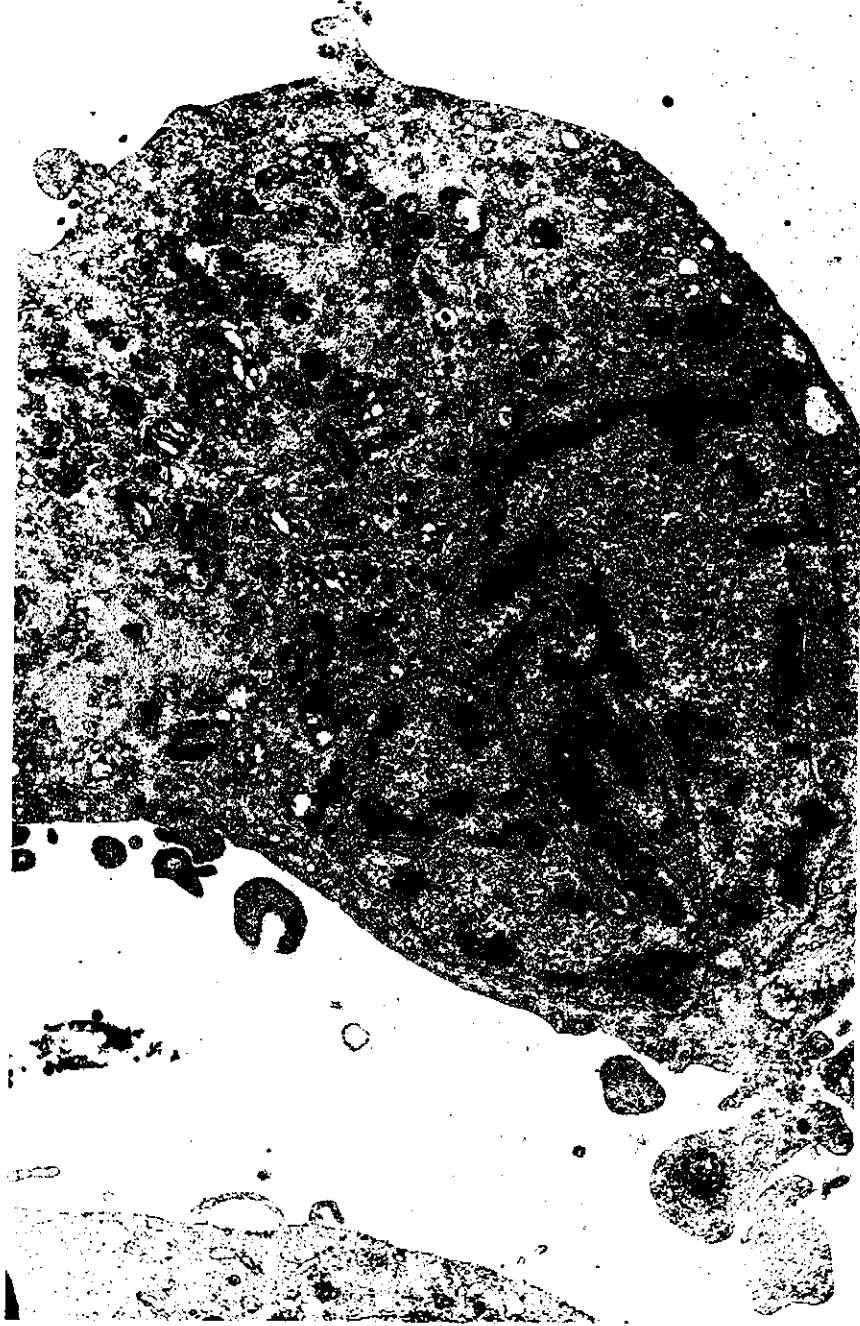
Tüm gruplar birlikte ele alındığında yapılan varyans analizi sonucunda gruplar arası fark önemli bulundu ( $P < 0.05$ ). (Tablo 13).

Tablo 13: Gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemlilik düzeyleri.

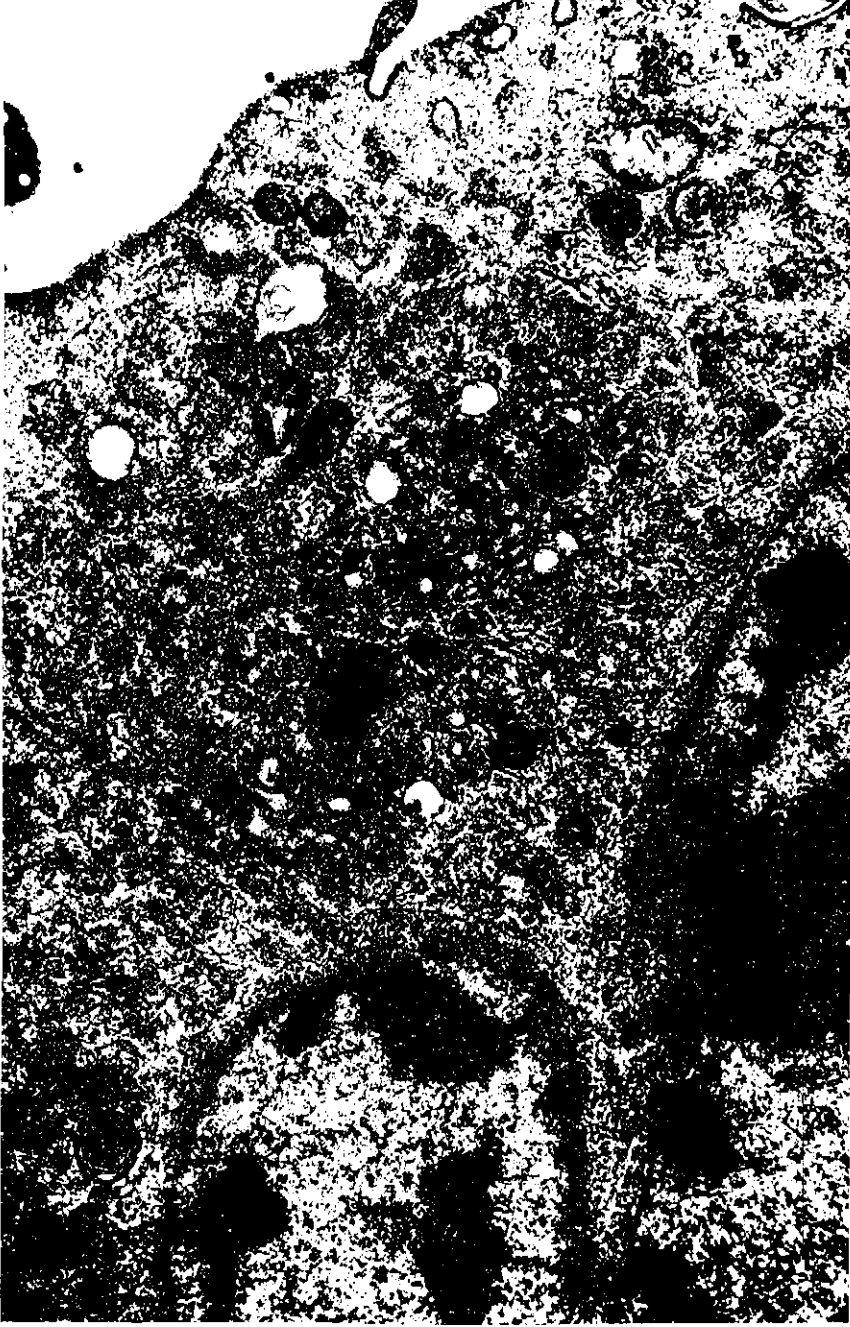
	Hastalıklı Sement	Diş Taşı	Plak
Sağlıklı Sement	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Plak	$p < 0.05$	$p < 0.05$	
Diş Taşı	önemsiz		

Aynı analize göre konsantrasyon grupları arasındaki farkın da önemli olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ). (Tablo 14).

	100 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$
5 $\mu\text{g/ml}$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
10 $\mu\text{g/ml}$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	
20 $\mu\text{g/ml}$	$p < 0.05$	önemsiz		
50 $\mu\text{g/ml}$	$p < 0.05$			



Resim 16 : 2 mg/ml plak ekstraktı uygulanmış kültürlerde fibroblastların Elektron Mikroskopik görünümüleri (x5.000). Çekirdek lobüle stoplazma yüzeyi uzantılı olarak izlenmekte. Stoplazmada mitokondri, bol vakuoller, Endoplazmik retikulum ve Golgi mevcut. Flamentöz bir yapı izlenmekte.

