

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI



**ROSMANOLÜN GİNGİVAL KAYNAKLI FİBROBLAST
HÜCRELERİNDE OKSİDATİF STRESİN NEDEN OLDUĞU
HASARA KARŞI KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

HİLAL KECCEL TURAN

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Bilge MERACI YILDIRAN

BOLU, NİSAN - 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

HİLAL KECEL TURAN tarafından hazırlanan “**ROSMANOLÜN GİNGİVAL KAYNAKLI FİBROBLAST HÜCRELERİNDE OKSİDATİF STRESİN NEDEN OLDUĞU HASARA KARŞI KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Periodontoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak oy birliği/ oy çokluğuyla kabul edilmiştir. 7/04/2025

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Bilge MERACI YILDIRAN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Doç. Dr. Tuğçe PAKSOY
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Nuray ERCAN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2024/86 sayısı ile etik izin alınmıştır.

.....

HİLAL KECEL TURAN

ÖZET

**ROSMANOLÜN GİNGİVAL KAYNAKLI FİBROBLAST
HÜCRELERİNDE OKSİDATİF STRESİN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF
HASARA KARŞI KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ
HİLAL KECEL TURAN
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ BİLGE MERACI YILDIRAN)**

**BOLU, NİSAN - 2025
XIV + 60**

Bu in vitro çalışmanın amacı, insan gingival fibroblast (İGF) hücrelerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oluşturulan oksidatif hasarın öncesinde ve sonrasında rosmanol uygulamasının oksidatif hasarda koruyucu ve tedavi edici etkileri etkisini değerlendirmektir.

Çalışmamızda İGF hücre hattı kullanıldı. Hücrelerde oksidatif stres oluşturmak için 200 μM H_2O_2 ile İGF hücrelerine indükleme işlemi yapıldı. Oksidatif stres oluşturulmadan önce ve sonra 4 farklı konsantrasyonda (0.1, 0.5, 1 ve 5 μM) rosmanol uygulanarak İGF hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi XTT testi ile incelendi.

Çalışmadan elde ettiğimiz verilere bakıldığında; İGF hücrelerine oksidatif hasar öncesi rosmanol uygulandığında hücre hasarını %2.5-%7.2, oksidatif hasar sonrası uygulandığında hücre hasarını %2.1-%4.9 oranında azalttığı tespit edildi. İGF hücrelerine sadece rosmanolün uygulandığı, 0.1, 0.5 ve 1 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını azaltıcı bir etki görülmedi. 5 μM rosmanol konsantrasyonunda hücre canlılığı %94 oranında tespit edildi. 10, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonunda uygulanan rosmanol İGF hücrelerinde doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı tespit edildi.

Sonuç olarak, İGF hücrelerinde H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif strese rosmanol uygulamasının koruyucu ve tedavi edici etkinliği olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlar, rosmanolün periodontitis gibi oksidatif stres kaynaklı enflamasyonların ve doku hasarlarının önlenmesinde ve tedavisinde kullanımı açısından umut verici olup ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ANAHTAR KELİMELELER: Rosmanol, Fibroblast, Oksidatif stres, Hidrojen peroksit

ABSTRACT

PROTECTIVE AND THERAPEUTIC EFFECT OF ROSMANOL AGAINST OXIDATIVE STRESS-INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN GINGIVAL-DERIVED FIBROBLAST CELLS

PHD THESIS

HİLAL KECEL TURAN

**BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY FACULTY OF
DENTISTRY, DEPARTMENT OF PERIODONTOLOGY**

**(SUPERVISOR: DR. ASSISTANT PROFESSOR BILGE MERACI
YILDIRAN)**

BOLU, APRIL 2020

XIV + 60

The aim of this in vitro study was to evaluate the protective and therapeutic effects of rosmanol administration on oxidative damage before and after hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative damage in human gingival fibroblast (HGF) cells.

IGF cell line was used in our study. IGF cells were induced with 200 µM H₂O₂ to induce oxidative stress in the cells. Before and after induction of oxidative stress, 4 different concentrations (0.1, 0.5, 1 and 5 µM) of rosmanol were applied and the effect on the viability of IGF cells was examined by XTT assay.

Considering the data obtained from the study, it was determined that when rosmanol was applied to IGF cells before oxidative damage, it reduced cell damage by 2.5%-7.2%, and when applied after oxidative damage, it reduced cell damage by 2.1%-4.9%. No effect on cell viability was observed at 0.1, 0.5 and 1 µM rosmanol concentrations at doses where only rosmanol was applied to HGF cells. At 5 µM rosmanol concentration, cell viability was 94%. It was determined that rosmanol applied at concentrations of 10, 25, 50 and 100 µM decreased cell viability in a dose-dependent manner in HGF cells.

In conclusion, rosmanol application was found to be protective and therapeutic in oxidative stress induced by H₂O₂ in HGF cells. The results obtained are promising for the use of rosmanol in the prevention and treatment of oxidative stress-induced inflammation and tissue damage such as periodontitis and further studies are needed.

KEYWORDS: Rosmanol, Fibroblast, Oxidative stress, Hydrogen peroxide

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
FOTOĞRAF LİSTESİ	xi
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Periodonsiyum	4
2.2 Diş eti	4
2.3 Diş Etinin Histolojisi	5
2.3.1 Diş Eti Epiteli	5
2.3.2 Diş Eti Bağ Dokusu	6
2.3.3 Bağ Dokusu Hücreleri	6
2.4 Fibroblast	7
2.5 Periodontal Hastalıklar	8
2.6 Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması	8
2.6.1 Periodontal Sağlık, Gingival Hastalıklar ve Durumlar	9
2.6.2 Periodontitis	10
2.7 Periodontal Hastalıkların Patogenezi	13
2.8 Serbest Radikaller	14
2.9 Reaktif Oksijen Türleri	14
2.10 Periodontitis ve Oksidatif Stres	16
2.11 Antioksidanlar	17
2.12 Biberiye (Rosmarinus Officinalis L.)	18
2.12.1 Rosmanol	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1 Kullanılan Cihaz ve Aletler	24
3.2 Kullanılan Sarf Malzemeler	25
3.3 Gingival Fibroblast Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Hücre Kültürü Uygulamaları	26
3.4 Primer İnsan Gingival Fibroblast Hücre Hattında Hidrojen Peroksit Kullanılarak Hasar Modeli Oluşturulması	33
3.5 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Rosmanol Etkisinin Değerlendirilmesi	34

3.6 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Hasar Öncesi Rosmanol Uygulamasının Etkisinin Değerlendirilmesi	34
3.7 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Hasar Sonrası Rosmanol Uygulamasının Etkisinin Değerlendirilmesi	35
3.8 Hücre Proliferasyon Canlılık Testi (XTT).....	35
3.9 İstatiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Hasar Modeli Oluşturulacak H ₂ O ₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	37
4.2 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Rosmanol Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi	38
4.3 Rosmanolün İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkisi.....	40
4.4 Rosmanolün İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Hasarı Tedavi Edici Etkisi	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR.....	53
8. EKLER.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Periodontal hastalık ve durumlar.....	9
Şekil 2.2. Biberiyenin temel bileşenleri.....	20
Şekil 2.3. Rosmanolün kimyasal yapısı.....	22
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ 'nin İGF hücrelerinde hücre canlılığı (%) üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda rosmanolün İGF hücrelerinde hücre canlılığı (%) üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.3 İGF hücrelerinde oksidatif hasar oluşturmada önce farklı konsantrasyonlarda rosmanol uygulamasının hücre canlılığına (%) etkisi.....	41
Şekil 4.4 İGF hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası farklı konsantrasyonlarda rosmanol uygulamasının hücre canlılığına (%) etkisi.....	43

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Periodontitis evreleri.....	12
Tablo 2.2. Periodontitis dereceleri.....	12
Tablo 3.1. Çalışmamızda kullanılan alt yapı, ekipmanlar ve kullanım amaçları.....	24
Tablo 3.2 Çalışmamızda kullanılan sarf malzemeler ve kullanım amaçları.....	25
Tablo 4.1. İGF hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ ile oluşturulan hasar modelinde XTT testi ile ölçülen canlılık değerlerinin (%) karşılaştırılması.....	37
Tablo 4.2. İGF hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda rosmanolün hücre canlılığına (%) etkisinin karşılaştırılması.....	39
Tablo 4.3 Oksidatif stres oluşturmada önce farklı konsantrasyonlarda rosmanol uygulamasının İGF hücrelerinin hücre canlılığına (%) etkisinin karşılaştırılması.....	41
Tablo 4.4 Oksidatif stres oluşumu sonrası farklı konsantrasyonlarda rosmanol uygulamasının İGF hücrelerinin hücre canlılığına (%) etkisinin karşılaştırılması.....	42

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 3.1	Hastalardan elde edilen diş eti dokularının kültür için hazırlanması.....	27
Fotoğraf 3.2	İGF hücrelerinin kontrol edildiği inverted mikroskop...	27
Fotoğraf 3.3	Hastalardan alınan diş eti dokularından gingival fibroblast hücresi elde edilmesi.....	28
Fotoğraf 3.4	Gingival fibroblast hücrelerinin ilk pasajının ardından 16.gündeki görünümü.....	29
Fotoğraf 3.5	İGF hücrelerinin EVE otomatik hücre sayma aracı ile sayılması.....	32
Fotoğraf 3.6	İGF hücrelerinin sitoskeletal yapısının phalloidin boyama ile gözlendiği mikroskop ile gözlenmesi.....	33

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

Bcl-2	: B hücreli lenfoma-2
CCCL4	: Karbon tetraklorür 4
COX-2	: Siklooksijenaz-2
COXs	: Siklooksijenazlar
CXCL10	: Kemokin Ligandı 10
CXCL3	: Kemokin Ligandı 3
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindole
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Minimal Esansiyel Medyumu
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOS	: Diş Eti Oluğu Sıvısı
EDTA	: Etilen Diamine Tetra Asetikasit
ER	: Endoplazmik Retikulum
F.nucleatum	: Fusobacterium nucleatum
GSH	: Glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
İGF	: İnsan Gingival Fibroblast
İL-1BETA	: İnterlökin 1 beta
İL-27	: İnterlökin 27
İL-6	: İnterlökin 6
İL-8	: İnterlökin 8
Inos	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JAK2/STAT3	: Janus Kinaz 2/ Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
KAK	: Klinik Atışman Kaybı
LOXs	: Lipooksijenazlar
LPS	: Lipopolisakkarit
MCP-1	: Kemotaktik Protein - 1
mm	: milimetre
MMP	: Matrix Metalloproteinaz
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NF-KB	: Nükleat Faktör KappaB
NLRP3	: Pyrin Domain İçeren Protein 3

NO	: Nitrik Oksit
NOXs	: NADPH Oksidaz
O₂^{·-}	: Süperoksit
¹O₂	: Single Oksijen
OH⁻	: Hidroksik Radikali
P.gingivalis	: Porphyromonas Gingivalis
PBS	: Fosfatlı Tamponlu Su
PGE2	: Prostaglandin E2
PMN	: Polimorfonükleer
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
T.denticola	: Treponema Denticola
T.forsythia	: Tannarella Forsythia
TAOS	: Total Antioksidan
TBA	: Ter-bütil Alkol
Th1	: Tip 1 T Yardımcı
TNF-α	: Tümör Nekrotizan Faktör Alfa
XOS	: Ksantin Oksidazlar
XTT	: 2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-Tetrazolyum-5-Karboksianilid Tuzu

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve bu çalışmanın hazırlanmasında bana her konuda destek olan, bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Bilge MERACI YILDIRAN'a,

Bilgi ve deneyimlerini hiç esirgmeden paylaşan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Nuray ERCAN, Dr. Öğr. Üyesi Esra ATEŞ YILDIRIM ve Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKGÜL'e

Tez çalışmamı yürütmemde benimle tüm olanak ve imkanlarını paylaşarak bana yol gösteren Prof. Dr. Akif Hakan KURT, Dr. Cansu KARA ÖZTABAG'a

Bu çalışmayı gerçekleştirmemizde her türlü bilgi ve yardımlarıyla istatistiksel değerlendirmelere katkıda bulunan Prof. Dr. Seyit Ali KAYIŞ'a

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum araştırma görevlisi arkadaşlarım Tuğba BULUT'a, Tuğçe ÇAĞIRAN GÜRBÜZ'e, Utku BÖCÜOĞLU'na, Fatmanur Ezgi DOĞAN'a, Hatice Aysim LEYMUN'a ve Işıl YALÇIN'a, İlayda GÜNEY'e ve Senem FİLİZ'e,

Başından sonuna kadar Bolu Perio ailesinin tüm çalışanlarına ve bana emeği geçen herkese,

Her zaman ve her konuda yanımda olan, hiçbir karşılık beklemeden beni her zaman seven, beni bugünlere getiren ve hayatım boyunca emeklerini esirgemeyen sevgili annem Gülümser KECEL'e, sevgili babam Turgut KECEL'e ve benim neşe kaynağım, kardeşim Kerem KECEL'e

Beni sevgi ve desteğiyle her zaman yücelten başta sevgili eşim Semih TURAN ve ailesine teşekkürlerimi borç bilirim.

.

1. GİRİŞ

Periodontitis, dünya çapında yetişkin nüfusun yaklaşık %50'sini etkileyen en yaygın ağız hastalıklarından biridir (1). Dental plakla ilişkili bakteriyel enfeksiyonun neden olduğu lokalize bir enflamatuvar yanıttır (2). Bakteriyel enfeksiyondan sonra ilk enflamatuvar yanıt, sitokinler ve kemokinler yoluyla bağışıklık sistemini aktive eder. Nötrofil hücreleri bakteriyel enfeksiyona karşı ilk savunma hattıdır ve enfeksiyon bölgesinde reaktif oksijen türleri (ROT) dahil olmak üzere çeşitli toksik ürünler üretirler (3). Oksidatif stres koşulları altında ROT miktarı oldukça artar. Düşük konsantrasyonlarda ROT, diş eti fibroblastlarının ve epitel hücrelerinin büyümesini uyarırken, daha yüksek konsantrasyonlarda serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatarak enflamatuvar yanıtların artmasına ve doku hasarına neden olur (4). Periodontal patojenik bakteriler doğrudan oksidatif stresle ilişkilidir (5). *Porphyromonas gingivalis*'ten elde edilen lipopolisakkarit (LPS), periodontitisin önemli bir uyarıcısıdır ve oksidatif stresi artırır (6). LPS, transkripsiyon faktörünü, nükleer faktörkappa B'yi (NF- κ B) aktive eder ve bu da proenflamatuvar sitokinlerin üretimini indükler (7). Günümüzde periodontitis tedavisi için çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. Periodontal hastalıkların etiyolojisinde rol oynayan dental plağın ve diş taşlarının uzaklaştırılmasını amaçlayan diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi periodontal tedavinin temelini oluşturur. Bu işlemler periodontal tedavide etkili yöntemler olsa da derin cepler, furkasyon defektleri, kemik içi cep varlığı gibi bazı durumlarda başarı şansı düşmektedir (8, 9). Başarıyı arttırmak için cerrahi olmayan periodontal tedaviye ek yardımcı antibiyotikler ve antienflamatuvar ilaçlar kullanılabilir. Klinikte kullanılan antibakteriyel ilaçlar arasında minosiklin hidroklorür, klorheksidin, metronidazol, doksisisiklin, vb. yer alır (10). Bununla birlikte, antibiyotiklere uzun süreli maruz kalma ve/veya aşırı kullanım, çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gelişimine neden olabilir. Çeşitli ticari ilaçların sistemik kullanımının, hastalarda ciddi yan etkilere neden olduğu da bilinmektedir (11). Tüm bunlar göz önüne alındığında düşük yan etki ve geniş kullanım alanı sunan bitki ekstraktları veya bitki kaynaklı aktif bileşenlerin periodontal tedavide kullanılması dikkat çekici araştırma konularındandır (12). İnsan gingival fibroblast hücreleri (İGF), periodontal yumuşak dokulardaki baskın hücrelerdir. Bir bariyer görevi görerek periodontal dokuların korunmasının yanı sıra, bu dokuların yeniden şekillendirilmesi ve onarımında görev

alırlar. Ayrıca enflamasyon ve enfeksiyonun etkilerini kontrol ederler (13). Sürekli olarak oral patojenlere veya bunların ürünlerine maruz kalan İGF'lerin daha fazla interlökin 1 beta (IL-1 β) ve tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) salgılaması enflamasyonun daha da şiddetlenmesine neden olabilir (14). Yapılan çalışmalarda kullanılan çeşitli antioksidan ilaçların İGF'lerdeki enflamasyon belirteçlerini azalttığı ve enflamasyonun antioksidan tedavilerle tersine çevrilebileceği gösterilmiştir (15).

Normal koşullar altında koruyucu antioksidanlar (enzimler ve redoks molekülleri), ROT'un neden olduğu hasarı hızla onarır (16). Antioksidanlar, etki şekillerine (önleyici veya temizleyici), konumlarına (hücre içi, hücre dışı veya membranla ilişkili), çözünürlüklerine (suda veya yağda çözünür) ve kökenlerine (doğal veya sentetik) göre kategorize edilebilir (17). Stefana ve ark., ROT ve antioksidanlar arasındaki dengesizliğin periodontal hastalığın başlamasında ve gelişmesinde anahtar faktör olabileceğini bildirmişlerdir (18). ROT'un artan ve sürekli üretimi, oksidatif strese yol açar ve bu da periodontal yapının, alveol kemiğinin ve bağ dokusunun giderek tahrip olmasına neden olur (19). Antioksidanlar ROT'a karşı güçlü bir savunma fonksiyonu sunar; E vitamini, taurin ve likopen gibi antioksidanlarla yapılan destekleyici periodontal tedavilerin, geleneksel periodontal tedaviyle karşılaştırıldığında klinik periodontal parametrelerde iyileşme, lokal ve sistemik antioksidanların daha yüksek aktiviteleri ve daha düşük lokal ve sistemik ROT seviyeleri ile sonuçlandığı gösterilmiştir (20).

Doğal bitki içerikleri, düşük yan etkileri, düşük maliyetleri ve kabul edilebilir geniş aralıkları nedeniyle son yıllarda giderek araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (21). Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) içerikleri baharat ve gıda aroması olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (22). Susan C. ve ark., biberiyenin antioksidan, anti-enflamatuar, antikanser ve antiproliferatif aktiviteler dahil olmak üzere farmakolojik ve fizyolojik özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir (23). Biberiye ekstraktı; uçucu yağ, fenolik asitler, flavonoidler ve diterpenler içerir. Karnosik asit, karnosol, rosmanol ve epirosmanol biberiyenin antioksidan özelliklerinden sorumlu başlıca fenolik diterpenlerdir (24). Karnosik asit işleme ve depolama sırasında kararsız olduğundan oksijen varlığında kolayca karnosol ve rosmanol gibi diğer diterpenlere dönüşür (25). Biberiyenin antioksidan aktivitesine

en önemli katkı diterpenler ile radikal temizleme aktivitesi arasındaki ilişkidir. Biberiye diterpenlerinin yapısında bulunan en önemli elementler katekol grubundaki aromatik halka (C₁₁ - C₁₂) ile birlikte üç temel halkanın konjugasyonudur. Katekol grubu oksidasyon sonucu oluşan radikal elektronun temizlenmesinden sorumludur (21).

Fenolik diterpenlerden biri olan rosmanol yüksek antioksidan, antienflamatuar ve antitümörojenik aktiviteye sahiptir (26). Rosmanolün süperoksit anyon üretimini engelleme özelliklerinin yanı sıra lipit peroksidasyonu ve serbest radikal temizleme aktiviteleri nedeniyle güçlü antioksidan olarak kullanılmıştır (27). Inatani ve ark., yaptıkları çalışmada biberiye ekstraktlarının farklı solventler kullanarak antioksidan kapasitesini ölçmüşlerdir. Rosmanolün antioksidan kapasitesi hem linoleik asit hem de domuz yağında sentetik antioksidanlardan dört kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada rosmanolün antioksidan aktivitesi tert-bütül alkol (TBA) ve ferrik tiyosiyanat yöntemleriyle rapor edilmiştir (28).