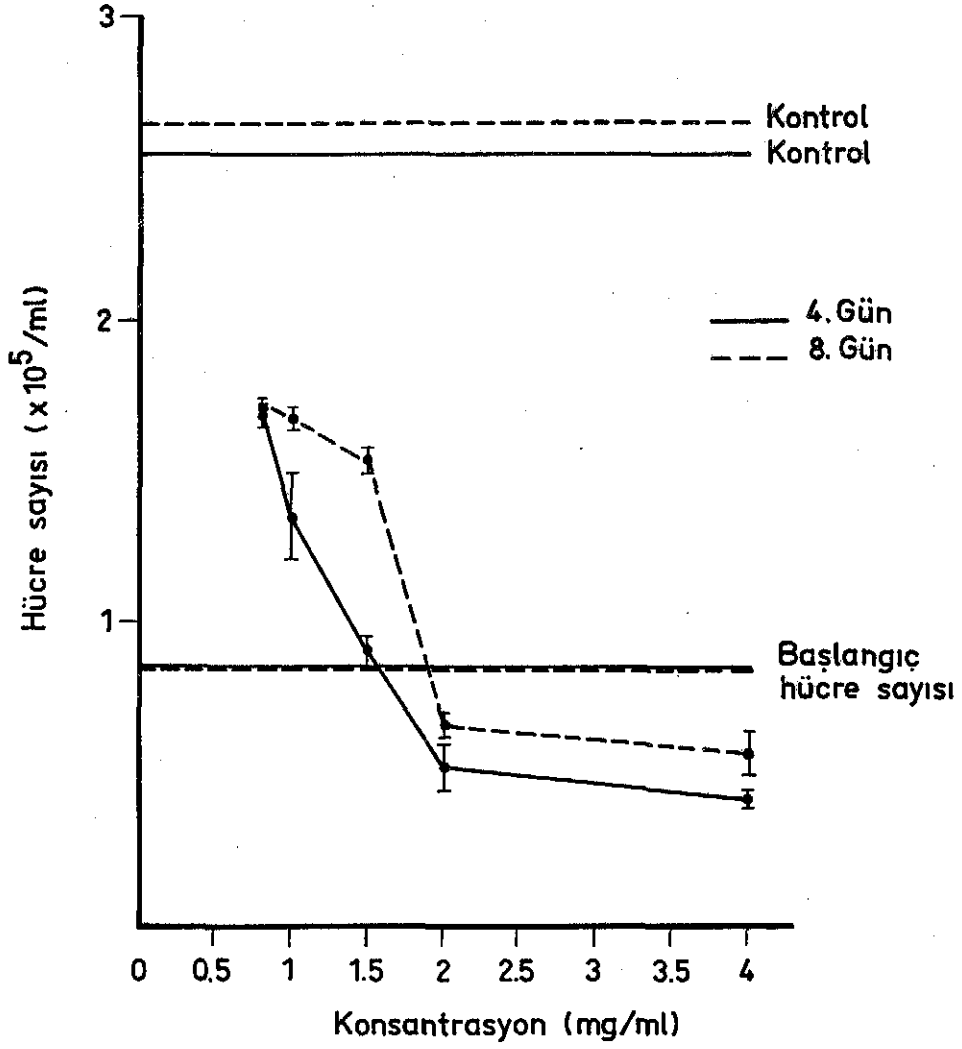


Resim 17 : 50 µg/ml hastalıklı sement ekstraktı uygulanmış kültürlerde fibroblastların 4.gün sonundaki elektron mikroskopik görünümleri (X13.00) Çekirdek lobüle stoplazma uzantılı, golgi ve vakuoller daha fazla, mitokondri ise daha az sayıda izlenmekte.

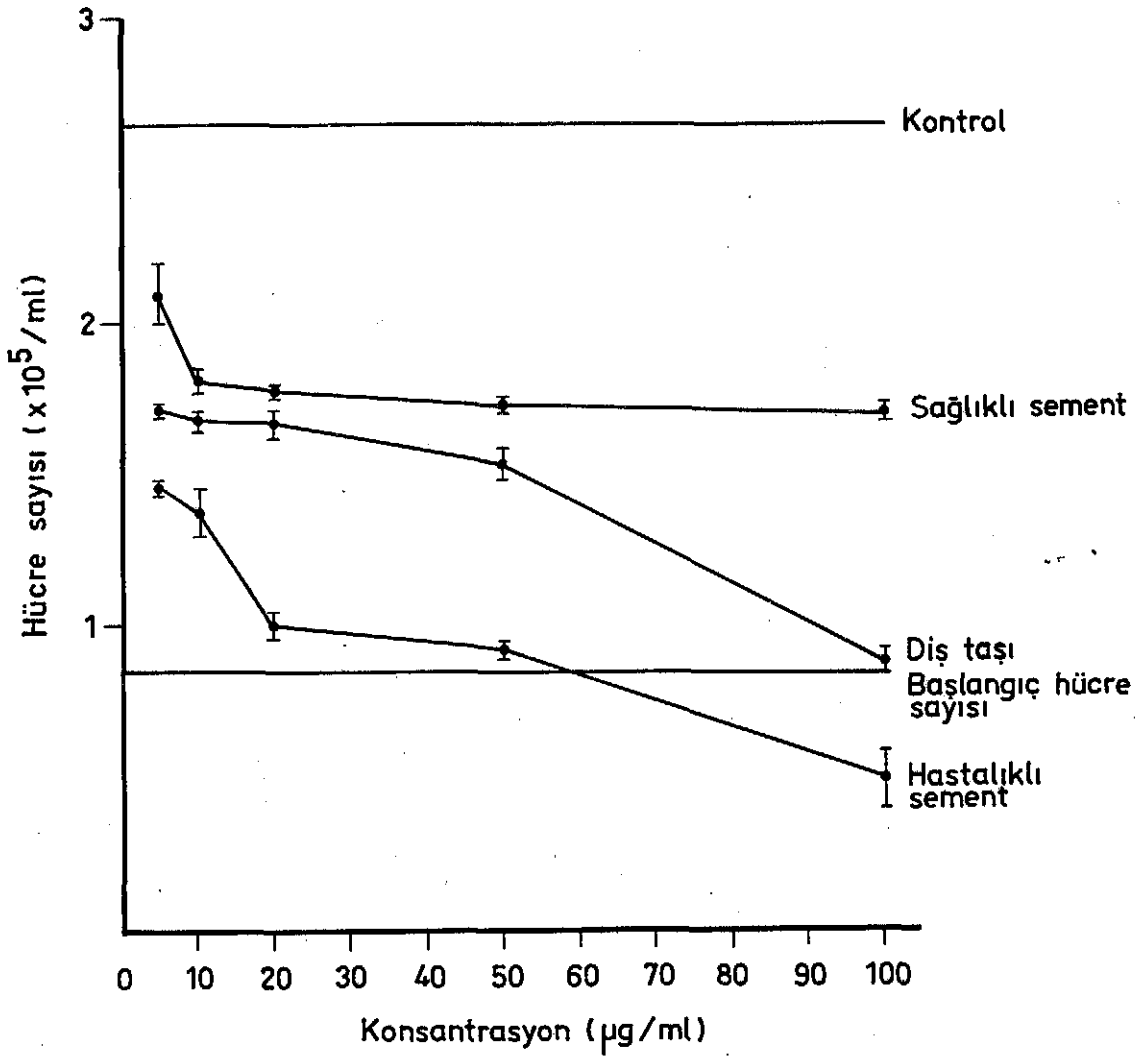


Resim 18 : Elektron Mikroskopta 4. günde kontrol kültürlerindeki fibroblastlar izlenmekte(X6.600). Çekirdek aktif, girintili çıkıntılı ve lobule bir yapıda. Stoplazma organelden zengin ve bol mitokondri gözlenmekte. Stoplazmik uzantılar mevcut.