Rosmanolün antienflamatuar etkileri esas olarak hücre deneyleri ile in vitro olarak araştırılmıştır. Ching Sui Lai ve ark., yaptıkları çalışmada rosmanolün lipopolisakkarit ile uyarılan RAW 0264.7 hücrelerinde, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) proteini ve gen ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Enflamasyon patogeneğinde yer alan ve aynı zamanda bu genlerin ürünleri olan nitrik oksit (NO) ve prostaglandin E2 (PGE2)'yi belirgin şekilde inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Bu bulgulara dayanarak, rosmanolün çeşitli enflamatuar hastalıkların tedavisinde yeni bir kemoprotektif ajan olarak büyük potansiyel gösterdiğini bildirmişlerdir (29).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Periodonsiyum

Periodonsiyum, dişin etrafındaki destek dokuları ifade eder. Bu dokular; diş eti, periodontal ligament, sement ve alveol kemiğinden oluşur. Periodonsiyumun ana işlevi, dişin alveolar kemik ve çiğneme mukozasıyla olan bütünlüğünü korumaktır (9).

2.2 Diş eti

Diş eti; alveol kemiği ve dişin kök kısmını kaplar, mine ve sementin birleştiği noktanın koronal kısmına kadar uzanır. Diş eti anatomik olarak marjinal, yapışık ve interdental olmak üzere 3 ayrı kısımdan oluşur. Anatomik olarak farklı olan diş eti kısımları histolojik ve morfolojik açıdan birbirinden ayrı şekilde özelleşmiş olup, her biri mekanik ve mikrobiyal hasara karşı bir bariyer görevi yapar (30).

Marjinal diş eti, dişi bir yaka gibi çevreleyen dişetinin en servikal kısmıdır ve genişliği yaklaşık 1 mm'dir. Diş eti sulkusunun yumuşak doku duvarını oluşturur. Serbest diş eti oluşu ile yapışık dişetinden ayrılır (31). Yapışık diş eti, marjinal diş etiyle devamlılık gösterir ve mukogingival sınıra kadar uzanır. Alveol kemiğindeki periosta sıkıca yapışık. Yapışık diş eti periodonsiyumu yaralanmalara karşı korur, diş eti kenarının stabil kalmasını ve diş etine gelen fizyolojik kuvvetlerin eşit bir şekilde dağılmasını sağlar (32). İnterdental diş eti, dişlerin kontak noktaları altındaki interdental boşluğu kaplar. Fasial ve lingual bölgelerde temas noktasına doğru sivrilirken, mezial ve distal yüzeylerde hafif içbükeydir. İnterdental diş etinin şekli; dişlerin arasındaki temas noktasına, bu temas noktasının kemiğe olan uzaklığına bağlıdır. Temas noktası olmayan dişlerde diş eti, interdental kemiğe sıkıca yapışık ve interdental papilla içermeyen yuvarlak ve pürüzsüz bir diş eti formu oluşturur (33).

2.3 Diş Etinin Histolojisi

Diş eti mikroskopik olarak incelendiğinde üst katmanda hücreden zengin çok katlı yassı epitel bulunmaktadır. Epitelin altında kollajen lif ağırlıklı bağ dokusu bulunmaktadır (34).

2.3.1 Diş Eti Epiteli

Diş eti epiteli altta yatan dokuları örter ve enfeksiyona karşı fiziksel bir bariyer oluşturur. Epitel hücreleri bakterilere interaktif bir şekilde yanıt verir ve bakteriyel ürünlerle sürekli temas halindedir. Çeşitli hücre tiplerini uyarmak ve nötrofilleri çekmek için interlökin-8 (İL-8), kemokin ve sitokinleri salgılar, bakteri plağına yanıt olarak doğal antimikrobiyal peptitler üretir. Bu antimikrobiyal peptitler periodonsiyumdaki ekolojik dengeyi koruyan bağışıklık sisteminin bir parçasını oluşturur (35).

Diş etinin epitel kısmı, diş ve alveolar kemiğe uyumu açısından farklı morfolojik özellikler gösterir. Morfolojik bakımdan diş eti epiteli; oral epitel, sulkular epitel ve birleşim epiteli olarak üçe ayrılır. Oral ve sulkular epitel büyük ölçüde koruyucu işlev görürken; birleşim epiteli diş eti sağlığının korunmasında önemli bir role sahiptir. Epitel hücreleri diş etinin metabolik sürecinde aktif rol oynarlar ve sitokin, enzim, büyüme faktörü sentezleyerek dış uyaranlara tepki verirler (36, 37).

Diş eti 4 epitel tabakasından oluşmaktadır. Bu tabakalar sırasıyla Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum ve Stratum korneumdur. Stratum basale’de yer alan bazal hücreler hemidesmozomlar aracılığıyla hem birbirlerine hem de basal laminaya bağlanırlar. Stratum basale’nin bazı hücreleri epitel boyunca göç edip keratinize olmaktadır. Bu hücrelere keratinosit adı verilir (38). Keratinositler diş eti epitelinin temel hücresidir. Keratinositlerin çoğalması ve farklılaşmasıyla diş eti seçici geçirgen bir hale gelirken, altta yatan dokuları da korumaktadır (39). Epitelde bulunan diğer hücreler; melanositler, nonkeratinositler, Merkel hücreleri ve Langerhans hücreleridir. Melanositler; stratum basale ve stratum spinosumda yer alan dentritik hücrelerdir. Melanozom adı verilen organellerinde melanin sentezlerler (40). Kemik iliği kökenli Langerhans hücreleri mononükleer fagosit sistemine aittir. Lenfositler için antijen sunan hücreler olarak

immun sistemde önemli bir role sahiptir (41). Merkel hücreleri, epitelin derin katmanlarında bulunur ve sinir uçları barındırır (42).

2.3.2 Diş Eti Bağ Dokusu

Epitel, basal lamina aracılığıyla alttaki bağ dokusuna bağlanır. Bağ dokusu hücrel kısm ve liflerden zengin ekstrasellüler kısımdan oluşur. Bu nedenle diş eti bağ dokusu büyük ölçüde fibröz bir bağ dokudur. Ana bileşenleri kollajen fibril, fibroblast, damar sinir paketi ve matrikstir. Bağ dokusu, epitele komşu papiller uzantılardan oluşan papiller kısım ve alveolar kemiğin periostu ile bitişik olan retiküler kısım olmak üzere iki kısımdan oluşur (36).

Bağ dokusunda kollajen, retiküler ve elastik olmak üzere 3 tip lif bulunur. Kollajen tip I bağ dokusunun büyük bir kısmını oluşturur ve diş etine gerginlik kazandırır. Birleşim epitelinin hemen altında sıralanmış kollajen lif demetleri bağ dokusu ataşmanını oluşturur ve birleşim epitelinin migrasyonunu sınırlandırır. Elastik lif demetleri oktalan, elaunin ve elastin liflerden oluşur ve kollajen lifler arasında dağınık halde bulunur (43). Marjinal diş etinin bağ dokusu gingival lifler adı verilen kollajen lif demetine sahiptir.

Gingival liflerin görevleri:

- Marjinal diş etini desteklemek
- Diş yüzeyinden uzaklaşmadan, çiğneme kuvvetlerine karşı diş eti stabilitesini sağlamak
- Serbest marjinal diş etini; sement ve birleşim epiteli ile birleştirmek (44).

2.3.3 Bağ Dokusu Hücreleri

Diş eti bağ dokusunda baskın hücreler fibroblastlardır. Lif demetlerinin arasında çok sayıda fibroblast bulunur. Fibroblastlar mezenkimal kökenlidir ve diş eti bağ dokusunun gelişimi, bakımı ve onarımında görev alır (45). Mast hücreleri oral mukoza ve bağ dokusunda çok sayıda bulunur. Mast hücreleri bağ dokusunun ilerleyici yıkıma neden olan enflamasyon durumlarında sayıca artar ve fibroblastlar ile enflamasyonun düzenlenmesinde görev alır (46). Makrofajlar ve histiositler mononükleer fagosit sisteminin bir üyesi olarak diş eti bağ dokusunda yer alır.

Adipoz hücreleri ve eozinofiller de az sayıda olsa bağ dokusunun içinde yer alan hücrelerdir. (47)

2.4 Fibroblast

Fibroblastlar bağ dokuda sayıca en çok bulunan hücrelerdir. Diş eti bağ dokusunun onarımı, bakımı ve gelişimini düzenlerler. Ayrıca yara iyileşmesi, enflamasyon, fibrozis gibi fizyolojik ve patolojik durumlarda anahtar rol oynarlar (48).

Fibroblastların ana işlevi, hücre dışı matriksi sentezlemek ve yeniden şekillendirmektir. Hücre dışı matriks, diş eti dokularındaki hücreler için hücrel mikroyevreyi oluştur ve diş eti dokuları için yapısal bütünlüğü sağlar (49). Kollajen, glikozaminoglikan ve proteoglikan gibi büyük miktarlarda protein sentezleyerek hücre dışı matriksi oluşturur (50). Yabancı cisimleri fagosite etmenin yanı sıra; kollajenaz ve matriks metalloproteinaz enzimleri ile hücre dışı matriksi parçalama aktivitesine de sahiptir. Bu yapım ve yıkım döngüleri sayesinde diş etinin yapısını ve doku bütünlüğünü düzenler (51). Fibroblastlar ayrıca büyüme faktörü ve sitokinler salgılayarak diğer hücrelerle iletişim kurar ve karmaşık hücrel iletişim ağları oluşturarak birbirleriyle ve diğer hücrelerle hücre-hücre temasları geliştirirler (49).

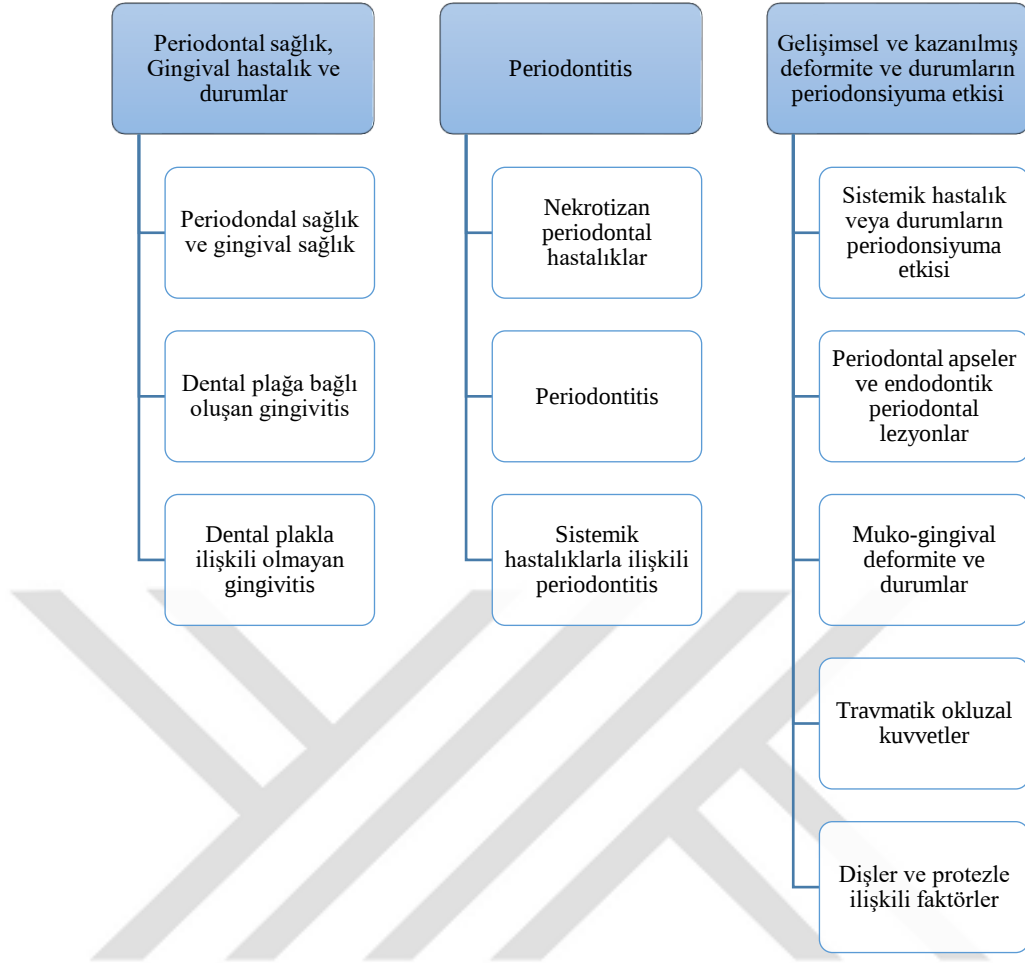
Işık mikroskopuyla bakıldığında fibroblastlar; soluk ve büyük çekirdeğe sahip, uzamış ve iğsi yapıda bir gövdeye sahip olduğu görülür. Elektron mikroskopuyla bakıldığında, bol miktarda endoplazmik retikulum, geniş bir Golgi aygıtı ve çok miktarda mitokondri bulundurmasıyla tipik bir aktif sentez yapan hücrenin tüm karakteristik özelliklerini taşır (32).

2.5 Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalık, dental biyofilmdeki bakterilerle ilişkili kronik, enflamatuvar bir hastalıktır. Alveol kemik, diş eti, periodontal ligament gibi diş destekleyen dokuları etkileyerek dişlerin kaybına neden olur (52). Periodontal dokuların kaybına, spesifik patojenik bakterilerin yanısıra yetersiz konak immun yanıt da neden olur (53). Konak immun yanıt periodontal hastalığın ilerlemesinde kilit rol oynar. Periodontal hastalığın ilerleme şekli patojenik bakterilerin konakta meydana getirdiği immun cevabın şiddetine bağlıdır (54). En yaygın iki periodontal hastalık gingivitis ve periodontitistir. Gingivitis, bakterilerin neden olduğu diş eti iltihabını ifade ederken, periodontitis periodontal dokuların kaybına neden olan periodontal hastalığın ilerlemiş bir formudur. Gingivitisin erken dönemlerinde sondlamada kanama ve diş eti oluşu sıvısında artış görülür. Klinik olarak diş eti kızarıklık ve ödemlidir, radyografide kemik kaybı gözlenmez. Tedavi edilmediği takdirde periodontitise ilerler ve destek dokuların kaybıyla sonuçlanır (55).

2.6 Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması

Periodontal hastalıkların 1999 sınıflaması, hem klinik uygulamada hem de bilimsel literatürde kabul görmüş olsa da, agresif periodontitis teşhisinin gözden geçirilmesi, klinik ataşman kaybının yaşa ve ilerlemesine bağlı verilerin gözden geçirilmesi, akut periodontal lezyonların teşhisi, periodontal hastalığın risk faktörlerinin değerlendirilmesiyle yeni bir sınıflamaya ihtiyaç duyulmuş ve 2017 yılında periodontal hastalık sınıflaması revize edilmiştir (56-58)(Şekil2.1).



Şekil 2.1 Periodontal hastalık ve durumlar

2.6.1 Periodontal Sağlık, Gingival Hastalıklar ve Durumlar

2.6.1.1 Sağlıklı Periodonsiyumda Klinik Gingival Sağlık

Sağlıklı periodonsiyumda klinik gingival sağlık, ataşman ve kemik kaybının olmadığı, klinik olarak enflamasyonun gözlenmediği durumdur.

2.6.1.2 Azalmış Periodonsiyumda Klinik Gingival Sağlık

Azalmış bir periodonsiyumda klinik gingival sağlık, azalmış klinik ataşman ve kemik seviyelerine rağmen; sondalamada kanama, diş etlerinde kızarıklık, ödem

olmadığı durumlardır. Daha önceden periodontitis geçmişi olan; ancak şu an periodontal olarak stabil olan hastalarda enflamasyon yoksa, klinik gingival sağlık olarak tanımlanır (58).

2.6.1.3 Dental Plakla İlişkilendirilen Gingivitis

- Sadece dental plak biyofilmi ile ilişkili
- Sistemik veya lokal risk faktörlerince yönetilen
- İlaça bağlı gingival büyümeler

2.6.1.4 Dental Plakla İlişkilendirilmeyen Gingivitis

- Genetik/gelişimsel hastalıklar
- Endokrin, nutrisyonel ve metabolik hastalıklar
- Enflamatuvar ve immün durumlar
- Spesifik enfeksiyonlar
- Reaktif prosesler
- Neoplasmlar
- Travmatik lezyonlar
- Gingival pigmentasyon

2.6.2 Periodontitis

Yeni sınıflandırma sistemine göre; birbirine komşu olmayan 2 veya daha fazla dişte interdental ataşman kaybı varlığı veya bukkal/oral yüzeyde klinik ataşman kaybının 3 milimetre(mm) ve daha fazla olduğu ve sondlama derinliğinin 3 mm'den fazla olduğu durumlarda periodontitis teşhisi konulur (55).

2.6.2.1 Nekrotizan Periodontal Hastalıklar

- Nekrotizan gingivitis
- Nekrotizan periodontitis

- Nekrotizan stomatitis

2.6.2.2 Periodontitis

2017 sınıflamasına göre periodontitis sınıflandırması, hastalığın şiddetini ve karmaşıklığını gösteren evre “stage” ve hastalığın ilerleme hızını tanımlayan derece “grade” sistemine dayanmaktadır (Tablo 2.1 ve Tablo 2.2).

Periodontitis evresinin (evre I,II, III ve IV) belirlenmesinde ilk aşamada klinik ataşman kaybı (KAK) değerlendirilmektedir. Eğer KAK verileri yoksa evre radyografik kemik kaybına göre belirlenmektedir. Periodontal hastalığın şiddeti ele alınırken periodontal nedenli diş kaybı da değerlendirilmektedir. Evre III ve evre IV arasındaki ayrım, öncelikli olarak karmaşıklık faktörlerine dayanmaktadır. Hastalık durumunun karmaşıklığı belirlenirken sondlama derinliği, kemik kaybı paterni, furkasyon lezyonlarının varlığı, diş mobilitesi, kret defektleri, çiğneme disfonksiyonları dikkate alınmaktadır (56).

Periodontitisin derecesi (derece A, B ve C) periodontitisin ilerleme hızının geçmişe dayalı analizi; daha fazla ilerleme riskinin değerlendirilmesi; tedavinin olası kötü sonuçlarının analizi ve hastanın genel sağlığını olumsuz etkileme riskinin değerlendirilmesi dahil olmak üzere hastalığın biyolojik özellikleri hakkında ek bilgiler sağlamaktadır. Derecelendirmede periodontitisin ilerlemesi, genel sağlık durumu, diyabetin kontrol düzeyi ve sigara kullanımı gibi hastaya özel risk faktörleri de değerlendirilir (56).