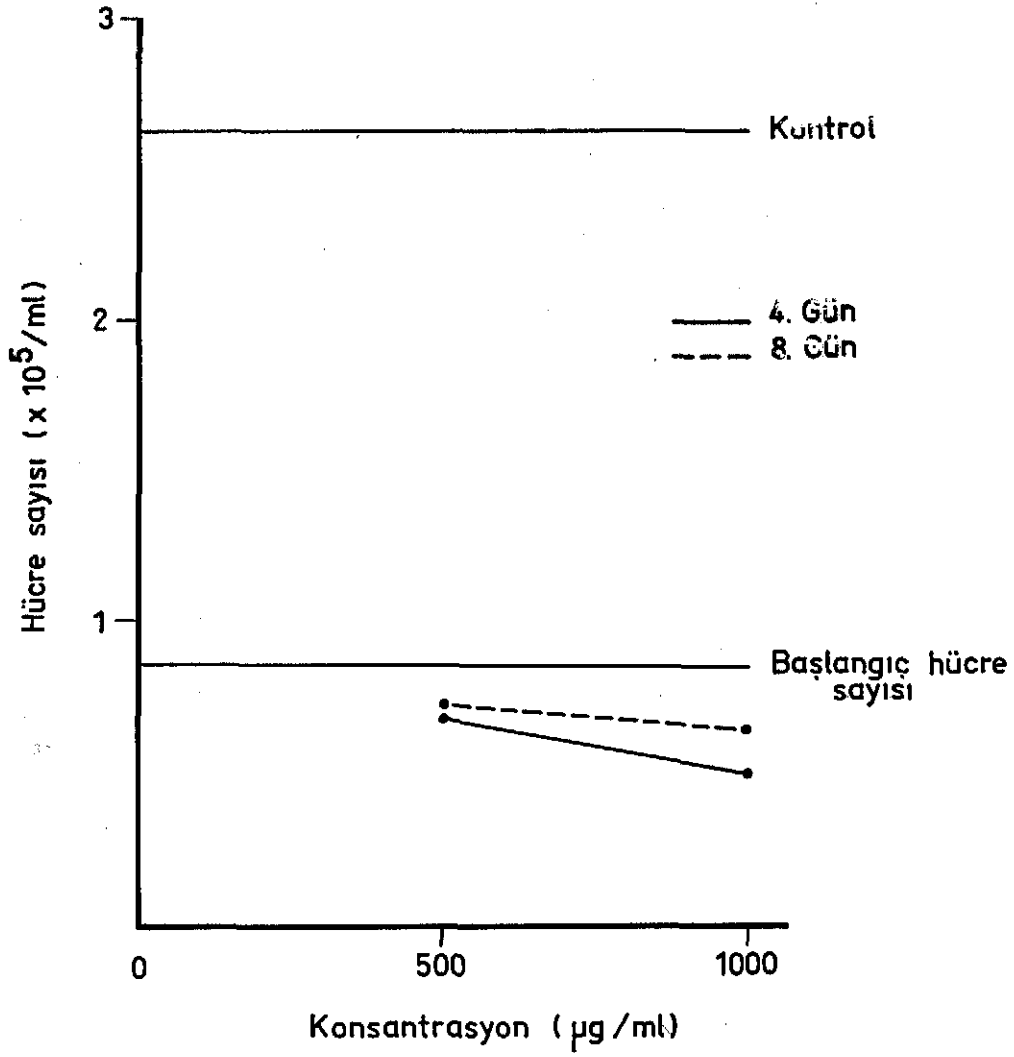




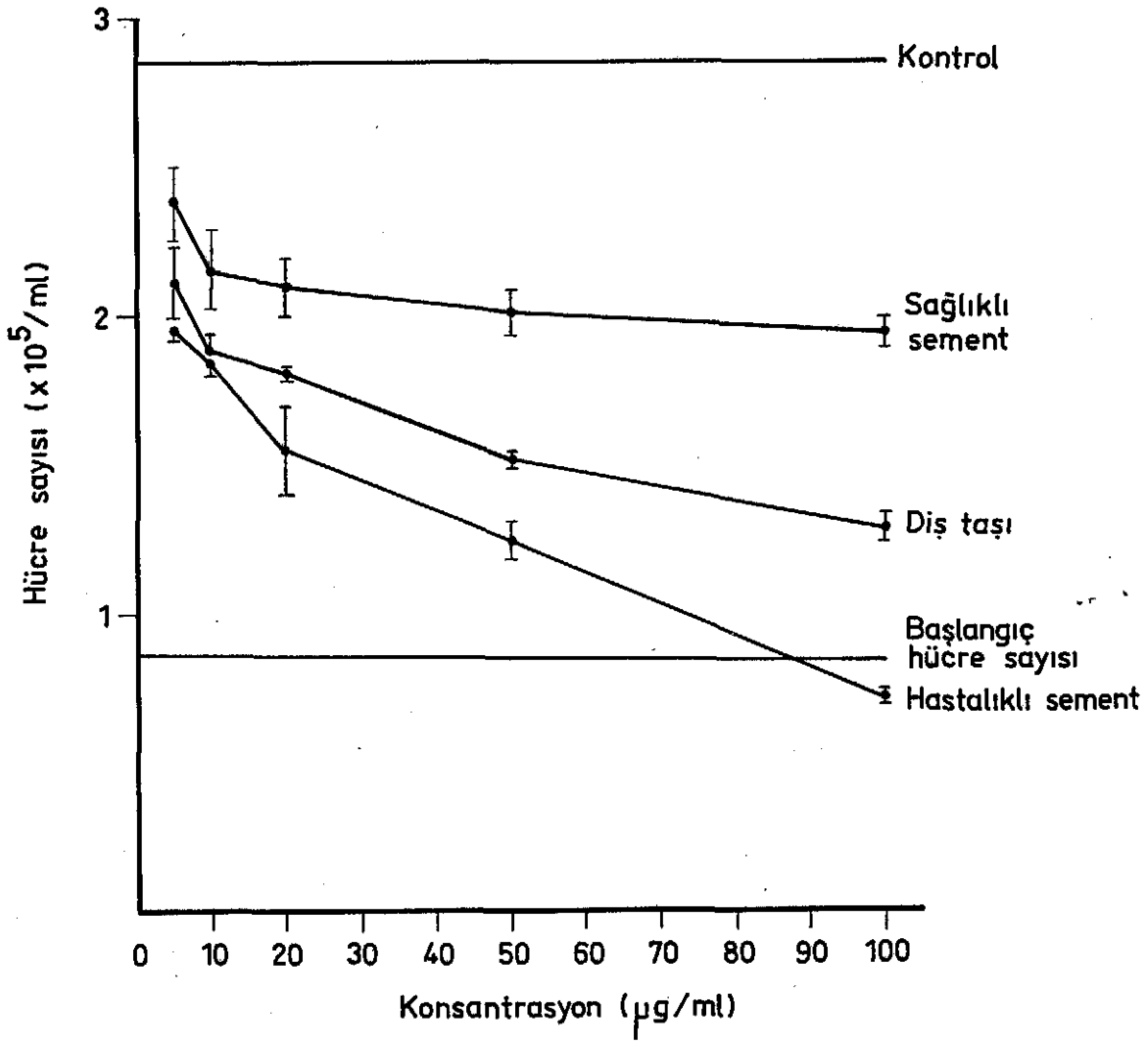
Grafik 1 : 4. ve 8. günde plak örneklerindeki hücre sayısı ve konsantrasyon ilişkisi.



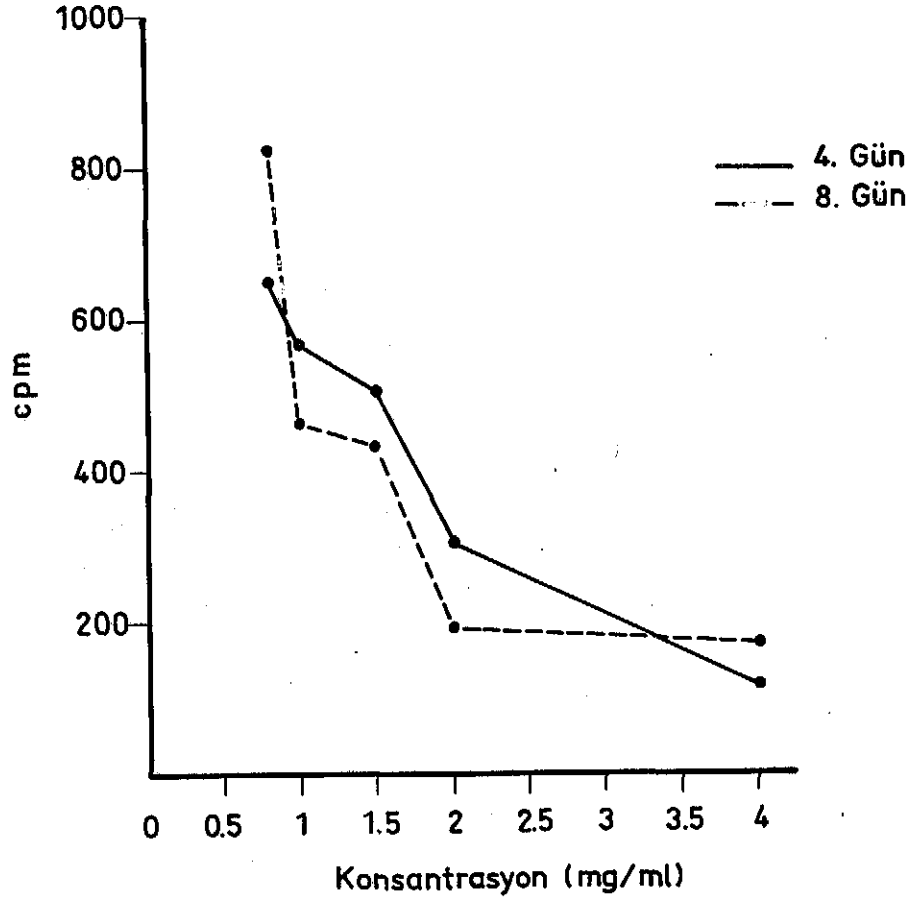
Grafik 2 : 4. gün sonunda diş taşı, hastalıklı sement ve sağlıklı sement ekstraktı uygulanmış kültürlerde hücre sayısı ve konsantrasyon ilişkisi.



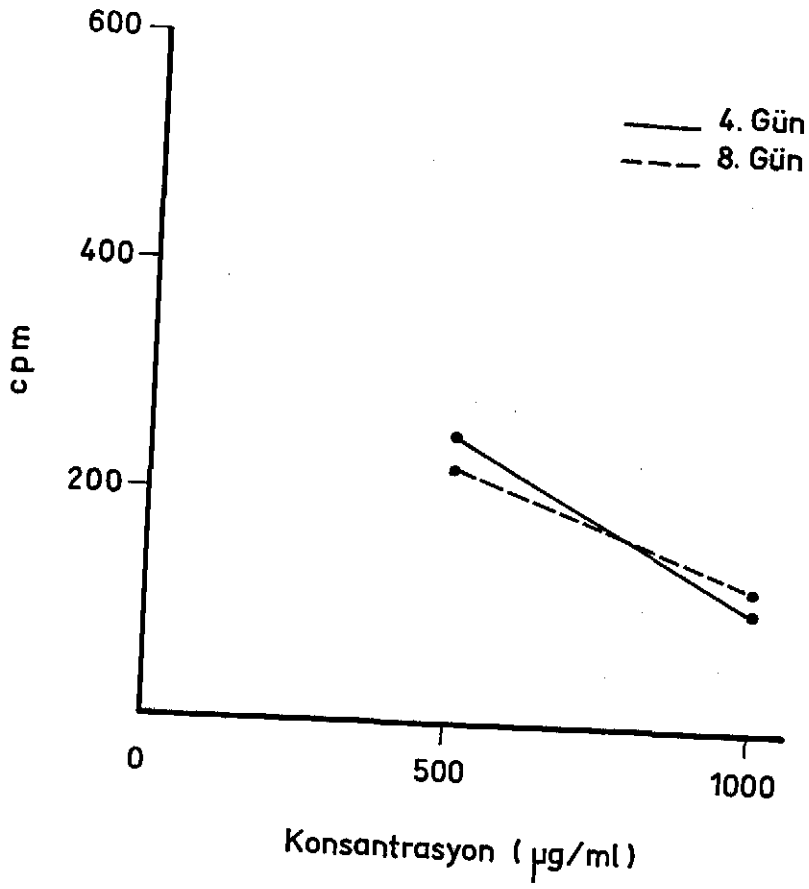
Grafik 3 : 4. ve 8. günde endotoksin uygulanmış kültürlerde hücre sayısı ve konsantrasyon ilişkisi.