Tablo 2.1: Periodontitis evreleri

Periodontitis Evre		Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
Hastalık Şiddeti	En Fazla Kayıp Bölgesinde İnterdental Klinik Ataçman Kaybı	1-2 mm	3-4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	Radyografik Kemik Kaybı	Koronal Üçlüde < %15	Koronal Üçlüde < %15	Kökün ortasına veya apikal üçlüye uzanan	Kökün ortasına veya apikal üçlüye uzanan
	Diş Kaybı	Periodontitise Bağlı Diş Kaybı Yok		Periodontitise Bağlı Diş Kaybı ≤4	Periodontitise Bağlı Diş Kaybı ≥5
Karmaşıklık	Lokal	Maksimum Sondlama Derinliği ≤ 4 Horizontal Kemik Kaybı	Maksimum Sondlama Derinliği ≤ 5 Horizontal Kemik Kaybı	Evre II'ye ek olarak: Sondlama Derinliği ≥ 6 mm Vertikal Kemik Kaybı ≥ 3 mm Sınıf II veya Sınıf III Furkasyon Problemi Orta Derecede Kret Defekti	Evre III'e ek olarak: aşağıdaki nedenlerden dolayı kompleks rehabilitasyon gerekliliği, Çiğneme Disfonksiyonu Sekonder Okluzal travma Şiddetli Kret Defekti Kapanış bozukluğu, Dişlerde Sürüklenme, Açılma 20'den az diş
Kapsam ve Dağılım	Tanımlayıcı olarak Evreye Ekle	Her evre için, lokalize (% 30 diş dahil), generalize veya molar / kesici diş paterni			

Tablo 2.2: Periodontitis dereceleri

Periodontitis Derecesi			Derece A: Yavaş ilerleyen	Derece B: Orta Hızla ilerleyen	Derece C: Hızlı ilerleyen
Primer Kriter	İlerlemenin Doğrudan Kanıtları	Longitudinal Veri (Radyografik Kemik Kaybı veya KAK)	5 yılın üzerinde kayıp bulgusu yok	5 yılın üzerinde < 2 mm	5 yılın üzerinde ≥ 2 mm
	İlerlemenin Dolaylı Kanıtları	% Kemik Kaybı / Yaş	< 0.25	0.25- 1.0	> 1.0
		Vaka Fenotipi	biyofilm miktarına göre periodontal dokularda yıkım düşük	biyofilm miktarına periodontal dokularda yıkım ile uyumlu	biyofilm miktarına göre periodontal dokularda yıkım fazla
Derece Belirleyicisi	Risk Faktörleri	Sigara	Sigara Kullanmayan	Sigara < 10/ gün	Sigara ≥ 10/ gün
		Dişabet	Normoglisemik	HgA1c < %7	HgA1c ≥ %7
Periodontitisin Sistemik Etki Riski	Enflamatuvar Yük	hsCRP	< 1 mg/L	1-3 mg/L	> 3 mg/L
Biyobelirteçler	KAK/Kemik Kaybı Göstergeleri	Salya, DOS, Serum	?	?	?

2.7 Periodontal Hastalıkların Patogenezi

Periodontal hastalığın primer etiyolojik faktörü mikrobiyal dental biyofilm oluşumu olarak kabul edilmektedir. Periodontal hastalığın ilerlemesi ise biyofilimde yer alan patojenik bakterilere verilen konak immün yanıt, genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir (59).

Periodontal hastalıkların gelişimi; başlangıç, erken, yerleşik ve ileri lezyonlar olmak üzere bir dizi aşamaya ayrılır (60). Başlangıç lezyonu mikrobiyal dental plağın birikmesinden 2-4 gün sonra başlar. Başlangıç lezyonu sırasında kapiller damarların genişlemesi, polimorfonükleer (PMN) hücrelerin birleşim epitelinden dişeti sulkusuna göçü, diş eti sulkusundan sıvı eksüdasyonu ve perivasküler kollajen kaybı gözlenmektedir (37). Erken lezyon 4-10 gün içinde gelişir. Bu lezyon, T lenfositlerin ve diğer mononükleer hücrelerin yoğun infiltrasyonunun yanı sıra fibroblastların patolojik değişimi ile karakterizedir. Bu aşamada klinik olarak sondalamada kanama ve diş eti oluğu sıvısı (DOS)'nda artış gözlenir (61). 2-3 hafta içinde yerleşik lezyon gelişir. Bu lezyona aktive B hücreleri (plazma hücreleri) hakimdir ve diş eti bağ dokusu matriksinde daha fazla kayıp olur. Henüz kemik kaybı tespit edilemez ancak diş eti cebi kademeli olarak oluşur (62). Son olarak ilerlemiş lezyonda, alveolar kemik ve periodontal ligamentin yıkımı ile birlikte diş eti dokusunun yapısı bozulurken plazma hücreleri baskın olmaya devam eder. İlerlemiş lezyon, bağlantı epitelinin cep epiteline dönüşmesi, plazma hücreleri ve makrofajlardan oluşan daha yoğun enflamatuar infiltrat oluşumu ve alveolar kemiğin rezorpsiyonu ile karakterizedir (63).

Konak-bakteri etkileşimi sonrası akut enflamatuar yanıt olarak başlayan periodontal enflamasyon, yoğun T lenfosit evresini takiben B lenfositler ve makrofajların hakim olduğu kronik bir evreye ilerler (64). Bu aşamalar arasındaki geçiş, enflamatuar bölgede immün hücrelerin birikimi ve farklılaşması "sitokinler" aracılığı ile gerçekleşir. Sitokinler hematopoez, yara iyileşmesi, sistemik ve lokal enflamatuar yanıtlar gibi birçok biyolojik sürece katkıda bulunan çözünebilir araçlardır (65). Epitel hücreleri, diş eti, periodontal ligament fibroblastları ve keratinositler gibi immün hücrelerin bakterilerle etkileşime girmesi sonucunda sitokin ürettiği gösterilmiştir. Sitokinler hücre aktivasyonunu, proliferasyonunu ve fonksiyonunu düzenleyerek farklı hedef hücreler üzerinde pleiotropik etkiler

gösterir (65). Bu nedenle sitokinlerin net etkisi, romatoid artrit, enflamatuvar osteoartrit ve periodontitis gibi birçok enflamatuvar kronik hastalıkta doku yıkımının kritik bir belirleyicisi olarak hizmet edebilecek immün yanıtın yoğunluğunu ve süresini yönlendirmektedir (66). Periodontal hastalıklardaki başlıca enflamatuvar sitokinler; interlökinler ve TNF- α 'dır (67). Bu sitokinler periodontal sert ve yumuşak doku yıkımından temel olarak sorumludur (67). Periodontal hastalıkta sitokinlerin yanında prostanoidler (PGE2), enzimler [matriks metalloproteinaz (MMP) vb] ve ROT'un aşırı üretimi görülür (68). Periodontal hastalıkların patogeneğinde pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinler ve enzimler arasındaki denge son derece önemlidir (69). Periodontal sağlıkta; prostaglandinler, çoğu sitokinleri içeren pro-enflamatuvar mediatörler ve ROT; anti-enflamatuvar sitokinler, lipoksinler ve anti-oksidanlar tarafından dengelenmiştir (70).

2.8 Serbest Radikaller

Serbest radikaller normal hücrel metabolik aktivitenin ürünleridir (71). Serbest radikal, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve bağımsız olarak var olabilen bir atom veya molekül olarak tanımlanabilir (71). Bir serbest radikalın tek sayıda elektron(lar)a sahip olması onu kararsız, kısa ömürlü ve yüksek reaktif yapar (72). Yüksek reaktiviteleri nedeniyle, kararlılık elde etmek için diğer bileşiklerden elektron çekebilirler. Böylece saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybederek kendisi de bir serbest radikal haline gelir ve sonunda canlı hücreye zarar veren zincirleme bir reaksiyon dizisi başlar (73, 74).

2.9 Reaktif Oksijen Türleri

ROT, toplu olarak serbest radikalleri ve diğer radikal olmayan reaktif türleri oluşturur (72). ROT, canlı sistem için hem faydalı hem de toksik bileşikler olarak iki yönlü bir görev üstlenir. Orta veya düşük seviyelerde ROT, faydalı etkilere sahiptir ve bağışıklık fonksiyonu, patojenik mikroorganizmalara karşı savunma, bir dizi hücrel sinyal yolağı, mitojenik aktivite ve redoks düzenlemesi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda rol oynar (75). Ancak daha yüksek konsantrasyonlarda ROT, oksidatif stres oluşturarak biyomoleküllerde potansiyel hasara neden olur. Oksidatif stres, bir tarafta aşırı ROT üretimi ve diğer tarafta enzimatik ve enzimatik

olmayan antioksidanların eksikliği olduğunda gelişir (76). En önemlisi aşırı ROT; lipidler, proteinler ve DNA dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküllerin bütünlüğüne zarar verebilir ve diabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, katarakt, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolu hastalıkları ve yaşlanma süreci gibi çeşitli hastalıklarda oksidatif stresin artmasına neden olabilir (77).

Genel olarak, ROT; süperoksit($O_2^{\cdot -}$) , hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($-OH$) ve single oksijen (1O_2) içerir (78). Bu türler endojen olarak peroksizomlar; endoplazmik retikulum (ER); NADPH oksidazlar (NOXs), ksantin oksidazlar (XOs), siklooksijenazlar (COXs) ve lipooksijenazlar (LOXs) gibi enzimler ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri tarafından üretilir (74). Günlük olarak üretilen hücre içi ROT miktarı her bir hücrede ~1 milyar moleküle ulaşmaktadır (79). ROT üretimi, redoks homeostazını korumak için antioksidan enzimler, küçük moleküller [örn. C vitamini ve glutatyon (GSH)] ve glutaredoksin ve tiyoredoksin sistemleri dahil olmak üzere çok sayıda ROT temizleyen molekül ile dengede gerçekleşir (80). ROT'un üretimi ve ortadan kaldırılması arasındaki denge insan sağlığı için kritik öneme sahiptir. Aşırı ROT üretimi, düşük antioksidan seviyeleri veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu oksidatif strese neden olur ve biyolojik makromoleküllerde (lipidler, proteinler ve DNA) hasara yol açabilir (81).

Reaktif oksijen türlerinden biri olan H_2O_2 , oksidatif hasar nedeni olmanın yanı sıra fizyolojik ve patolojik süreçler sırasında hücre içinde üretilen ROT'un önemli bir bileşenidir (82). Lipid peroksidasyonu, H_2O_2 'nin neden olduğu hücre hasarının başlıca mekanizmalarından biridir (83). H_2O_2 hücre ve doku kültürleri de dahil olmak üzere çeşitli deneysel modellerde oksidatif strese bağlı hücre ölümünü incelemek için yaygın olarak kullanılan bir oksidandır. H_2O_2 , geniş bir biyolojik etki spektrumuna sahipken, H_2O_2 'ye verilen hücresel yanıtlar hücre tipine ve konsantrasyona özgü bir şekilde farklılık gösterebilir (84). Bu endojen H_2O_2 sadece oksidatif hasara önemli bir katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda önemli bir sinyal molekülünü de temsil eder (85). H_2O_2 kararsızdır ve biyolojik moleküllere zarar veren oldukça reaktif bir $OH^{\cdot}$ -a kolayca ayrışır (86). Hücrelerde H_2O_2 mitokondri, sitozol ve peroksizomlarda çok çeşitli koruyucu mekanizmalar aracılığıyla parçalanır (87). H_2O_2 üretimi ve dejenerasyonu arasındaki dengesizlik

ve dolayısıyla hücrel enzimler tarafından detoksifikasyon oksidatif hasara yol açar (88).

2.10 Periodontitis ve Oksidatif Stres

Periodontal dokularda; düşük seviyelerdeki ROT; hücrel sinyal iletimi, hücrel farklılaşma, apoptozis ve patojenlerin etkisiz hale getirilmesi gibi fizyolojik süreçlere katılır (89). *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ve *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) gibi periodontal dokularda enflamasyona yol açan patojen bakteriler oksidatif ortamdaki değişikliklere oldukça hassastır (90). ROT, oksidatif değişikliklere yol açarak patojenlerin öldürülmesine katkı sağlar. Örneğin lökositlerin, in vitro olarak *P. gingivalis* ve *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) ile etkileşime girdiğinde ROT seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (91). *Treponema denticola* (*T. denticola*) gibi periodontal patojenlerin ROT indüksiyonunu bastırmak için stratejiler ürettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (92). ROT'un optimal seviyede kalmasını sağlayan antioksidan sistem yetersiz veya etkisiz kaldığında oksidatif stres oluşur, bunun sonucunda sitotoksik etkiler başlar ve periodontal doku hasarı oluşur (93). Birkaç kesitsel çalışmadan elde edilen veriler, periodontitis hastalarında, sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük serum ve plazma total antioksidan (TAOS) konsantrasyonları olduğunu göstermektedir (70), (94).

Patojenik biyofilm tarafından konak yanıtının başlatılmasından sonra, nötrofiller periodontal dokuda ve diş eti sulkusunda toplanan en yaygın enflamatuvar hücreler haline gelir ve periodontitiste baskın ROT kaynağıdır (95). Patojenler tarafından uyarılmalarının ardından nötrofiller, fagositoz sırasında NADPH oksidaz tarafından katalize edilen “solunum patlaması” adı verilen metabolik yolla O_2 üretirler (70). O_2 fagozomal ve hücre dışı ortama salınabilir ve daha sonra H_2O_2 , hipokloröz asit (HOCl), OH^- ve 1O_2 gibi farklı radikal ve radikal olmayan türevlere dönüştürülebilir (84).

Periodontal doku hasarı doğrudan oksidatif stresten, dolaylı olarak enflamasyon, apoptoz, sinyal iletimi ve gen transkripsiyonunu düzenleyerek oluşur. ROT'un neden olduğu doku hasarı; lipid peroksidasyonu, hücre zarı yıkımı ve bunun sonucunda gerçekleşen protein denatürasyonu ve enzim deaktivasyonu, nükleik asit hasarı ve kromozom bozulması, mitokondriyel hasar ve ROT patlamaları sonucunda gerçekleşir (89), (93), (96).

ROT'un sinyal iletimini ve gen transkripsiyonunu düzenlemesiyle periodontal doku hasarı meydana gelir. İlk olarak ROT, NF- κ B 'yi aktive ederek enflamatuvar ve immün yanıtları düzenleyen bir sinyal kaskadı başlatabilir (97). İkincisi, ROT, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonunu indükleyerek hücre apoptozuna neden olur (98). ROT'un aşırı üretimi ve oksidatif stresin ortaya çıkması, sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla proenflamatuvar sitokinlerin salınımına ve toplanmasına neden olarak periodontal doku hasarını şiddetlendirir ve aynı zamanda inflamazomların bir araya gelmesini de sağlar. İnflamazom apoptoz ile ilişkili kaspaz-1 aktivasyonu ve enflamasyon indüksiyonu yoluyla mikroorganizmalara karşı koyan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçasıdır (99). Periodontal hastalıkla ilgili olarak, NOD-, LRR- ve pyrin domain içeren protein 3 (NLRP3) inflamazomunun ekspresyonunun periodontitisli hastalarda periodontal olarak sağlıklı bireylere kıyasla arttığı gösterilmiştir (100, 101). Son olarak, ROT otofajide de rol oynar. Otofaji, enerji homeostazını korumak için uzun ömürlü proteinlerin ve hasarlı organellerin geri dönüştürüldüğü hücresel bir kendi kendini parçalama süreci olarak tanımlanabilir (102). Yüksek miktarlardaki ROT, otofaji ile ilişkili genleri hedef alarak otofaji faaliyetlerinin bir indükleyicisi veya inhibitörü olarak işlev görebilir (103).

2.11 Antioksidanlar

Antioksidanlar, ortamdaki oksijeni hapsederek oksidasyon reaksiyonlarının başlamasını veya ilerlemesini engelleyen bileşiklerdir (104). Hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünü koruyarak, normal fonksiyonlarının sürdürülmesinde, oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin sağlanmasında önemli rol oynarlar (70).

Vitaminler, mineraller, enzimler ve hormonlar gibi antioksidanlar, besin maddeleri ve bitkisel takviyelere ek olarak ekzojen ve endojen kaynaklardan elde edilebilen moleküllerdir (105).

Endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere ikiye ayrılır;

a) Enzimatik antioksidanlar arasında glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon transferaz, katalaz, süperoksit dismutaz, mitokondriyel sitokrom oksidaz bulunur (106). Glutatyon peroksidaz, H_2O_2 düzeyini azaltarak lipid peroksidasyonunu önler (107). Antioksidanların enzim aktivitesi gösterebilmesi için glutatyonun indirgenmiş halde olması önemlidir, bir flavoporetin olan glutatyon redüktaz glutatyonun indirgenmesini katalize eder (108). Hem peroksizomlarda hem sitozollerde bulunan katalaz, H_2O_2 'nin moleküler düzeyde oksijen ve suya dönüşmesini sağlar (107). SOD, süperoksit radikallerinin hücreye verdiği zararı engeller (22).

b) Enzimatik olmayan endojen antioksidan kaynakları ise; melatonin, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, glutatyon, sistein, ürik asit, albümin ve bilirubindir (106).

Ekzojen antioksidanlar A vitamini, C vitamini, E vitamini, polifenoller, flavonoidler, koenzimQ10 ve selenyumdur (109). Chapple ve arkadaşları periodontitis prevalansı ile serumdaki C vitamini düzeyleri karşılaştırdığında ters bir korelasyon olduğunu görmüşlerdir (70). Ratlarda üzerinde yapılan bir çalışmada E vitamini ve selenyum kombinasyonunun kolajen yıkımını azalttığı bulunmuştur (110). Stefano ve ark., yaptığı in vitro çalışmalarda polifenollerin antibakteriyel ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu anlaşılmıştır (18). Flavonoidler; meyve, sebze ve bitkilerde bulunan, serbest radikal temizleyici olarak bilinen polifenol ailesinin bir üyesidir (106). Flavonoidlerin antioksidan, antiinflamatuvar, antialerjik, antiviral, antibakteriyel, antiplatelet ve antitümör özellikleri sayesinde hücreleri oksijen hasarından korur, doku ve organlardaki enfeksiyonu önlemeye yardımcı olur (111).

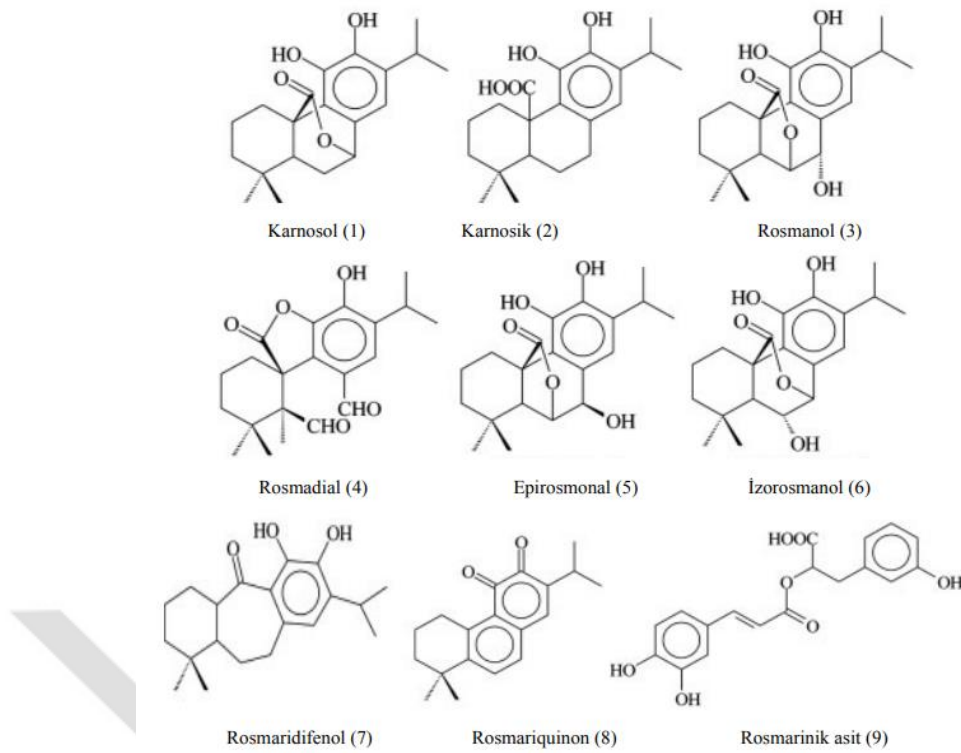
2.12 Biberiye (*Rosmarinus Officinalis* L.)

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), Türkiye dahil birçok ülkede yetiştirilen Akdeniz kökenli, Lamiaceae ailesine ait bir bitkidir (112). Biberiye eski

zamanlardan beri; hafıza güçlendirme, saç uzatma, deri egzemaları, enflamatuar hastalıklar, solunum yolu hastalıkları gibi çeşitli durumlarda kullanılmaktadır (113). Anti-enflamatuar, antikanser, antioksidan, antiproliferatif, antibakteriyel gibi farmasötik özellikleri sayesinde geleneksel tıpta gün geçtikçe kullanımı artmaktadır (23, 26, 114). Biberiye, doğal antioksidanlar arasında en yüksek antioksidan aktiviteye sahip türlerden biri olarak kabul edilmektedir (115). Bazı önemli antioksidan yağ ve fenolik bileşenlerin varlığı nedeniyle biberiye ekstraktlarının tıp ve gıda endüstrisindeki aktivitesinin, yağ ve lipit içeren gıdaların oksidatif bozulmasını önlediği bilinmektedir (116).

Biberiye ekstresinin temel bileşenleri arasında fenolik diterpenler, fenolik asitler, triptenler, flavonodiler, karotenoidler ve alfa- tokoferol yer alır (117).

Fenolik diterpenler; karnosik asit, karnosol, rosmanol, rosmadial, epirosmanol, isorosmanol, apirosmanol, rosmaridifenol, rosmariquinon, rosmakinon A, rosmakinon B, metil karnosat, dimetilisorosmanol, sekohinokiol, royleanonik asit, 12-metoksi-trans-karnosik asit, 12-metoksi-cis-karnosik asitten oluşur (117). Biberiyenin içeriğinde fenolik asit (kafeoil türevleri) olarak rosmarinik asit yer alır (118). Triterpenler grubunda betulin, betulinik asit, 23-hidroksibetulinik asit, mikromerik asit, oleanolik asit, ursolik asit, roffiseron bulunur (119). Flavonoidler; diosmin, diosmetin, eriositrin, genkvanin, hesperidin, luteolin, nepetin, nepitrin, sirsimaritindir (118, 120, 121)(Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Biberiyenin temel bileşenleri

Biberiyenin antioksidan aktivitesinin en önemli yönlerinden biri, diterpenler ile radikal temizleme aktivitesi arasındaki ilişkidir. Karnosik asit, karnosol, rosmanol ve epirosmanol biberiyenin antioksidan özelliklerinden sorumlu başlıca fenolik diterpenlerdir (122). Diterpenler, üç temel halkanın konjugasyonu ile birlikte katekol grubundaki aromatik halkadan oluşur ($C_{11}-C_{12}$). Katekol grubu, oksidasyon sonucu oluşan radikal elektronun temizlenmesinden sorumludur (123). Diterpenlerin yanı sıra, biberiyenin fenolik bileşiklerinin lipit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girerek bunları kararlı ürünlere dönüştürdüğünde birincil antioksidanlar olarak hareket ettiği belirtilmiştir (124).

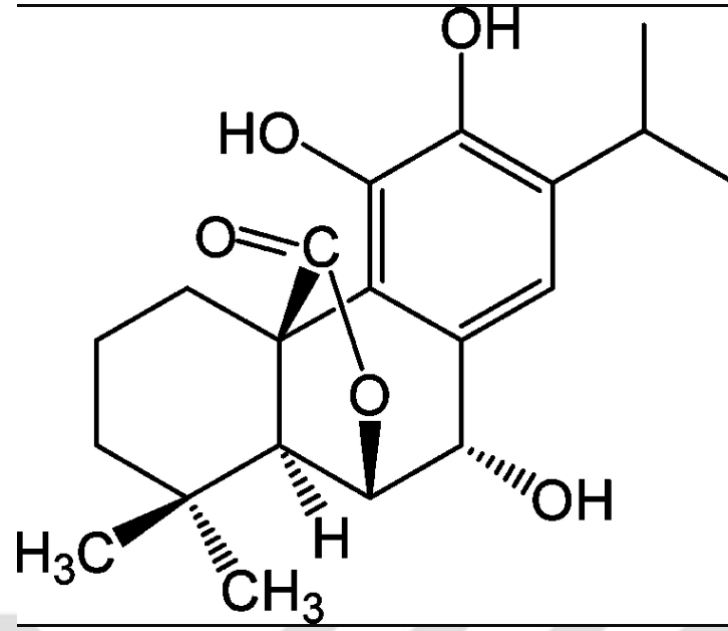
Biberiye özlerinin antimikrobiyal özelliklerinden yararlanabilmek için diş hekimliği alanında kullanımını içeren çalışmalar mevcuttur. Mira Günther ve ark., yaptıkları çalışmada; biberiye özünün başlangıç oral biyofilm oluşumunda yer alan hem aerobik hem de anaerobik bakterilerde antimikrobiyal etkisini göstermişlerdir (125). Bernardes ve ark., diş çürüklerinde etkili olan oral patojenlerden *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus salivarius* ile yaptıkları *in vitro* çalışmada; diterpen grubundan karnosik asit ve karnosolün antimikrobiyal etkilerini ortaya koymuşlardır (126). Biberiyenin anti-enflamatuar etkilerini gösteren çalışmalara

bakıldığında; karnosik asitin interlökin-27 (İL-27) ile uyarılan insan oral epiteli hücrelerinde anti-enflamatuar etkiler göstererek periodontal hastalıklarda pro-enflamatuar rolü olan Tip 1 T yardımcı (Th1) hücrelerinin göçünü azalttığı görülmektedir (127). Bu çalışmadan örnek alınarak insan periodontal ligament hücrelerinde karnosik asitin kullanıldığı *in vitro* çalışmada; karnosik asitin interlökin 6 (İL-6) ve periodontal hastalıkla ilişkili kemokinleri inhibe ettiği gösterilmiştir (128).

Biberiyenin en güçlü antioksidan ajanlarından biri olan karnosik asidin, insanlarda meme, prostat, akciğer ve karaciğerdeki malign dokularından türeyen çeşitli kanser hücre hatlarına karşı etkili anti-kanser aktivite sergilediği bildirilmiştir (129). Diterpen grubunda yer alan bir başka bileşik olan karnosol; çeşitli *in vitro* çalışmalarda kanser karşıtı ajan olarak kullanılmıştır (130). Jeremy ve ark., prostat kanseri hücre hattını karnosol ile tedavi ettiklerinde B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ve pro-kaspaz 8 proteininde azalma ve Bax gen ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (130).

2.12.1 Rosmanol

Rosmanol, *Salvia officinalis* (ada çayı), *Hyptisincana* ve *Rosmarinus* (biberiye) dahil olmak üzere çeşitli bitkilerden elde edilen fenolik diterpendir (131). İlk olarak 1982 yılında Inatani ve arkadaşları tarafından biberiye yapraklarından izole edilmiştir (114)(Şekil 2.3). Biberiyedeki antioksidan bileşenler arasında karnosol ve karnosik asit fenolik diterpenleri arasında en güçlü antioksidan etkiye sahiptir (27). Oksijen varlığında, karnosik asit kolaylıkla rosmanol ve karnosol diterpenlerine dönüşür (25). Çeşitli çalışmalar rosmanolün güçlü bir antioksidan olduğunu ortaya koymaktadır. Lipid peroksidasyonu ve serbest radikal temizleme özelliklerinin yanı sıra süperoksit anyon oluşumunu da engeller (27, 132).



Şekil 2.3 Rosmanolün kimyasal yapısı

Diterpenler grubunda yer alan rosmanol içeriğinde orto-hidroksil grubunun varlığı nedeniyle iyi bir antioksidan özellik gösterir. Orto-hidroksil grubu sayesinde radikal temizleme özelliği taşır. Orto-hidroksil grubu, radikallerle doğrudan reaksiyona girerek veya metal iyonlarını bağlayarak serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı minimuma indirir. Fenton reaksiyonları ile metal iyonlarına bağlanarak -OH radikalinin oluşumunu engelleyebilir, serbest radikallere bir hidrojen atomu veya bir elektron transferi yaparak, serbest radikalleri nötralize edebilir (133). Beatriz ve ark., yaptıkları çalışmada karnosol, karnosik asit ve rosmanolün antioksidan kapasitesini sentetik antioksidan ve vitamin E ile karşılaştırmışlardır. Çalışmada; karnosol, rosmanol ve karnosik asitin sentetik antioksidana göre anlamlı derecede daha kuvvetli antioksidan özellik gösterdiği, vitamin E ile benzer antioksidan özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (134). Hiroyuki ve ark., biberiye diterpenlerinden rosmanol, karnosol ve karnosik asitin fare makrofajlarındaki mitokondrilerde antioksidan kapasitesine bakmışlardır. 10, 20 ve 30 μM konsantrasyonda lipid peroksidasyonu ve süperoksit anyonu üzerine etkilerine bakıldığında, doza bağımlı olarak süperoksit anyonunu azaltma ve lipid peroksidasyonunu önleyici etkileri olduğunu göstermişlerdir (135).

Ching-Shu Lai ve ark., yaptıkları çalışmada, fare makrofajlarında rosmanolün kullanımı ile enflamatuar hastalıklarla ilişkili olabilecek enflamasyon faktörlerinden iNOS ve COX-2 gen ekspresyonunu ve bu moleküllerin ürünleri olan nitrik oksit NO, PGE2, NF- κ B alt biriminin translokasyonunun azalmasında etkili olduğu bulunmuştur (29). LPS ile uyarılan fare makrofajlarında 1, 2.5, 5, 10 μ M rosmanol uygulaması yapılmasının ardından doza bağımlı olarak iNOS ve COX-2 seviyelerinde azalma, bu sitokinlerin ürünleri olan NO, PGE2 ve NF-KB seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Liançun Li ve ark., romatoid artrit modeli oluşturdukları farelerde enflamasyon faktörlerinin azaltılmasında rosmanol ve karnosolü kullandıkları çalışmalarında, rosmanol ve karnosolün enflamasyonu inhibe ederek sinerjik olarak romatoid artrit semptomlarını hafiflettiğini görmüşlerdir. Rosmanol ve karnosol ile tedavi edilen gruplarla karşılaştırıldığında, kombinasyonla tedavi edilen farelerde serum TNF- α , İL-6 ve monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1) düzeyleri önemli ölçüde azaldı, bu da rosmanol ve karnosolün enflamasyon yanıtını inhibe ederek sinerjik olarak romatoid artriti hafifletebileceğini göstermektedir. Sonuçlar rosmanol ve karnosolün anti-enflamatuar ajan olarak kullanılabileceğini destekler niteliktedir (136).

Rosmanol, karnosik asit ve rosmarinik asitin COLO 205 insan kolorektal adenokarsinom hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada rosmanolün, karnosik asit ve rosmarinik asite göre hücre canlılığı üzerinde daha güçlü inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. COLO 205 hücrelerinde rosmanol, hem mitokondriyel yol hem de reseptör aracılı yol ile hücre ölümünü güçlü bir şekilde indükleyerek; kanser önlenmesi ve tedavisinde umut vaat edici ajan olarak görülmektedir(137). Dongjun Jiang ve ark., yaptığı bir *in vitro* çalışmada sağlıklı ve kanserli meme hücre hattında 0.6, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μ M rosmanol konsantrasyonundaki etkilerine bakmışlardır. Yüksek dozlarda rosmanol, oksidatif stresi tetikleyerek ROT kaynaklı DNA hasarına neden olduğunu ve kanserli meme hücrelerinde mitokondriyal yol aracılı hücre ölümü ile anti-proliferatif bir rol oynadığını göstermektedir. Rosmanol, hücre döngüsünde S fazında kanser hücresinin durmasına neden olur. Ayrıca, rosmanolün meme kanseri gelişiminde hücre büyümesi ve gelişmesinde önemli rol oynayan Janus Kinaz 2/ Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 (JAK2/STAT3) sinyallerinin inhibisyonuyla anti-proliferatif ve anti-kanser etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (107).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızın etik kurul onayı Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 02.04.2024 tarihinde alınmıştır. (Karar 2024/86)

3.1 Kullanılan Cihaz ve Aletler

Çalışmamızda kullanılan altyapı ve ekipmanlar ile kullanım amaçları Tablo 3.1' de özetlenmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmamızda kullanılan alt yapı, ekipmanlar ve kullanım amaçları

Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat, vb.)	Kullanım Amacı
Thermo Scientific Multiskan FC	Moleküler analiz
BİORAD MJ Mini Personal Thermal Cycler	Moleküler analiz
Biosan CH-100 Heating/Cooling Dry Block	Moleküler analiz
RT-PCR sistem	Moleküler analiz
-20 derin dondurucu	Moleküler analiz, Hücre üretimi
-80 derin dondurucu	Moleküler analiz, Hücre üretimi
Homejenizatör (mekanik parçalayıcı)	Moleküler analiz
Hanna Instruments pH 211 Microprocessor pH Meter	Moleküler analiz
A&D Company, Limited. HR-250AZ Analitik terazi	Moleküler analiz
Velp Scientifica heating magnetik stirrer ısıtıcı karıştırıcı	Moleküler analiz, Kök hücre üretimi
Olympus CX41 Fluorescence Mikroskop	Hücre üretimi, analiz
Olympus CX31 Upright mikroskop	Hücre üretimi, analiz
Thermo Scientific Heracell 150 L CO2 inkübatör	Moleküler analiz, Hücre üretimi
MMM Medcenter Einrichtungen GmbH Ecocell Etüv	Moleküler analiz
NanoEnTek EVE otomatik hücre sayacı	Hücre sayımı
Hettich Universal 320R Santrifüj	Moleküler analiz
Biosafety Cabinet Class II güvenlik kabini	Hücre üretimi

3.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

Çalışmamız için kullanılan sarf malzemeler ve kullanım amaçları Tablo 3.2' özetlenmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmamızda kullanılan sarf malzemeler ve kullanım amaçları

Sarf Malzeme/Kimyasal Madde Adı	Projede Kullanım Amacı
Rosmanol 5 mg	Hücrelere rosmanol uygulaması aşamasında kullanılmıştır.
Mikrosantrifüj Tüpü - P.P - 1,5 Ml - Dna & Rna Free – Steril Sertifikalı microcult	Hücre kültürü elde edilmesi aşamasında kullanılmıştır.
Tüp - Santrifüj - P.P – Vidalı Kapaklı - 15 Ml - Steril (50 Adet/Pk) microcult	
Tüp - Santrifüj - P.P – Vidalı Kapaklı - 50 Ml -- Gamma Steril - Tekli Ambalaj (25 Ad/Pk) microcult	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose 500 ml sigma d5796	
Fetal Bovine Serum Advanced (FBS Advanced), Collected in South America 500 ml	
Trypsin-EDTA solution 0.25%, sterilefiltered, BioReagent, suitable for cell culture, 2.5 g porcine 100 ml sigma	
Cell Culture Flask, 25 cm ² , Vent Cap, TC, Sterile, (10 ad/pk)	
Ethanol 2,5 L merck	
Pastör Pipetleri - P.E - 3 Ml - Steril - Tekli Paket (500 Adet/kutu) microcult	
Collagenase, Type I, Clostridium histolyticum 100 mg Genaxxon	
Eldiven Nitril Pudrasız Large 100 Adet nitril	Laboratuar çalışmalarında kişisel koruyucu ekipman olarak kullanılmıştır.
Cell Proliferation Kit (XTT based) 1000assay 1000 assays	XTT testi için kullanılmıştır.
Hydrogen peroxide solution (H1009 Sigma-Aldrich) 5 ml	Hücrelerde oksidatif stres oluşturmak için kullanılmıştır.

3.3 Gingival Fibroblast Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Hücre Kültürü Uygulamaları

Çalışmamızda kullanılan insan diş eti fibroblast hücreleri, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na kuron yapılacak dişlerin yüksekliğinin arttırılması ve gingivektomi endikasyonu ile başvuran hastalardan alınan artık diş eti dokularının eksplant kültürleri ile elde edildi. Katılımcıların; 18-35 yaş aralığında, sistemik ve periodontal olarak sağlıklı, herhangi bir ilaç kullanmayan, sigara içmeyen bireyler olmasına dikkat edildi. Tüm katılımcılar çalışma prosedürleri hakkında sözlü olarak bilgilendirilip, yazılı onamları alındı.

Hastalardan alınan diş eti dokularının epitel kısmı 15C numaralı bistüri ile dikkatlice çıkarılarak deepitelize edildikten sonra %10 Fetal Sığır Serum (FBS), 250 µg/ml gentamisin sülfat ve 1,5 µg/ml Amfoterisin B ile desteklenmiş taşıma solüsyonu Dulbecco'nun Modifiye Minimal Esansiyel Medyumu (DMEM) içeren bir çözeltide laboratuvara getirildi. Diş eti bağ dokusu örnekleri, petri kaplarına biyogüvenlik kabini içerisinde aktarıldıktan sonra taşıma çözeltisi ile iki kez yıkandı. Doku örneklerini küçük parçalara ayırmak için 15 numaralı bistüri kullanıldı. Küçük parçalara ayrılan doku örnekleri, %10 FBS içeren DMEM ile üç kez daha yıkandıktan sonra 25 cm²'lik flasklara yerleştirildi. Dokuların üzerini kaplayacak şekilde 2 ml %10 FBS içeren DMEM flaska eklendi ve 37°C'de %5 CO₂ varlığında inkübasyona bırakıldı (Fotoğraf 3.1).



Fotoğraf 3.1 Hastalardan elde edilen diş eti dokularının kültür için hazırlanması

24 saat sonra, kültür ortamı %10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM ile değiştirildi. Her gün hücreler yüzeye tutunma durumunu gözlemleyebilmek için inverted mikroskop ile kontrol edildi (Fotoğraf 3.2).



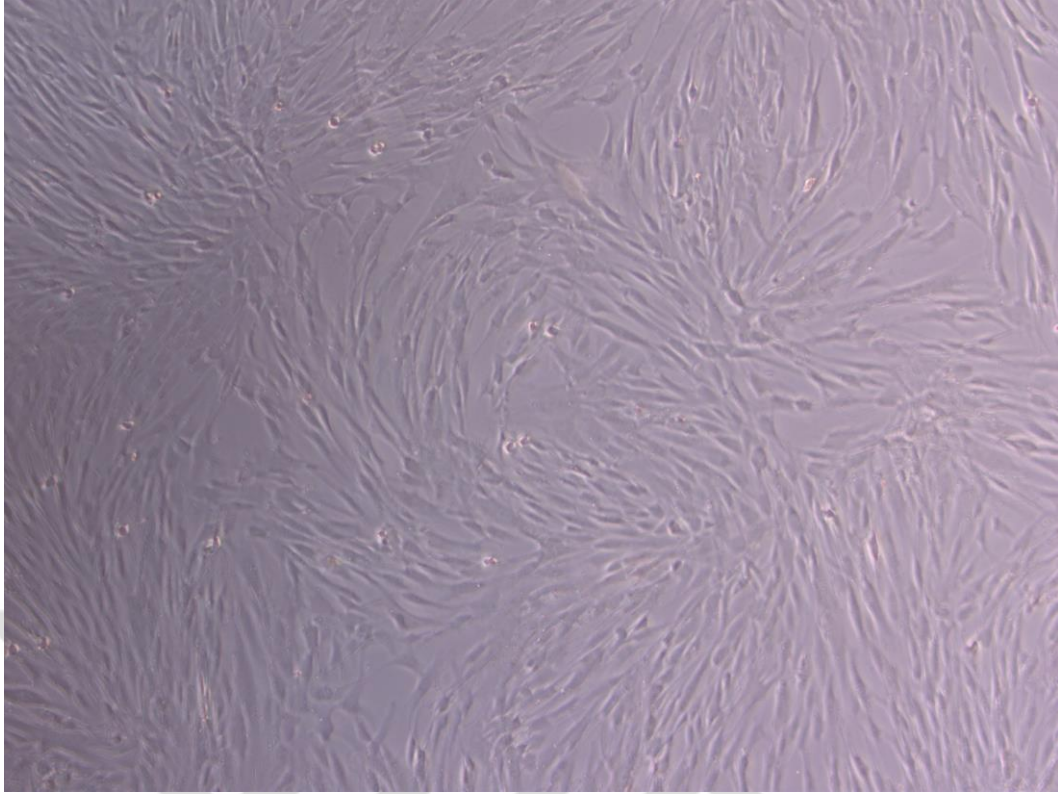
Fotoğraf 3.2 İGF hücrelerinin kontrol edildiği inverted mikroskop (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı)



Fotoğraf 3.3 Hastalardan alınan diş eti dokularından gingival fibroblast hücresi elde edilmesi

Hücrelerin flaskın yaklaşık olarak %25'ini kapladığı gözlemlendiğinde, flask içindeki 2 ml besiyeri aspire edildi(Fotoğraf 3.3).