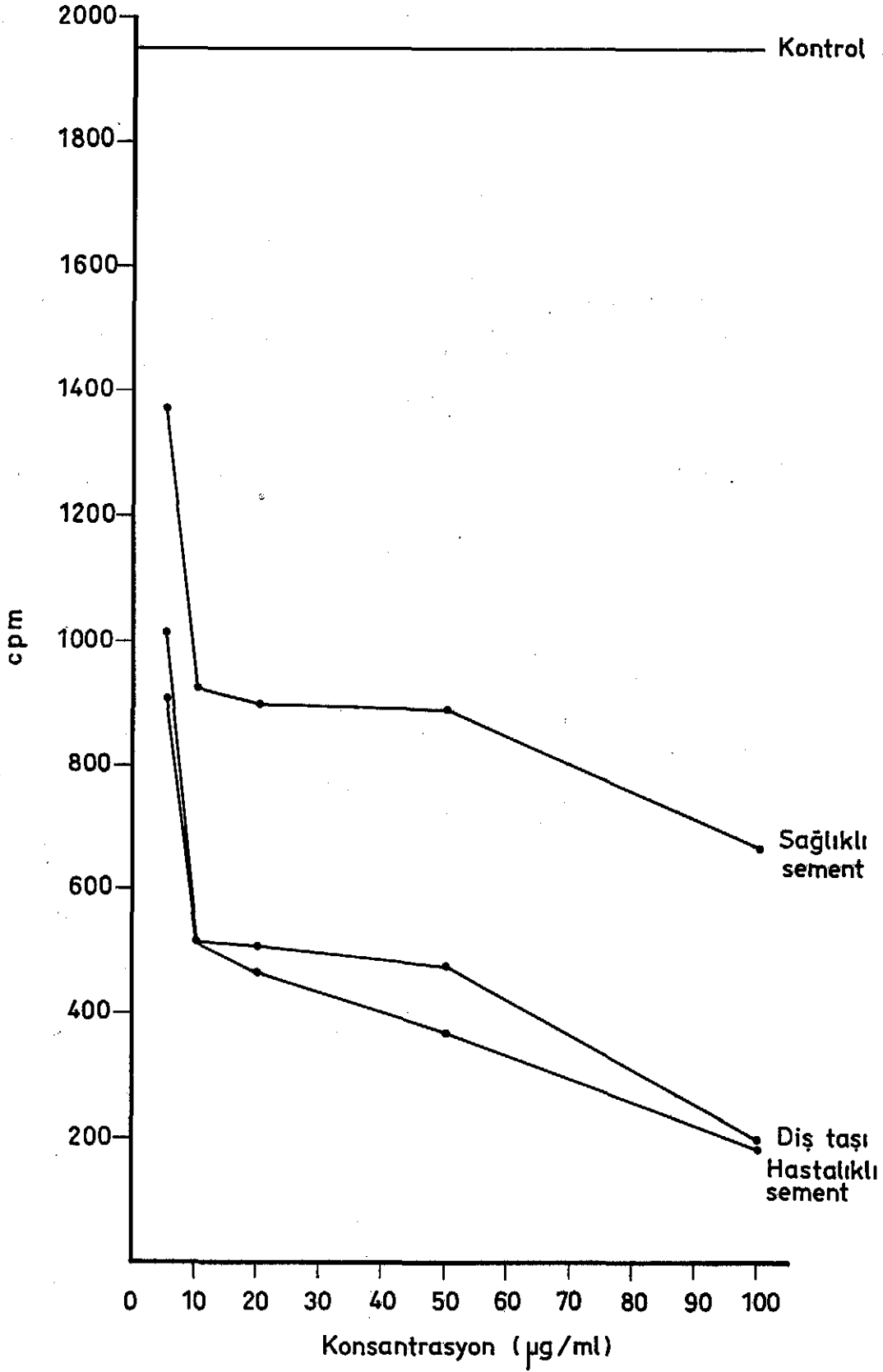
Grafik 4 : 8. günde diş taşı, hastalıklı sement ve sağlıklı sement ekstraktı uygulanmış kültürlerde hücre sayısı ve konsantrasyon ilişkisi.



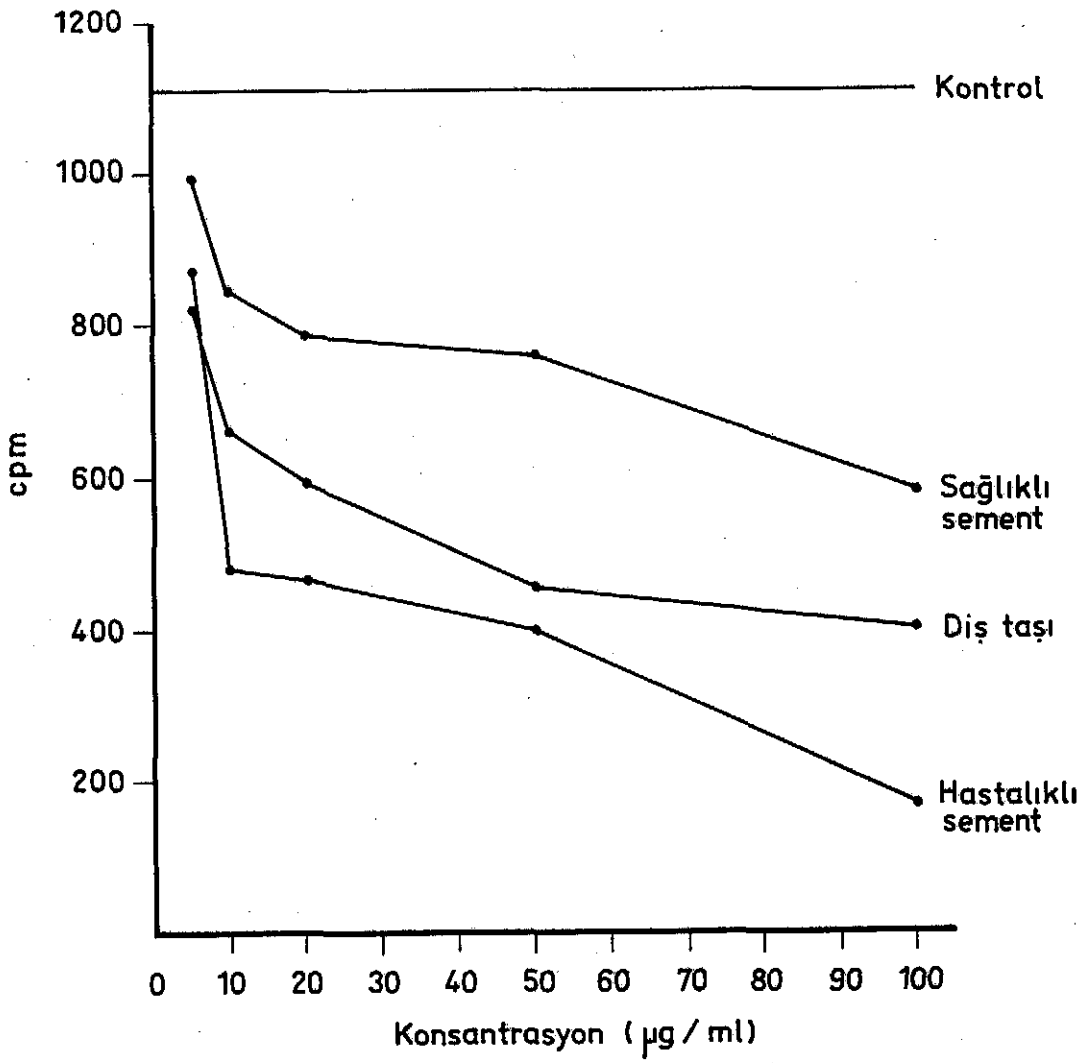
Grafik 5 : 4. ve 8. gün sonunda plak ekstraktı uygulanmış kültürlerde timidin inkorporasyonu sayım sonuçları.



Grafik 6 : 4. ve 8. gün sonunda endotoksin uygulanmış kültürlerde timidin inkorporasyonu sayım sonuçları.



Grafik 7 : Diş taşı, hastalıklı sement ve sağlıklı sement ekstraktı uygulanmış kültürlerde 4. gün sonunda timidin inkorporasyonu sayım sonuçları.