Hücreler, tripsin enziminin etkinliği için 2 ml serum içermeyen besiyeri ile yıkandı ve ardından 1,5 ml Tripsin- Etilen diamine tetra asetik asit (EDTA) flaska eklendi. Ardından, %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de beş dakika boyunca hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmaları için bekletildi. Tripsin-EDTA'nın aktivitesinin durdurulması için, kültür kabına 2 ml %10 FBS içeren DMEM besiyeri eklendi. Hücre peleti elde etmek için, petri kabından toplanan hücre süspansiyonu, oda sıcaklığında 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu hücre peleti, 2 ml %10 FBS içeren DMEM ile süspanse edilip 100 mm'lik petri kabındaki besiyeri ile karıştırıldı. Bu sayede İGF hücrelerinin ilk pasajları elde edildi (Fotoğraf 3.4).



Fotoğraf 3.4 Gingival fibroblast hücrelerinin ilk pasajının ardından 16.gündeki görünümü

Yirmi dört saat sonra, kültür kabındaki besiyeri 8 ml taze besiyeri ile yenilendi. Flasklardaki besiyeri iki gün aralıklarla değiştirildi. Hücreler, %70- %80 konfluente ulaştıklarında, İGF kültürü elde edilmiş oldu.

Hücrelerin Pasajlanması:

Çalışmamızın her aşamasında kullanılacak yeterli hücre hattının sağlanabilmesi amacıyla hücre hatları çoğaltılarak pasajlanmıştır.

Primer kültürden; fibroblast alt kültürlerini elde etmek için, doku parçaları birkaç kez steril fosfatlı tampon tuzlu su (PBS) ile yıkandı. Fibroblastları bağlı oldukları yüzeyden kaldırmak için 0.5 ml tripsin- EDTA uygulandı ve 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Tripsin- EDTA uygulanan hücrelerin flasklarından ayrıldığı gözlemlendikten sonra, 5-8 ml %10 FBS içeren DMEM eklenerek pasajlandı. Hücreler, 3. ve 4. pasajlar için benzer bir yöntemle kültüre edildi. Hücreler 2.

pasajdayken donduruldu ve deney zamanı çözülerek kullanıldı. 3. ve 4. pasaja geldiklerinde tüm deneyler yapıldı.

Hücrelerin Toplanması ve Dondurulması:

- Büyüme ortamı flasktan uzaklaştırıldı.
- Flask PBS ile yıkandı
- Önceden 37°C'ye ısıtılmış tripsin- EDTA solüsyonu; 25 cm² flask için 1-2 mL, 75 cm² flask için 3-5 mL eklendi.
- Flasklar 37°C'de 4-5 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücreler toplanarak 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve tüplere 5 ml medyum eklendi
- Pellet, önceden 37°C'de inkübe edilmiş büyüme ortamı içerisine uygun miktarda eklendi.
- Hücre süspansiyonu sayıldıktan sonra seyreltme işlemi yapıldı. Hücreler flasklara veya plaklara pasajlandı.
- Dondurulması planlanan hücre süspansiyonuna ise soğuk %95 FBS ve %5 dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edildi.
- Elde edilen süspansiyon cryo tüplere dağıtılarak kademeli olarak donduruldu ve -20°C'de saklandı.
- Süspansiyon, -20°C'de bir saat bekletildikten sonra cryo tüpler 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°C'ye, daha uzun süre depolanacaksa sıvı nitrojene aktarıldı.

Hücrelerin Çözülmesi

- Sıvı nitrojende muhafaza edilmiş hücreler deney zamanı geldiğinde çözülerek kullanıldı.
- -80°C'den alınan cryo tüpler veya sıvı nitrojen hızla 37°C'de çözüldü.
- 4°C'nin üzerindeyken DMSO, hücrelere toksik etki gösterdiğinden 37°C'de hücreleri çözdürürken 120 saniye içerisinde hızlı bir şekilde karıştırıldı.
- Tüp içerisindeki hücre süspansiyonu 15 mL'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10 mL önceden 37°C'de inkübe edilen büyüme ortamı ilave edildi.
- Tüp 1800 rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.

- Santrifüjün ardından tüpün üstündeki süpernatant atıldı.
- Pelet 7 mL büyüme ortamında süspansiyon edildikten sonra 2 adet 25 cm² flaska eşit bir şekilde paylaştırıldı.
- Bu flaskalar, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayılmasında kullanılan yöntem; membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine alarak ölü hücre olarak değerlendirilmeleri, membran bütünlüğünü koruyan hücrelerde ise membrandan boya geçişine izin vermemeleri prensibine dayanır (138). Canlı hücreler mitokondri organelinde enerji üretimi ile aktif taşıma yapabilirler. Canlı hücrelerde hücre membranına giren tripan mavisi boyası aktif taşıma sayesinde hücre dışına atılır ve canlı hücreler renksiz görülür. Ölü hücreler mitokondri organeline sahip olmadığı için, hücre membranında giren tripan mavisi boyası aktif taşıma ile hücre dışına atılamaz ve ölü hücreler mavi renkte görülür. Yapılacak tüm deneylerde belirli sayıdaki hücrelerin flaskalara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir.

- 50 µl İGF hücre süspansiyonu, 1,5 ml'lik bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Ardından, üzerine 50 µl %0,5 Tripan mavisi boyası ilave edildi ve iyice karıştırıldı.
- Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10'ar µl örnek alındıktan sonra özel EVE™ Lamin her iki kuyucuğuna yüklendi (Fotoğraf 3.5).



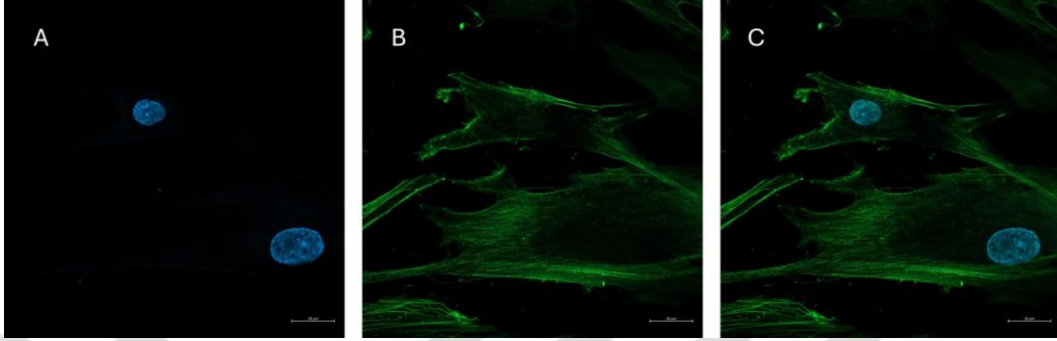
Fotoğraf 3.5 İGF hücrelerinin EVE otomatik hücre sayma aracı ile sayılması

- Hücre sayımı EVE otomatik hücre sayacı kullanılarak yapıldı.
- Tripan mavisi boyasını aktif taşımayla hücre membranında dışarı atan hücreler parlak görünerek canlı kabul edilirken, boyayı içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü olarak kabul edildi.
- 96'lık kuyucuklu plakalara kuyucuk başına $1,1 \times 10^4$ hücre denk gelecek şekilde 100 μ l olarak ekildi (139).

Fibroblastların İmmunofloresan Boyanması

Cam tabanlı petri kaplarına diğ eti dokusundan farklılaştırılan hücreler ekilmiştir. 48 saatlik inkübasyonun ardından medyum çıkarılmış ve hücreler üç kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler daha sonra 15 dakika boyunca %4 paraformaldehit (PFA) ile sabitlenmiştir. Hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra, bloklama solüsyonunda (%3 BSA, %0,1 Sodyum Azid, %0,1 Tween 20) oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler, 488-konjuge phalloidin (Thermo Fisher,

A12379) ile 4°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) eklenmiş ve hücreler 5 dakika daha inkübe edilmiştir. Hücreler; 0,1 Tween 20 içeren PBS ile yıkandıktan sonra, görüntülemeler ZEN BLUE yazılımı ile LSM 800 konfokal mikroskop kullanılarak 20x büyütmede çekilmiştir (Fotoğraf 3.6).



Fotoğraf 3.6 İGF hücrelerinin sitoskeletal yapısının phalloidin boyama ile gözlenmesi. (A) DAPI boyama. (B) Phalloidin boyama. (C) Birleştirme görüntüsü.

3.4 Primer İnsan Gingival Fibroblast Hücre Hattında Hidrojen Peroksit Kullanılarak Hasar Modeli Oluşturulması

Reaktif oksijen türlerinden olan H_2O_2 , İGF hücre serisinde oksidatif stres kaynağı olarak kullanıldı. İGF hücre serisi oluşturmak için, hücrelerin ekimi her bir kuyucuğa yaklaşık 22.000/200µl hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu platelere ekilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası %0.5 FBS içeren fenol redsiz medium içerisinde tekrar 24 saat inkübe edildi.

Biyogüvenlik kabini içerisinde, 102 µl H_2O_2 üzerine 10 ml DMEM eklenerek H_2O_2 çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan ana stok çözeltiden seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda 200, 400, 600, 800, 1000 µM hazırlanan H_2O_2 çözeltileri elde edildi. Çalışmada kullanılan hücreler seri dilüsyonlar şeklinde (200-1000µM) H_2O_2 çözeltisi gruplara ayrılmış hücrelere uygulandı. Hasar modeli için uygun H_2O_2 konsantrasyonunu belirlemek üzere 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.5 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Rosmanol Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda rosmanolün İGF hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Rosmanol için belirli konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M) çözeltiler Dongjun Jiang ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi hazırlanmıştır (131).

İGF hücreleri 96 kuyucuklu platelere ekildi ve deneyde kullanılmak üzere uygun hücre serisi oluşturuldu. Bu hücre serileri %5 CO₂ ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C’ de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası %0.5 FBS içeren fenol redsiz medium ile tekrar 24 saat inkübe edildi. Biyogüvenlik kabini içerisinde, 96 kuyucuklu platelere eşit bir şekilde ekilen İGF hücre serisindeki besiyerinin aspire edilmesinden sonra yerine hücre kontrol, çözücü (DMSO) ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M) rosmanol içeren çözeltiler ilave edildi ve 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, XTT (2,3-bis [2-metoksi-4- nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid tuzu) yöntemi kullanılarak hücre canlılığı analiz edildi.

3.6 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Hasar Öncesi Rosmanol Uygulamasının Etkisinin Değerlendirilmesi

Rosmanolün İGF hücrelerinde oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin belirlenmesi için biyogüvenlik kabini içerisinde 96 kuyucuklu platelere eşit bir şekilde hücreler ekildi. Hücreler, 37 °C’ de 24 saat %0.5 FBS içeren fenol redsiz medium ile %5 CO₂ ve %95 hava içeren etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Ardından hücreler kontrol grubu, medium kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5 μ M) rosmanol uygulanarak 2 saat inkübasyona bırakıldı. 2 saatlik inkübasyonun ardından hücelere 200 μ M konsantrasyonunda H₂O₂ uygulandı ve 22 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Hücre canlılığını belirlemek amacıyla XTT solüsyonu hazırlandı ve uygulandı.

3.7 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Hasar Sonrası Rosmanol Uygulamasının Etkisinin Değerlendirilmesi

Rosmanolün İGF hücrelerinde oksidatif hasarı tedavi edici etkisinin belirlenmesi için, İGF hücreleri biyogüvenlik kabini içerisinde 96 kuyucuklu platelere ekildi. 24 saat sonra %0.5 FBS içeren fenol redsiz medium içerisinde tekrar 24 saat inkübe edildi. Hücrelere 200 µM konsantrasyonunda H₂O₂ çözeltisi uygulandı ve hücreler 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 2 saatlik inkübasyondan sonra 0.1, 0.5, 1, 5 µM konsantrasyonlarında rosmannol çözeltileri hücrelere uygulandı ve 22 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından XTT çözeltisi hazırlandı ve hücre canlılıkları değerlendirildi.

3.8 Hücre Proliferasyon Canlılık Testi (XTT)

Çalışmamızda hücre canlılığını değerlendirmede günümüzde en sık kullanılan yöntemlerden biri olan XTT yöntemi kullanılmıştır. XTT yöntemi, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazları tarafından tetrazolyum tuzunun formazana dönüşümü ve bu ürün miktarının spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. XTT yöntemi, güvenilir olduğu gibi hızlı bir yöntem olarak kabul edilir (140). Bu çalışmada çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan rosmannolün farklı uygulamalarla İGF hücre canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, İGF hücreleri DMEM besiyerinde her kuyucukta 1x10⁴ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere ekilmiştir. 24 saat sonra plakalarındaki besiyeri uzaklaştırılmış ve fenol red içermeyen DMEM içerisinde dilüe edilmiş rosmannol hücrelere 24 saat boyunca uygulanmıştır. Kültür süresi dolduktan sonra hücrelere XTT (Cell Proliferation Kit II) solüsyonu eklenmiş ve dört saat boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda, 450 ve 620 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Kontrol hücrelerinden (rosmannol içermeyen kuyucuklar) elde edilen absorbans değeri %100 kabul edilerek, diğer örneklerin absorbans değerlerine göre canlılık değerleri hesaplanmıştır. Yüzde Canlılık = [Örnek ABS ortalama / Kontrol ABS ortalama] x 100 formülü kullanılarak belirlenmiştir.

3.9 İstatiksel Analiz

Analiz öncesi verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile belirlendi. Rosmanolün ve H₂O₂'in tek başına hücre canlılığına etkisi çalışma verilerinin normal dağılım göstermediği tespit edildi. Transformasyon ile de normal dağılım sağlanamadı ve non-parametrik istatistiksel analiz yöntemlerinden Kruskall Wallis test ile veriler analiz edildi. Post-hoc test olarak Mann Whithney U testi kullanılarak bütün gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve Bonferroni düzeltmesi yapıldı.

Rosmanolün koruyucu olarak kullanıldığı çalışmada verilerinin normal dağılım göstermediği tespit edildi. Log_e transformasyonu verilerin normal dağılıma uyumluluğu için yeterli oldu. Log_e transformasyonu sonucu elde edilen veriler grup karşılaştırması için tek yönlü varyans analizine tabi tutuldu. Post-hoc test olarak Dunnet testi kullanılarak bütün gruplar H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı.

Rosmanolün tedavi edici olarak kullanıldığı çalışmada verilere gruplardaki varyans homojenliğini sağlamak için Log_e transformasyonu uygulaması yapıldı. Log_e transformasyonu sonucu elde edilen veriler grup karşılaştırması için tek yönlü varyans analizine tabi tutuldu. Post-hoc test olarak Dunnet testi kullanılarak bütün gruplar H₂O₂ grubu ile karşılaştırıldı.

$P < 0.05$ istatistiksel anlamlılık seviyesi olarak belirlendi. İstatistiksel analizlerde R (version 4.3.0) yazılımı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Hasar Modeli Oluşturulacak H₂O₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İGF hücrelerinde oksidatif hücre hasarı modeli oluşturmak için H₂O₂; 200, 400, 600, 800 ve 1000 µM konsantrasyonlarında uygulandı. Uygulanan tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0.01$) (Şekil 4.1). 200 µM H₂O₂ konsantrasyonu uygulanan İGF hücrelerinde yaklaşık %53 hücre canlılığı tespit edildi. 400, 600, 800 ve 1000 µM konsantrasyonlarında H₂O₂ İGF hücrelerinde %35 ve daha az hücre canlılığı gösterdiğinden, hasar modeli oluşturmak için uygun H₂O₂ konsantrasyonu 200 µM olarak seçilmiştir (Tablo 4.1).

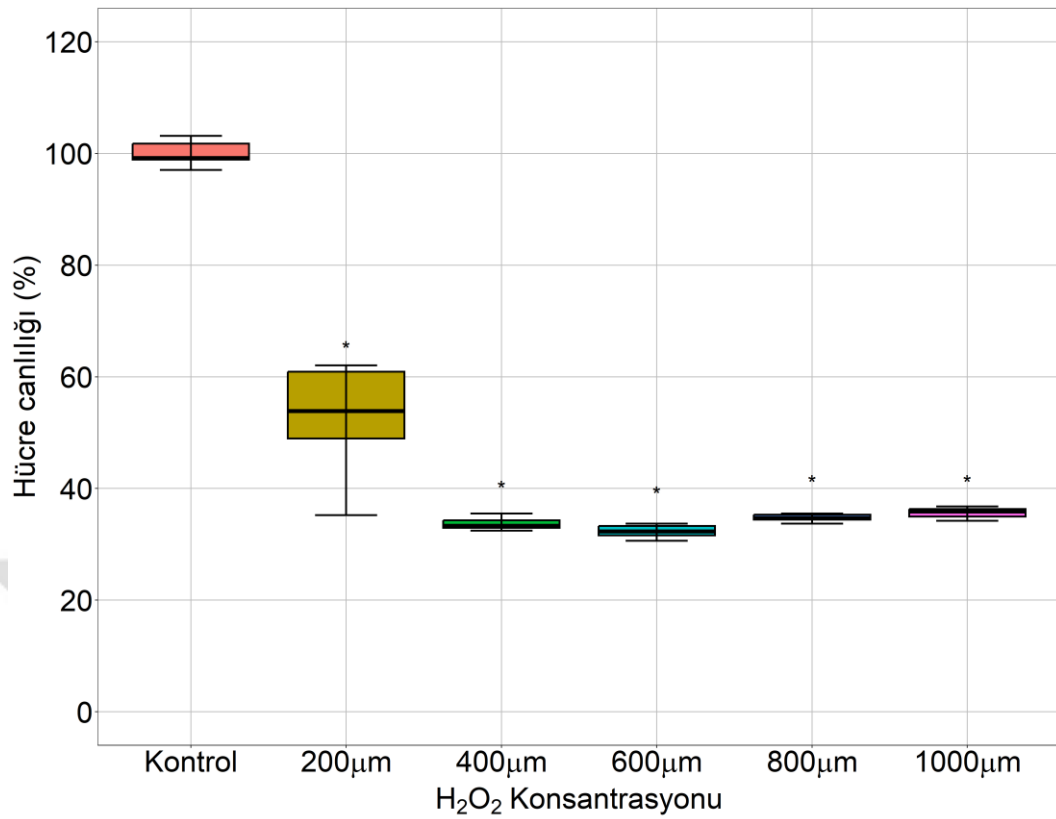
Tablo 4.1 İGF hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ile oluşturulan hasar modelinde XTT testi ile ölçülen canlılık değerlerinin (%) karşılaştırılması

Grup	N	Hücre canlılığı (%) Ortanca (Min-Maks)
Kontrol	8	99.20 (97.03-103.16)
200 µM H ₂ O ₂	8	53.88 (35.24 - 62.05)*
400 µM H ₂ O ₂	8	33.32 (32.43 - 35.49)*
600 µM H ₂ O ₂	8	32.30 (30.64 - 33.71)*
800 µM H ₂ O ₂	8	34.73 (33.71 - 35.49)*
1000 µM H ₂ O ₂	8	35.88 (34.22 - 36.77)*
<i>p</i>		<0.01

P değeri Kruskal Wallis testi sonucu elde edildi.

*: Grupların kontrol grubuyla post-hoc test karşılaştırılmasında Bonferoni düzeltilmeli Mann Whitney u testi kullanıldı. **' olan grupların kontrol grubuyla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. ($p < 0.01$)

H₂O₂: Hidrojen peroksit, µM: Mikromolar



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'nin İGF hücrelerinde hücre canlılığı (%) üzerine etkisi

P değeri Kruskal Wallis testi sonucu elde edildi.

*: Grupların kontrol grubuyla post-hoc test karşılaştırılmasında Bonferoni düzeltilmeli Mann Whitney u testi kullanıldı. **' olan grupların kontrol grubuyla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. (p < 0.01)

H₂O₂: Hidrojen peroksit, µM: Mikromolar

4.2 İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Rosmanol Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

Rosmanolün İGF hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisini görmek için İGF hücrelerine tek başına farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µM) rosmanol uygulanmıştır. 0.1, 0.5 µM ve 1 µM rosmanol konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında istatistiksel anlamlı bir fark görülmezken (p < 0.01), artan rosmanol konsantrasyonlarının her birinde kontrol grubuna göre hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (p < 0.01) (Şekil 4.2). Çalışmamızda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde etkilemeyen 0.1, 0.5 ve 1 µM rosmanol konsantrasyonları ile sitotoksitenin ilk görülmeye başlandığı 5 µM rosmanol konsantrasyonu, İGF

hücrelerinde oksidatif hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin değerlendirilmesi için seçilmiştir (Tablo 4.2).

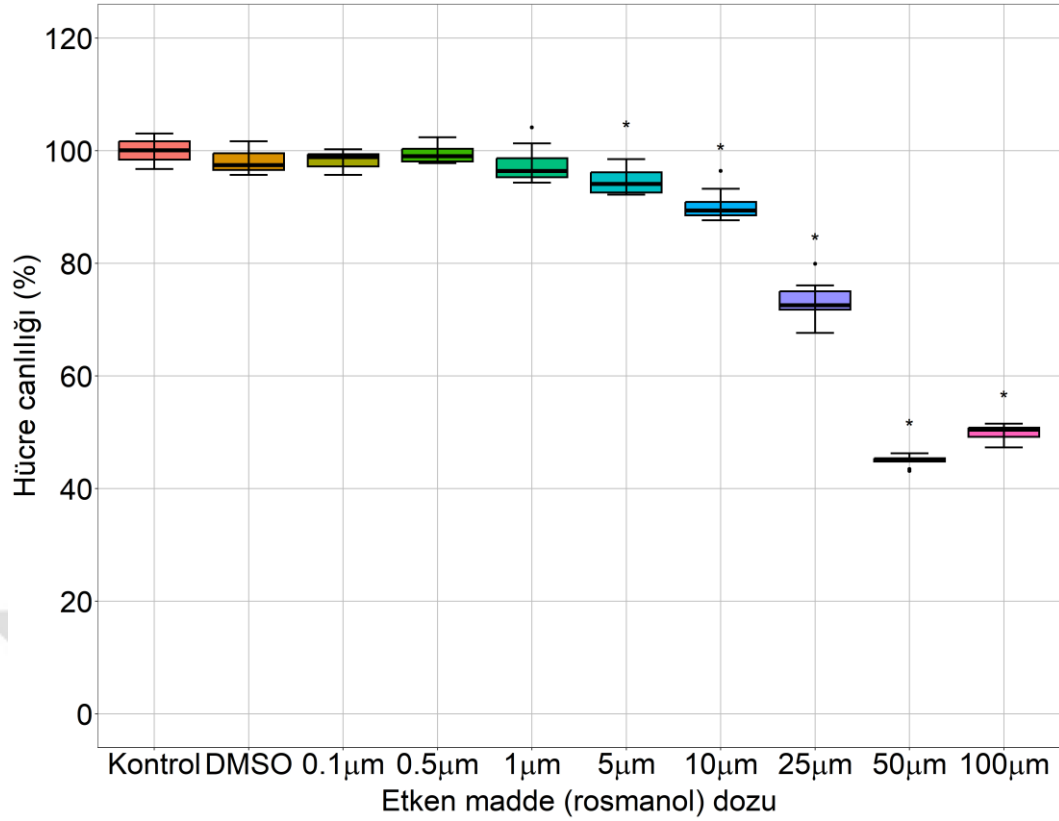
Tablo 4.2 İGF hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda rosmanolün hücre canlılığına (%) etkisinin karşılaştırılması

Grup	N	Hücre canlılığı (%) Ortanca (Min-Maks)
Kontrol	8	100.09 (96.76-103.07)
DMSO	8	97.46 (95.71 -101.67)
0,1 µM rosmanol	8	98.86 (95.71-100.26)
0,5 µM rosmanol	8	99.04 (97.81 -102.37)
1 µM rosmanol	8	96.41 (94.30-104.12)
5 µM rosmanol	8	94.13 (92.20 -98.51)*
10 µM rosmanol	8	89.40 (87.64 -96.41)*
25 µM rosmanol	8	72.57 (67.66 -79.93)*
50 µM rosmanol	8	45.22 (43.12 -46.28)*
100 µM rosmanol	8	50.48 (47.33 -51.53)*
<i>p</i>		<0.01

P değeri Kruskal Wallis testi sonucu elde edildi

*: Grupların kontrol grubuyla post-hoc test karşılaştırılmasında Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney u testi kullanıldı. '**' olan grupların kontrol grubuyla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.(p < 0.01)

µM: Mikromolar, DMSO: dimetil sülfoksit



Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda rosmanolün İGF hücrelerinde hücre canlılığı (%) üzerine etkisi

P değeri Kruskal Wallis testi sonucu elde edildi

*: Grupların kontrol grubuyla post-hoc test karşılaştırılmasında Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney u testi kullanıldı. ** olan grupların kontrol grubuyla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. ($p < 0.01$)

µM: Mikromolar, DMSO: dimetil sülfoksit

4.3 Rosmanolün İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkisi

Oksidatif hasar modeli oluşturulan İGF hücrelerinde rosmanolün profilaktik etkisini incelemek amacıyla, hücrelere 200 µM H₂O₂ uygulamasından 2 saat önce farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1 ve 5 µM) rosmanol uygulaması yapıldı. Tüm konsantrasyonlarda H₂O₂ grubuna kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak artış tespit edildi ($P < 0.01$). 0.1 µM ve 0.5 µM rosmanol H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasara karşı sırasıyla %2.5 ve %2.6 hücre hasarını azaltmıştır. 1 µM ve 5 µM rosmanol konsantrasyonu ise hücre hasarını sırasıyla %4.5 ve %7.2 azaltmıştır (Tablo 4.3)(Şekil 4.3).

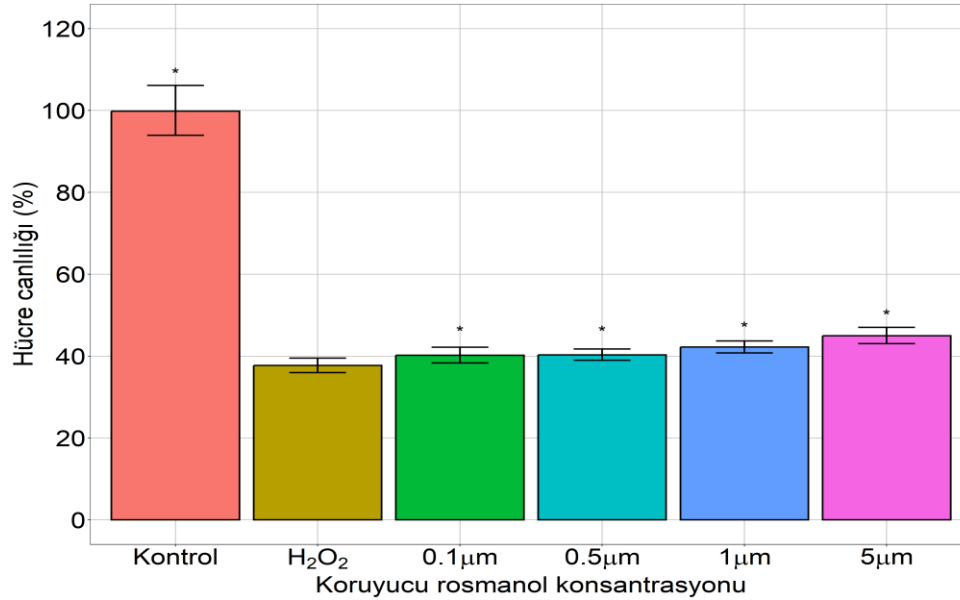
Tablo 4.3 Oksidatif stres oluşturmada önce farklı konsantrasyonlarda rosmanol uygulamasının İGF hücrelerinin hücre canlılığına (%) etkisinin karşılaştırılması

Grup	N	Hücre canlılığı (%)
		Geometrik ortalama (-1SS - +1SS)
Kontrol	8	99.84(93.93-106.12)*
200 µM H ₂ O ₂	8	37.70(35.97-39.52)
0,1 µM rosmanol + 200 µM H ₂ O ₂	8	40.22(38.35-42.18)*
0,5 µM rosmanol + 200 µM H ₂ O ₂	8	40.32(38.96-41.72)*
1 µM rosmanol + 200 µM H ₂ O ₂	8	42.23(40.79-43.72)*
5 µM rosmanol + 200 µM H ₂ O ₂	8	44.99(43.04-47.02)*
<i>p</i>		<0.01

P değeri transforme edilmiş(Log_e) veriler üzerinde tek yönlü varyans analizi sonucu elde edilmiştir.

*: Grupların H₂O₂ grubuyla post-hoc test karşılaştırılmasında Dunnet testi kullanıldı. '**' olan grupların H₂O₂ grubuyla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. ($p < 0.01$)

µM: Mikromolar, H₂O₂: Hidrojen peroksit



Şekil 4.3 İGF hücrelerinde oksidatif hasar oluşturmada önce farklı konsantrasyonlarda rosmanol uygulamasının hücre canlılığına (%) etkisi

P değeri transforme edilmiş(Log_e) veriler üzerinde tek yönlü varyans analizi sonucu elde edilmiştir.*:

Grupların H₂O₂ grubuyla post-hoc test karşılaştırılmasında Dunnet testi kullanıldı. '**' olan grupların H₂O₂ grubuyla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. ($p < 0.01$) µM: Mikromolar, H₂O₂: Hidrojen peroksit

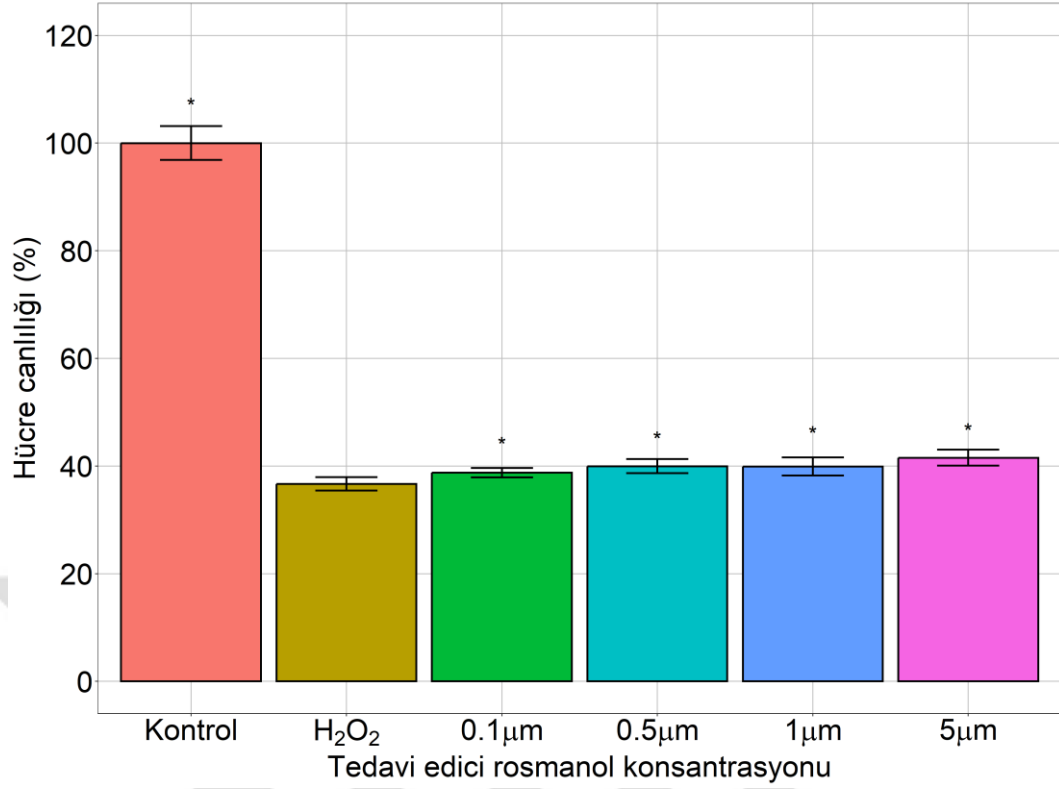
4.4 Rosmanolün İnsan Gingival Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Hasarı Tedavi Edici Etkisi

Oksidatif hasar modeli oluşturulan İGF hücrelerinde rosmanolün tedavi edici etkisini incelemek amacıyla hücrelere 200 µM H₂O₂ uygulamasından 2 saat sonra farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1 ve 5 µM) rosmanol uygulaması yapıldı. Tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığında H₂O₂ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($P < 0.01$). 200 µM H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasara karşı 0.1 µM rosmanol %2.1, 0.5 µM rosmanol %3.3, 1 µM rosmanol %3.23 ve 5 µM rosmanol %4.87 oranında hücre hasarını azalttı (Tablo 4.4)(Şekil 4.4).

Tablo 4.4 Oksidatif stres oluşumu sonrası farklı konsantrasyonlarda rosmanol uygulamasının İGF hücrelerinin hücre canlılığına (%) etkisinin karşılaştırılması

Grup	N	Hücre canlılığı (%) Geometrik ortalama (-1SS - +1SS)
Kontrol	8	99.96(96.86-103.16)*
200 µM H ₂ O ₂	8	36.66(35.46-37.94)±1.26
200 µM H ₂ O ₂ + 0,1 µM rosmanol	8	38.76(37.88-39.66)*
200 µM H ₂ O ₂ + 0,5 µM rosmanol	8	39.96(38.68-41.29)*
200 µM H ₂ O ₂ + 1 µM rosmanol	8	39.89(38.23-41.62)*
200 µM H ₂ O ₂ + 5 µM rosmanol	8	41.53(40.08-43.04)*
<i>p</i>		<0.01

P değeri transforme edilmiş(Log_e) veriler üzerinde tek yönlü varyans analizi sonucu elde edilmiştir.*: Grupların H₂O₂ grubuyla post-hoc test karşılaştırılmasında Dunnet testi kullanıldı.*' olan grupların H₂O₂ grubuyla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.($p < 0.01$) µM: Mikromolar, H₂O₂: Hidrojen peroksit



Şekil 4.4 İGF hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası farklı konsantrasyonlarda resmanol uygulamasının hücre canlılığına (%) etkisi

P değeri transforme edilmiş(Log_e) veriler üzerinde tek yönlü varyans analizi sonucu elde edilmiştir.

*: Grupların H₂O₂ grubuyla post-hoc test karşılaştırılmasında Dunnet testi kullanıldı. '**' olan grupların H₂O₂ grubuyla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. ($p < 0.01$) µM: Mikromolar, H₂O₂: Hidrojen peroksit

5. TARTIŞMA

Bilgilerimiz dahilinde bu çalışma, hücre kültürü ortamında İGF hücrelerinde rosmanolün hücre canlılığı üzerine etkisini ve H₂O₂ ile indüklenen oksidatif hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızda İGF hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar öncesi farklı konsantrasyonlarda (0.1-5 µM) rosmanol uygulandığında hücre hasarını %2.5-7.2 oranında azalttığı görüldü. İGF hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar sonrası farklı konsantrasyonlarda (0.1-5 µM) rosmanol uygulandığında ise, hücre hasarını %2.1-4.9 oranında azalttığı görüldü. Oksidatif hasar oluşturulmadan uygulanan rosmanol konsantrasyonlarında (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µM) kontrol grubuyla kıyaslandığında 0.1 ve 0.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığında istatistiksel fark gözlenmezken artan konsantrasyonlarda hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü. Çalışmamızda İGF hücrelerine H₂O₂ uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilirken uygulanacak rosmanol konsantrasyonları hücre canlılığında azalmanın olmadığı 0.1, 0.5, 1 µM ve sitotoksitenin ilk görüldüğü konsantrasyon olan 5 µM rosmanol seçilmiştir.

Çalışmamızda İGF hücrelerine farklı konsantrasyonlarda rosmanol uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada, oksidatif stres oluşturulup kısmen periodontitisteki enflamasyonun modellendiği gingival fibroblast hücrelerinde rosmanolün geniş doz aralığındaki etkisi incelenmiştir. Çalışmamızda peridontal tedavide terapötik bir ajan olarak kullanılması araştırılan rosmanolün insan diş eti bağ dokusundan elde edilen fibroblastlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. Fibroblast hücreleri, periodontal yumuşak dokulardaki baskın hücrelerdir ve diş eti bağ dokusunun %65'ini oluştururlar (145). Bir bariyer görevi görerek periodontal dokuların korunmasının yanısıra, bu dokuların yeniden şekillendirilmesi ve onarımında görev alırlar. Ayrıca enflamasyon ve enfeksiyonun etkilerini kontrol ederler (146). Diş eti dokusundan fibroblast elde etme süreci, bağ dokusu içinde epitel hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerini içeren diş eti yapısının karmaşık doğası nedeniyle zorluklar arz etmektedir. Diş eti fibroblastları genellikle hücre dışı matris içine gömülüdür ve bu da izolasyonu diğer dokulardaki fibroblastlara kıyasla daha zor hale getirir (141). Bu

fibroblastlar yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve doku homeostazının korunması için çok önemlidir (5). Çalışmamızda diş eti kaynaklı hücrelerin morfolojisini ve hücre iskeleti organizasyonunu incelemek için F-aktin boyaması kullanılmıştır. Aktinin iplikli formu olan F-aktin, hücre iskeletinin temel bir bileşenidir, yapısal bütünlük sağlar ve göç, bölünme ve yapışma gibi hücresel süreçleri kolaylaştırır (142). F-aktin boyaması, hücre morfolojisini ve hücre iskeleti düzenlemelerini görselleştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (143). Bu çalışmada, doku eksplantlarından izole edilen gingival fibroblastlar, F-aktin filamentlerine seçici olarak bağlanan ve hücre iskeleti yapısının ayrıntılı olarak gözlemlenmesini sağlayan phalloidin kullanılarak boyanmıştır. Hücrelerin iyi tanımlanmış aktin filamentleri sergilediği görülmüş ve bu da işlevsel bir hücre iskeletinin varlığını doğrulamıştır. Aktin filamentleri, hücre yayılması ve bağlanmasının açık göstergeleriyle yapısal destek sağlayan bir ağ oluşturmuştur. Bu boyama modeli, diş eti fibroblastlarının izolasyon ve kültürden sonra bile normal işlevleri için çok önemli olan temel hücre iskeleti bileşenlerini koruduğunu göstermektedir. Bu bulgular, göç ve mekanik stabilite gibi hücresel işlevlerin sürdürülmesinde F-aktinin önemini vurgulayan önceki çalışmalarla tutarlıdır (144). Aktin hücre iskeletinin net bir şekilde görüntülenmesi, diş eti dokusundan izole edilen fibroblastların işlevsel olduğu ve çalışmamızın daha ileriki aşamaları için kullanılabileceğini göstermektedir. Fibroblastlar başlıca diş eti ve periodontal ligament olmak üzere ağız içinde birçok kaynaktan elde edilebilir. Periodontal ligamentten elde edilen fibroblastlar diş çekimi sonrası kök kısmının hassas bir biçimde biyopsisi ile elde edilir. Diş eti fibroblast hücreleri, periodontal ligament fibroblast hücrelerine göre kültür şartlarına daha kolay adapte olur ve daha hızlı proliferasyon gösterir. Bu nedenle çalışmamızda rosmanolün periodontal tedavide terapötik ajan olarak etkisini incelemek üzere diş eti fibroblast hücreleri seçilmiştir.