Grafik 8 : 8. gün sonunda diş taşı, hastalıklı sement ve sağlıklı sement ekstraktı uygulanmış kültürlerde timidin inkorporasyonu sayım sonuçları.



## T A R T I Ş M A

Çalışmamızda, plak, diş taşı ve periodontal hastalıklı dişlerden elde edilen sement ekstraktlarının periodontal ligament fibroblastları üzerine etkileri kıyaslamalı olarak araştırıldı. Bu tür toksisite deneylerinde *in vivo* çalışmak çok zor, hatta olanaksız olduğundan hücre kültür sistemi kullanıldı. Hücre sağlığının en güvenilir belirtisi hücre büyümesi ve morfolojisi olduğu için değerlendirmelerde bu kriterler esas alındı.

Diş plağı ve diş taşı periodontal hastalıkların primer etyolojik ajanı olarak kabul edilirler. Aynı zamanda bu etkenlerin tam elimine edilememesi periodontal tedaviyi başarısızlıkla sonuçlandırır<sup>(18,45)</sup>.

Periodontal tedavinin amacı, periodontal dokuların doğal ataçmanı hastalık nedeniyle yıkıma uğradığında diş yüzeyinde daha koronalde yeni ataçmanı sağlamak, böylece hastanın yeterli ağız bakımı için ortam oluşturarak periodonsiyumun daha fazla harap olmasını önlemektir. Böyle bir gereksinimin karşılanabilmesi için patolojik olarak derinleşmiş periodontal ceplerin ve bu sonucu yaratan etkenlerin elimine edilmesi gerekmektedir<sup>(9,10,46)</sup>.

Yeni diş-dişeti bileşiminin sağlanmasında bakteriyel plağın uzaklaştırılması gerektiği konusunda şüphe yoktur. Yeni ataçman girişiminde başarı iyi bir plak eliminasyonu ile gerçekleşir. Plak varlığında yara iyileşmesinin geciktiği ileri sürülmüştür. Plak elimine edilmediği durumlarda cerrahi tedavi sonrası dişetin uzun epitelial ataçman ile dişe tutunduğu gözlenmiştir. Bu tutunma yeterince dirençli olmadığı için

cep kolaylıkla eski seviyesine ulaşır, hatta daha da derinleşir<sup>(6,34,45)</sup>.

Plağın patolojik olayı başlatması ve tedaviyi başarısız kılması konusunda pek çok araştırma yapılmış ve etki mekanizması öğrenilmeye çalışılmıştır.

Memeli hücre kültürleri dış plağından elde edilen suda çözünür maddelerin tayininde yararlı ve tekrarlanabilir yöntemler sağlar<sup>(31)</sup>.

Levine ve arkadaşları plak ekstraktlarının epitelial kökenli HeLa hücrelerinin ve 4 farklı hücre tipinin büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu materyalin hücrelerde toksik etki yarattığını ve salyadan 20 kez daha konsantre olduğunu savunmuşlardır. Bu araştırmacılara göre plak ekstraktı, hücrelerin yapışkanlıklarını etkilemekten çok, hücre içeriğinin lizisine neden olmaktadır<sup>(31,32)</sup>.

Daha sonra araştırmacılar, dış plağının kimyasal kompozisyonunu tayin ederek plaktaki toksik ve diğer maddelerin miktarının değişkenliklerini göstermişlerdir. Az miktarda plağın HeLa hücrelerinin büyümesini attırdığını, daha fazla miktarların ise toksik etkiye sahip olduğunu savunmuşlardır<sup>(32,33)</sup>.

Toplanmış plak ekstraktları ve oral streptokok türleri fibroblast büyümesini inhibe eden yüksek molekül ağırlıklı komponentlere ve fibroblast büyümesini stimüle eden düşük molekül ağırlıklı komponentlere sahiptir<sup>(12,32)</sup>. Bununla birlikte kültüre edilmiş dış plağı düşük molekül ağırlıklı toksik faktörler de içerir<sup>(33)</sup>. Bakteriler tarafından üretilen organik asitler ekstrakt toksisitesinden sorumlu tutulmuşlardır<sup>(58)</sup>. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı komponenti olan endotoksinlerin kültüre edilmiş hücrelerde çeşitli etkilere sahip oldukları çok sayıda araştırmada gösterilmiştir<sup>(8,23,39,52)</sup>. Dış plağı ekstraktlarının toksik etkilerinin

yanısına kültüre edilmiş dişeti fibroblastlarından muhtemelen ısıya dayanıklı komponentleri aracılığıyla hyalüronik asit sentezini artırdıkları ileri sürülmüştür. Böylece plak irritasyonuna karşı oluşan doku değişikliklerinin, bağ dokusu komponentlerinin sentez dengesinin bozulması sonucu olabileceği savunulmuştur. Bu nedenle bakteriyel plak ekstraktına maruz kalan fibroblast hücrelerindeki metabolik değişiklikler de geniş ölçüde araştırılmıştır<sup>(29,30)</sup>.

Literatürdeki çalışmalara göre cep formasyonu, birleşim epiteli hücrelerinin sulkus tabanında bütünlüğünün bozulması ve mine yüzeyinden ayrılmalarıyla meydana gelir. Bakteriyel lökotoxinler polimorfonükleer lökositleri harekete geçirir ve bunların etkisiyle birleşim epiteli parçalanır. Parçalanan doku hücreleri ise bakterilerden daha fazla lökotoxin üretme potansiyeline sahiptir. Böylece bu şartlar in vivo olarak gerçekleştiğinde plak bakterileri tarafından üretilen toksik maddeler direkt olarak birleşim epiteli hücrelerine zarar verirler, cep formasyonunu başlatırlar ve bölgeye lökotoxin çekimini artırırırlar<sup>(31)</sup>.

Periodontal hastalık patogenezi çalışmalarında, diş etinde meydana gelen ilk değişiklikler "Başlangıç Lezyon" olarak tanımlanmış olup vaskülit tablosuyla seyreden nonspesifik immün yanıt şeklinde kendini gösterir. Bu değişiklikler plak birikiminden 2-4 gün sonra başlar ve bu aşamada özellikle perivasküler sahadaki fibroblastlarda ilk bozulmalar gözlenir<sup>(44)</sup>. Bu değişiklikler her ne kadar ortamda gelişen iltihap mediatörlerinin yan etkisi olarak meydana gelebilirse de direkt olarak plak bakteri toksinlerinin dişeti fibroblastları üzerindeki etkileri sonucu da olabilir. Literatürde plak ve fibroblast çalışmaları bu görüşü destekler niteliktedir ki çalışmamızda ulaşılan sonuçlar ile de uyum gösterilmektedir<sup>(31)</sup>.

Çalışmamızda plak toplanması değişik yaş guruplarındaki gingivitis veya periodontitis tanısı koyulan hastalardan gerçekleştirildi. Bu işlem sırasında plağın su içeriğinin değişmemesi için salya ve kan kontaminasyonundan kaçınıldı. Toplanan plak kullanılıncaya kadar toksik aktivitesinin bozulmaması için -20°C saklandı.

Plak ekstraktlarının elde edilmesinde Levine ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem kullanıldı. Gene bu araştırmacıların bulgularına dayanarak plak ekstraktının yaklaşık olarak plak yaş ağırlığının %6 kadârını çözümlür madde olarak içerdiği kabul edildi. Doz ayarlama işlemleri buna göre yapıldı (31,32).

Çalışmamızda plak ekstraktı uygulanan tüm kültürlerde kontrollerle kıyasla hücre sıklığında azalma gözlemlendi. Plak ekstraktının özellikle 2 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyonlarında toksik etkinin belirginleştiği görüldü. Düşük dozlarda etkilerin daha az olarak gözlenmesi fibroblast hücrelerin doku kültürlerinin en dayanıklı serilerini oluşturmaları ve değişen durumlarda kompensasyon yapabilmeleri nedeniyledir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan periodontal ligament fibroblastları rejenerasyon yeteneği en fazla olan hücreler arasında sayıldığından düşük dozlarda hücre sayısının daha az etkilenmiş olması normal karşılanabilir. Yüksek dozlarda gördüğümüz değişiklikler ise tamamen literatürle uyum göstermektedir (31,32).

Dış taşı örneklerinin toplanmasında ve saklanmasında plak toplanması sırasında uyulan kurallara bağlı kalındı. Ekstrakt hazırlanması işlemlerinde bu konuda literatürde bir bulguya rastlanamadığı için sement ekstraktlarının hazırlanmasındaki kurallara uyuldu.

Periodontal tedavinin başarısı ve yeni ataçman oluşumu için diş taşlarının uzaklaştırılması gerektiği konusunda fikir birliği vardır<sup>(37,46)</sup>. Listgarten ve arkadaşları,sterilize edilmiş diş taşına birleşim epitelinin normal bir ataçman oluşturduğunu göstermişlerdir<sup>(35)</sup>. Adelson ve arkadaşları ise yaptıkları in vitro bir çalışmada insan dişeti fibroblastlarının diş taşı mevcut olan yüzeylere de ataçman yaptıklarını savunmuşlardır<sup>(1)</sup>.

Literatürde bu yöndeki bulgulara rağmen Waerhaug diş taşlarının tamamen uzaklaştırılmadığı durumlarda,supragingival plak kontrolü çok iyi olsa bile periodontal hastalığın yeniden aktive olduğunu vurgulamıştır<sup>(64,65)</sup>.

Çalışmamızda değişik yaş ve cins guruplarından toplanan supra ve subgingival diş taşı ekstraktlarının periodontal ligament fibroblast hücrelerine özellikle yüksek dozlarda etkili olduğu gözlenmiş olup,Waerhaug'un bu konudaki görüşlerini desteklemiştir. Bu sonucun tartışmasını bakteri plağını bir kenara iterek tek başına yapmak mümkün değildir. Literatürde de belirtildiği gibi diş taşlarının yüzeyi her zaman kalsifiye olmamış bir plak tabakası ile örtülüdür<sup>(9)</sup>. Çalışmamızda,diş taşı etkeninin deneye katılmasının nedeni plağın yanısıra diş taşı sert dokusuna absorbe olmuş endotoksinlerin konsantrasyon açısından daha yüksek değerlere ulaşabileceği varsayımı idi. Ancak plak ile etki açısından aradaki farkın önemli olması bu varsayımı çürütmemişse de kanıtlamış da değildir.

Bunun yanısıra diş taşlarının mevcut olduğu bir ağız ortamında günlük fırçalama ile plak kontrolü yapılırsa bile diş taşının barındırdığı enzim ve toksinlerin dişeti iltihabını sürdürebileceği belirtilmiş olmaktadır.

Çalışmamızda sement ekstraktlarının hazırlanması Westphal ve Jann'ın endotoksin ekstraksiyonu için tanımladıkları yönteme göre yapıldı. Likit fenol pek çok protein için iyi bir çözücü olarak bilinir.

Polisakkaritler, mukopolisakkaritler, lipopolisakkaritler ve nükleik asitler suda çözünmelerine rağmen fenolde çözünmezler. Fenol-su karışımının dielektrik katsayısı oldukça yüksektir. Bu özelliği nedeniyle fenol-su karışımı proteinlerin, polisakkaritlerin veya nükleik asitlerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılır<sup>(66)</sup>.

68<sup>0</sup>C veya daha yüksek ısıda fenol ve su herhangi bir oranda karıştırılabilir. Bu karışım soğutulduğunda üstte su, altta fenol fazı olmak üzere iki tabaka ayrılır. Eğer Gram (-) bakteriler eşit miktar fenol-su karışımıyla 65-68<sup>0</sup>C'de muamele edilirse hücreler hızla parçalanır ve bakteriyel yapıların büyük bir kısmı solüsyona geçer. Solüsyon, 5-10<sup>0</sup>C'ye soğutulur ve santrifüj edilirse su fazı, fenol fazı ve çözünmemiş su-fenol fazı olmak üzere 3 faz ayrılır. Su fazı, dializden sonra proteinden yoksun, 0- antijen, endotoksin gibi bakteriyel lipopolisakkaritleri ve nükleik asitleri içerir. Fenol fazında ise proteinler mevcuttur<sup>(66)</sup>.

Bu yöntem antijenik veya toksik lipopolisakkaritlerin ekstraksiyonu için geniş ölçüde uygulanmaktadır. Fenol fazının ayrılmasıyla ve nükleik asitlerin çöktürülmesiyle lipopolisakkaritleri saf olarak elde etmek mümkün olabilir. Çalışmamızda fenol fazının ayrılması ve nükleik asitlerin çöktürülmesi yoluna gidilmedi. Çünkü fenol ekstraksiyonu sırasında mevcut proteinlerin denatüre olduğuna inanıldı<sup>(2)</sup>.

Periodontal hastalıkta sement yüzeyinde oluşan değişiklikler yoğun araştırma konusu olmuştur. Sementte meydana gelen bu değişiklikler; fiziksel, kimyasal veya toksik olabilir. Plakta mevcut olan endotoksin gibi bazı toksik ürünlerin semente penetre olduğu ileri sürülmüştür<sup>(2,9)</sup>.

Hatfield ve Baumhammers periodontal hastalıklı köklerin hücre kültürlerinde hücrelerde dönüşümsüz değişiklikler oluşturduğunu gözlemişler ve bu etkiyi yaratan ısıya dayanıklı maddenin endotoksin olabileceğini savunmuşlardır<sup>(22)</sup>.

Aleo ve arkadaşları periodontal hastalıklı kök yüzeylerine in vitro fibroblast ataçmanının olmadığını ancak bu köklere fenol-su ekstraksiyonu uygulandığında veya kök düzeltmesi yapıldığında fibroblast ataçmanının kontrollere yaklaştığını göstermişlerdir<sup>(3)</sup>.

Aleo ve arkadaşları bir başka araştırmada periodontal hastalıklı köklerden ekstrakte edilen materyalin fare fibroblastlarına toksik etki gösterdiğini ve bu materyalin endotoksin özelliklerine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Sement bağımlı bu maddelerin hücre kültürlerinde endotoksine oranla çok daha etkin olduğunu ileri sürerek periodontal hastalıklı kök yüzeyinin endotoksinden başka ısıya dayanıklı toksik yapılar içerebileceğini savunmuşlardır<sup>(2)</sup>.

Jones ve O'Leary periodontal hastalıklı köklerde mevcut olan endotoksin benzeri maddelerin sementin yüzeyel tabakasında sınırlı kalmadığını, ancak aşırı kök düzeltmesi ile uzaklaştırılabileceğini savunmuşlardır. Gömülü 20 yaş dişlerinin ise endotoksinleri çok önemsiz miktarda içerdiğini bildirmişlerdir<sup>(27)</sup>.

Nishimine ve O'Leary araştırmalarında dikkatli yapılan kök düzeltmesi ile kök yüzeyinden endotoksinin uzaklaştırılabileceğini, ultrasonik alet kullanımının ise ancak küretle yapılan kaba bir kazıma işlemi kadar etkin olabileceğini savunmuşlardır. Aynı araştırmacılar periodontal hastalıklı kök yüzeyinin periodontal yönden sağlıklı gömülü dişlerle karşılaştırıldığında çok daha fazla miktar endotoksin içerdiğini bildirmişlerdir<sup>(42)</sup>.

Nakib ve arkadaşları endotoksinin sağlıklı ve hastalıklı kök yüzeyine tutunduğunu ancak bu bağlanmanın çok zayıf olduğunu bildirmişlerdir. Yaklaşık 900.000 dalton molekül ağırlığı olan bakteriyel endotoksinlerin büyük boyutları nedeniyle iyi kalsifiye olmuş semente penetrasyonlarının engellendiğini savunmuşlardır. Bu durum mineral içeriği yüksek bir tabaka içeren, periodontal cep içine açılmış kök yüzeyleri için de geçerli olacaktır<sup>(38)</sup>.

Ito ve arkadaşları ise tavşanlarda "Local Schwartzman Phenomenon"i oluşturarak periodontal hastalıklı dişlerde sement-bağımlı endotoksinin varlığını araştırmışlardır. Isıya dayanıklı, irritasyon oluşturma özelliğine sahip ve fenol-su karışımı ile ekstrakte edilebilen maddelerin elde edilmesine rağmen bu tür yapıların endotoksin olduğu konusunda şüpheli olduklarını bildirmişlerdir<sup>(25)</sup>.

Fine ve arkadaşları sitrik asit kullanarak kök yüzeyinden çektikleri maddelerin endotoksin benzeri yapılar olduğunu ve sementin yüzeysel tabakalarında sınırlı kalmadığını bildirmişlerdir. Kök yüzeyindeki toksik maddelerin ekstraksiyonunda Triklor-asetik asit ve sitrik asitin fenol-su karışımından daha etkili olduğunu göstermişlerdir<sup>(15)</sup>.

Olson ve arkadaşları, son zamanlarda yaptıkları bir çalışmada sitrik asitin kök yüzeyinden toksik maddelerin uzaklaştırılmasında etkin olduğunu bildirmişlerdir. Periodontal hastalıklı sement örneklerinden sitrik asit ekstraksiyonu ile elde ettikleri materyalin hücre kültürlerinde insan fibroblastlarının büyümesini inhibe ettiğini göstererek klinik olarak sitrik asit tedavisinin kök yüzeyinin detoksifikasyonunda yararlı olacağını savunmuşlardır<sup>(43)</sup>.



Çalışmamızda, doku kültürü bulgularını desteklemek amacıyla seçilen örneklerden elektron mikroskop inceleme yapıldı. Elektron mikroskop bulguları kültür bulgularını desteklediği gibi literatürdeki endotoksin ve elektron mikroskopla yapılan çalışmaların sonuçları ile de uyum göstermiştir. Plak ve hastalıklı sement ile muamele edilen fibroblastların stoplazmalarında görülen vakuoller ve ribozomlardaki değişiklikler nedeniyle bu hücrelerin bağ dokusu komponenti yapımında gerekli etkinliği gösteremeyeceği kanısına varılmıştır<sup>(11,36)</sup>.

Çalışmamızda incelenen plak ve diş taşı ekstraktlarının fibroblastlar üzerindeki etkileri periodontal hastalığın patogenezindeki bazı konulara ışık tutmaktadır. Literatürde de belirtildiği üzere periodontal harabiyet doku yıkımının yanısıra yeni bağ dokusu komponentlerinin yapımının engellenmesiyle de iki kat artmaktadır. Plak içindeki ısıya dayanıklı komponentlerin konakçı dokusunda hücresele olduğu kadar humoral immün cevabı da başlattığı belirtilmiştir. İmmünolojik olaylar zinciri içinde kemik yıkımına kadar varan bu olaylar gerek bakteriyolojik gerekse immünolojik çalışmalarda vurgulanmıştır<sup>(41,54)</sup>. Çalışmamızın sonuçları olayın bu yönüne değinmemekle birlikte en az onlar kadar önemli olan bağ dokusu tamirinin ve yeni kollagen sentezinin sitotoksik etkiler sonucu engellenebileceğini kanıtlamaktadır. Özellikle periodontal ligament gibi kollagen turnover'ının son derece yüksek olduğu dokularda yeni kollagen oluşumunun engellenmesi harabiyeti bir kat daha artırmaktadır.

Hastalıklı sement dokularının periodontal ligament fibroblastları üzerine etkisi de bu konuyu desteklemekle birlikte periodontal tedavinin başarısını etkileyen en belirgin faktörlerden birisi olan kök düzeltmesi ve detoksifikasyonunun önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Bütün cerrahi periodontal tedavilerden sonra ulaşılmak istenen amaç yeni oluşacak epitelial ataçmanın eskisinden daha koronalde yer alması ve bunun

altında sağlıklı bir bağ dokusu ataçmanın oluşması yönündedir. Bağ dokusu ataçmanın epitelial ataçmandan daha geç oluşması nedeniyle epitelial proliferasyonu geciktirecek önlemlere başvurulmuştur. Bu nedenle özellikle kemik defektlerinin tedavisinde flap üzerindeki epitel kazınarak uzaklaştırılıp veya defektin üzeri serbest diş eti grefti ile kapatılarak epitelial migrasyon geciktirilmeye çalışılmıştır. Ancak sement yüzeyinin iyi detoksifiye edilememesi nedeniyle bu çabaların boşa gitmesi kaçınılmazdır. Bu nedenle son yıllarda sement yüzeyine absorbe olmuş toksinleri uzaklaştırmak amacıyla başta sitrik asit olmak üzere pek çok ajan kullanılmış ve bunların başarısı gerek klinik, gerekse laboratuvar deneylerinde kanıtlanmıştır<sup>(7,13,15)</sup>.

Çalışmamızın sonucunda plak ve diş taşı ekstraktlarının fibroblastlar üzerine yaptıkları toksik etkinin periodontal hastalığın patogenezinde yeni doku yapımını engelleyerek en az immünopatolojik doku yıkımı mekanizmaları kadar önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir. Ayrıca hastalığın ilerlemesinde ve özellikle cerrahi periodontal tedaviden sonra sağlıklı bir yeni ataçman oluşmasında hastalıklı kök yüzeylerindeki endotoksinlerin veya endotoksin benzeri yapıların önemi belirgin bir şekilde vurgulanmıştır.

Çalışmamızın literatürde yayınlanan araştırmalara oranla iki belirgin üstünlüğü vardır. Literatürdeki doku kültürü çalışmaları genellikle diş etinden üretilen fibroblastlarla yapılmış olup, periodontal ligamentin gerçek rejeneratif etkisini vurgulamak için yeterli değildir. Ayrıca bu araştırmalarda salt plak veya hastalıklı sement ile çalışılmıştır. Oysa çalışmamızda aynı kaynaktan üretilen ve pasajları eş olan periodontal ligament fibroblastlarında kıyaslamalı olarak her üç parametre de incelenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmanın vurguladığı sonuçlar kanımızca daha gerçekçi değerler taşımaktadır.

## S O N U Ç L A R

Periodontal ligamentten elde edilen fibroblast hücre kültürlerine endotoksin, plak, diş taşı, hastalıklı sement ve sağlıklı sement ekstraktlarının uygulanmasıyla şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. Plak ekstraktı uygulanan kültürlerde etki tüm dozlarda gözlemlendi. Hücre morfolojisindeki bozulma ve hücre sayısındaki düşme özellikle son konsantrasyonlarda belirgin olarak kaydedildi.

2. Diş taşı ekstraktı uygulanan kültürlerde hücre morfolojisinde ilk konsantrasyonlarda belirgin bir bozulma izlenmedi. Doz artışına bağlı olarak hücre sayısında azalma gözlemlendi.

3. Hastalıklı sement ekstraktının değişik konsantrasyonlarda kültürlere eklenmesi hücrelerde doz artışına bağlı olarak morfolojik bozulma ve sayısal azalmaya neden oldu. Hücre morfolojisindeki bozulma son dozda belirgin olarak kaydedildi.

4. Sağlıklı sement ekstraktı uygulanan kültürlerde konsantrasyon artışına bağlı hücre sayısında azalma olduğu gözlemlendi. Örneklerde hücre morfolojisinde değişme kaydedilmedi.

5. Endotoksin uygulanan kültürlerde hücre sayısındaki azalma ve hücre morfolojisindeki bozulma çok belirgin olarak gözlemlendi.

6. Kontrol kültürlerinde ve plak kontrol kültürlerinde hücre morfolojisinde bozulma kaydedilmedi. Hücrelerin sağlıklı olduğu gözlemlendi.

7. Fibroblast hücre kültürlerine plak, diş taşı ve sement ekstraktlarının uygulanmasıyla en etkin maddenin plak ekstraktı olduğu sonucuna varıldı.

8. Plak, diş taşı ve hastalıklı sementin periodontal hastalıkların patogeneğinde ve doku tamirinde etkili olabileceği sonucuna varıldı.

## Ö Z E T

Çalışmamızda; plak, diş taşı ve hastalıklı sement ekstraktlarının hücre kültürlerindeki periodontal ligamentten üretilmiş fibroblastlar üzerine etkileri kıyaslamalı olarak incelendi.

Hücre kültürlerinde kullanılmak üzere ekstraktlar kliniğimize başvuran hastalardan edinilen plak ve diş taşlarından hazırlandı. Sağlıklı ve hastalıklı sement ekstraktları ise periodontal hastalık nedeniyle çekilmiş dişlerden ve gömülü 20 yaş dişlerinden sağlandı.

Çalışmamızın sonucunda, hücre kültürlerine uygulanan plak, diş taşı ve hastalıklı sement ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre sayısında ve timidin inkorporasyonu sayım sonuçlarında düşme olduğu gözlemlendi. Plak ekstraktlarının fibroblastlar üzerine etkilerinin diğerlerine oranla daha fazla olduğu saptandı.

Sonuç olarak, plak ve diş taşının periodontal hastalıkların patogenezinde fibroblastları inhibe ederek yeni doku yapımını engelleyebilecekleri ve hastalıklı sementin ise fibroblastların kök yüzeyine yapışmasını engelleyerek sağlıklı bir ataçman ünitesinin oluşmasını geciktirebileceği sonucuna varıldı.

## KAYNAKLAR

- 1- Adelson, L.J., et al.: In Vitro Cytotoxicity of Periodontally Diseased Root Surfaces. J.Periodontol. 51:700, 1980.
- 2- Aleo, J.J., et al.: The Presence and Biologic Activity of Cementum- Bound Endotoxin.J. Periodontol. 45: 672,1974.
- 3- Aleo, J.J., De Renzis, F.A., Farber, P.A.: In Vitro Attachment of Human Gingival Fibroblasts to Root Surfaces. J.Periodontol. 46: 639,1975.
- 4- Armitage, G.C.,Christie,T.M.: Structural Changes in Exposed Human Cementum: I.Light Microscopic Observations.J.Periodont.Res.8:343, 1973.
- 5- Armitage, G.C., Christie, T.M.: Structural Changes in Exposed Human Cementum. II. Electron Microscopic Observations. J. Periodont. Res. 8:356,1973.
- 6- Barrington, E.P.: An Overview of Periodontal Surgical Procedures. J.Periodontol. 52(9):518, 1981.
- 7- Boyko, G.A., Brunette, D.M., Melcher, A.H.: Cell Attachment to Demineralized Root Surfaces In Vitro. J.Periodont. Res. 15: 297, 1980.
- 8- Buckingham, R.B. and Castor, C.W., Hoag, P.F.: The Effect of Bacterial Products on Synovial Fibroblast Function : Hypermetabolic Changes Induced by Endotoxin. J.Clinical Invest. 51: 1186,1972.
- 9- Carranza, F.A.: Glickman's Clinical Periodontology, 6<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1984.
- 10- Çağlayan, G.: Dişler Üzerinde Biriken Eklentiler. Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi. 5 (3-4): 78, 1981.
- 11- DeRenzis, F.A., and Chen, S.Y.: Ultrastructural Study of Cultured Human Gingival Fibroblasts Exposed to Endotoxin. J.Periodontol. 54:86,1983.

- 12- Duguid, R., Al-Makadsi, F., Cowley, G.C.: Cytotoxic Material Extracted from Human Dental Plaque and Oral Streptococci. Arch. Oral Biol. 25: 349,1980.
- 13- Ellegaard, B., Karring, T., and Løe, H.: New Periodontal Attachment Procedure Based on Retardation of Epithelial Migration. J. Clinic. Periodontol 1: 75, 1974.
- 14- Fine, D.H., et al.: Studies in Plaque Pathogenicity. I. Plaque Collection and Limulus Lysate Screening of Adherent and Loosely Adherent Plaque. J. Periodont. Res. 13: 17, 1978.
- 15- Fine, D.H., et al.: Preliminary Characterization of Material Eluted from the Roots of Periodontally Diseased Teeth. I. Periodont. Res. 15:10,1980.
- 16- Frank, R.M., Voegel, J.C.: Bacterial Bone Resorption in Advanced Cases of Human Periodontitis. J. Periodont. Res. 13:251,1978.
- 17- Genco, R.J., Evans, R.T., Ellison, S.A.: Dental Research in Microbiology with Emphasis on Periodontal Disease. J. Am. Dent. Ass. 78: 1016,1969.
- 18- Genco, R., Zander, H.: Proceeding From State of the Art. Workshop. J. Periodontol. 53(8): 477,1982.
- 19- Goldman, M.H., Cohen, D.W.: Periodontal Therapy, 6. ed., The C.V. Mosby Comp. St. Louis, Toronto, London, 1980.
- 20- Gonzales, F., Sognaes, R.F.: Electronmicroscopy of Dental Calculus. Science. 131: 156, 1960.
- 21- Grant, D.A., Stern, I.B., Everett, F.G.: Periodontics, In the Tradition of Orban and Gotlieb. The C.V. Mosby Co. St. Louis, 1979.
- 22- Hatfield, C.G., Baumhammers, A.: Cytotoxic Effects of Periodontally Involved Surfaces of Human Teeth. Arch. Oral Biol. 16: 965, 1971.
- 23- Hausmann, E., Raisz, L.G., Miller, W.A.: Endotoxin: Stimulation of Bone Resorption in Tissue Culture. Science. 168:862,1970.
- 24- Hiep, N., Stallarel, R.E., Shapiro, L.: Dental Plaque. J. Periodontol. 45: 117, 1974.

- 25- Ito, Koichi, et al.: Determination of the Presence of Root- Bound Endotoxin Using the Local Shwartzman Phenomenon (LSP). J. Periodontol. 56:8,1985.
- 26- Johnson, D.A., et al.: Role of Bacterial Products in Periodontitis. I. Endotoxin content and Immunogenicity of human plaque. J.Periodont. Res. 11:349,1976.
- 27- Jones, W.A., O'Leary, T.: The Effectiveness of In Vivo Root Planing in Removing Bacterial Endotoxin from the Roots of Periodontally Involved Teeth. J.Periodontol. 49: 337, 1978.
- 28- Larjava, H., et al.: The Effect of Human Dental Plaque on Bone Resorption and Hyaluronic Acid Synthesis in In-Vitro Cultures of Fetal Rat Calvaria. Archs. Oral Biol. 27, 147, 1982.
- 29- Larjava, H., et al.: Enhanced Synthesis of Hyaluronic Acid by Human Gingival Fibroblasts Exposed to Human Dental Bacterial Extract. J. Periodont. Res. 18: 31, 1983.
- 30- Larjava, H.: Metabolic Change in Cultured Gingival Fibroblasts Exposed to Bacterial Extracts. Stimulation of Hyaluronic Acid Synthesis. J. Periodont. Res. 1984: 19. 230, 1984.
- 31- Levine, M., Adams, R.L.P., Cowley, G.C.: Effect of Dental Plaque Extracts on Mammalian Cells In Vitro J. Periodont. Res. 8: 296, 1973.
- 32- Levine, M., Cowley, G.C.: Human Dental Plaque Extracts. Their Crude Chemical Composition and Toxicity to Cultured Hela Cells. Archs. Oral Biol. 19: 583, 1974.
- 33- Levine, M., DeLuca, C.: Variation in the Cytotoxic Activities of Human Dental Plaque. Archs. Oral Biol. 23: 1135,1978.
- 34- Lindhe, J.: Textbook of Clinical Periodontology, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1984.
- 35- Listgarten, M.A., Ellegaard, B.: Electron Microscopic Evidence of a Cellular Attachment Between Junctional Epithelium and Dental Calculus. J. Periodont. Res. 8: 143, 1973.



- 36- Lucas, R.M., Chen, S.Y., Aleo, L.J.: Histochemical Study of Strain L-Fibroblasts Exposed to Endotoxin. The Effect on Cellular Organelles. J. Periodontol. 50: 20, 1979.
- 37- Nabers, C.L., et al.: In Our Opinion. In Order to Secure "fill" in Osseous Defects Is It Necessary or Desirable to "Plane" the Exposed Root Surfaces Until They are Hard and Smooth to the Touch? J. Periodontol. 41: 419,1970.
- 38- Nakib, N.M., et al.: Endotoxin Penetration Into Root Cementum of Periodontally Healthy and Diseased Human Teeth. J. Periodontol. 53: 368,1982.
- 39- Neiders, M.E., Weiss, L.: The Effects of Endotoxin on Cell Detachment In Vitro. Arch. Oral Biol. 18: 499, 1973.
- 40- Newman, M.G., Socransky, S.S.: Predominant Cultivable Microbiota in Periodontics. J.Periodont. Res. 12: 120, 1977.
- 41- Nisengard, R.J.: The Role of Immunology in Periodontal Disease. J.Periodontol. 48:505,1977.
- 42- Nishimine, D., O'Leary, T.J.: Hand Instrumentation Versus Ultrasonics in the Removal of Endotoxins From Root Surfaces. J.Periodontol. 50, 345, 1979.
- 43- Olson, R.H., Adams, D.F., Layman, D.L.: Inhibitory Effect of Periodontally Diseased Root Extracts on the Growth of Human Gingival Fibrablant. J.Periodontol. 56: 591,1985.
- 44- Page, R.C., Schroeder, H.E.: Pathogenesis of Inflammatory Periodontal Disease. A Summary of Current Work. Lab. Invest. 33: 235,1976.
- 45- Polson, A.M., Caton, J.: Factors influencing Periodontal Repair and Reperation.J.Periodontol.53: 617, 1982.
- 46- Ramfjord, S.P., Ash, M.M.: Periodontology and Periodontics. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1979.
- 47- Register, A.A., Burdick, F.: Accelerated Reattachment with Cementogenesis to Dentin Demineralized In Situ. I. Optimum Range. J.Periodontol. 46: 646, 1975.

- 48- Register, A.A., Burdick, F.: Accelerated Reattachment with Cementogenesis to Dentin Demineralized In Situ: II. Defect Repair. *J.Periodontol.* 47: 497, 1976.
- 49- Schluger, S., Yuodelis, R.A., Page, R.C.: Periodontal Disease. Lea Febiger Co., Philadelphia, 1977.
- 50- Schwartz, J., Stinson, F.L., Parker, R.B.: The Passage of Tritiated Bacterial Endotoxin across Intact Gingival Crevicular Epithelium. *J.Periodontol.* 43: 270, 1972.
- 51- Selvig, K.A., Hals, E.: Periodontally Diseased Cementum Studied by Correlated Microradiography, Electron Probe Analysis and Electron Microscopy. *J.Periodont.Res.* 12:419, 1977.
- 52- Shands, J.W., et al.: In Vitro and In Vivo Effects of Endotoxin on Mouse Peritoneal Cells. *Infect. Immun.* 9: 106, 1974.
- 53- Shapiro, L., et al.: Endotoxin Determinations in Gingival Inflammation. *J. Periodontol.* 43: 591, 1972.
- 54- Shaw, I.H., et al.: Textbook of Oral Biology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1978.
- 55- Simon, B.I., et al.: The Role of Endotoxin in Periodontal Disease. I. A Reproducible, Quantitative Method for Determining the Amount of Endotoxin in Human Gingival Exudate. *J. Periodontol.* 40: 695, 1969.
- 56- Simon, B.I., et al.: The Role of Endotoxin in Periodontal Disease. II. Correlation of the Quantity of Endotoxin in Human Gingival Exudate with the Clinical Degree of Inflammation. *J. Periodontol.* 41:81, 1970.
- 57- Simon, B.I., et al.: The Role of Endotoxin in Periodontal Disease. III. Correlation of the Quantity of Endotoxin in Human Gingival Exudate with Histologic Degree of Inflammation. *J. Periodontol.* 42: 210, 1971.
- 58- Singer, R.E., Bucner, B.A.: Butyrate and Propionate: Important Components of Toxic Dental Plaque Extracts. *Infect. Immun.* 32: 458, 1981.
- 59- Socransky, S.S.: Microbiology of Periodontal Disease - Present Status and Future Considerations. *J. Periodontol.* 48: 497, 1977.

- 60- Stahl, S.S.: The Nature of Healthy and Diseased Root Surfaces. J. Periodontol. 46: 156, 1975.
- 61- Synderman, R.: Role of Endotoxin and Complement in Periodontal Tissue Destruction. J. Dent. Res. 51: 356, 1972.
- 62- Tzamouranis, A., et al.: Increase of Endotoxin Concentration in Gingival Washings During Experimental Gingivitis in Man. J. Periodontol. 50: 175, 1979.
- 63- Van Palenstein Helderma, W.H.: Microbial etiology of Periodontal Disease. J. Clinic. Periodont. 8: 261, 1981.
- 64- Waerhaug, J.: Healing of the Dento-Epithelial Junction Following Subgingival Plaque Control. I. As Observed in Human Biopsy Material. J. Periodontol. 49: 1, 1978.
- 65- Waerhaug, J.: Healing of the Dentogingival Junction Following Subgingival Plaque Control. II. As Observed on Extracted Teeth. J. Periodontol. 49: 119, 1978.
- 66- Westphal, O., Jann, K.: Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. R.L. Whistler (ed.), Methods in Carbohydrate Chemistry. V. General Polysaccharides, New York Academic Press, 1965.