Son yıllarda oksidatif stres birçok enflamatuar hastalığın ilerlemesindeki merkezi rolleri nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmektedir (147). Periodontal dokularda patojenik biyofilm tarafından enflamasyonun başlamasının ardından nötrofiller, fagositoz sırasında NADPH oksidaz tarafından katalize edilen “solunum patlaması” adı verilen metabolik yolla O_2 üretirler (78). O_2 , fagozomal ve hücre dışı ortama salınabilir ve daha sonra H_2O_2 , $HOCl$, OH^- ve 1O_2 gibi farklı radikal ve radikal olmayan türevlere dönüştürülebilir (68). Artan ROT seviyeleri veya

aktiviteleri antioksidan savunma sistemi tarafından dengelenemez ve bu da oksidatif strese ve periodonsiyumda doku hasarına yol açar (148).

Çalışmamızda İGF hücrelerinde periodontal hastalıklardaki enflamasyon modelini oluşturmak için, oksidatif stres mekanizmasının ürünü olan H_2O_2 uygulanmıştır. 200, 400, 600, 800, 1000 μM konsantrasyonda uygulanan H_2O_2 'nin hücre canlılığı üzerine etkisine bakıldığında 200 μM konsantrasyondaki H_2O_2 %52 hücre canlılığı göstermiştir. 400, 600, 800 ve 1000 μM konsantrasyondaki H_2O_2 hücre canlılığını %35 ve altındaki değerlere kadar azalttığı için çalışmamızda oksidatif hasar modeli oluşturmak için uygulanacak H_2O_2 konsantrasyonu 200 μM olarak seçilmiştir.

Periodontal hastalıklar, dünya çapında yetişkin nüfusun yaklaşık %50'sini etkileyen en yaygın ağız hastalıklarından biridir (1). Periodontal hastalıkların sebebi birden fazla etkenle ilişkili olsa da primer etiyolojik faktör mikrobiyal dental plaklıdır. Dental plakla ilişkili mikrobiyal enfeksiyondan sonra ilk enflamatuvar yanıt, sitokinler ve kemokinler yoluyla bağışıklık sistemini aktive eder (2). Nötrofil hücreleri bakteriyel enfeksiyona karşı bağışıklık sisteminin ilk savunma hattıdır ve enfeksiyon bölgesinde ROT dahil olmak üzere çeşitli toksik ürünler üretirler (145). Bu durum oksidan ve antioksidan sistem arasındaki dengeyi bozarak oksidatif strese neden olmaktadır (70). Düşük konsantrasyonlarda ROT, diş eti fibroblastlarının ve epitel hücrelerinin büyümesini uyarırken, daha yüksek konsantrasyonlarda oksidatif stresi artırır. Yüksek konsantrasyonlarda ROT, serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatır ve inflamatuvar yanıtların artmasına ve periodontal doku hasarına neden olur (4).

Günümüzde periodontal hastalıkların tedavisi için çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. Periodontal hastalıkların etiyolojisinde rol oynayan dental plağın ve diş taşlarının uzaklaştırılmasını amaçlayan diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi periodontal tedavinin temelini oluşturur. Bu işlemler periodontal tedavide etkili yöntemler olsa da derin cepler, furkasyon defektleri, kemik içi cep varlığı gibi bazı durumlarda başarı şansı düşmektedir (37, 47). Başarıyı arttırmak için cerrahi olmayan periodontal tedaviye ek yardımcı antibiyotikler ve antienflamatuvar ilaçlar kullanılabilir. Klinikte kullanılan antibakteriyel ilaçlar arasında klorheksidin, lokal antibiyotikler (minosiklin hidroklorür,

metronidazol, doksisisiklin, vb.) yer alır (10, 145-147). Klorheksidinin antimikrobiyal etkinliği birçok sistematik incelemeler ve meta-analizlerle doğrulanmış olmasının yanısıra (148-150), diş yüzeyinde sarı-kahverengi lekelenme, tat duyusunda değişiklik, yanma hissi, ağız yumuşak dokularında ağrı ve kuruluk, dişeti mukozasında deskuamatif lezyonlar ve ülserasyonlar ve supragingival diş taşı oluşumunda artış gibi yan etkilere sahiptir (151). Bununla birlikte, periodontal hastalıkların tedavisinde kullanılan lokal antibiyotiklere uzun süreli maruz kalma ve/veya aşırı kullanım, çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gelişimine neden olabilir. Çeşitli ticari ilaçların sistemik kullanımının, hastalarda ciddi yan etkilere neden olduğu da bilinmektedir (11).

Son yıllarda periodontal hastalığın tedavisinde doğal bitki içerikleri, düşük yan etkileri, düşük maliyetleri ve kabul edilebilir geniş aralıkları nedeniyle araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (21). Aromatik bitkiler tarafından üretilen uçucu yağlar; antioksidan, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, antikarsinojenik, antimikotik ve anti paraziter etkiler göstermektedir (145). Genel olarak aromatik bitki özleri; fenolik asit, diterpenler, flavonoidler gibi antioksidan bileşenler açısından zengindir (146). Nieto ve ark.,'nın yaptığı çalışmada özellikle *Lamiaceae* ailesinden kekik, biberiye, adaçayının antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (147).

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da biberiye, antioksidan olarak kullanılmak üzere ticari olarak temin edilebilen bir baharattır (148). Alzheimer hastalığı için terapötik potansiyeli ve antianjiyojenik etkisi nedeniyle hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (149). Öte yandan, oksidasyonu ve mikrobiyal kontaminasyonu önledikleri için gıdaları muhafaza etmek için de kullanılmaktadır (24, 147, 150). Aleksandar Rašković ve ark., farelerden elde ettikleri karaciğer dokularında biberiyeden elde edilen uçucu yağı kullanarak antioksidan enzim aktivitesini değerlendirmişlerdir. Çalışmada, serbest radikal temizleme aktivitesi gösteren biberiye uçucu yağı uygulamasının, lipid peroksidasyonunun sınırlayarak farelerde karbon tetraklorür 4(CCl₄) kaynaklı hepatotoksisteyi önlemede etkili olduğunu göstermektedir Biberiyenin ağız içi dokularda antioksidan özellikler gösterdiği bir çalışmaya literatürde rastlanmasa da antiplak ve antienflamatuvar özellikler gösteren klinik çalışmalar mevcuttur. Andreas ve ark., diş yüzeyi

temizliği ve kök yüzeyi dzleştirmesi yaptıkları periodontitisli hastalarda tedaviyi takiben biberiye içerikli esansiyel yağ ile gargaranın etkinliğini araştırdılar. Araştırma sonuçları cep derinliğinde azalma ve ataşman kazanımında 0,2 mm' lik farklar ortaya koymuştur. Ağız gargarası kullanımından 3 ay sonra *F. nuclueatum* seviyelerinde belirgin azalma tespit edilmiştir (142). Saman ve ark.,' larının gingivitis olan hastalarda biberiye içerikli gargara ve klorheksidin içerikli gargara kullanımını içeren çalışmada; 14 günün sonunda diş eti kanama indeksi ve plak indeksinde grup içinde istatikselsel olarak anlamlı iyileşmeler gözlemlenirken, gruplar arasında istatikselsel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır (143).

Biberiye'nin içeriğinde yer alan sıklık diterpen difenollerden karnosik asit, karnosol ve rosmanol biberiye'nin antioksidan özelliğini sağlamada en çok katkıda bulunan bileşenlerdir (151). Lliger ve ark.,'nın yaptığı çalışmada karnosik asit ve karnosolün peroksit radikalinin temizlenmesinde etkili oldukları bulunmuştur (152). Chen ve ark.,'ı yaptıkları çalışmalarda karnosik asit ve karnosolün lipit peroksidasyonunu etkileyerek sentetik antioksidanlara göre daha etkili antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (137). Inatani ve ark., rosmanolün hem linoleik asitte hem de domuz yağında sentetik antioksidanlardan dört kat daha yüksek bir antioksidan kapasite gösterdiğini bildirmiştir (114).

Rosmanol yüksek antioksidan, anti-enflamatuar ve anti-tümörojenik aktiviteye sahip olduğundan birçok kanser ve enflamatuar hastalığın tedavisi için yapılan araştırmalarda kullanılmıştır (131, 137, 151) Literatür incelendiğinde kanserli hücre hattı ve normal hücre hatlarında rosmanolün etkisini değerlendiren çalışmalar görülmektedir. Her iki hücre tipinde de geniş doz aralıklarında rosmanolün etkisine bakılmıştır. İGF hücrelerinde rosmanolün hücre canlılığı üzerine etkilerine bakmak için çalışma tasarımı oluşturulurken 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonları seçilmiştir. Araştırmamızda rosmanolün hangi konsantrasyonlarda uygulanacağının belirlenmesinde Dongjun Jiang ve arkadaşlarının çalışması rehberlik etmiştir. Rosmanolün meme kanseri ve normal meme hücresi üzerindeki sitotoksitesini belirlemek amacıyla ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılmıştır. Hücreler 0.6, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µM rosmanol ile inkübe edilmiştir. Rosmanolün normal meme hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi

olmamıştır (131). Bu çalışmadaki konsantrasyonlar çalışmamızla benzerdir. Donjung ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak, çalışmamızda rosmanolün 0.1-100 μ M aralığında 8 farklı konsantrasyonu uygulanmıştır ve 5 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda İGF hücrelerinde hücre canlılığında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Sonuçlarımızdaki bu farklılık uyguladığımız hücre tiplerinin kaynak, köken ve fonksiyon bakımından farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ching-Shu Lai ve ark.,; yaptıkları çalışmada, fare makrofajlarında rosmanolün kullanımı ile enflamatuar hastalıklarla ilişkili olabilecek enflamasyon faktörlerini azalttığını göstermişlerdir. Fare makrofajlarından türetilen RAW 264.7 hücreleri LPS ile enflamasyon modeli oluşturulduktan sonra; 1, 2.5, 5, 10 μ M rosmanol uygulanmıştır. Prostaglandin ve nitrit seviyeleri incelendiğinde, iNOS ve COX-2 gen ekspresyonunu ve bu moleküllerin ürünleri olan NO, PGE2 ve NF- κ B alt biriminin translokasyonunu azalmasında etkili olduğu bulunmuştur (29). Fare makrofajında enflamasyon faktörlerini azaltan rosmanol konsantrasyonları çalışma tasarımıımızdaki rosmanol konsantrasyonlarıyla benzerdir. Periodontal hastalıklarda enflamasyonla ilişkili oksidatif stresin İGF hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkilerini görebilmek için H₂O₂ ile oksidatif hasar modeli oluşturulmuştur. Ardından uygulanan 4 farklı rosmanol konsantrasyonunun hücre hasarını azalttığı tespit edilmiştir.

Romatoid artrit modeli oluşturulan farelerin tedavisinin karnosol ve rosmanol ile yapıldığı bir çalışmada, rosmanol ve karnosolün enflamasyonu inhibe ederek sinerjik olarak romatoid artrit semptomlarından kızarıklık, şişlik, sinoviti hafiflettiği görülmüştür. Farelerde kolajen kaynaklı artrit modeli oluşturmak için sığır tip 2 kolajeni uygulaması yapılarak, farelerde enflamasyon modeli oluşturulmuştur. Rosmanol, karnosol ile tedavi edilen gruplar ve kombinasyonla tedavi edilen farelerde serum TNF- α , IL-6 ve MCP-1 düzeyleri önemli ölçüde azaldı. Sonuçlar rosmanol ve karnosolün anti- enflamatuar ajan olarak kullanılabileceğini destekler niteliktedir (136). Bu çalışmanın bulguları, bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Çalışmamızda rosmanol uygulanan gruplarda hücre hasarının azalmasında rosmanolün belirtilen antienflamatuar özelliklerinin etkisi olabileceği düşünülmektedir. Hücre hasarının azalmasının altında yatan

mekanizmaların aydınlatılması için enflamasyon yollarının ve proenflamatuvar sitokin seviyelerinin incelenmesi gerekmektedir.

Biberiye diterpenlerinden karnosik asit, oksijen varlığında kolayca rosmanol ve karnosole dönüşür ve bu bileşiklerin kimyasal yapısı birbirine benzerdir (25). Literatür incelendiğinde rosmanolün daha farklı hücre tiplerinde çalışmasına rastlanmadığından karnosik asitin etkilerini inceleyen çalışmalara tartışmamızda yer verilmiştir.

Ikuko ve ark., insan periodontal ligament hücrelerinde karnosik asitin sitotoksik etkisi incelendiğinde 25 μ M karnosik asitin herhangi bir sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Ardından insan periodontal ligament hücreleri, IL-1 β veya TNF- α ile inkübasyondan önce 3.125, 6.25, 12.5 ve 25 μ M karnosik asit ile inkübe edilmiştir. Çalışma, IL-1 β ile uyarılan insan periodontal ligament hücrelerinde tüm konsantrasyonlarda; karnosik asitin IL-6, kemokin ligandı(CXCL)10 ve kemokin ligandı(CCL)2 üretimini inhibe edebileceğini göstermiştir. TNF- α ile uyarılan insan periodontal ligament hücrelerine uygulanan tüm karnosik asit konsantrasyonlarında, konsantrasyona bağımlı bir şekilde IL-6, CXCL10 ve CCL2 üretimini önemli ölçüde azalttığını gösterir (128). Çalışmamızda geniş doz aralığında rosmanolü uyguladığımızda 5 μ M ve artan konsantrasyonlarda İGF hücrelerinde sitotoksikite tespit edilmiştir. İGF hücrelerinde önce rosmanol uygulayarak sonrasında hasar modeli oluşturduğumuz ve koruyucu etkiye baktığımız çalışmamızın verileri bu çalışma ile uyumludur. Uyguladığımız tüm rosmanol konsantrasyonlarının İGF hücrelerinde hücre hasarını azaltan etkileri tespit edilmiştir.

Ikuko ve ark., oral epitel hücrelerinde interlökin(IL)27 ile ilişkili kemokin ligandı 3 (CXCR3)'ün periodontal hasara neden olan T lenfositlerin birikimini arttırdığını göz önünde bulundurarak karnosik asitin IL-27 ve CXCR3 seviyelerini azalttığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada insan oral epitel hücreleri IL-27 ile inkübasyondan önce 3.125, 6.25, 12.5, 25 veya 50 μ M karnosik asit ile inkübe edilmiştir. Uygulanan tüm konsantrasyonlarda karnosik asit CXCR3 ligandını konsantrasyona bağımlı azaltmıştır (127). Bu çalışmada karnosik asitin oral epitel hücrelerinde kullanımının enflamasyon faktörlerini azalttığı göz önünde bulundurulursa, rosmanolün İGF hücrelerinde oksidatif hasar öncesi kullanımını ile

elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur. 0.1, 0.5, 1 ve 5 μ M konsantrasyonda uygulanan rosmanol konsantrasyonlarında İGF hücrelerinde hücre hasarını azalttığı tespit edilmiştir.

Bilgilerimiz dahilinde bu çalışma; yüksek antioksidan, anti-enflamatuar ve anti-tümörojenik aktiviteye sahip olduğu araştırılmış rosmanolün İGF hücrelerinde oksidatif hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, rosmanolün periodontitis gibi oksidatif stres kaynaklı enflamasyonların ve neden olduğu doku hasarlarının önlenmesinde ve tedavisinde kullanımı açısından umut vericidir. Elde ettiğimiz sonuçlar umut verici olsa da çalışmamızın limitasyonlar mevcuttur. İleri moleküler verilere bakılamamış olması (TAOS, enflamatuar belirteç seviyeleri vs.) çalışmamızın kısıtlamalarındandır. Bu çalışma yalnızca in vitro ortamda gerçekleştirildiği için, klinik koşullardaki pek çok değişkenin etkisi göz önünde bulundurulamamış ve bu nedenle elde edilen sonuçlar sınırlı bir anlam taşıyabilir. Çalışmamızın bulgularını daha sağlam bir şekilde destekleyecek ileri düzey in vitro deneyler, hayvan çalışmaları ve klinik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda, uygulanan rosmanol konsantrasyonlarında 0.1, 0.5, 1 μM konsantrasyonda rosmanol hücre canlılığında azalma göstermemiştir. 5, 10, 25, 50, 100 μM konsantrasyonda uygulanan rosmanol İGF hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir.
2. İnsan gingival fibroblast hücre hattında hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif stresin öncesinde ve sonrasında uygulanan rosmanol, hücre canlılığını destekleyerek koruyucu ve tedavi edici etki göstermiştir.
3. Bu in vitro çalışma, rosmanolün terapötik bir ajan olarak geliştirilmesine yönelik bir ön araştırma niteliğindedir. Elde ettiğimiz sonuçlar rosmanolün periodontal hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanımı açısından umut verici olmakla birlikte, periodontal ligament hücre hattında yapılacak in vitro çalışmalar, hayvan çalışmaları ve klinik araştırmalar gibi ileri araştırmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.

1. Eke P, Zhang X, Lu H, Wei L, Thornton-Evans G, Greenlund K, et al. Predicting periodontitis at state and local levels in the United States. *Journal of dental research*. 2016;95(5):515-22.
2. Haffajee AD, Socransky SS. Attachment level changes in destructive periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*. 1986;13(5):461-72.
3. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology*: Garland science; 2016.
4. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Periodontal Disease Mechanisms: Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral diseases*. 2000;6(3):138-51.
5. Chen C, Zhou T, Sun X, Han C, Zhang K, Zhao C, et al. Autologous fibroblasts induce fibrosis of the nucleus pulposus to maintain the stability of degenerative intervertebral discs. *Bone research*. 2020;8(1):7.
6. Liu J, Zeng J, Wang X, Zheng M, Luan Q. P53 mediates lipopolysaccharide - induced inflammation in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology*. 2018;89(9):1142-51.
7. Kajiura Y, Nishikawa Y, Lew JH, Kido Ji, Nagata T, Naruishi K. β - carotene suppresses *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide - mediated cytokine production in THP - 1 monocytes cultured with high glucose condition. *Cell Biology International*. 2018;42(1):105-11.
8. Carranza F, Newman M, Takei H. *Clinical periodontology*. Philadelphia. WB Saunders Company; 1996.
9. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4th edition ed2003.
10. Soeroso Y, Akase T, Sunarto H, Kemal Y, Salim R, Octavia M, et al. The risk reduction of recurrent periodontal pathogens of local application minocycline HCl 2% gel, used as an adjunct to scaling and root planing for chronic periodontitis treatment. *Therapeutics and clinical risk management*. 2017:307-14.
11. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(6):433-42.
12. Toker H, Ozan F, Ozer H, Ozdemir H, Eren K, Yeler H. A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontology*. 2008;79(6):1089-94.
13. Sun J, Nemoto E, Hong G, Sasaki K. Modulation of stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF-1 α) and its receptor CXCR4 in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal inflammation. *BMC Oral Health*. 2017;17:1-8.
14. Naruishi K, Nagata T. Biological effects of interleukin - 6 on gingival fibroblasts: cytokine regulation in periodontitis. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(9):6393-400.
15. Bhattarai G, Poudel SB, Kook SH, Lee JC. Anti - inflammatory, anti - osteoclastic, and antioxidant activities of genistein protect against alveolar bone loss and periodontal tissue degradation in a mouse model of periodontitis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017;105(9):2510-21.
16. San Miguel SM, Opperman LA, Allen EP, Zielinski J, Svoboda KK. Bioactive polyphenol antioxidants protect oral fibroblasts from ROS-inducing agents. *Archives of Oral Biology*. 2012;57(12):1657-67.
17. Sharma A, Sharma S. Reactive oxygen species and antioxidants in periodontics: a review. *International journal of Dental clinics*. 2011;3(2):44-8.
18. Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry*. 2009;37(6):413-23.

19. Bullon P, Cordero MD, Quiles JL, Morillo JM, del Carmen Ramirez-Tortosa M, Battino M. Mitochondrial dysfunction promoted by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(10):1336-43.
20. Arora N, Avula H, Kumar Avula J. The adjunctive use of systemic antioxidant therapy (lycopene) in nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a short-term evaluation. *Quintessence International*. 2013;44(6).
21. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural antimicrobials and oral microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Frontiers in Microbiology*. 2016;6:169768.
22. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Australian dental journal*. 2010;55(1):70-8.
23. Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*. 2007;17(6):1525-31.
24. Nieto G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines (Basel)*. 2018;5(3).
25. Doolaee EH, Raes K, Smet K, Andjelkovic M, Van Poucke C, De Smet S, Verhé R. Characterization of two unknown compounds in methanol extracts of rosemary oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(18):7283-7.
26. Petiwala SM, Johnson JJ. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer letters*. 2015;367(2):93-102.
27. Del Bano MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Del Rio JA, Ortuño A, et al. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(15):4247-53.
28. Inatani R, Nakatani N, Fuwa H. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agricultural and biological chemistry*. 1983;47(3):521-8.
29. Lai C-S, Lee JH, Ho C-T, Liu CB, Wang J-M, Wang Y-J, Pan M-H. Rosmanol potently inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through downregulating MAPK, NF-κB, STAT3 and C/EBP signaling pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(22):10990-8.
30. Ainamo J, Talari A. The increase with age of the width of attached gingiva. *Journal of Periodontal research*. 1976;11(4):182-8.
31. Ainamo J, Löe H. Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. *The Journal of Periodontology*. 1966;37(1):5-13.
32. HASSELL TM. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology 2000*. 1993;3(1):9-38.
33. Tarnow DP, Magner AW, Fletcher P. The effect of the distance from the contact point to the crest of bone on the presence or absence of the interproximal dental papilla. *Journal of periodontology*. 1992;63(12):995-6.
34. Fiorellini JP, Stathopoulou P. Anatomy of the periodontium. *Carranza's Clinical Periodontology 12th ed St Louis, MO: Elsevier Saunders*. 2015:9-10.
35. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontology 2000*. 2002;30(1):70-8.
36. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology 2000*. 2000;24(1).
37. Lindhe J, Hamp SE, Löe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *Journal of periodontal research*. 1973;8(1):1-10.
38. Skougaard M. Turnover of the gingival epithelium in marmosets. *Acta Odontologica Scandinavica*. 1965;23(6):623-43.
39. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997;14:216-48.
40. Cleaton - Jones P, Buskin S, Volchansky A. Surface ultrastructure of human gingiva. *Journal of Periodontal Research*. 1978;13(4):367-71.

41. Newcomb G, Seymour G, Powell R. Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. *Journal of clinical periodontology*. 1982;9(4):297-304.
42. Ness K, Morton T, Dale B. Identification of Merkel cells in oral epithelium using antikeratin and antineuroendocrine monoclonal antibodies. *Journal of Dental Research*. 1987;66(6):1154-8.
43. Løe H, Karring T. A quantitative analysis of the epithelium-connective tissue interface in relation to assessments of the mitotic index. *Journal of Dental Research*. 1969;48(5):634-40.
44. Kronfeld R. *Histopathology of the teeth and their surrounding structures*: Lea & Febiger; 1927.
45. Schor S, Ellis I, Irwin C, Banyard J, Seneviratne K, Dolman C, et al. Subpopulations of fetal - like gingival fibroblasts: characterisation and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease. *Oral diseases*. 1996;2(2):155-66.
46. Trautmann A, Feuerstein B, Ernst N, Bröcker E-B, Klein CE. Heterotypic cell-cell adhesion of human mast cells to fibroblasts. *Archives of dermatological research*. 1997;289:194-203.
47. Newman M. TH, Klokkevold PR, Carranza FA *Carranza's Clinical Periodontology*. St Louis Saunders Elsevier; 2006.
48. Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental cell research*. 2010;316(17):2713-22.
49. Häkkinen L, Larjava H, Koivisto L. Granulation tissue formation and remodeling. *Endodontic Topics*. 2011;24(1):94-129.
50. Moore BB, Kolodnick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, Hogaboam C, et al. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *The American journal of pathology*. 2005;166(3):675-84.
51. Garant PR, Cho MI. Cytoplasmic polarization of periodontal ligament fibroblasts: Implications for cell migration and collagen secretion. *Journal of Periodontal Research*. 1979;14(2):95-106.
52. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. *Principles of periodontology*. Periodontology 2000. 2013;61(1):16-53.
53. Hasan A, Palmer RM. *A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease*. British dental journal. 2014;216(8):457-61.
54. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):36.
55. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*. 2018;89:S159-S72.
56. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*. 2018;89:S173-S82.
57. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri - implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Wiley Online Library*; 2018. p. S1-S8.
58. Chapple IL, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*. 2018;89:S74-S84.
59. Kina JR. Periodontal Disease. *Int J Biomed Investig* 2018; 1: 101 doi: 1031531/2581. 2018;4745(2).
60. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontology 2000*. 2017;75(1):116-51.
61. Amato R, Caton J, Poison A, Espeland M. Interproximal gingival inflammation related to the conversion of a bleeding to a nonbleeding state. *Journal of periodontology*. 1986;57(2):63-8.
62. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in immunology*. 2014;35(1):3-11.
63. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2001;25(1):8-20.

64. Gemmell E, Carter C, Seymour G. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clinical & Experimental Immunology*. 2001;125(1):134-41.
65. Bozkurt FY, Ay ZY, Berker E, Tepe E, Akkuş S. Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Cytokine*. 2006;35(3-4):180-5.
66. GÜLER ÖŞ, ŞEN SC, SAYGUN NI. Romatoid Artrit Periodontal Hastalık ve Periodontal Bakterilerin Tetikleyici Rolü. *Türkiye Klinikleri Periodontology-Special Topics*. 2020;6(2):25-31.
67. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontologica Scandinavica*. 2001;59(3):167-73.
68. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*. 1997;14(1):33-53.
69. Fentoğlu Ö, Tülüceoğlu EE, Doğan ESK, Doğan B. PERİODONTAL HASTALIKLI BİREYLERDE PRO İNFLAMATUAR SİTOKİN GEN POLİMORFİZMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ. *Current Research in Dental Sciences*. 2022;32(3):196-200.
70. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*. 2007;43(1).
71. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford university press; 2015.
72. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2008;4(2):89.
73. Mukherji S, Singh S. *Reaction mechanism in organic chemistry*: Macmillan; 1984.
74. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(3-4):243-70.
75. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
76. Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*. 2007;19(9):1807-19.
77. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *carcinogenesis*. 2000;21(3):361-70.
78. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clinical oral investigations*. 2003;7:103-7.
79. Zhang J, Tripathi DN, Jing J, Alexander A, Kim J, Powell RT, et al. ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS. *Nature cell biology*. 2015;17(10):1259-69.
80. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*. 2003;552(2):335-44.
81. Knight J. *Biochemistry of free radicals and oxidative stress*. Free radicals, Antioxidants, Ageing and Disease; Knight, JA, Ed. 1999:21-43.
82. Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2007;3(10):713-20.
83. Yang C-F, Shen H-M, Ong C-N. Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. *Biochemical pharmacology*. 1999;57(3):273-9.
84. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;100:14-31.
85. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000;279(6):L1005-L28.
86. Halliwell B, Gutteridge JM. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*. 1990;186:1-85.
87. Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environmental health perspectives*. 1994;102(suppl 10):17-24.
88. Buettner G. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem* 11 (4): 341–346. 2011.
89. Takane M, Sugano N, Iwasaki H, Iwano Y, Shimizu N, Ito K. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *Journal of periodontology*. 2002;73(5):551-4.

90. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in molecular medicine*. 2015;21(3):172-83.
91. Sheikhi M, Gustafsson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum* - activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2000;27(10):758-62.
92. Shin JE, Baek KJ, Choi YS, Choi Y. A periodontal pathogen *Treponema denticola* hijacks the *Fusobacterium nucleatum* - driven host response. *Immunology and cell biology*. 2013;91(8):503-10.
93. Nibali L, Donos N. Periodontitis and redox status: a review. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(15):2687-97.
94. Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, Akalın FA. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *Journal of periodontology*. 2014;85(10):1432-41.
95. Miyasaki KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *Journal of periodontology*. 1991;62(12):761-74.
96. Mashayekhi F, Aghahoseini F, Rezaie A, Zamani MJ, Khorasani R, Abdollahi M. Alteration of cyclic nucleotides levels and oxidative stress in saliva of human subjects with periodontitis. *J Contemp Dent Pract*. 2005;6(4):46-53.
97. Morgan MJ, Liu Z-g. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell research*. 2011;21(1):103-15.
98. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao J, Xue X, Okumura K. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF- κ B and JNK. *Cell Death & Differentiation*. 2006;13(5):730-7.
99. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine*. 2015;21(7):677-87.
100. Ding P-H, Yang M-X, Wang N-N, Jin L-J, Dong Y, Cai X, Chen L-L. *Porphyromonas gingivalis*-induced NLRP3 inflammasome activation and its downstream interleukin-1 β release depend on caspase-4. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:1881.
101. Marchesan JT, Girnary MS, Moss K, Monaghan ET, Egnatz GJ, Jiao Y, et al. Role of inflammasomes in the pathogenesis of periodontal disease and therapeutics. *Periodontology 2000*. 2020;82(1):93-114.
102. Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, Rucker I, Edmund B. Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy*. 2013;9(7):951-72.
103. Greabu M, Giampieri F, Imre MM, Mohora M, Totan A, Pituru SM, Ionescu E. Autophagy, one of the main steps in periodontitis pathogenesis and evolution. *Molecules*. 2020;25(18):4338.
104. Young I, Woodside J. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(3):176-86.
105. Chapple I. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *Clinical Molecular Pathology*. 1996;49(5):M247-55.
106. Cemil Talmaç A ÇM. Antioxidants and Periodontal Diseases Gingival Disease - A Professional Approach for Treatment and Prevention. 2019.
107. Garewal H. Antioxidants and disease prevention: CRC Press; 1997.
108. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *nature*. 2000;408(6809):239-47.
109. ALTINIŞIK M, AD ATFB. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Aydın. 2000.
110. Åsman B, Wijkander P, Hjerpe A. Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium. *Journal of clinical periodontology*. 1994;21(1):45-7.
111. Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids-food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2014;65(2).
112. Roohbakhsh Y, Rahimi VB, Silakhori S, Rajabi H, Rahmanian-Devin P, Samzadeh-Kermani A, et al. Evaluation of the effects of peritoneal lavage with *Rosmarinus officinalis* extract against the prevention of postsurgical-induced peritoneal adhesion. *Planta Medica*. 2020;86(06):405-14.
113. Al-Sereiti M, Abu-Amer K, Sena P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. 1999.

114. Inatani R, FUWA H, SETO H, NAKATANI N. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*. 1982;46(6):1661-6.
115. Peng Y, Yuan J, Liu F, Ye J. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005;39(3-4):431-7.
116. Stefanovits-Bányai É. Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta biologica szegediensis*. 2003;47(1-4):111-3.
117. Boudet A-M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. 2007;68(22-24):2722-35.
118. Mena P, Cirlini M, Tassotti M, Herrlinger KA, Dall'Asta C, Del Rio D. Phytochemical profiling of flavonoids, phenolic acids, terpenoids, and volatile fraction of a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Molecules*. 2016;21(11):1576.
119. Chan EWC, Wong SK, Chan HT. An overview of the chemistry and anticancer properties of rosemary extract and its diterpenes. *Journal of Herbmmed Pharmacology*. 2021;11(1):10-9.
120. Nakatani N, Inatani R. Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*. 1981;45(10):2385-6.
121. Yanishlieva NV, Marinova E, Pokorný J. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of lipid science and Technology*. 2006;108(9):776-93.
122. Wu JW, Lee MH, Ho CT, Chang SS. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1982;59(8):339-45.
123. Munné-Bosch S, Alegre L. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant physiology*. 2001;125(2):1094-102.
124. Gordon M. Themechanismof antioxidant action into vitro. *Food antioxidants*. 1990:1-18.
125. Günther M, Karygianni L, Argyropoulou A, Anderson AC, Hellwig E, Skaltsounis AL, et al. The antimicrobial effect of *Rosmarinus officinalis* extracts on oral initial adhesion ex vivo. *Clinical oral investigations*. 2022;26(6):4369-80.
126. Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Souza MG, Andrade Silva ML, da Silva Filho AA, et al. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chemistry & biodiversity*. 2010;7(7):1835-40.
127. Hosokawa I, Hosokawa Y, Ozaki K, Matsuo T. Carnosic acid inhibits CXCR3 ligands production in IL-27-stimulated human oral epithelial cells. *Inflammation*. 2019;42:1311-6.
128. Hosokawa I, Hosokawa Y, Ozaki K, Matsuo T. Carnosic acid inhibits inflammatory cytokines production in human periodontal ligament cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2020;42(4):373-8.
129. Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, Vardar-Sukan F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant foods for human nutrition*. 2010;65:158-63.
130. Johnson JJ, Syed DN, Heren CR, Suh Y, Adhami VM, Mukhtar H. Carnosol, a Dietary Diterpene, Displays Growth Inhibitory Effects in Human Prostate Cancer PC3 Cells Leading to G 2-Phase Cell Cycle Arrest and Targets the 5' -AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Pathway. *Pharmaceutical research*. 2008;25:2125-34.
131. Jiang D, Xu J, Liu S, Nasser MI, Wei W, Mao T, et al. Rosmanol induces breast cancer cells apoptosis by regulating PI3K/AKT and STAT3/JAK2 signaling pathways. *Oncology letters*. 2021;22(2):1-13.
132. Altinier G, Sosa S, Aquino RP, Mencherini T, Loggia RD, Tubaro A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(5):1718-23.
133. Gorduza V, Tarabasanu C, Gorduza A, Cernatescu C, Rusu M. Structure-reactivity relationships of antioxidant flavonoides. *Ovidius University Annals of Chemistry*. 2000;11(1):56-9.
134. Escuder B, Torres R, Lissi E, Labbé C, Faini F. Antioxidant capacity of abietanes from *Sphacele salviae*. *Natural Product Letters*. 2002;16(4):277-81.
135. Haraguchi H, Saito T, Okamura N, Yagi A. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*. 1995;61(04):333-6.

136. Li L, Pan Z, Ning D, Fu Y. Rosmanol and carnosol synergistically alleviate rheumatoid arthritis through inhibiting TLR4/NF- κ B/MAPK pathway. *Molecules*. 2021;27(1):78.
137. Cheng A-C, Lee M-F, Tsai M-L, Lai C-S, Lee JH, Ho C-T, Pan M-H. Rosmanol potently induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(2):485-93.
138. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
139. Özkaya AB. HCT-116 Kolon Kanseri Hücre Hattında Yeşil çay Etken Maddesi Olan (-)-Epigallocatekin-3-Gallat'ın Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi: Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey); 2009.
140. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability assays. *Assay guidance manual* [Internet]. 2016.
141. Pal D, Ghatak S, Singh K, Abouhashem AS, Kumar M, El Masry MS, et al. Identification of a physiologic vasculogenic fibroblast state to achieve tissue repair. *Nature Communications*. 2023;14(1):1129.
142. Bertling E, Blaesse P, Seja P, Kremneva E, Gateva G, Virtanen MA, et al. Carbonic anhydrase VII regulates dendritic spine morphology and density via actin filament bundling. *bioRxiv*. 2019:736868.
143. Sugioka K, Kodama-Takahashi A, Yoshida K, Aomatsu K, Okada K, Nishida T, Shimomura Y. Extracellular collagen promotes interleukin-1 β -induced urokinase-type plasminogen activator production by human corneal fibroblasts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2017;58(3):1487-98.
144. Battaglia RA, Faridounnia M, Beltran A, Robinson J, Kinghorn K, Ezzell JA, et al. Intermediate filament dysregulation in astrocytes in the human disease model of KLHL16 mutation in giant axonal neuropathy (GAN). *Molecular biology of the cell*. 2023;34(12):ar121.
145. Van Alphen LB, Burt SA, Veenendaal AK, Bleumink-Pluym NM, Van Putten JP. The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. 2012.
146. del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Marín MP, Del Río JA, et al. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(16):4987-92.
147. Nieto G, Huvaere K, Skibsted LH. Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *European Food Research and Technology*. 2011;233(1):11-8.
148. Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot - plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1996;73(5):645-52.
149. Habtemariam S. The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer ' s disease. *Evidence - based Complementary and Alternative Medicine*. 2016;2016(1):2680409.
150. Nieto G, Estrada M, Jordán MJ, Garrido MD, Bañón S. Effects in ewe diet of rosemary by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display conditions. *Food Chemistry*. 2011;124(4):1423-9.
151. Li L, Pan Z, Ning D, Fu Y. Rosmanol and carnosol synergistically alleviate rheumatoid arthritis through inhibiting TLR4/NF- κ B/MAPK pathway. *Molecules*. 2022;27(1):78.

8. EKLER

EK 1: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sizin BAİBÜ Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülen bu çalışmaya katılmanızı arzu ediyoruz. Bu çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı "Rosmanolün Gingival Kaynaklı Fibroblast Hücrelerinde Oksidatif Stresin Neden Olduğu Hücrel Hasara Karşı Korumucu ve Tedavi Edici Etkisi"dir.

Bu araştırmanın amacı, diş eti hastalıklarında rosmanolün tedavi edici etkisini araştırmaktır. Bu amaçla bu çalışmada, rosmanolün diş etinde bulunan gingival fibroblast hücreleri üzerindeki etkisi laboratuvar ortamında incelenecektir. Bu araştırma için, halihazırda sizin periodontal tedavi planlamanız içinde yer alan, diş kuron boyunu uzatmak için yapılacak gingivektomi (diş etinin kesilerek uzaklaştırılması) işlemi esnasında alınan artık diş eti dokuları laboratuvar ortamında hücre çoğaltılması için kullanılacaktır. Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 15-30 dakika (gingivektomi işlemi süresi kadar) olup, araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 2 (iki)'dir.

Bu araştırma ile ilgili olarak, gingivektomi işlemi sonrası hekiminizin önereceği yara bakımı ve ağız hijyeni talimatlarına uymak sizin sorumluluklarınızdır.

Bu araştırmada sizin için herhangi bir risk bulunmamakla beraber, yapılacak gingivektomi işlemine bağlı olarak işlemin ilk günlerinde olabilecek küçük kanamalar ve az da olsa dişlerde oluşabilecek sıcak-soğuk hassasiyeti gibi riskler ve rahatsızlıklar söz konusu olabilir. Bunun yanında gingivektomi işlemi sonucunda sizin için beklenen yararlar, diş etlerinizin daha doğal bir görünüme sahip olması ve kolay temizlenebilirliğinin sağlanmasıdır.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırma BAİBÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmektedir.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırmacı bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmanın yürütücüsü Dr. Öğr. Üyesi Bilge MERACI YILDIRAN ve araştırmacısı Arş. Gör. Hilal KECEL'dir. Çalışmaya dahil olan bireylerin çalışma ile ilgili soruları en kısa sürede yanıtlanacaktır. Sorular doğrudan araştırma yürütücüsüne de sorulabilir. Bu konuda gerekirse 0312 254 1000 numaralı telefonu ve e-mail adresini kullanabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntısıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün, Adı-Soyadı: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza:	Açıklamaları yapan araştırmacının, Adı-Soyadı: Görevi: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza:
Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin, Adı-Soyadı: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza:	Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının, Adı-Soyadı: Görevi: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza: