

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZANASI KOLLAJENİ/ MİSVAK HİBRİT MEMBRANLARIN ÜRETİMİ VE PERİODONTAL DOKU GREFTİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

İlkim KANTARCIOĞLU

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZANASI KOLLAJENİ/ MİSVAK HİBRİT MEMBRANLARIN ÜRETİMİ VE PERİODONTAL DOKU GREFTİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

İlkim KANTARCIOĞLU

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **26/01/2017**

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN

ÇANAKKALE

İlkim KANTARCIOĞLU tarafından Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde hazırlanan ve **26/01/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Denizanası Kollajeni/Misvak Hibrit Membranların Üretimi ve Periodontal Doku Grefti Olarak Kullanımının Araştırılması**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Emel EMREGÜL ……

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN ……

Üye

Doç. Dr. Ayhan ORAL ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından 632 numaralı projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

İlkim KANTARCIOĞLU

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN,

Çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen çalışma arkadaşlarım , Tuğba SEZGİN ARSLAN, Evren ERTEN, Furkan GALATA, Elif ÖZDEMİR KAYNAK ve Burcu EFE'ye,

Tezin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL ve Doç. Dr. Ayhan ORAL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Hande İPEK Ayşe Senem KAYA, Özge MUTLU ve Gökçe ESER'e,

Materyal temininde bize destek olan İlhan DEMİREL ve İlhan Balıkçılık çalışanlarına, Ece ÖZÇAKIR ve ailesine,

Cihaz temininde desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Uğur CENGİZ ve Yrd. Doç. Dr. Sani DEMİRİ'ye

Analizlerimde benimle ilgi ve tecrübesini paylaşan Yrd. Doç. Dr. Çiğdem PALA ve Aygül CAN'a,

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından 632 numaralı projeden desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruma,

Son olarak hayatımın her evresinde bana destek olan canım annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İlkim KANTARCIOĞLU

Çanakkale, Ocak 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

PDL	Periodontal Ligament
PDLF	Periodontal Ligament Fibroblast
nm	Nanometre
HDM	Hücre Dışı Matriks
NaOH	Sodyum Hidroksit
M	Molar
mM	Milimolar
HCl	Hidroklorik Asit
SDS- PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
DMAB	4- (Dimetilamino) benzaldehit
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
°C	Santigrad derece
MTT	((3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
µl	Mikrolitre
CO_2	Karbon Dioksit
PBS	%0.9 NaCl içeren fosfat tamponu
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etil alkol
NHS	N-Hidroksisüksinamit
EDC	N-(3-Dimetillaminopropil)-N′-etilkarbodiimit hidroklorit
BMDCs	Fare Kemik İliğinden Elde Edilen Dendritik Hücreler
TNF-a	Tümör Nekröz Faktör - a
IL-6	İnterlökin 6
IL-1	İnterlökin 1
IL-12	İnterlökin 12
Na_2HPO_4	Sodyum fosfat dibazik
Pb	Kurşun
Hg	Civa
As	Arsenik

FBS	Fötal Sığır Serumu
DMEM	Dulbecco'nun ürettiği Eagle Besi yeri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
GC-MS	Gaz Kromotografisi- Kütle Spektrumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ICP- MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma ve Kütle Spektrumu
MES	4-Morfolinetanesulfonik asit
UV	Ultra Viyole
Au	Altın
Pd	Paladyum
DTGS	Triglisin Sülfat
ZnSe	Çinko Selenür

ÖZET

DENİZANASI KOLLAJENİ/ MİSVAK HİBRİT MEMBRANLARIN ÜRETİMİ VE PERİODONTAL DOKU GREFTİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

İlkim KANTARCIOĞLU
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN
26/01/2017, 58

Periodontitis, diş ve dişi destekleyen dokuları hedef alan, dünya üzerinde yaygın görülen iltibahi bir diş eti hastalığıdır. Tedavisinde, yumuşak veya sert doku greftleri, kök ve diş yüzey temizliği ve dişeti cebinin sondalanması gibi yöntemler kullanılır. Kollajen doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilen; parankimal organ ve bağ doku elemanlarından kolayca izole edilen ekstraselülar matriks proteinidir. Genel olarak sığır ve domuz gibi hayvanlardan izole edilen kollajen, son dönemlerde deniz canlılarından da izole edilmeye başlamıştır. Salvadora persica, tarihi dönemler boyunca diş temizliği için kullanılan, anti-bakteriyal, anti-fungal, anti- enflamatuar özellikleri bilinen bir bitkidir. Bu çalışmada, periodontal hastalıklarda kullanılmak üzere; *Rhizostoma pulmo* türüne ait denizanasından kollajen tip I izole edilmiş ve belirli oranlarda *Salvadora persica* (misvak) eklenerek iskeleler oluşturulmuştur. Kollajenin karakterizasyonu için SDS-PAGE, aminoasit ve hidroksiprolin testi, ATR-FTIR ve termal analizler yapılmıştır. Farklı misvak ekstraksiyon yöntemleri denenmiş, sonrasında GC-MS, toplam fenol analizi ve antioksidan kapasitesi testi yapılmıştır. Üretilen iskeleler, izole edilen insan PDLF hücreleriyle etkileştirilmiştir. Ekilen hücrelere MTT uygulanmış ve iskele üzerindeki davranışları SEM ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda, doku mühendisliği ürünü iskelelerin periodontitis tedavisine yönelik kısa sürede tedavi olanağı sağlayabilecek, kolay elde edilebilir, düşük maliyetli bir iskele olarak tedavilerde kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Denizanası Kollajeni, Periodontitis, *Salvadora persica L*, Kollajen tip I, Rejeneratif Tıp

ABSTRACT

FABRICATION OF JELLYFISH COLLAGEN/MISWAK HYBRID MEMBRANES AND INVESTIGATION OF THE POTENTIAL USE AS PERIODONTAL TISSUE GRAFT

İlkim KANTARCIOĞLU
Çanakkale Onsekiz Mart University
Graduate School of Natural And Applied Sciences
Master of Science Thesis in Bioengineering and Materials Engineering
Advisor Assis. Prof. Yavuz Emre ARSLAN
26/01/2017, 58

Periodontitis is a common chronical inflammatory gingival disease throughout the world that targets a tooth and the supporting tissues of it. In the treatment of the disease, certain methods such as scaling, root-planting, surgical cleaning, and soft or hard tissue graft are used. However, these methods require a long treatment process. As alternatives to these materials, marine sources come into prominence. Collagen is an extracellular matrix protein which is often preferred in tissue engineering and which is easily isolated from all parenchymal organs and connective tissue elements. Collagen which is used to be isolated from animals such as pig skin nowadays has been isolated also from marine such as jellyfish, fish, and *Salvadora persica L.* which is also known as toothpaste tree has been used by people for mouth hygiene since very early periods. Extracts of miswak possess various biological properties including significant anti-bacterial, anti-fungal and anti-inflammatory aspects. In the present study, to be used in the treatment of periodontal diseases, type I collagen is isolated from *Rhizostoma pulmo* and scaffolds are created by adding certain amounts of *Salvadora persica*. SDS-PAGE, amino acid and hydroxyproline tests, ATR and thermal analyses are conducted for collagen characterization. Different *S. persica* extraction techniques are tested and then, GC-MS, total phenol analysis and antioxidant capacity test are applied. Created scaffolds are chemically cross-linked and interacted with isolated human periodontal ligament fibroblast cells. After that, cultured cells are exposed to MTT and their behavior on the scaffold is examined through SEM. As a result, it is found out that the scaffolds which are the products of tissue engineering can

be used effectively in the treatment of periodontitis as a scaffold which can provide treatment in a short time and is easily obtained at a low cost.

Keywords: Jellyfish Collagen, Periodontitis, *Salvadora persica L.*, Type I Collagen, Regeneratif Medicine

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU……ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI..... iii
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vii
ABSTRACT.....ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xv
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
1.1.Periodontal Doku ve Sağlığı 1
1.1.1. Periodontal Hastalıkların Epidemiyolojisi.....4
1.2. Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp 6
1.3. *Rhizostoma pulmo* ve Genel Özellikleri.....8
1.4. Ağız Sağlığında *Salvadora persica*' nın (Misvak) Rolü.....10
BÖLÜM 2 12
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 12
BÖLÜM 3 16
MATERYAL VE METOT 16
3.1. Materyal 16
3.2. Yöntem.....17
3.2.1. Pepsinde çözünür kollajenin hazırlanması.....17
3.2.1.1. Lowry Metodu Kullanılarak Protein Miktarının Belirlenmesi 19
3.2.1.2. Aminoasit Analizi 19
3.2.1.3. SDS-PAGE.....20
3.2.1.4. Hidroksiprolin testi 21
3.2.1.5. ATR-FTIR Spektroskopisi.....21
3.2.2. Salvadora persica (Misvak) ekstraksiyonu 21
3.2.2.1. Misvak içerik analizi.....24
3.2.2.2. Termal Analizler 24
3.2.2.3. Toplam Fenol Miktarı 24
3.2.2.4. CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi ile Antioksidan Miktarının Belirlenmesi.....24
3.2.3. Kollajen/ Misvak Hibrit İskelelerin Hazırlanması 25
3.2.4. Şişme Testi.....25
3.2.5. Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Temini ve Kültüre Edilmesi.....26

3.2.6.Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Üretilen İskelelerle Etkileştirilmesi 26
3.2.6.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi 27
3.2.6.2. Üretilen İskelelerin Taramalı Elektron Mikroskobuyla İncelenmesi 28
3.3. İstatistiksel Analiz 28
BÖLÜM 4 29
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 29
4.1. Kollajen İzolasyonunun Verimliliği 29
4.1.1. Aminoasit Kompozisyonu 29
4.1.2. SDS- PAGE 31
4.1.3. Hidroksiprolin testi 32
4.1.4. Kollajen için ATR-FTIR spektroskopisi 33
4.1.5. Termal Analiz Sonuçları 34
4.2. Misvak ekstraksiyonu 35
4.2.1. GC-MS Analizi 36
4.2.2. Toplam Fenol İçeriği Analizi 37
4.2.3. CUPRAC Antioksidan Kapasitesi Testi 38
4.3. Kollajen/ Misvak Hibrit İskelelerin Hazırlanması 40
4.3.1. Şişme Kapasitesi 41
4.3.2. Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Kültürü ve İskelelerle Etkileşimi 42
4.3.2.1. MTT Verileri 44
4.3.2.2. İskelelerin SEM Mikrografisi 45
BÖLÜM 5 49
SONUÇ VE ÖNERİLER 49
KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Dişin anatomik yapısı ve kısımları (http://www.shutterstock.com/pic-93462538/stock-photo-anatomy-of-the-tooth.html' den uyarlanmıştır) 3
Şekil 1.2. Sağlıklı diş ve periodontitisli dişin yapısal farklılıkları (http://www.intelligentdental.com/2009/12/11/chronic-adult-periodontitis-cause-and-symptoms' den uyarlanmıştır) 4
Şekil 1.3. A.15- 19 yaş arası bireylerde maksimum yüzde CPI oranları. B. 15- 19 yaş arası bireylerde sekstant değer ortalamaları C. 35- 44 yaş arası bireylerde yüzde maksimum CPI oranları D. 35- 44 yaş arası bireylerde sekstant değer ortalamaları E. 65- 74 yaş arası bireylerde maksimum yüzde CPI oranları F. 65- 74 yaş arası bireylerde sekstant değer ortalamaları (RO: WHO bölgesel ofis, AFRO: Afrika RO, AMRO: Amerika RO, EMRO: Doğu Akdeniz RO, EURO: Avrupa RO, SEARO: Güneydoğu Asya RO, WPRO: Kuzey Pasifik RO) 5
Şekil 1.4. Kollajenin yapısı (Venugopal ve ark., 2010; Sibilla ve ark., 2015) 6
Şekil 1.5. Doku mühendisliğine genel yaklaşım (Arslan, 2007) 8
Şekil 1.6. Rhizostoma pulmo türüne ait görseller 9
Şekil 1.7. A. S.persica ağaç formu (Sofrata, 2010) B. S.persica çiğneme çubuğu 10
Şekil 3.1. Denizanası kollajeni izolasyonunun fotoğraflı gösterimi (Derkus ve ark., 2016) 18
Şekil 3.2. SDS-PAGE için kullanılan dikey tankın şematik görüntüsü (http://image.slidesharecdn.com/b-150317231111-conversion-gate01/95/bsc-biotech-ii-bat-unit-3-electrophoresis-24-638.jpg 'den uyarlanmıştır) 20
Şekil 3.3. Misvak ekstraktsiyonunun şemalı gösterimi 23
Şekil 3.4. Sarı renkli tetrazolyum tuzunun enzimleriyle mor renkli formazana dönüşüm reaksiyonu (http://www.wikiwand.com/en/MTT_assay 'den uyarlanmıştır) 27
Şekil 4.1. Sıçan kuyruğunda izole edilen kollajenin absorbans ve konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren kalibrasyon eğrisi 29
Şekil 4.2. Denizanası kollajeni, sıçan kuyruğu kollajeni ve BSA için SDS- PAGE bantları 32
Şekil 4.3. Ham denizanası ve pepsinde çözünür denazanası kollajeni için yapılan hidroksiprolin miktar tayinine ait sonuç grafiği 33
Şekil 4.4. (a) Sıçan kuyruğu kollajeni, (b) denizanası kollajeni 34
Şekil 4.5. Termal analize ait grafikler (A) Denizanası kollajeni (B) Ham denizanası (C)Sıçan kuyruğu kollajeni (D) BSA. 35
Şekil 4.6. (A) Birinci yönteme ait liyofilizasyon sonrası görüntü (B) İkinci yönteme ait liyofilizasyon sonrası görüntü 36
Şekil 4.7. Misvak için uygulanan GC-MS analizine ilişkin sonuç grafikleri 37
Şekil 4.8. Toplam fenol içeriğinin saptanması için oluşturulan gallik asit kalibrasyon eğrisi 38
Şekil 4.9. Toplam fenol analizi sonra yöntem 1 ve yöntem 2 arasındaki korelasyonu gösteren grafik 38
Şekil 4.10 Antioksidan kapasitesinin saptanması için oluşturulan (A) Trolox ve (B) C vitamini kalbirasyon eğrisi 39
Şekil 4.11. % 10'luk sulu misvak çözeltisinden alınan 20 µl numune için mg Trolox/L cinsinden sonuç grafiği 39

Şekil 4.12. % 10'luk sulu misvak çözeltisinden alınan 20 µl numune için mg Vitamin C/L cinsinden sonuç grafiğİ 40
Şekil 4.13. İskelelerin çapraz bağlama sonucu görüntüsü 41
Şekil 4.14. Şişme testinin yapılışına ait görsel 41
Şekil 4.15. (A) Diş kökü yüzeyinden periodontal tabakanın kazınması (B) Periodontal ligamentin kültür ortamına alınması (C) Periodontal tabakanın 4X mikroskop görünümü (D) Periodontal ligament hücrelerinin 3.gün (E) 7.gün (G) 9.gün (F) 11.gün mikroskop görünümü (4x) 43
Şekil 4.16 Canlılık testi sonrasında iskelelerde formazana bağlı renk değişimi (A) 3. gün (B) 7.gün (C) 14.gün 44
Şekil 4.17. İskelelerin 3,7 ve 14. Günlere ait MTT analizi sonuçlarına ait grafik 45
Şekil 4.18. Hücresiz ve hücreli iskelelerin 50x büyütmede SEM mikrografları 46
Şekil 4.19. Hücresiz ve hücreli iskelelerin 500x büyütmedeki SEM mikrografları 47
Şekil 4.20. Hücresiz ve hücreli iskelelerin 2500x büyütmedeki SEM mikrografları 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Karasal kaynaklı kollajen ve deniz kaynaklı kollajen arasındaki farkların şematik gösterimi (Suphan, 2014) 8
Çizelge 1.2. Rhizostoma pulmo'nun taksonomik sınıflandırması 9
Çizelge 1.4. *Salvadora persica*'nın taksonomik özellikleri 10
Çizelge 4.1. Amino asit analizine ait sonuçlar 31
Çizelge 4.2. Üretilen iskelelerin şişme kapasitelerine ait değerler 42

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Periodontitis, diş ve dişi destekleyen dokuları hedef alan, dünya üzerinde yaygın olarak görülen iltihabi bir diş eti hastalığıdır. Ağız hijyeninin bozulmasıyla dişeti iltihaplanır ve periodontal hastalık (periodontitis) baş gösterir. Günümüzde periodontitisin tedavisi mevcuttur. Tedavide yumuşak veya sert doku greftleri, kök ve diş yüzey temizliği ve dişeti cebinin sondalanması gibi yöntemler kullanılır. Ancak bu yöntemler hastaya acı veren ve tedavi süreci uzun yöntemlerdir (Meşeli ve ark., 2015Kim ve ark., 2014; Kurşunlu ve Öztürk, 2013).

Kollajen, doku mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılan, hayvan vücudunun yaklaşık %25-30'unu oluşturan ekstrasellüler matriks proteinidir. Kemik, tendon, diş, kas ve kıkırdak gibi bağ doku elemanlarından kolayca izole edilebilir. Günümüzde; deniz anası, sünger ve bazı balık türlerinden kollajen izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmaktadır. Denizanası %60 kollajen içeriği ile büyük bir potansiyel taşımaktadır. Denizanası mesogleasından izole edilen kollajen ise omurgalıların bağ dokusu ile benzerlik göstermektedir (Addad ve ark., 2011; Song ve ark., 2005; Lee ve ark., 2001).

Salvadora persica (misvak), dünyanın birçok yerinde diş temizliği için kullanılan bir bitkidir. Yapılan araştırmalarda *S. Persica*'nın anti-bakteriyal, anti-fungal, anti-enflamatuar özelliklerinin yanı sıra dişeti hastalıkları ve dişeti kanamalarını önlediği görülmektedir (Ahmad ve Rajagopal, 2013; Arora ve ark., 2013; Khan ve ark., 2010; Masood ve ark., 2010; Taha, 2008).

Bu tez kapsamında; denizanası kollajeni (*Rhizostoma pulmo*) izole edildi, misvak özütüyle belirli oranlarda karıştırılarak bir iskele oluşturuldu. İskele üretimi sona erdikten sonra üzerine insan Periodontal Ligament Fibroblast hücreleri ekildi ve gelişim süreçleri gözlemledi.

1.1.Periodontal Doku ve Sağlığı

Periodontal Ligament Fibroblast (PDLF), embriyolojik olarak diş folikülünün ektomezenkimal dokusundan köken alan, diş ve alveolar kemik arasında konumlanan bağ dokusu elemanıdır (Sokos ve ark., 2015). Periodontal doku; gingiva, periodontal ligament (PDL), sementum ve alveolar kemiği içine alan ve bu yapılar arasında fonksiyonel bağlantıyı sağlayan kompleks bir yapıdır (Kim ve ark., 2014).

Gingiva; keratinize çok katlı yassı epitel doku ile yoğun bağ dokusu içeren *lamina propria* tabakasından oluşur. Diş eti bağlantı (junction) epiteli ile diş boynuna bağlanır ve yumuşak ile sert doku arasında yalıtımı sağlar. Periodontal ligament; diş soketini çevreleyen yoğun fibröz bağ dokusudur. PDL, oldukça vasküler bir yapıya sahip olup, hızlı bir hücresel döngü sergiler. PDL genişliği yaklaşık olarak 0,2 mm'dir. Bu dokunun görevi çiğneme esnasında mekanik kuvvetin yumuşatılarak diş ve alveolar kemiğe iletilmesini sağlamaktır. Buna ek olarak, çiğnemenin nöromusküler kontrolünde propriosepsiyonu sağladığı da bilinmektedir. Sementum; periodontal ligamentin aksine, avasküler yapı gösterir ve hücresel döngüsü nispeten yavaştır. Rezorpsiyon kuvvetlerine karşı dayanıklıdır. Alveolar kemik ise; çene kemiğinde diş soketini oluşturan yapıdır. Diş çekimi ya da diş kaybı gibi durumlar kemiğin bu bölümü doğal olarak rezorbe edilir. Dişe bağımlı bir dokudur. Alveolar kemiğin çene kemiğine yuva yaptığı yerde periodontal ligamentle birleşir (Han ve ark., 2014; Hughes ve ark., 2010)

Periodontitis, diş ve dişi destekleyen dokuları hedef alan, dünya üzerinde yaygın olarak görülen kronik enflamatuvar bir diş eti hastalığıdır. *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi Gram negatif bakterilerin mikrobiyal dengeyi kendi yararına olacak şekilde bozması sonucu hastalık baş gösterir (Berberoğlu, 2007). Hastalık genellikle *Gingivitis* olarak başlar ve geç teşhis gibi durumlarda periodontitis olarak ilerler. Hastalığın ilerlemesi sırasında osteogenez ve osteoklast arasındaki denge yani homeostazi bozulur. Homeostazinin bozulmasıyla, immün hücrelerin ve bu hücrelerce üretilen sitokinlerin aktif rol aldığı geri dönüşü olmayan kemik hasarları oluşur (Kurşunlu ve Öztürk, 2013). Periodontitisin patogenezinde; dişeti iltihaplanması, dişeti cebi oluşumu, periodontal ligament yıkımı ve alveolar kemik rezorbsiyonu bulunmaktadır. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde diş kaybı da söz konusudur (Meşeli ve ark., 2015). Yapılan son çalışmalarda, periodontitisin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi sistemik hastalıklarla da ilişki içerisinde olduğu bildirilmiştir (Han ve ark., 2014).

Enfeksiyonun gelişimi, bakteri türüne, direnç haline ve hastanın immün kimliğine bağlı olarak değişim gösterir (Bayındır, 2003). Periodontitis bu parametrelere bağlı olarak kendi içinde gruplanır (Şener, 2004):

I. Dişeti Hastalıkları
II. Kronik Periodontitis
III. Agresif Periodontitis

IV. Sistemik Hastalıklara Bağlı Periodontitis

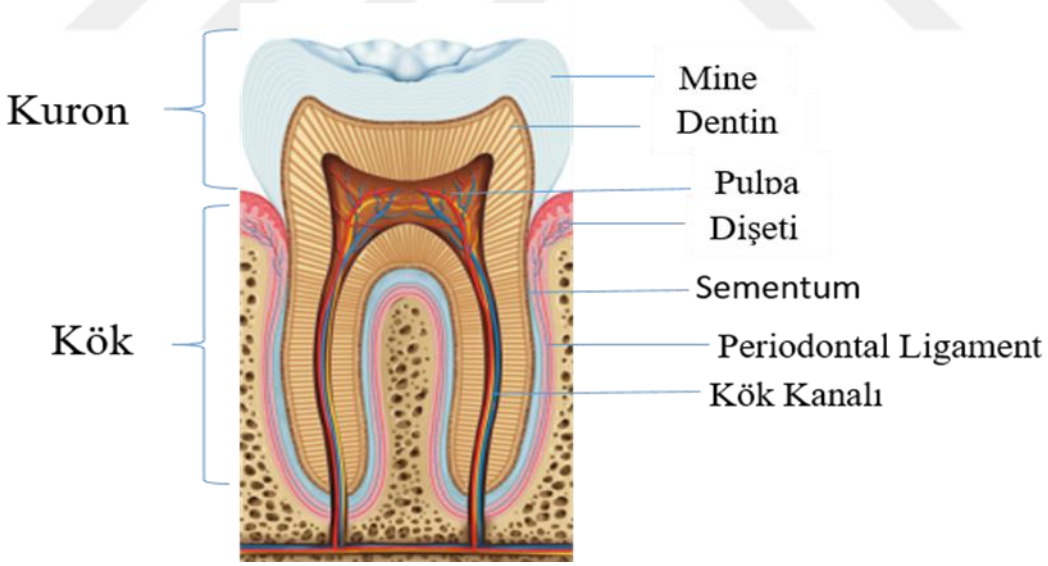
V. Nekrotizan Periodontitis

VI. Periodontal Abse

VII. Periodontik Lezyonlar

VIII. Gelişimsel Deformiteler

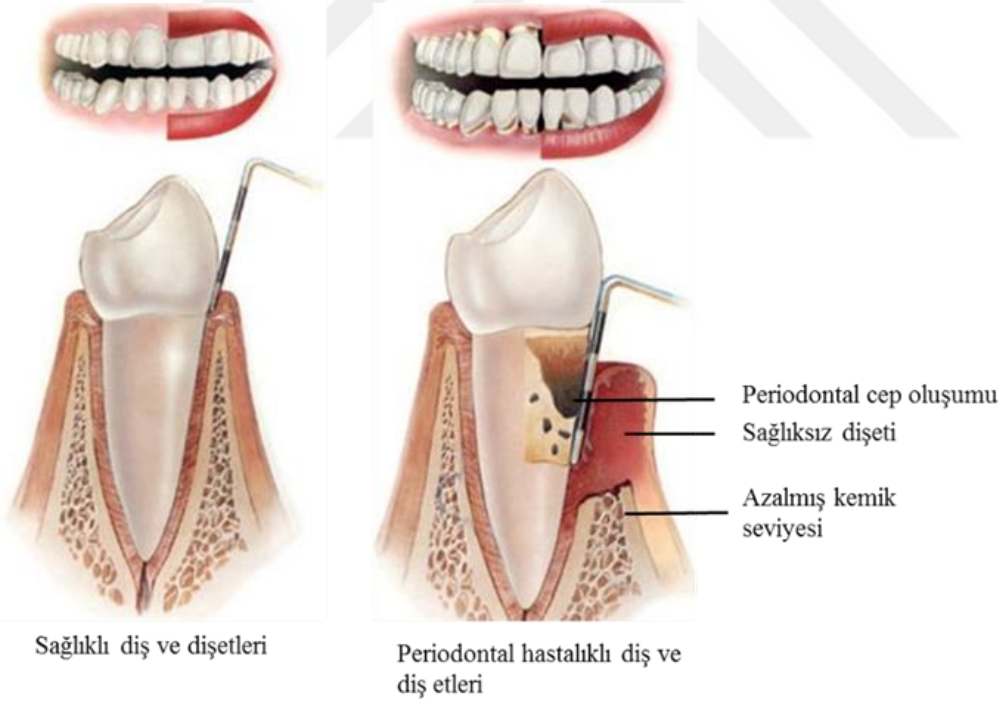
Periodontitisin primer tedavi yöntemi, hastalığın etiyolojisinde rol alan bakteri plaklarının ve diş taşlarının temizlenmesidir. Daha sonrasında ise, cep derinliğinin sondajlanması, diş yüzeyi temizliği, kök yüzeyin düzleştirilmesi ve lokal antibiyotik uygulamaları gibi yöntemler mevcuttur. Periodontitisin cerrahi tedavi yöntemlerinde ise allojenik, otojenik ve zenojenik kemik doku greftleri yer almaktadır. Bu prosedürlerde amaç hastalık sürecini durdurmaya veya patogenezi yavaşlatmaya yöneliktir ve kaybedilen dokunun özgün formda geri kazanılması mümkün değildir (Iwata ve ark., 2014; Zeytinoğlu ve ark., 2013; Orbak, 2006; Bayındır, 2003). Son dönemlerde, kök hücre ve doku mühendisliği kullanılarak periodontal rejenerasyon gündeme gelmeye başlamıştır. Bu yöntemle; kaybedilen dokunun geri kazanılması, kısa ve acısız tedavi mümkün hale gelmeye başlamıştır.



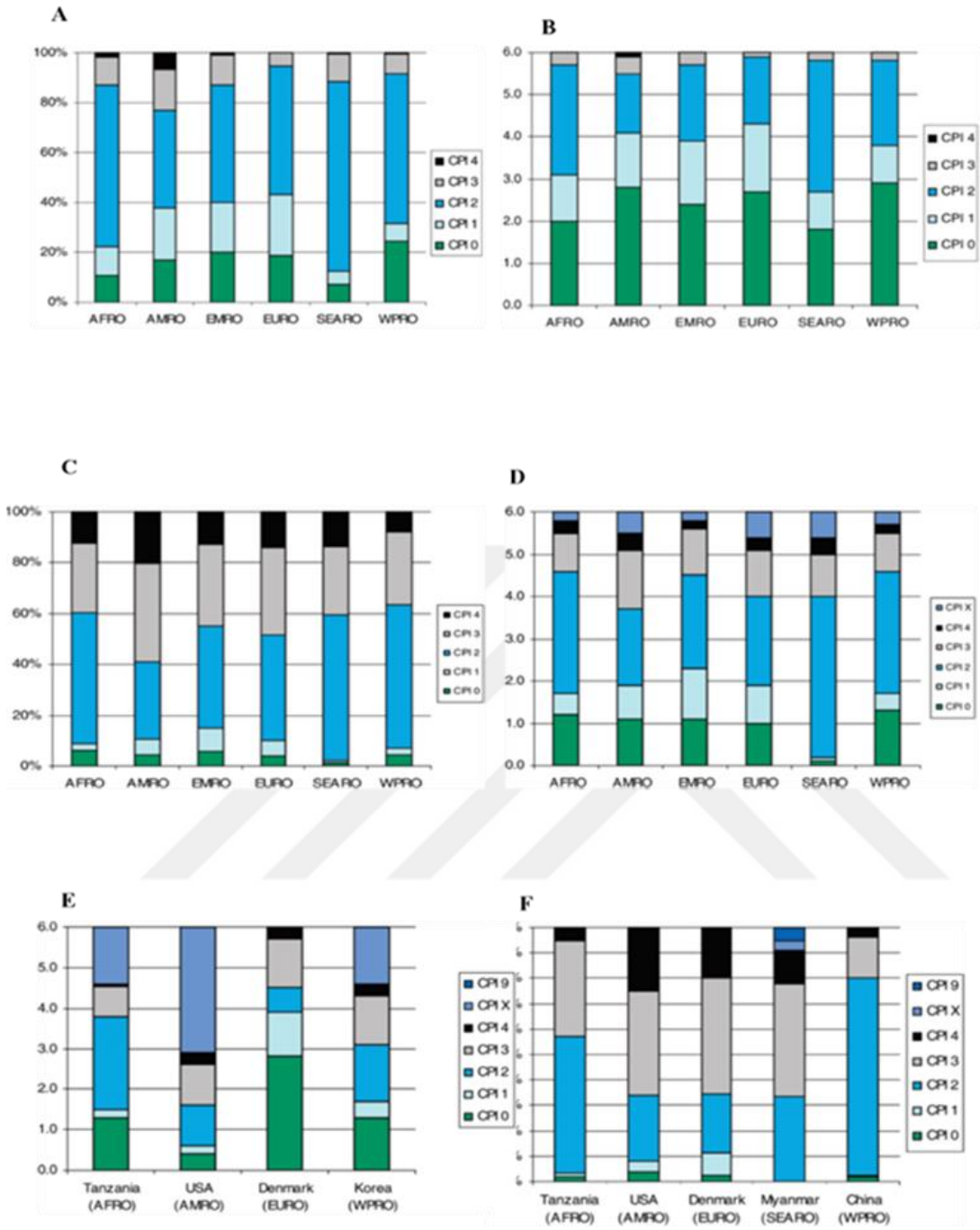
Şekil 1.1. Dişin anatomik yapısı ve kısımları (http://www.shutterstock.com/pic-93462538/stock-photo-anatomy-of-the-tooth.html' den uyarlanmıştır)

1.1.1. Periodontal Hastalıkların Epidemiyolojisi

Periodontal hastalık, dünya çapında insan topluluklarını etkileyen iki büyük diş hastalığından birisidir. Periodontal hastalığın prevalans ve şiddeti Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde anketlerle ölçülmüştür. Toplum periodontal indeksi (The community periodontal index=CPI), ülkelerde periodontal hastalığın profilini belirlemek ve etkili kontrolünü sağlamak amacıyla yapılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda ataşman kaybı, sondaj derinliği ve hastalık şiddeti yaş ile bağlantı göstermiştir. Çalışmada yer alan temel yaş gruplarını 15, 19, 35, 44, 65 ve 74 oluşturmaktadır. İleri yaş gruplarında periodontal hastalık oranı genç gruplara oranla daha fazladır. Çalışmaya ait grafikler aşağıda verilmiştir. CPI 0 sağlıklı bireyleri, CPI 1 diş eti kanamasını, CPI 2 gingival diş eti kanaması ve hesaplaması, CPI 3 yüzeysel periodontal cepler (4-5 mm), CPI 4 derin periodontal cepleri (6 mm ve daha derin), CPI 9 dahil edilmeyen grupları ve CPI X göz ardı edilebilecek değerleri temsil etmektedir (Petersen ve Ogawa, 2005).



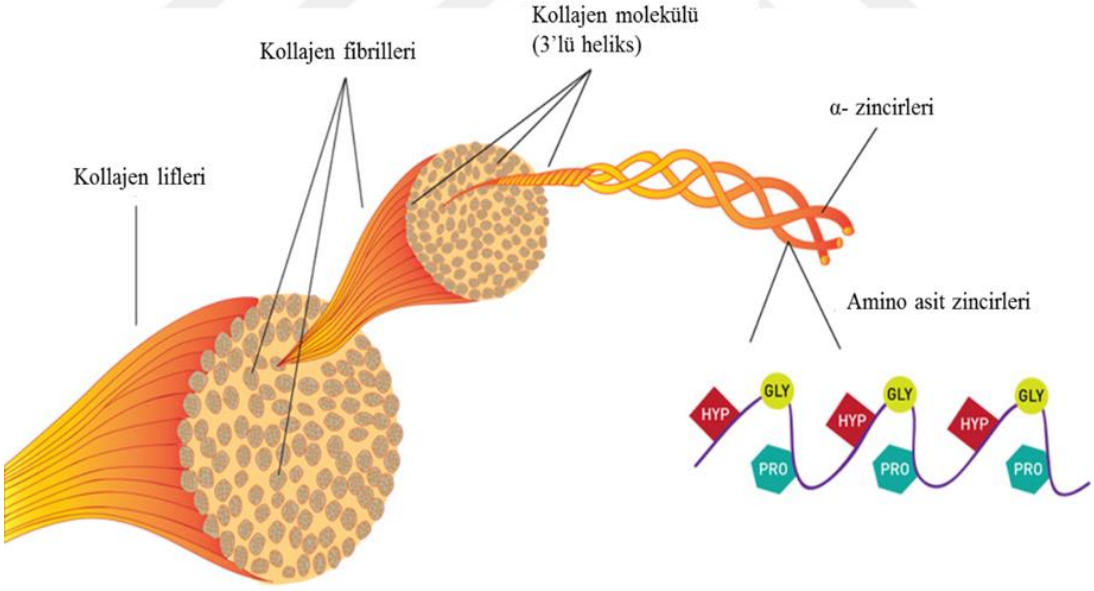
Şekil 1.2. Sağlıklı diş ve periodontitisli dişin yapısal farklılıkları (http://www.intelligentdental.com/2009/12/11/chronic-adult-periodontitis-cause-and-symptoms' den uyarlanmıştır)



Şekil 1.3. A.15- 19 yaş arası bireylerde maksimum yüzde CPI oranları. B. 15- 19 yaş arası bireylerde sekstant değer ortalamaları C. 35- 44 yaş arası bireylerde yüzde maksimum CPI oranları D. 35- 44 yaş arası bireylerde sekstant değer ortalamaları E. 65- 74 yaş arası bireylerde maksimum yüzde CPI oranları F. 65- 74 yaş arası bireylerde sekstant değer ortalamaları (RO: WHO bölgesel ofis, AFRO: Afrika RO, AMRO: Amerika RO, EMRO: Doğu Akdeniz RO, EURO: Avrupa RO, SEARO: Güneydoğu Asya RO, WPRO: Kuzey Pasifik RO)

1.2. Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp

Doku mühendisliği, hasarlı doku ve organların yeniden onarılmasını hedefleyen, doğal veya sentetik iskeleler üreterek ve de özel sinyallerle farklılaşma metotları üzerine yapılandırılmış disiplinler arası bir bilim dalıdır (Tyagi ve Dhindsa, 2009). Bu tedavi sisteminde, izole edilen hücreler *ex vivo* şartlarda 3 boyutlu kollajen, glikozaminoglikan, keratin gibi ekstra sellüler matriks moleküleriyle benzerlik gösteren, tasarlanmış iskeleler üzerine ekildikten sonra spesifik şartlar altında yeniden farklılaştırılarak çoğaltılmakta ve oluşan dokuya benzer yeni yapılar geri nakledilmektedir. Günümüzde rejeneratif tıptaki araştırmaların çoğu doku mühendisliğinde biyomateryallerle destek yapıların yani iskelelerin üretilmesi üzerinedir. Doku ve hücre çalışmalarının gelişimi, deney hayvanlarının kullanımını azaltmakta, öncesinde hayvanlar üzerinden yapılan deneyler hücre ve doku kültürleri üzerinde gerçekleştirilmektedir Rejeneratif tıptaki gelişmeler 3 boyutlu organ çalışmalarına da hız kazandırmaktır. Bu alandaki en başarı çalışmalardan biri yapay derinin oluşturulması ve hatta deri örneklerinin inflamasyon ve irritasyon testlerinde kullanımına başlanmasıdır (Uslu ve Arbak, 2010).

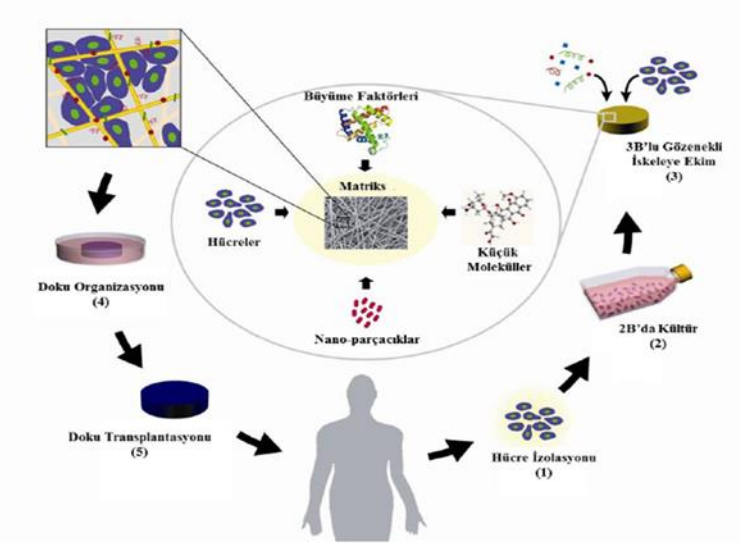


Şekil 1.4. Kollajenin yapısı (Venugopal ve ark., 2010; Sibilla ve ark., 2015)

Kollajen, doku mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılan, hayvan vücudunun yaklaşık %25-30'unu oluşturan ekstrasellüler matriks proteinidir. Tüm parankimal organların ve bağ dokuların (deri, kemik, tendon ve kıkırdak) hücre dışı matriksinin ana yapısal malzemesidir (Barzideh ve ark., 2014). $[Gly\text{-}X\text{-}Y]_n$ bileşimden türeyen bir üçlü

heliks konformasyonuna sahiptir. X ve Y formunda çoğunlukla prolin ve hidroksiprolin yer almaktadır. 1970'li yıllardan bu yana kollajen, araştırmalarda bağ doku çalışmalarında biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Tercih edilmesinin sebebi, biyouyumluluk ve biyobozunurluk seviyesinin yüksek olması, mekanik ve homeostatik özellikleri, düşük antijenite göstermesi ve hücre bağlayıcı özelliklerinin olmasıdır. Biyokimyasal uygulamalarda kollajen kullanımı hızla artmış ve polimer iskeleleri dahil pek çok biyomühendislik alanlarında da kullanımı yaygınlaşmıştır (Addad ve ark., 2011; Lee ve ark., 2001; Song ve ark., 2006).

Hayvan dokularında genetik olarak farklı yaklaşık 29 tip kollajen bulunmaktadır. Ancak en bol bulunan kollajen tip I'dir. Kemik, tendon, diş, kas ve kıkırdak gibi bağ doku elemanlarından kolayca izole edilebilir. Endüstriyel ve akademik araştırmalarda, sığır derisi veya tendonu ve domuz derisi kullanılmaktadır. Sığır kaynaklı kollajen, bulaşıcı süngerimsi ensefalopati bulaştırma riski taşımaktadır. Ek olarak, Hinduizm (sığır kaynaklı) ve İslamiyet (domuz kaynaklı) bu kaynakların kullanımını hoş görmemektedir (Barzideh ve ark., 2014; Hoyer ve ark., 2014; Leone ve ark., 2015; Minh Thuy ve ark., 2014; Song ve ark., 2006) Bu kaynaklara alternatif olarak denizel kaynaklar ön plana çıkmıştır. Denizel kaynakların memelilere kıyasla daha güvenli, yüksek verimli ve doğal bir kaynak olduğu düşünülmekte; deniz süngeri, denizanası ve çeşitli balık türleri üzerinde izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları üzerinde durulmaktatır. Yapılan bazı araştırmaların sonucunda, denizanası dahil olmak üzere, denizel kaynakların karakteristik farklı aminoasit kompozisyonlarıyla, memeli hayvanlara benzer çözünürlük, ısı, ve isoelektrik pH dahil olmak üzere bir çok benzer özellik gösterdiği görülmüştür. Ayrıca genomik programlamalar, moleküler klonlama ve ultrastrüktürel çalışmalarda, omurgasızlara ait fibriler kollajenlerin memelilerle aynı özellikleri paylaştığı da ortaya koyulmuştur (Barzideh ve ark., 2014; Hoyer ve ark., 2014; Subhan ve ark., 2014; Nagai ve ark., 2000; Addad ve ark., 2011).



Şekil 1.5. Doku mühendisliğine genel yaklaşım (Arslan, 2007)

Çizelge 1.1. Karasal kaynaklı kollajen ve deniz kaynaklı kollajen arasındaki farkların şematik gösterimi (Suphan, 2014)

	Karasal Kaynaklı (Memeli) Kollajen	Denizel Kaynaklı Kollajen
1	Pahalı	Ucuz
2	Yüksek erime noktası	Düşük erime noktası
3	Yoğun viskozite	Düşük viskozite
4	Zor ekstraksiyon	Kolay ekstraksiyon
5	Organik çözücüde çözünme	Suda çözünme
6	Bulaşıcı hastalık taşıma riski	Hastalık riski yok
7	Düşük Glisin ve Alanin içeriği, yüksek Prolin içeriği	Yüksek Glisin ve Alanin içeriği, düşük Prolin içeriği

1.3. *Rhizostoma pulmo* ve Genel Özellikleri

Rhizostoma pulmo Akdeniz kıyıları boyunca en yoğun olarak görülen Scyphomedusae sınıfına ait türdür. *R. pulmo*, Akdeniz kıyılarının yanı sıra, Kuzey ve Güney Adriyatik Denizi, İyon Denizi ve Karadeniz, Liguria Denizi gibi bölgelerde de sıkça görülmeye başlanmıştır. Gelişme dönemlerinde ise Türk sularında (Mersin Körfezi-Doğu Akdeniz Denizi) görülmektedir. Dönemsel olarak görülen lokasyon değişiminin ise su sıcaklığı ve zooplankton bolluğuna bağlı olduğu bilinmektedir (Fuentes ve ark., 2011; Mariottini ve Pane, 2010; Purcell ve ark., 2012).



Şekil 1.6. Rhizostoma pulmo türüne ait görseller

Mesoglea; şekli yarı küresel ve çan şeklinde olup, marjinal loblara sahiptir. Mesoglea ve tentakül kenarlarında mor renkler görülür (Şekil 1. 4). *R. pulmo* orta derecede zehirli olup yaygın görülmesine rağmen insanlar için zararsız kabul edilir. Bu özelliğine rağmen balıkçılar ve yüzücülerde ani temas halinde kontakt dermatit atakları bildirilmiştir. Lokal kortikosteroid tedavi sonrası şikayetlerin 36 saat içinde kaybolduğu görülmüştür. *R. pulmo* zehrinin doğal bir proteinin özelliklerini göstermemesinden dolayı -20 °C'de 1 ay depo edildiğinde bağışıklık fenomenleri ve hemolitik aktivite %50 kayba uğramaktadır. (Mariottini ve Pane, 2010).

R. pulmo da diğer denizanası türleri gibi yüksek rejenerasyon ve üreme yeteniğine sahiptir. Denizanalarının biyokimyasal içeriğindeki organik bileşenlerini karbohidrat, lipid ve protein oluştururken ağırlıklı olarak kollajen proteini bulundurmaktadır. Bu özellikleri ve dağılımının yaygın olması sebebiyle doku mühendisliği, farmasötik ve sağlık çalışmalarında potansiyel kaynak olarak görülmektedir (Leone ve ark., 2015).

Çizelge 1.2. Rhizostoma pulmo'nun taksonomik sınıflandırması

Sınıf	Scyphozoa
Takım	Rhizostomae
Aile	Rhizostomatidae
Cins	*Rhizostoma*
Tür	*Rhizostoma* pulmo (Macri, 1778)

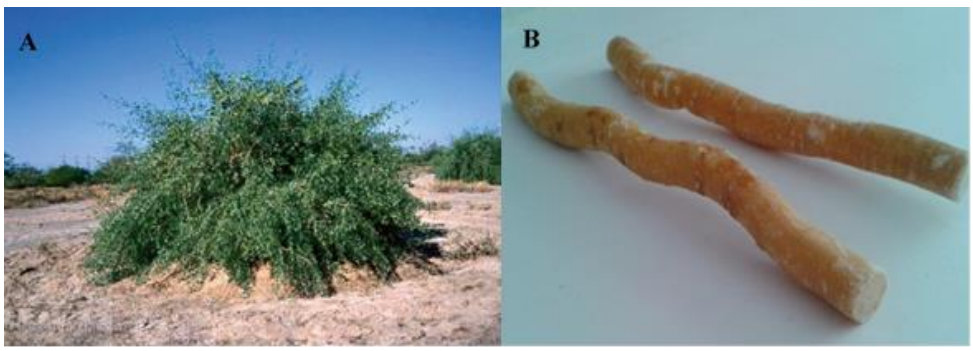
1.4. Ağız Sağlığında *Salvadora persica*' nın (Misvak) Rolü

Salvadoraceae familyasına ait *Salvadora persica*, Hindistan, İran, Afrika, Suudi Arabistan, İsrail ve Pakistan dolaylarında dağılış göstermektedir. Diş fırçası ağacı olarak da bilinen misvak, erken dönemlerden beri insanlar tarafından ağız hijyenini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Laboratuvarlarda geliştirilen ağız hijyen ürünleri olmadan, yalın kullanımında dahi yarar sağladığı bilimsel olarak kanıtlanmış ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından kullanımı onaylanmıştır (Gupta ve ark., 2015; Alireza ve ark., 2014; Darout ve ark., 2000; A. H. Sofrata, 2010).

Çizelge 1.4. *Salvadora persica*'nın taksonomik özellikleri

Sınıf	**Magnoliopsida**
Takım	Brassicales
Aile	Salvadoraceae
Cins	*Salvadora*
Tür	*Persica oleoides*
Bionomial isim	*Salvadora persica*

Sodyum klorit, potasyum klorit, salvadoüre, oleik asit, linoleik asit, trimetilamin, tiyosinat, benzilisotiyosiyanat, nitrat, silika, C vitamini, tanin, saponin, N-benzil-2-fenilasetamin, lignanlar, flavonoidler, florit, esensiyal yağlar, sodyum bikarbonat, alkaloit nitrojen ve kalsiyum yapısında bulunan biyoaktif bileşenlerdir. Yapılan araştırmalarda *S. persica*'nın içerdiği bu biyoaktif komponentlerle anti-bakteriyal, anti-fungal, anti-enflamatuar özellik taşıdığını göstermiştir (Ahmad ve Rajagopal, 2013; Arora ve ark., 2013; Khan ve ark., 2010; Masood ve ark., 2010; Taha, 2008).



Şekil 1.7. A. S.persica ağaç formu (Sofrata, 2010) B. S.persica çiğneme çubuğu

S. persica ekstratlarının farklı oranlarının, *Streptoccoccus mutans, S. faecelis, S. pyrogenis, Lactobacillus acidophilus, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi Gram negatif bakterilere karşı direnç oluşturduğu bilinmektedir. *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* türü bakteriler periodontitis başlangıcında yer almaktadır. Bu bakteriler, tükrük ile birleşerek diş yüzeyinde biyofilm oluştururlar ve sayıları kommensal dengeyi bozacak miktara ulaştığında dental plaklar oluşur. Dental plaklar temizlenmediği takdirde önce gingivitis olmak üzere daha sonra periodontitise sebebiyet verirler. *S. persica'*nın düzenli kullanımının ise plak yıkımını desteklediği görülmüştür (Alireza ve ark., 2014; Ahmad ve Rajagopal, 2013; Masood ve ark., 2010; A. H. Sofrata, 2010).

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Nagai ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan çalışmada, *Rhopilema asamushi* türü denizanasından kollajen izole etmiş, pepsinle sindirilmiş, kuru ağırlık bazında verimi ölçülmüş ve karakterize edilmiştir. Primer yapı, denizanası mesogleasından gelen pepsinde çözünen kollajene benzer, ancak dış şemsiyesinden ve iç şemsiyeden gelen asitte çözünebilir kollajenden farklıdır. Kollajenin denatürasyon sıcaklığı ise 28,8 °C olarak saptanmıştır.

İnanç ve arkadaşları (2008), canlı Periodontal Ligament hücreleri içeren poly(DL-laktik-ko-glikolik asit) lifsi iskeleler oluşturmuştur. Bu iskeleler elektroeğirme tekniği kullanılarak üretilmiştir. İnsan periodontal ligament (hPDL) hücreleri eksplant kültürü çoğaltılmış ve daha sonra morfolojik ve immünohistokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Nanolif membranın mekanik özellikleri, yüzey topografisi, nanolif boyutları, gözenekliliği taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Bu çalışma, nanolif ile periodontal ligament hücre içeren doku benzeri yapıların mühendislik alanında uygulanabilirliğini göstermektedir.

Addad ve arkadaşları (2011), deniz kaynaklı kollajenlerin ekonomik potansiyelini araştırmak üzere çalışma yapmışlar, farklı saflaştırma yöntemleri denemişlerdir. Veriler sonucunda, denizanası kollajenlerinin zararsızlığı teyit edilmiş ve tip I kollajenin insan hücreleri üzerindeki biyolojik etkisi test edilmiştir. Biyomedikal uygulamalarda karasal kaynaklı kollajen yerine denizel kaynaklı kollajenlerin kullanılabiliceği görülmüştür.

Vaquette ve arkadaşları (2012), alveoler kemik ve periodontal ligamentin eş zamanlı rejenerasyonu için bifazik bir iskele tasarlamıştır. İskele için tıbbi dereceli polikaprolakton içeren beta-trikalsiyum fosfat kullanılmıştır. Eriyik biriktirerek modelleme yöntemi ile elde edilen elektrospun membran üzerine osteoblast ve periodontal ligament hücre tabakaları ekilmiş ve her iki yüzeyde de hücre gelişimi gözlenmiştir.

Kumar ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada, periodontal kemik içi defektlerin önlenmesi amaçlanarak, balık kollajeni izole edilmiş ve bir membran oluşturulmuştur. Hastalarda yapılan denemeler sonucunda kemik için defektlerde 6-9 aylık süreçlerde düzelme görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmanın sonucu kollajen membranların periodontal doku tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Hoyer ve arkadaşları (2014), *Rhopilema esculentum* türü denizanasından gözenekli kollajen iskele elde ederek, kıkırdak rejenerasyonu için kullanmışlardır. Kollajen tayinine yönelik karakterizasyon analizleri (SDS-PAGE, atomik kuvvet mikroskopisi ve transmisyon elektron mikroskopisi) yapılmıştır. Refibrilize denizanası kollajeni kurutma işlemi ardından kimyasal çapraz bağlanmış %98,2 gözenek açıklığına sahip iskeleler elde edilmiştir. İnsan mezenkimal kök hücreleri ile etkileştirilmiş ve hiçbir sitotoksik etki göstermemiştir. Tipik hücre dışı matriks bileşenlerinin oluşumu gözlenmiş ve daha fazla sülfatlanmış glikozaminoglikan miktarı tayin edilmiştir.

Barzideh ve arkadaşları (2014), tarafından yapılan çalışmada, *Chrysaora sp*. cinsi denizanalarından kollajen izole edilip, karakterizasyonu yapılmış ve farklı pepsin miktarlarına bağlı olarak verim değerlendirilmesi yapılmıştır. İzole kollejen içerisinden tip II kollajen ayrılıp peptit haritası çıkartılmış ve standart kollajenle kıyaslanmıştır. FTIR, aminoasit analizi ve izoelektrik noktası analizi yapılmış ve bu türün karasal kaynaklı kollajen yerine kullanılabileceği gösterilmiştir.

Zhang ve arkadaşları (2014), *Cyanea nozakii* türüne ait denizanalarının asitte ve pepsinde çözünürlük oranlarını karakterize etmiştir. Asitte çözünebilen kollajenin kuru ağırlığına göre verimliliğini %13 ve pepsinde çözünen kollajenin ise % 5,5 olduğunu tespit etmişlerdir. Asitte ve pepsinde çözünen kollajenlerin SDS-PAGE sonuçları değerlendirildiğinde ise bantlaşmaların tip I kollajen ile benzer olduğu görülmüştür. Kollajenlerin denatürasyon sıcaklığını 23,8 °C olarak tespit eden çalışma grubu, ayrıca ICP-MS sonuçlarında Pb, Hg ve As elementleri oranının ulusal standartlara göre daha düşük olduğunu saptamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, *Cyanea nozakii* türüne ait denizanalarının, kollajen kullanımı için alternatif bir kaynak olduğu gösterilmiştir.

Putra ve arkadaşları (2015), *Nemopilema nomurai* türüne ait denizanası kollajenin murin makrofaj benzeri J774.1 hücrelerini uyardığını tespit etmişlerdir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında, fare kemik iliğinden elde edilen dendritik hücreler (BMDCs) üzerine, denizanası kollajenin immünostimülatör etki gösterdiği de saptamışlardır. Denizanası kollajeninin, TNF-a, IL-6, IL-1 ve IL-12 üretimini stimule ettiği ve bunun sonucunda BMDCs gen ekspresiyonunda yükselme görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, denizanası kollajeninin MHC-II ekspresyonunu uyardığı ve BMDCs'nin fagositoz kapasitesini düzenlediği raporlanmıştır.

Jin ve arkadaşları (2003), alveol kemiği, periodontal ligament ve semetumu aynı anda tedavi edebilecek osteokondüktif bir iskelenin rejenerasyon kabiliyetini

araştırmışlardır. İskeleler elektrospnizasyon ile üretilmiş ve kemik bölmesi eklenmiştir. Kemik bölgesi iletkenliği arttırmak için kalsiyum fosfat ile kaplanmıştır. Kemik ve periodontal hücreler membranla etkileştirilmiştir. Elde edilen iskeleler sıçanlarda dentin bloğuna yerleştirilmiştir. Çalışma sonucunda kalsiyum fosfat kaplı iskelelerin normal gelişim hızına göre daha hızlı gelişim gösterdiği, periodontal ligamentin vasüklarizasyona izin verdiği ve dentin ara yüzde periodontal tutunmaların başladığı gözlemlenmiştir.

Shalumon ve arkadaşları (2013), nano biyoglass (nBG) ve nano hidroksiapatit (nHAp) gibi nano-biyoseramik parçacıklarını elektrospun nanofibröz membanlar içerisine dahil ederek kemik hücre dışı matrisini taklit edebilen bir biyomimetik iskele oluşturmuşlardır. NHAp ile birleştirilmiş poli (kaprolakton) (PCL)-kitosan (CS) ve nBG ile PCL-CS nanofibril iskeleleri arasındaki karşılaştırmalı bir çalışma yürütülmüş ve doku mühendisliğindeki fizibilitesi araştırılmıştır. İnsan periodontal bağ fibroblast hücreleri (hPLFs) ve osteoblast benzeri hücreler (MG-63 hücre çizgileri) kullanılarak yapılan hücre ekleme ve çoğalma çalışmaları, nBG'ye dahil edilen örneklerin, nHAp ile birleştirilmiş benzerlerinden biraz üstün olduğunu ortaya koymuştur. Hücre canlılık testleri de iskelelerin sitotoksisitesinin az olduğunu göstermiştir. Ayrıca nHAp ve nBG'nin varlığı hPDLF'nin PCH3 ve PCB3 iskele üzerindeki alkalen fosfataz aktivitesini arttırmıştır. Bu çalışmalar, nBG'ye dahil edilen elektrospuan iskelelerinin ortopedik ve periodontal doku mühendisliği uygulamaları için nispeten daha iyi aday olduğunu göstermektedir.

Wang ve arkadaşlarının (2016) yürüttüğü, çalışmada insan periodontal ligament ve çene kemiği mezenkimal kök hücreleri izole edilmiş, askorbik asitçe zengin ortamda çoğalması indüklenerek, morfoloji ve gen ekspresyonu profilleri incelenmiştir. İnsanın venöz kanından trombositce zengin fibrin, çeşitli büyüme faktörleri içeren biyolojik olarak emilebilir fibrin iskeletlerine dönüştürülmüştür. Son olarak, periodontal dokuyu oluşturmak için insan periodontal ligament kök (PDLSC) tabakalarına, oluşturulan iskelelere (PRF) ve insan çene kemiği mezenkimal kök hücresi (JBMSC) tabakalarına dayanan bir hücre materyali in vivo olarak fare modelinde değerlendirilmiştir. Bu modelde, PDLSC tabaka / PRF / JBMSC levha kompozitleri, insan tedavi edilmiş dentin matrisi (TDM) ve hidroksiapatit (HA) / trikalsiyum fosfat (TCP) içeren bir periodontal boşluğa yerleştirilmiştir. İmplantasyondan sekiz hafta sonra PDLSC tabakaları, PDL benzeri dokulara dönüşme eğilimi gösterirken, JBMSC tabakaları ağırlıklı olarak kemik benzeri dokuları üretme eğilimi göstermiştir. Bu hücre transplantasyon tasarımındaki

iyileştirmeler, gelecekteki periodontal doku rejenerasyonu için potansiyele sahip olabileceğini gösterir.

Rezaei ve arkadaşları (2014), Salvadora persica ekstratının anti-quorum sensing (bakterilerin koordine olmasını sağlayan bir mekanizma) oluşturduğunu tespit ederek, periodontitis oluşumuna etken *Enterococcus faecalis* üzerinde denemişler ve oral enfeksiyonda *E. faecalis'*in neden olabileceği hastalıkları engelleyebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Patki ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada, diş plağı, diş eti kanaması ve periodontal hastalıkların kontrolünde bitkisel diş macunu (*S. persica* vb.) kullanımının etkinliğini ölçmüşlerdir. 18-60 yaş aralığındaki hastalara, 6 hafta boyunca günde 2 kere komple bakım bitkisel diş macunu verilmiş ve oral problemler bu hastalar üzerinde değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda komple bakım bitkisel diş macunlarının gingivitis, plak, diş eti kanaması ve diğer oral sorunlara karşı etkili ve güvenilir olduğu gösterilmiştir.

Alireza ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada, oral sıvıdan izole edilen suşlar üzerinde metanolik misvak ekstresinin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus ve Escherichia tespit edilen bakteri gruplarıdır. Çalışma sonucunda, misvak özütünün Gram negatif bakterilere olan etkisinin, Gram pozitif bakterilere göre daha fazla olduğu ispatlanmıştır.

Al-bayaty ve arkadaşları (2010) %60 etanol ile ekstrakte edilen misvak çubuğunun toksit etkisini, antibakteriyel aktivitesini ve plak formasyonu üzerindeki etkisini klinik olarak değerlendirmişlerdir. Gönüllüler üzerinde 4 gün plak geliştirme uygulanmış, sonrasında %0,2 klorheksidin ve %10 misvak ekstraktı ile 3 kez çalkalamaları ve ardından durulamaları istenmiştir. Deney in vitro olarak belirgin bir antibakteriyel etki göstermiş ve bu etkinin in vivo olarak konsantrasyona bağlı olduğu saptanmıştır.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Rhizostoma pulmo Çanakkale açıklarında yakalanmış ve tuzlanarak laboratuvara transfer edilmiştir. Denizanasının levha haline getirilmesi için teknik alkol (Tekkim, Türkiye) kullanılmıştır. Temizleme aşamasında sodyum hidroksit (Sigma Aldrich, Almanya), sindirme aşamasında ise Pepsin (Sigma Aldrich, Almanya, 600-1200 U/mg) ve asetik asit (Sigma Aldrich, Almanya, %99.8) kullanılmıştır. Homojenizasyon işlemi için IKA T18 (Almanya) homojenizatör kullanılmıştır. Ortam pH sını dengelemek amacıyla yapılan diyalizde ise sodyum-fosfat dibazik (Sigma Aldrich) kullanılmış, pH ölçümleri Mettler Toledo (ABD) ile yapılmıştır. Deneyin santrifüj basamakları Hettich EBA 20 ve Mikro 120 (Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Tüm kurutma işlemleri Telstar LyoQuest HT40 (İspanya) marka liyofilizatör ile yapılmıştır. İzolasyon sonucunda elde edilen kollajen miktarı, Shimadzu UVmini-1240 (Japonya) spektrofotometre kullanılarak tayin edilmiştir. Prosedürün tüm basamakları +4 °C ortam sağlayan soğutucuda gerçekleşmiştir (Siemens, Almanya). İskelelerin kimyasal çapraz bağlaması 2-(*N*-morfolino)ethansulfonik asit (MES) (Sigma Aldrich, Almanya) tampounu içerisinde, N-Hidroksisüksinamit ve N-(3-Dimetillaminopropil)-N′-etilkarbodiimit hidroklorit (NHS/EDC) (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Üretilen materyaller -86 °C (Panasonic, Japonya) buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kollajenin amino asit analizi Thermo MS Finnigan Trace DSQ GC-MS (ABD) kullanılarak yapılmıştır. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS- PAGE), Thermo Owl P8DS (ABD) kullanılarak yapılmıştır. Önceden boyanmış yüksek moleküler ağırlıklı markör ise New England Biolabs'tan (İngiltere) temin edilmiştir. Karakterizasyon basamaklarından birisi olan hidroksiprolin testi Sigma Aldrich (Almanya) Hidroksiprolin Test Kiti kullanılarak yapılmıştır.

Pakistan kökenli yaş misvak, vakumlu torbalarda yerel marketlerden temin edilmiştir. Karıştırma işlemleri Jeio Tech (Kore) çoklu karıştırıcı kullanılarak yapılmıştır. Misvak bitkisinin öğütme işlemleri IKA M20 (Almanya) öğütücü kullanılarak yapılmıştır. Ekstraktsiyon işlemleri Buchi Rotavapor- R210 (İsviçre) ile yapılmıştır.

Periodontal ligament fibroblast hücreleri, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesii Rektörlügü Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2016-02 numaralı kararı ile 21 yaşındaki bir kadın hastadan temin edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında, Corning steril hücre kültürü kapları (ABD) ve besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's

Modified Eagle Medium) kullanılmıştır. Besi yeri ekleri olarak L-glutamin, penisilin-streptomisin (antibiyotik-antimikotik) ve fetal sığır serumu (FBS) (Sigma Aldrich, Almanya), hücrelerin pasajlanma işleminde ise tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Çalışmaların tümü laminer akışlı steril kabinde (Panasonic, MCO-18AC-PE, Japonya) gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü ise %5 CO_2, 37 °C sıcaklık ve %5 bağıl nem sağlayan inkübatörde (Telstar Bio II Advance, İspanya) yapılmıştır. Hücre proliferasyonu invert mikroskop (Primo-Vert Carl Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. Malzemelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) mikrografileri için JEOL SEM-7100-EDX (ABD), ATR-FTIR için Shimadzu IRAffinity-1 (Japonya) ve GC-MS için Thermo Finnigan trace GC Ultra cihazları (ABD) kullanılmıştır.

CUPRAC analizi için gerekli olan Trolox Merck (Almanya) ve C vitamini Sigma Aldrich (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Pepsinde çözünür kollajenin hazırlanması

R. pulmo, 24 saat etanol içerisinde bırakılmış ve etanol berraklaşıncaya dek birkaç kez etanol değişimi yapılmıştır. Etanol muamelesinden sonra denizanası ufak parçalara ayrılıp tekrar tuzlanarak kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin ardından, kollajen dışı maddeleri uzaklaştırmak için 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde 2 gün süreyle karıştırılmıştır. 48 saatlik süreç içerisinde 2-3 kez NaOH değişimi yapılmış, sonrasında ortam pH değeri nötral seviyeye ulaşıncaya kadar saf su altında 1-2 saat yıkanmıştır. Kollajen levhalarının temizlenme işlemi bittikten sonra sindirme aşamasına geçilmiştir. 0,5 M asetik asit ile kollajenler karıştırıldıktan sonra homojenizatörde tamamen parçalanıncaya kadar (yaklaşık 2 dakika) homojenize edilerek üzerine pepsin ilave edilmiş, 3 gün boyunca karışmaya bırakılmıştır. Sindirim işleminin ardından 3400g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kollajen çözeltisi içinde pepsinin inaktif hale gelmesi için 0,02 M Na_2HPO_4 'e (pH= 8.8) e karşı diyaliz edilerek nötral ortama ulaştırılmıştır. Ardından 10. 000g de 2 dakika santrifürüj edilerek, kalıplara dökülmüş ve -86 °C'de dondurulmaya bırakılmıştır. 24 saat dondurucuda bekledikten sonra liyofilize edilmiştir. Prosedüre ait tüm işlem basamakları +4°C'de gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Denizanası kollajeni izolasyonunun fotoğraflı gösterimi (Derkus ve ark., 2016)

3.2.1.1. Lowry Metodu Kullanılarak Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein tayini, modifiye Lowry metodu kullanılarak yapılmıştır (Lowry ve ark., 1951). Sıçan kuyruğu kollajeninin kalibrasyon eğrisi, standart olarak kabul edilmiştir. İzolasyon için gerekli sıçan kuyruğu, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılan deneyler sonucu uyutulan sıçanlardan toplanmıştır. Sıçan kuyrukları önce saf su ile yıkanıp temizlenmiş, sonrasında ise etil alkol (%99) kullanılarak sterilize edilmiştir. Sıçan kuyruğundan çıkarılan tendonlar, tekrar etanol muamelesi gördükten sonra küçük parçalara ayrılarak 60 mM fosforik asit içerisinde oda sıcaklığında sindirilinceye kadar çözülmeye bırakılmıştır. Fosforik asit içerisinde çözünen kollajen, kalıplara dökülmüş ve 1 gece -86°C'de dondurularak liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon adımından sonra kollajen matriks 24 saat boyunca oda sıcaklığında, 1 M HCl içerisinde pepsin ile sindirilmiştir. Pepsinde çözünür kollajen enzim inaktive oluncaya kadar (3 gün) 0,02 M Na_2HPO_4 'e karşı diyaliz edilmiştir. Tekrar kalıplanarak -86°C'de dondurulmuş, liyofilize edilmiştir (Derkus ve ark., 2016). Sıçan kuyruğu kollajeni izolasyonu tamamlandıktan sonra spektrofotomektrik ölçüm aşamasına geçilmiştir. Denizanası kollajeni 0,1 M asetik asit içerisinde, sıçan kuyruğu kollajeni ise 0,5 M asetik asit içerisinde çözülmüş ve modifiye Lowry yöntemi uygulanmıştır.

Verim hesabını saptamada;

$$Y=(VXC)/W \tag{3.1}$$

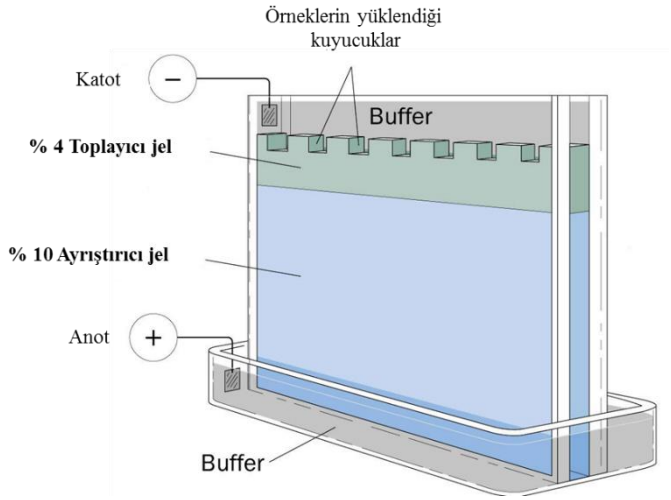
denklemi kullanılmıştır. Y, mg/ g cinsinden denizanası kollajeni verimini, V, m cinsinden izole edillmiş kollajen hacmini, C, spektrofotometrik analiz sonucu elde edilen mg/mL cinsinden analiz sonucunu ve W ise g cinsinden liyofilize kollajen ağırlığını temsil etmektedir.

3.2.1.2. Aminoasit Analizi

Ham denizanası, pepsinde çözünür denizanası, sıçan kuyruğu kollajeni ve sığır serum albümin (BSA) 110 °C de 6 M HCl içerisinde inert atmosferde 24 saat süresince hidrolize edilerek GC-MS analizine hazırlanmıştır.

3.2.1.3. SDS-PAGE

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) tarafından önerilen prosedürün modifiye edilmesiyle uygulanmıştır. Denizanası kollajeni ve BSA ultra saf su, sıçan kuyruğu kaynaklı kollajen ise 0.1 M asetik asit içerisinde çözülmüş ve numune yükleme tamponu (0,125 M Tris-Cl, % 4 SDS, % 20 v/v gliserol, 0,2 M merkaptoetanol, % 0,02 bromfenol mavisi, pH: 6.8) ile karıştırılmıştır. 100°C'de 5 dakika ısıtılmıştır. Kullanım süresince dondurucuda saklanmıştır. % 10 ayrıştırıcı jel ve % 4 toplayıcı jel deney sırasında hazırlanmış, tarak toplayıcı jele yerleştirilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sağlandıktan sonra jel kalıptan çıkarılmış ve dikey tanka yerleştirilmiştir. Tank içerisi tank tamponu ile doldurulmuştur (0,025 Tris, 0,192 M glisin, % 0,1 SDS, pH: 8.3). Tank tamponu doldurulduktan sonra yaklaşık 2-3 dakika bekletilmiş ve tarak nazikçe jel içinden çıkarılmıştır. Ardından, başta yüksek moleküler ağırlıklı markör olmak üzere, numuneler yükleme tamponuyla muamele edilmiş kuyucuklara yüklenmiştir. Cihaz çalışmaya hazırlanmış ve 300V- 15 mA'de yaklaşık 150 dakika yürütülmüştür. Elektroforez soğutma işlemi uygulanarak yapılmıştır. Elektroforezi takiben, jel çıkarılarak çeşme suyunda yıkanmıştır. Sonrasında Coomassie Blue (% 0,025 Coomassie Brillant Blue R250, % 40 v/v metanol, % 7 asetik asit) boyamasına geçilmiştir. Boya ile 1 saat muamele edilmiş ve boya, boya uzaklaştırıcı solüsyonlarla (metanol, asetik asit, su) yıkanarak görüntüleme yapılmıştır.



Şekil 3.2. SDS-PAGE için kullanılan dikey tankın şematik görüntüsü (http://image.slidesharecdn.com/b-150317231111-conversion-gate01/95/bsc-biotech-ii-bat-unit-3-electrophoresis-24-638.jpg 'den uyarlanmıştır)

3.2.1.4. Hidroksiprolin testi

Numune içerisindeki hidroksiprolin konsantrasyonu, 4- (Dimetilamino) benzaldehit (DMAB) ile reaksiyonu girerek oksitlenmesiyle tespit edilir.

Denizanası kollajeni (5,1 mg) ve ham denizanası (5 mg) tartılarak 100 µL 12 M HCl ve 100 µL 18.2 MΩ ultra saf su içerisinde 120°C'de 3 saat hidrolize edilmiştir. Hidroliz aşamasından sonra kömürleşen partiküllerin uzaklaştması için 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Numuneler hazır hale geldiğinde hidroksiprolin kiti uygulanmıştır. 2 µL numune 96 kuyucuklu plakaya alınarak kuruyuncaya dek 60°C etüvde kurutulmuştur. Hidroksiprolin miktarının doğru belirlenmesini sağlamak amacıyla spike kullanılmıştır. Akabinde kloramin T/ oksidasyon tampon karışımı ve 4-(Dimetilamino)benzaldehit eklenmiş ve inkübasyon süresi sonrası spektrofotometrik ölçüm 560 nm dalga boyunda alınmıştır (n=3). Hidroksiprolin konsantrasyonu: standart eğriye göre bilinmeyen numunedeki hidroksiprolin miktarının (S_a) (µg), kuyucuklara eklenen numune hacmine (µl) bölünmesiyle bulunmaktadır. Ancak spike kullanılan testlerde

$(S_a)= (A_{560})_{numune}/(A_{560})_{spike\ kontrol}-(A_{560})_{numune}* 0,4(\mu g)$ formülü ile hesaplanır. (3.2)

3.2.1.5. ATR-FTIR Spektroskopisi

Denizanası kollajeni ve sıçan kuyruğu kollajeni izolasyon aşamasından sonra liyofilize toz halinde analize gönderilmiştir. Numuneler iyice ezilerek analize uygun hale getirilmiştir. Karşılık gelen orta kızılötesi spektrumları, kolajenin karakteristik piklerini belirlemek için ATR aksesuarıyla donatılmış bir FTIR aleti kullanılmıştır. Cihaz, bir Çinko Selenür (ZnSe) ışın ayırıcı ve dötere triglisin sülfat (DTGS) detektörü ile bağlanmıştır. Spektrumlar 1 cm^{-1} çözünürlükle toplanmıştır. 32 tarama frekans aralığı 4000-700 cm^{-1}'e göre sinyal gürültü oranını iyileştirmek için her spektrum başına birlikte ilave edildi. Çevresel değişkeleri hesaba katmamak için her ölçümden önce arka plan spektrumu alınmıştır. Gürültüyü azaltmak ve spektrumları normalize etmek için OriginPro 8 yazılımı kullanılmıştır.

3.2.2. Salvadora persica (Misvak) ekstraksiyonu

Misvak çubukları, kabukları soyulduktan sonra küçük parçalara ayrılıp, etüvde 40°C'de kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan parçalar, milden geçirilerek toz haline getirilmiştir. Birinci ekstraktsiyon yönteminde 10g/200 ml (w/v) ultra saf su içerisinde 3

gün süreyle oda sıcaklığında karıştırılmıştır. İkinci ekstraktsiyon yönteminde ise 10g/200 ml (w/v) 18.2 MΩ ultra saf su içerisinde 80°C'de 1 saat süreyle demlenmiştir. Karışımlar vakumlu düzenekte süzülmüştür. Elde edilen misvak özütü, -86°C'de dondurularak liyofilize edilmiş ve 2 yöntem içinde verim hesabı yapılmıştır. Liyofilizatlar, kullanım aşamasına kadar -86° C de stoklanmıştır.

Şekil 3.3. Misvak ekstraktsiyonunun şemalı gösterimi

Misvak Ekstraktsiyonu







1. Misvak kabuklarından ayrılır, küçük parçalara bölünür ve 40 °C de kurumaya bırakılır. Mil kullanılarak toz haline getirilir.
2. **Yöntem 1:** 10 gr misvak 200 ml ultra saf su içerisinde 3 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
   Yöntem 2: 10 gr misvak 200 ml ultra saf su içerisinde 80 °C içerisinde 1 saat süreyle demlenir.
3. Ekstrakt filtreden geçirilir.
4. Sulu ekstrakt 40 °C de vakum altında balon dibinde yaklaşık 20 ml çözelti kalıncaya kadar damıtılır.
5. Son olarak ekstrakt -80 °C'de dondurulur ve liyofilize edilir.







3.2.2.1. Misvak içerik analizi

Misvak, su içerisinde çözülmüş ve 20 µm steril filtreden geçirilerek süzülmüştür. Analiz WAX kapilar kolon kullanılarak yapılmıştır. Taşıyıcı gaz helyum akış hızı 1 ml/dk olarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı başlangıçta 50°C ile başlayıp 220°C'ye kadar çıkmıştır. Sıcaklık dakika da 3°C'lik artış göstermiş olup enjeksiyon hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir.

3.2.2.2. Termal Analizler

Termogravmatik analiz (TGA) ve Diferansiyel taramalı analiz (DTA), denizanası kollajeni, ham denizanası, sıçan kuyruğu kollajeni ve BSA için yapılmıştır. Numuneler, N_2 atmosferi altında, 25°C–1000°C aralığında 10°C dakika^{-1} oranında arttırılarak ısıtılmıştır.

3.2.2.3. Toplam Fenol Miktarı

Analiz, Singleton ve Rossi, (1965)'nin önerilmiş olduğu Folin-Ciocalteau yöntemi kullanılarak yapılmıştır. 100 µL örnek, 900 µL distile su, 5 mL 0,2 N Folin-Ciocalteau çözeltisi, 4 mL % 7,5'lik sodyum karbonat çözeltisi ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 2 saat inkübe edilmiştir. Spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Gallik asit ile hazırlanan standart eğriden faydalanılarak örnekteki toplam fenol miktarı mg gallik asit/ L cinsinden tespit edilmiştir.

3.2.2.4. CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi ile Antioksidan Miktarının Belirlenmesi

Antioksidan kapasitesi, Apak ve ark., (2004) tarafından önerilen yöntem ile yapılmıştır. Yöntem, Neokuprin-Nc'in bakır(II) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan bakır (II)-neokuprin bileşiğinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de absorbans veren Cu(I)-neokuproin kelatına dönüştürme yeteneğine dayanmaktadır.

Kütlece %10'luk sulu misvak çözeltisinden 20 µL örnek, 1 mL 0,01M bakır klorür, 1 mL 7,5×10-3 Neocuprin, 1 mL 1 M amonyum asetat çözeltisi (pH:7) ve 1080 µL saf su eklenerek yarım saat inkübasyona bırakılmıştır. 450 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Trolox ve C vitamini ile hazırlanan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.3. Kollajen/ Misvak Hibrit İskelelerin Hazırlanması

Liyofilize denizanası kollajeni, % 2, % 3 ve % 5'lik (w/v) olacak şekilde 18.2 MΩ ultra saf su içerisinde homojen oluncaya kadar karıştırılarak çözülmüştür. 200 µl çözelti özel kalıplara dökülmüş ve -86°C de 24 saat dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir. Üretilen her bir iskelenin ağırlığı yaklaşık 6 mg gelmiştir. Liyofilize iskeleler nazikçe kalıplardan çıkarılmış ve çapraz bağlama yapılmak üzere başka bir kalıba aktarılmıştır.

Çapraz bağlama işlemi Buttafocoa ve ark. (2006) tarafından önerilen yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Üretilen iskeleler, 1 ml % 99,99 etil alkolde yarım saat bekletilmiştir. Bekletme işlemi sırasında, 0,05 M 4-morfolinetanosulfonik asit (MES) tamponu saf su içerisinde hazırlanmış ve pH 5,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Sulu tampon çözeltisi ve % 99,99 etanol sırasıyla 1:9 oranında karıştırılmıştır. Hazırlanan alkollü MES tamponunda çapraz bağlama çözeltisi hazırlanmıştır. 1 ml çapraz bağlama çözeltisi için 6,72 mg NHS ve 27,6 mg EDC tartılıp alkollü MES tamponunda çözülmüştür. Yarım saat sonunda iskeleler üzerindeki alkol atılıp her bir iskelenin üzerine 1 ml olacak şekilde çapraz bağlayıcıdan ilave edilmiştir. Hafif çalkalama hareketi yapılarak 7 saat süreyle oda sıcaklığında çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. 7 saat sonunda çapraz bağlayıcı atılmış ve iskeleler ultra saf suda içerisinde oda sıcaklığında 24 saat süreyle yıkanmıştır. Yıkanan iskeleler dondurulup tekrar liyofilize edilmiştir.

Toz haldeki misvak % 0,05 (w/v) ve % 0,1 (w/v) konsantrasyonunda ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Çapraz bağlanmış kuru kollajen iskeleler üzerine her iki konsantrasyondaki misvak çözeltilerden 200 mikrolitre damla damla ilave edilerek emdirilmiş ve iskeleler tekrar dondurularak liyofilize edilmiştir.

Toz haldeki misvak % 0,05 (w/v) ve % 0,1 (w/v) konsantrasyonunda % 3 kollajen çözeltisi içerisinde çözülmüş ve dondurularak liyofilize edilmiştir. Daha sonrasında MES içerisinde NHS/EDC kullanılarak aynı şekilde çapraz bağlama prosedürü uygulanmıştır. Çapraz bağlama sonrasında saf su ile yıkanmış ve dondurularak liyofilize edilmiştir.

3.2.4. Şişme Testi

%3'lik kollajen iskele (3,8 mg), %3 kollajen+ % 0,05 misvak hibrit iskele ve % 3 kollajen+ % 0,1 misvak hibrit iskele tartılarak oda sıcaklığındaki PBS içerisine 5 dakika süreyle bırakılmış ve şişme kapasitesi hesaplanmıştır (n=3). (PBS yoğunluğu http://www.csgnetwork.com/h2odenscalc.html referans alınarak hesaplanmıştır.)

İskelenin şişme kapasitesi:

İskele hacmi= (son ağırlık- ilk ağırlık)/ PBS yoğunluğu (3.3)

3.2.5. Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Temini ve Kültüre Edilmesi

Periodontal ligament, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlügü Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2016-02 numaralı kararı ile 21 yaşındaki bir kadın hastadan temin edilmiştir. Ortodontik nedenlerle çıkarılan molar dişin kök yüzeyinden alınan periodontal bağ dokusu steril bistüri yardımıyla kazınmış ve 15 ml'lik steril falkon tüplere aktarılmıştır. Transfer süreci, % 10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 2 mM L- glutamin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Eksplant kültür alımı İnanc ve arkadaşları (2008) tarafından önerilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir.

Periodontal Ligament Fibroblast (PDLF) hücrelerinin teminini takiben kollajenaz enzimi ile doku parçaları sindirilmiş ve enzim inaktive olana kadar serumlu vasat ile yıkanmıştır. Hücrelerin dibe çökmesini sağlamak amacıyla 300g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından % 10 FBS, 1mM L- glutamin ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren DMEM içerisinde süspanse edilmiş ve 37°C % 80-90 bağıl nem ve % 5 CO_2 sağlayan bir inkübatörde kültüre edilmiştir. Eksplant kültürün besi yeri iki günde bir değiştirilmiş ve % 80-90 doluluk oranına ulaşan hücreler tripsinizasyonla enzimatik olarak kap tabanından ayrılarak bir üst pasaja ayrılmıştır. Tripsinizasyondan önce kültür kaplarından vasat uzaklaştırılmış ve % 0.9 NaCl içeren fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmıştır. Sonra, %0.025 tripsin/ 0,53 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren çözeltiyle 5-10 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler tabandan ayrıldıktan sonra serumlu vasat ile yıkanmış ve böylelikle enzimatik aktivite sona erdirilmiştir. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve 300g'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

3.2.6.Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Üretilen İskelelerle Etkileştirilmesi

Üretilen iskeleler laminer akışlı steril kabinin UV ışığı altında sterilize 4 saat edildikten sonra 24'lü hücre kültürü kalıplarına yerleştirilmiş ve dördüncü pasajda % 80-90 doluluk oranına ulaşan PDLF hücreleri, iskele başına 20 µl hücre süspansiyonu (240.000 hücre/iskele) olacak şekilde iskelelere emdirilmiştir. %10 FBS, 1mM L- glutamin ve %1

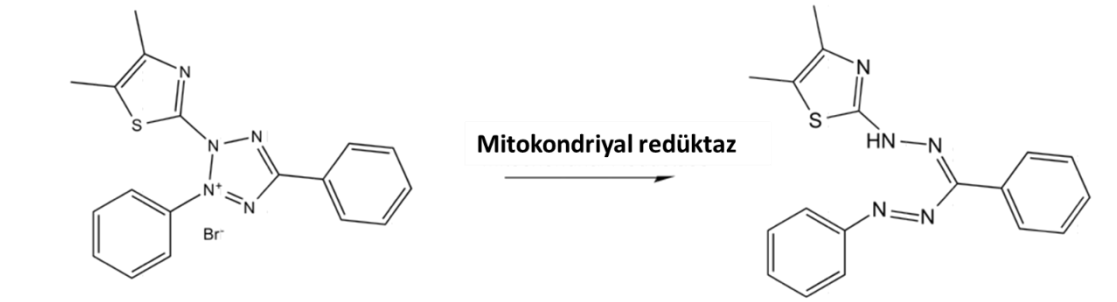
antibiyotik-antimikotik içeren DMEM içerisinde 37°C, % 80-90 bağıl nem ve % 5 CO_2 sağlayan bir inkübatörde inkübe edilmiştir.

Hücre sayısı x 10.000/ sayılan kare sayısı x dilüsyon faktörü (3.4)

formülü ile hesaplanmıştır. Hücre sayımları Neuber lamı ile gerçekleştirilmiştir. Hücre ile etkileştirilen iskelelerin besiyeri iki gün aralıkla değiştirilmiştir.3,7 ve 14. günlerde hücre miktarı invert mikroskop yardımıyla takip edilmiştir.

3.2.6.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT ((3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi, hücre canlılığını ve proliferasyonunu tespit etmeye olanak sağlayan bir testtir. Testin çalışma prensibi, tetrazolyum boyasının, canlı hücrelerdeki mitokondriyal redüktaz enzim grubuyla verdiği tepkimeler sonucunda indirgenmesiyle oluşan formazan maddesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır. MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan sarı renkli bir boyadır. Canlı hücrelerde mitokondri tarafından bu boyanın tetrozolyum halkası parçalanırsa, mavi-mor renkli suda çözünmeyen formazan maddesi oluşur. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak kabul edilir. MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu, canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir.



Şekil 3.4. Sarı renkli tetrazolyum tuzunun enzimleriyle mor renkli formazana dönüşüm reaksiyonu (http://www.wikiwand.com/en/MTT_assay ‘den uyarlanmıştır)

Hücreyle etkileştirilmiş iskeleler 48’li hücre kültürü kaplarına transfer edilmiş ve PBS içerisinde yıkanmıştır. Stok vasat içerisine MTT reaktifi eklenerek, 37ºC ve % 5 CO_2 ortamında inkübatörde 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından iskeleler MTT solüsyonu eklenmiş ependorf içerisine koyularak 10 dakika vorteks ile

karıştırılmıştır. Ependorf içerisindeki partikülleri uzaklaştırmak için 14000rpm‘de 2 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen renkli solüsyon spektrofotometrede kör alınarak 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.2.6.2. Üretilen İskelelerin Taramalı Elektron Mikroskobuyla İncelenmesi

Üretilen iskelelerin morfolojisi, insan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin, kollajen/misvak hibrit iskelelerine tutunuşu ve iskele üzerindeki görüntüleri SEM ile belirlenmiştir. SEM için kullanılan numune serileri :

- Çapraz bağlama yapılmış kollajen iskele
- Hücreyle etkileştirilmiş çapraz bağlanmış kollajen iskele
- Hücreyle etkileştirilmiş, çapraz bağlanmış kollajen/ misvak iskeleler kullanılmıştır.

Numuneler SEM öncesi steril PBS ile 3 kez yıkanmış ve PBS içerisinde hazırlanmış % 2,5 Gluteraldehit çözeltisinde fikse edilmiştir. Fiksasyon gerçekleştikten sonra fiksatifi uzaklaştırmak için iskeleler saf su ile yıkanmıştır Dereceli alkol dehidrasyonlarını (% 99.99, % 96, % 90, % 80, % 70, % 50) takiben iskelelerin iyice kurutulması sağlanmıştır. İskeleler SEM analizinde kullanılan stanblara yerleştirilmiş ve 120 sn Au-Pd ile kaplanmıştır.

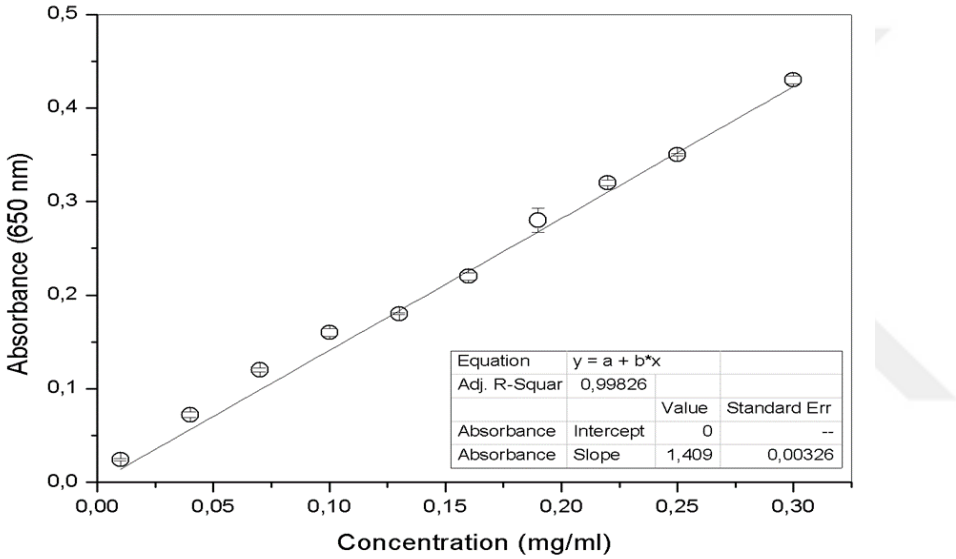
3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, OriginPro 8 kullanılarak yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir. Verilerin analizinde normal dağılım görüldüğü durumlarda parametrik bağımsız örneklem t-test kullanılmıştır. α -anlamlılık düzeyi $p< 0,05$ olarak belirlenmiştir.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kollajen İzolasyonunun Verimliliği

Sıçan kuyruğundan izole edilen kollajen için oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1'de görülmektedir. Konsantrasyon ve absorbans arasında lineer bir ilişki tespit edilmiş ve eğrinin R^2 değeri 0,99826 olarak bulunmuştur. Bu grafik temel alınarak yapılan denizanası kollajeni ölçümleri sonucunda pepsinde çözünür kollajen için kullanılan prosedüre göre verimlilik % 61,15 mg / ml olarak saptanmıştır (n=9).



Şekil 4.1. Sıçan kuyruğunda izole edilen kollajenin absorbans ve konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren kalibrasyon eğrisi

4.1.1. Aminoasit Kompozisyonu

Ham denizanası kollajeni, pepsinde çözünebilir denizanası kollajeni, sıçan kuyruğu kollajeni ve BSA için yapılan aminoasit analizi sonuçları Çizelge 4.1'de görülmektedir. Aminoasit hesaplaması, AA aminoasit kısaltması olmak üzere ;

$AA_1^{\text{GC-MS veya HPLC sonucu}}$ (nmol/ml) / MW_{AA1}=AA_1

AA_1+ AA_2+….+ AA_n = y

AA_1 /y*1000 = aminoasit sayısı/ 10000 (4.1)

şeklinde hesaplanmıştır.

Glisin denizanası kollajeni ve sıçan kuyruğu kollajeninde en yüksek değere sahip aminoasit olmuştur. En yüksek değere sahip diğer aminoasit ise prolindir. Glutamin, sistin ve triptofan aminoasitleri tespit edilememiştir. Hidroksiprolin beklendiği gibi en düşük değere sahip aminoasit olmuştur.

İmino asit içeriği (prolin ve hidroksiprolin içeriği) kollajenin termal stabilitesini gösteren bir parametredir. Deniz kaynaklı kollajenin imino asit içerik oranı karasal kaynaklı sıçan kuyruğu kollajenine göre daha düşüktür.

BSA amino asit kompozisyonunda ise kollajenin aksine yüksek miktarda fenilalanin, lösin ve tirosin, düşük oranda ise glisin aminoasidine rastlanmıştır. Hidroksiprolin ise tespit edilememiştir.

Amino asit analizi elde edilen veriler literatürle uyum sağlamaktadır. Song ve ark. (2006) yaptığı çalışmada, glisin baskın amino asit olarak tespit edilmiştir. Tirozin miktarının ise atelo kollajen saflığını gösterdiği ifade edilmiştir. Hidroksiprolin ise en düşük miktarda görülen amino asit olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde Barzideh ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan araştırmada, glisin en fazla görülen amino asit olarak tespit edilirken, glutamik asit ve prolin fazla görülen diğer aminoasitler olmuştur. Sistin ve histidin tespit edilmemiştir. İminoasit miktarı ise memeli kollajenine oranla daha küçük değere sahiptir.

Zhang ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan diğer bir çalışmada çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara benzer değerler elde edilmiştir. İmino asit miktarı denizel kaynaklarda daha düşük oranda olduğu saptanmıştır. Glisin en yüksek değere sahip aminoasit iken hidroksiprolin miktarı alt seviyelerdedir. Sıçan kuyruğu kollajeni ise Robinson (1997) tarafından çalışılmış olup, glisin ve prolin bakımından zenginlik göstermektedir.

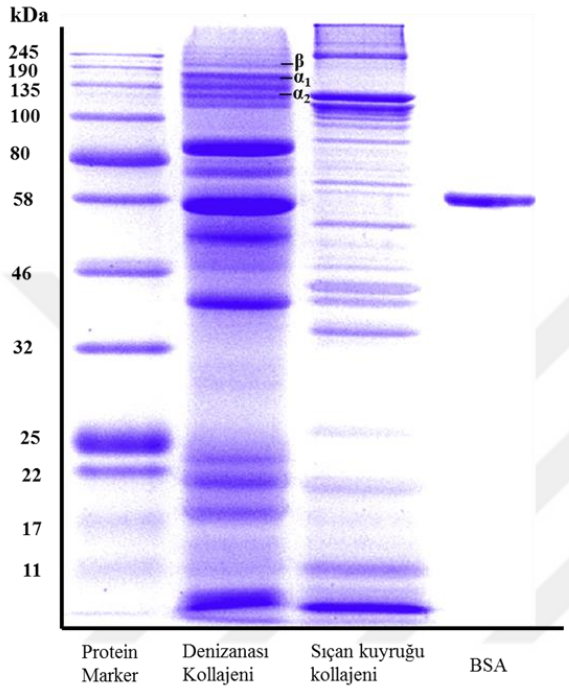
Çizelge 4.1. Amino asit analizine ait sonuçlar

Aminoasitler	Ham Denizanası	Denizanası Kollajeni	Sıçan Kuyruğu Kollajeni	BSA
Alanin	99	87	118	79
Arjinin	-	-	-	-
Asparajin	17	30	13	13
Aspartik asit	69	67	35	66
Sistin	-	-	-	20
Glutamik asit	88	77	54	76
Glutamin	-	-	-	-
Glisin*	301	293	343	25
Histidin	-	-	3	24
Hidroksiprolin*	16	21	49	-
İsolösin	75	72	33	56
Lösin	38	61	49	172
Lisin	34	28	22	82
Metiyonin	6	6	8	9
Fenilalanin	40	34	38	107
Prolin*	113	111	156	64
Serin	-	20	22	23
Trionin	26	26	13	37
Triptofan	-	-	-	-
Tirosin*	16	12	7	58
Valin	62	55	37	88
Toplam	**1000**	**1000**	**1000**	**1000**

4.1.2. SDS- PAGE

Şekil 4.2'de SDS- PAGE sonucu oluşan elektroforetik modellemeyi göstermektedir. Kollajen tip I genel olarak 100-190 kDa arasında yoğun bantlaşmalar gösterek karakteristik α bantlarını oluşturmaktadır. Protein markörü esas alınarak denizanası kollajeni tip I kollajen olduğu bilinen sıçan kuyruğu kollajeni ile karşılaştırılmış ve 100-190 kDa arasında α bantlarını göstermiştir. Pepsin sindiriminin bir sonucu olarak, pepsin ile hidrolize edilmiş polipeptitlere ait bazı yoğun bantlar yaklaşık 90 kDa ortaya çıkmıştır. 40 kDa civarındaki büyük bant, tüm pepsin hidrolizatı denizanaları örnekleri için ortaktır. Bu sonuç; Rhizostoma pulmo'dan izole edilen pepsinde çözünür kollajenin tip I kollajen olduğunu göstermiştir. BSA ile negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Barzideh ve arkadaşlarının (2014) denizanası kollajeni için yaptıkları elektroforetik çalışmada α zincirleri ve dimer β zinciri benzer aralıklarda (~137 ve ~241 kDA) konumlanmıştır. Zhang ve arkadaşları (2014) ise tip 1 kollajene ait bantları α zincirlerini ~116 ve ~205 kDA arasında tespit etmiştir. Robinson ve arkadaşları (1997), sıçan kuyruğundan izole edilmiş

kollajen tip I için α zincirini ~126~140 kDA arasında tespit etmişlerdir. Jankangram ve arkadaşları (2016), pepsinde çözünür denizanası kollajeni ve asitte çözünür denizanası kollajeni için sıçan kuyruğu kollajenini referans göstererek SDS-PAGE uygulamışlardır. Pepsinde çözünür denizanası kollajeni için α zincirininin yaklaşık ~116 kDa yakınlarında görüldüğünü bildirmiştir.



Şekil 4.2. Denizanası kollajeni, sıçan kuyruğu kollajeni ve BSA için SDS- PAGE bantları

4.1.3. Hidroksiprolin testi

Test sonrası ham denizanası hidroksiprolin içeriği 5,97±0,53 µg/mg, pepsinde çözünür denizanası kollajeni 7,34±0,91 µg/mg olarak bulunmuştur. Analiz spike kullanılarak yapıldığından hesaplamalar;

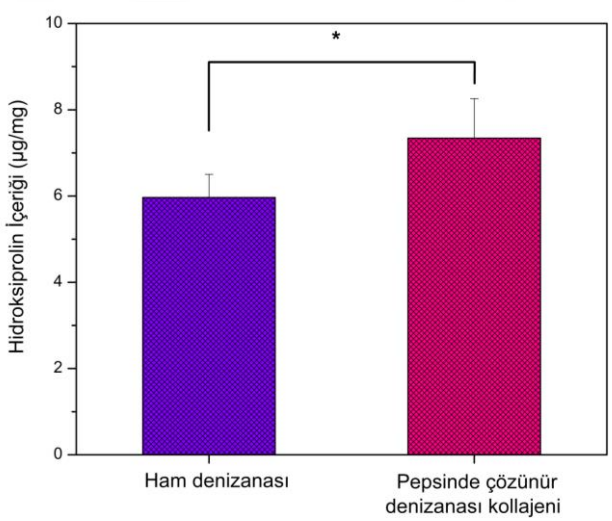
$$S_a = A(560)_{numune} / A(560)_{spike\ kontrol} - A(560)_{numune} \quad (4.2)$$

denklemi kullanılarak yapılmıştır.

Yapılan ANOVA testi, kullanılan her iki numuneninde birbirine benzer olduğunu göstermiştir ($p>0,05$). Analiz sonuçlarındaki önemsiz farklılık ise pepsinde çözünür denizanası kollajenin daha saf oluşundan kaynaklanmaktadır. Pepsinde çözünür denizanası kollajeni bir seri izolasyon işlemine tabii tutularak saf kollajen elde edilmesi

amaçlanmıştır. Ham denizanasında görülen düşük verim muhtemelen kovalent bağ ile ilişkilidir. Telopeptid bölgedeki aldehit gruplarının yoğunlaşmasıyla ortaya çıkan kovalent bağ çapraz bağlanmasının, moleküler çapraz bağlanma ile birlikte olmasıdır. Bu intermoleküler çapraz bağlanma pepsin sindirimi sırasında parçalanır, bu arada üçlü helisin bütünlüğünü korur, bu nedenle pepsinde çözünür kollajenin verimi ham denizanasından daha yüksektir.

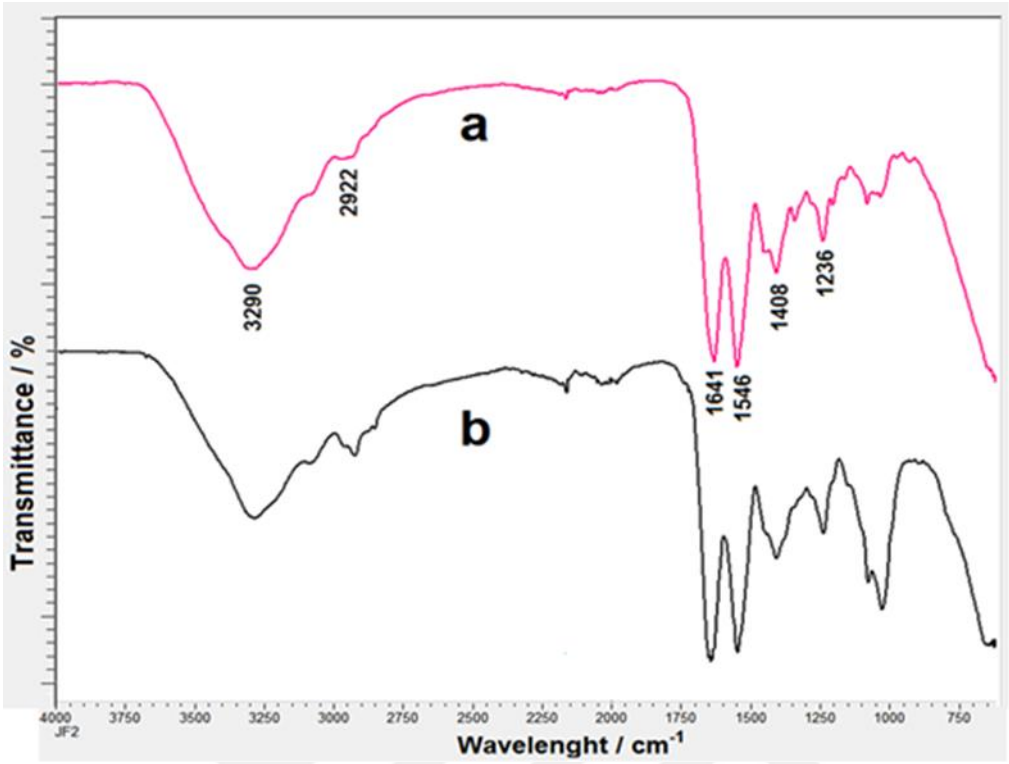
Literatür incelendiğinde, Pal ve arkadaşları (2016) kollajen tip 1 için hidroksiprolin miktarını 90 mg/g olarak bulmuşlardır. Ye ve arkadaşları (2000), kollajen için hidroksiprolin testi uygulamış ve hidroksiprolin miktarını 20 mg/ml olarak tespit etmişlerdir.



Şekil 4.3. Ham denizanası ve pepsinde çözünür denazanası kollajeni için yapılan hidroksiprolin miktar tayinine ait sonuç grafiği

4.1.4. Kollajen için ATR-FTIR spektroskopisi

Wang ve akadaşları (2008) ile Yang ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmalarda farklı türlerden izole edilen kollajenlerin FTIR analizleri yer almaktadır ve bu analiz sonuçları tez kapsamında yapılan analiz ile benzer sonuçlar göstermekedir. 3290 cm^{-1} N-H gerilme frekansı ile bağlantılı olan amit A grupları hem denizanası hem de sıçan kuyruğu kollajeninde bulunmuştur. Serbest N-H gruplarının gerilme titreşimleri 3400- 3440 cm^{-1} dalga sayısı aralıklarında görülmüştür. Diğer yandan her iki kaynaktan izole kollajenlerde B gruplarındaki CH_2 gerilmeleri asimetrik olup, 2922 cm^{-1} aralığında görülmüştür. Amit I grubu 1647 cm^{-1} aralığında bulunmuştur. Sekonder protein yapılarıyla ilişkili olan polipeptit karbonil gruplarının karakteristik aralığı ise 1600- 1700 cm^{-1} 'dir.

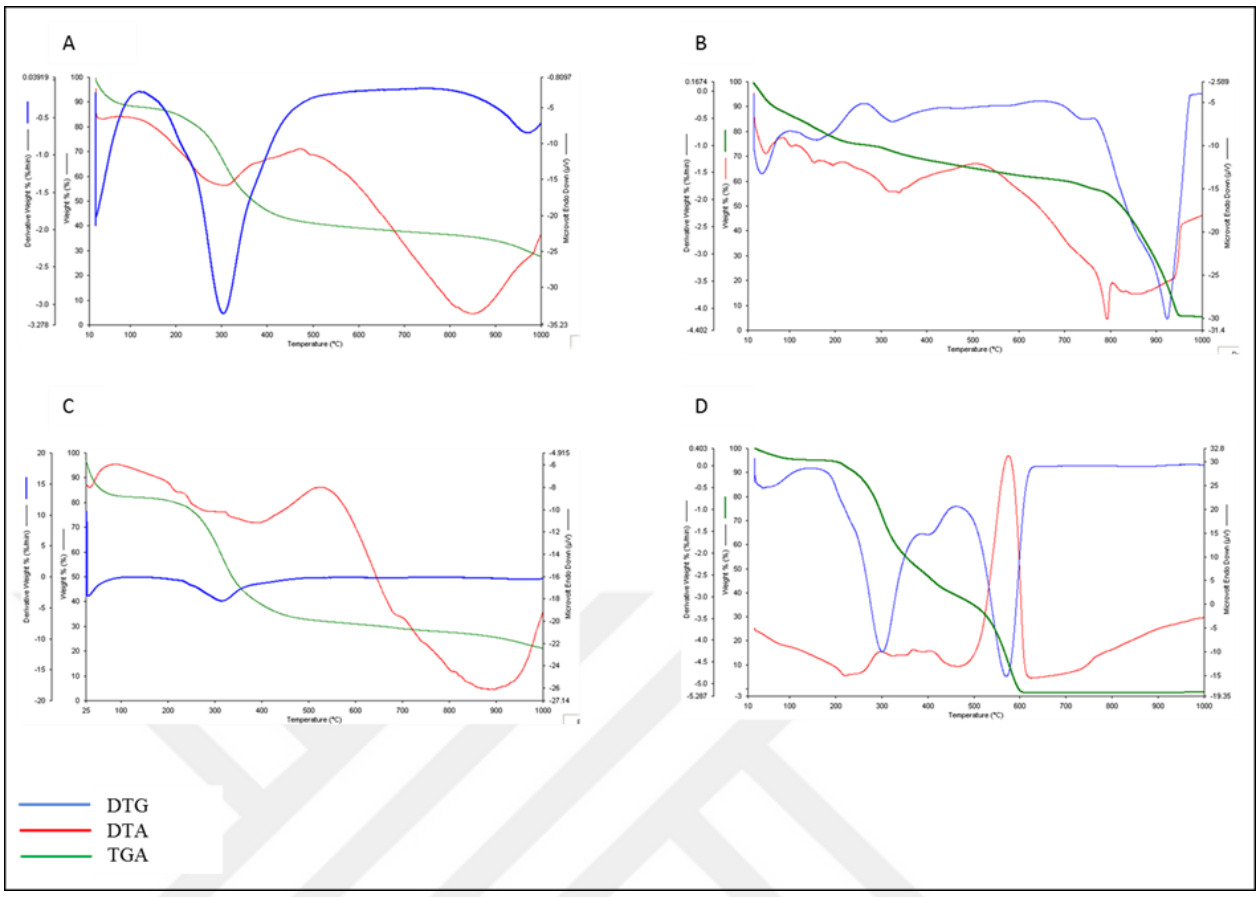


Şekil 4.4. (a) Sıçan kuyruğu kollajeni, (b) denizanası kollajeni

4.1.5. Termal Analiz Sonuçları

Denizanası kollajeni, ham denizanası, sıçan kuyruğu kollajeni ve BSA için TGA, DTA ve DTG analiz sonuçları Şekil 4.6'da verilmiştir. Kollajenin kütle kaybı iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta kollajenin yapısından su uzaklaştırılır, sonrasında proteinin ısıl kararlılığı ortaya çıkar. Denizanası kollajeni 25-100°C sıcaklık aralığında su kaybetmeye başlamıştır. Termal bozunma sıcaklığı ise 280-400°C aralağında olmuştur. Bu bozulma aralığında kollajen yaklaşık olarak %40-45 arası kütle kaybı göstermiştir. Denizanası kollajeni ve sıçan kuyruğu kollajeni benzer TGA sonuçları göstererek 100 °C'nin üzerinde yapısal olarak bozunma göstermiştir. Diğer numunelerin aksine BSA 300°C ve üzeri sıcaklıklarda bozunmaya başlamıştır.

Analiz sonuçları önceki çalışmalarla desteklenmektedir. Wisniewska ve arkadaşlarının (2014) yapmış olduğu çalışmada, 25°C ve 100° arasında kollajenden suyun uzaklaştığını ve 280 °C ve 400°C'de degregasyona uğradığı ifade edilmiştir. Sadeghi ve Hosseinzadeh (2013) yaptıkları çalışmada, termal bozunmanın 400°C'de gerçekleştiğini bildirmiştir. Zhao ve arkadaşları (2015) sığır serum albümininin bozunma sıcaklığının 600°C ve üzerinde olduğunu belirtmiştir.



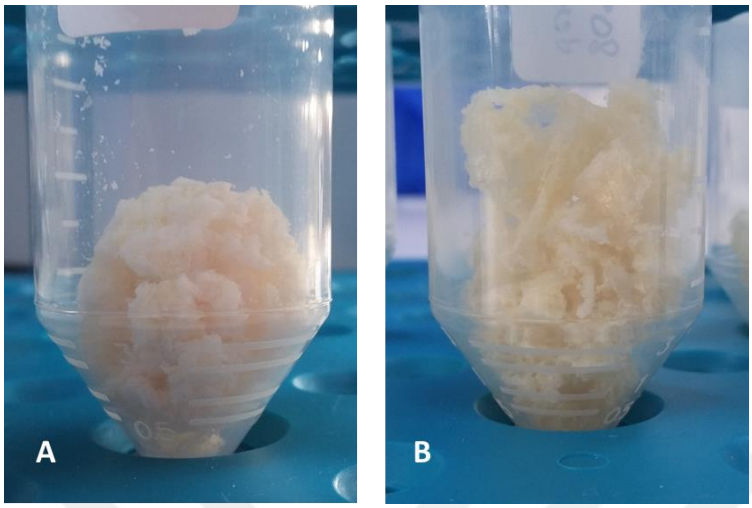
Şekil 4.5. Termal analize ait grafikler (A) Denizanası kollajeni (B) Ham denizanası (C)Sıçan kuyruğu kollajeni (D) BSA.

4.2. Misvak ekstraksiyonu

Misvak 2 farklı yolla ektrakte edilmiştir. Birinci yöntem 25°C' de 3 gün oda sıcaklığında 18.2 MΩ ultra saf su içerisinde karıştırılma yöntemidir. İkincisi ise 18.2 MΩ ultra saf su içerisinde 80°C'de 1 saat demlemedir. Ekstraksiyon işlemi sonrası sulu çözelti berraklaşıncaya kadar Watmann filtre kağıdı kullanılarak vakumlu sistemle süzülmüştür. Su belirli bir seviyeye kadar evaporatörde 40°C'de uzaklaştırılmış ve sonrasında liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası ekstraktlar tartılmış ve her iki ekstraksiyon yöntemi için de % 17 verim hesaplaması yapılmıştır. Ekstraktların nemi içerisine çabuk hapsettiği gözlemler arasındadır.

Mohamed ve Khan 'ın (2013) yaptıkları çalışmada toz misvak (Suudi Arabistan) % 80 etanol, % 80 metanol, % 80 aseton ve saf su da ekstrakte edilmiştir. En verimli yöntem % 80 metanolle olan yöntem olup (% 1.02), en düşük verimlilik % 0,56 ile saf suda gözlenmiştir. Chelli- Chentouf ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları çalışmada ise misvak (Güney Cezayir) metanolle ekstrakte edilmiş ve elde ettikleri verim % 45 olmuştur.

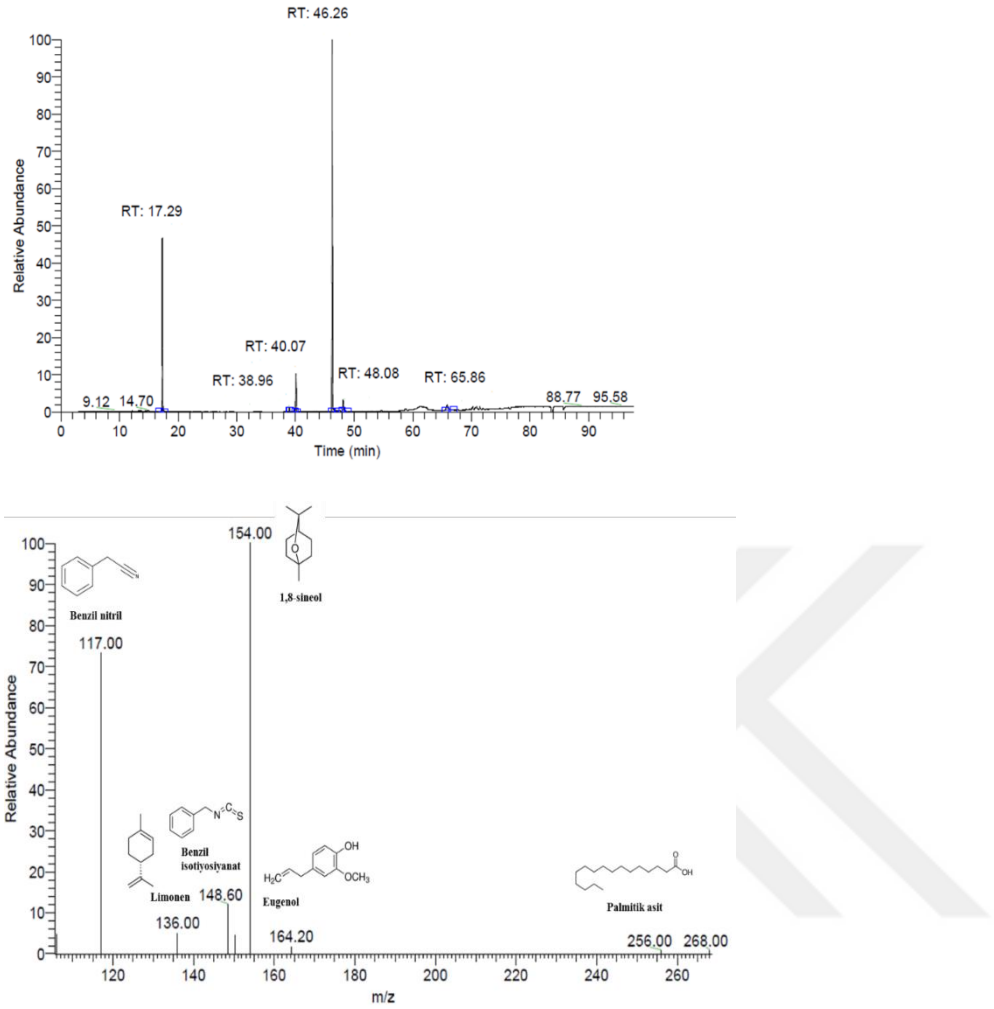
Yapılan ektraksiyonlardaki yüzde verim farkının misvak bitkisine ait farklı türlerin materyal olarak kullanılmasının sebep olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.6. (A) Birinci yönteme ait liyofilizasyon sonrası görüntü (B) İkinci yönteme ait liyofilizasyon sonrası görüntü

4.2.1. GC-MS Analizi

GC-MS analizi sonrası misvak Salvadora persica L. Bitkisine ait bileşenler tespit edilmiştir. GC-MS sonuçları kütle spektrumuna göre değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; sulu misvak ekstratlarında benzil nitril, benzil isotiyosiyanat, limonen, 1,8-sineol, eugenol ve palmitik asit tespit edilmiştir. Sofrata ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada benzil nitril ve benzil isotiyosiyanat bileşenlerine rastlanmaktadır. Benzer şekilde literatür araştırmalarına devam edildiğinde Naeini ve arkadaşları (2013) çalışmamızla uyum gösteren sonuçlar bulduğu gözlemlenmiştir. Noumi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da ise (2011) GC-MS analizleri sonrasında misvak bitkisinde 15 bileşen tespit etmişlerdir. Bu bileşenler benzaldehit, sabinen, 1,8-sineol, linalool, mirsenol, benzil isosiyanat, benzil nitril, benzil ester, naftalen, metil kavikol, anilin, trans-anetol, karvakrol, benzil isotiyosiyanat ve difenil eterdir. Bu maddelerden altı tanesi Şekil 4.7'de görüldüğü gibi analiz sonucunda saptanmıştır. Analiz sonuçlarındaki farklılıklar, misvak türündeki farklılıklar ve ekstraksiyon şekillerinden kaynaklanmaktadır.

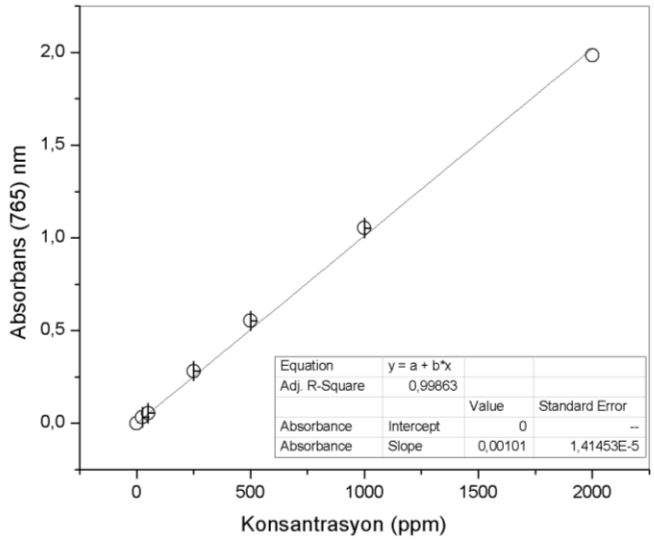


Şekil 4.7. Misvak için uygulanan GC-MS analizine ilişkin sonuç grafikleri

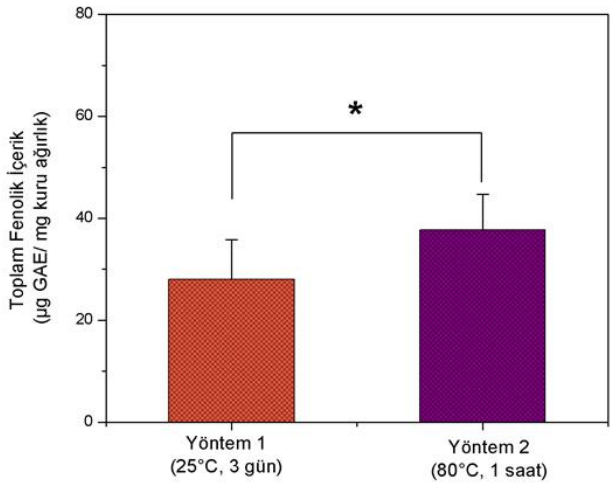
4.2.2. Toplam Fenol İçeriği Analizi

İki farklı ekstraksiyon şekli için Folin-Ciocalteau yöntemi kullanılarak toplam fenol analizi yapılmıştır. 25°C'de 3 gün süreyle ekstrakte edilen misvak için µl gallik asit/ mg kuru ağırlık cinsinden fenol miktarı 28,79 ± 7,79 bulunmuştur. 80°C'de 1 saat demleme yöntemi ile yapılan ekstraksiyonun toplam fenol miktarı ise 37,7±4,03 olarak bulunmuştur. İstatistiksel analizler sonucu p> 0,05 olarak saptanmış ve iki yöntem arasında fark olmadığı gösterilmiştir. Mariod ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmada misvak kabuğu metanolle ekstrakte edilmiş ve toplam fenol miktarı mg gallik asit /g ekstrakt cinsinden 111,70±0,21 olarak bulunmuştur. Chelli- Chentouf ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları çalışmada ise misvak kabuklarının metanolik çözeltisinde mg gallik asit / g cinsinden 52,6 bulunmuştur. Literatür ve yapılan tez çalışmasında görülen sonuç

farklılığının; ekstraksiyon yöntemi ve misvak bitkisine ait farklı türlerin kullanımı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.8. Toplam fenol içeriğinin saptanması için oluşturulan gallik asit kalibrasyon eğrisi

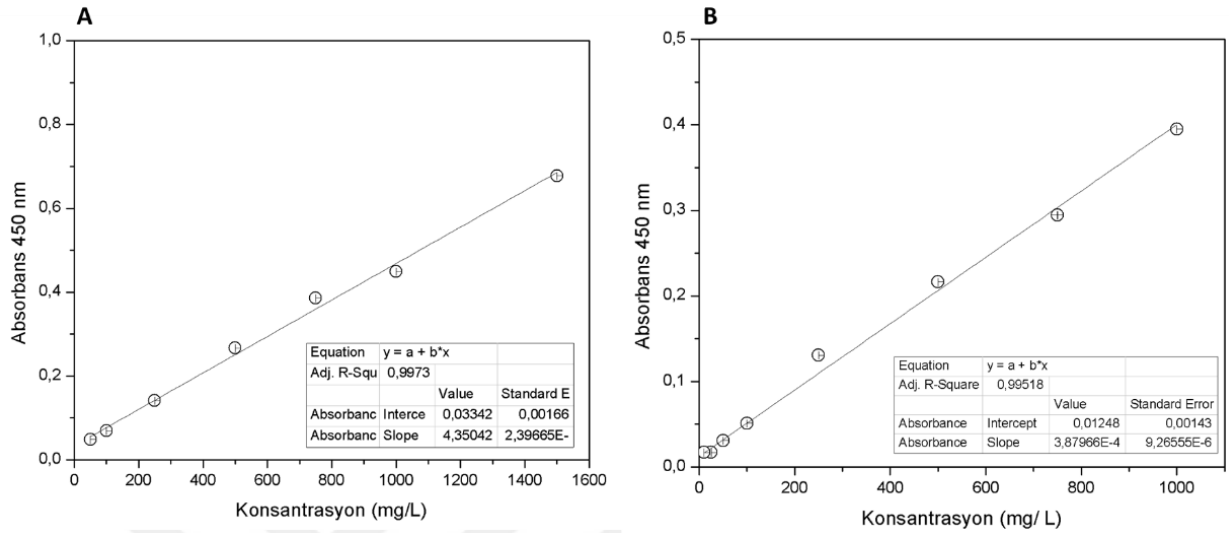


Şekil 4.9. Toplam fenol analizi sonra yöntem 1 ve yöntem 2 arasındaki korelasyonu gösteren grafik

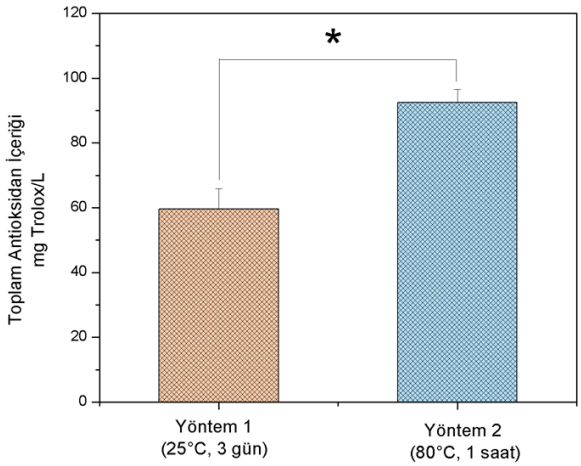
4.2.3. CUPRAC Antioksidan Kapasitesi Testi

CUPRAC yöntemine göre hem trolox hem de vitamin C standartlarında hesaplananan antioksidan aktivite değeri en fazla yöntem 2'de gözlenmiştir. Kütlece % 10'luk misvak sulu çözeltisinden 20 µl numune alınarak yapılan analizde, mg Trolox/L bazında yöntem 2'de 92,5±4,09 mg Trolox/L belirlenirken, yöntem 1'de 59,17±6,23 mg

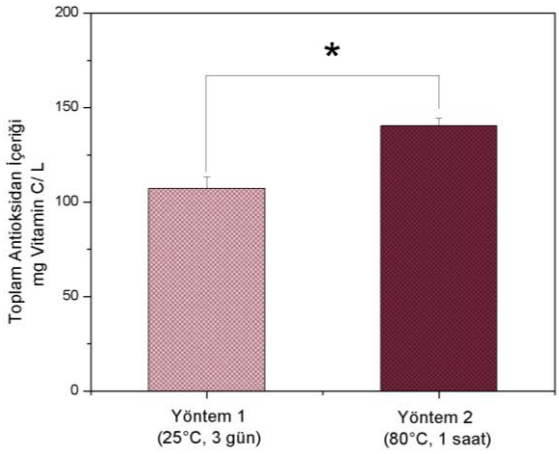
Trolox/L belirlenmiştir. Vitamin C ile çizilen kalibrasyon grafiğine göre ise yöntem 2; 140,5± 4,08 ve yöntem 1; 107,17±6,23 mg Vitamin C/L olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10 Antioksidan kapasitesinin saptanması için oluşturulan (A) Trolox ve (B) C vitamini kalbirasyon eğrisi



Şekil 4.11. % 10'luk sulu misvak çözeltisinden alınan 20 µl numune için mg Trolox/L cinsinden sonuç grafiği



Şekil 4.12. % 10'luk sulu misvak çözeltisinden alınan 20 µl numune için mg Vitamin C/L cinsinden sonuç grafiğİ

4.3. Kollajen/ Misvak Hibrit İskelelerin Hazırlanması

Denizanası kollajeni kaynaklı iskeleler % 2, % 3 ve % 5 denemiş, morfolojik açıdan periodontal bölgeye uygulanabilecek en uygun oranın % 3 (200 µl) olduğuna karar verilmiştir.

NHS/EDC ile yapılan çapraz bağlama glutamik ve aspartik asit kalıntılarının ve karboksilik grupların aktivasyonunun yanı sıra lizin veya hidroksilizin kalıntısı varlığında amit bağlarının oluşmasına neden olur (Song ve ark., 2006). Bu oluşumlar maddenin kararlılığını arttırmaktadır. 0,05 M MES tamponu saf su içerisinde (pH 5,5) % 99,99 etanol sırasıyla 1:9 oranında karıştırılarak hazırlanan çözeltinin içersine eklenen NHD/EDC ile elde edilen çapraz bağlama solüsyonuyla etkileştirilen iskeleler işlem sonrasında kararlı bir yapıya kavuşmuştur. Çapraz bağlanan iskeler su içerisine bırakıldığında morfolojisinde dağılma ya da parçalanma gibi bozulmalar görülmemiş, gözenekleriyle suyu emdiği ve rijit yapısını koruduğu gözlemlenmiştir. Periodontal hastalıklar için tasarlanan bu iskelenin, sorunlu bölgeye implante edildiğinde tükrük sıvısıyla teması süresince yapısını koruyacağını göstermektedir.

Toz haldeki misvak % 0,05 (w/v) ve % 0,1 (w/v) konsantrasyonunda % 3 kollajen çözeltisi içerisinde çözülmesiyle hazırlanan iskelelerde çapraz bağlamaya başarıya ulaşmamıştır. Liyofilizasyon sonrası oda sıcaklığına alınan iskelelerde kısa sürede hava etkileşimine bağlı olarak morfolojik bozukluklar görülmeye başlamıştır. İskelelerde neme aşırı duyarlılık söz konusudur.

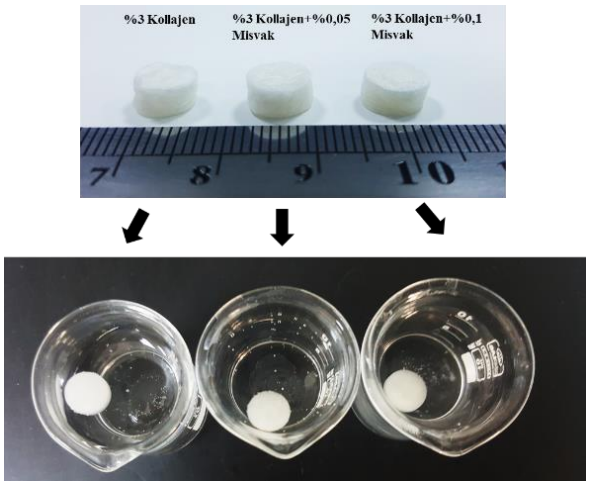
Hoyer ve arkadaşları (2014) yılında yaptıkları çalışmada, denizanası kollajeninden elde ettikleri iskeleleri % 80 etil alkol+ NHS/EDC içerisinde 2 saat kimyasal çapraz bağlamışlardır. Addad ve arkadaşları (2011), denizanası kollajeni iskelelerini çapraz bağlamak için sulu NHS/EDC çözeltisi kullanmışlardır. Song ve arkadaşları (2006), ürettikleri denizanası kollajeni iskeleleri, % 10-30 arasındaki sulu NHS-EDC konsantrasyonlarında, oda sıcaklığın 24 saat süreyle çapraz bağlamışladır.



Şekil 4.13. İskelelerin çapraz bağlama sonucu görüntüsü

4.3.1. Şişme Kapasitesi

% 3 kollajen, % 3 Kollajen+ % 0,1 Misvak ve % 3 Kollajen+ % 0,5 Misvak iskelelere ait şişme kapasiteleri Çizelge 4.1 ‘de görülmektedir. PBS ile 5 dakika muamele edilen iskeleler sürenin sonunda hassas terazi ile tartılmıştır. İskelelerin 5 dakikalık süreçte doygunluğa ulaştığı görülmüştür.



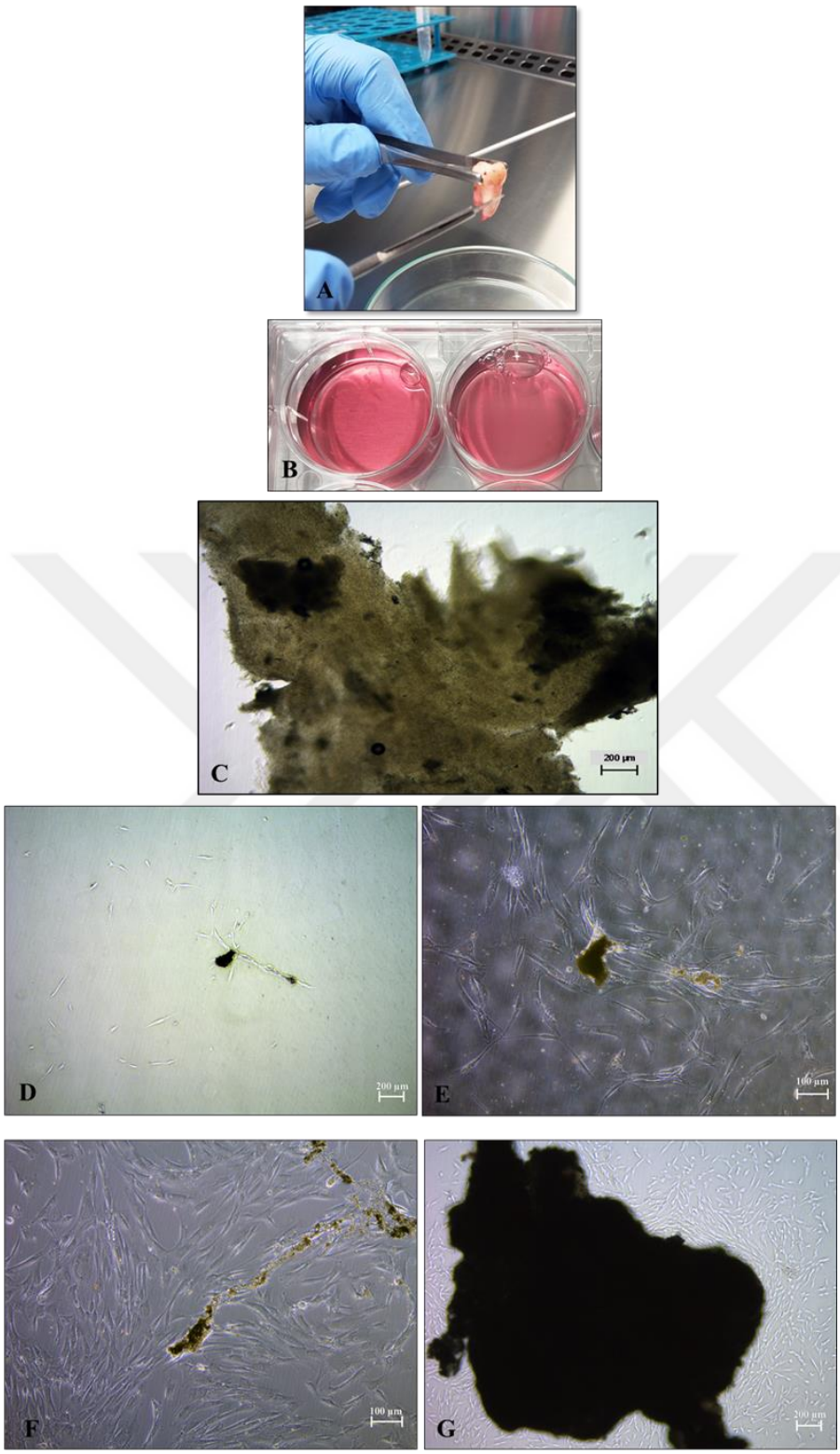
Şekil 4.14. Şişme testinin yapılışına ait görsel

Çizelge 4.2. Üretilen iskelelerin şişme kapasitelerine ait değerler

	%3 Kollajen	%3 Kollajen+ % 0,05 Misvak	%3 Kollajen+ %0,1Misvak
Ortalama su emme kapasitesi (cm^3)	0,125±0,012	0,111±0,013	0,104±0,014

4.3.2. Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Kültürü ve İskelelerle Etkileşimi

PDLF hücreleri % 10 FBS, 1mM L- glutamin ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren DMEM içerisinde süspanse edilmiş ve 37°C %8 0-90 bağıl nem ve % 5 CO_2 sağlayan bir inkübatörde kültüre edilmiş hücreler proliferasyon göstermiş ve 4-6 haftalar arasında % 80 doluluğa ulaşmıştır. Hücreler pasajlanarak alt kültüre geçilmiştir. Hücre morfolojisi ve proliferasyonu inversiyon mikroskobu ile takip edilmiştir. 4. pasaj hücreleri üretilen iskeleler üzerine ekilmiştir.



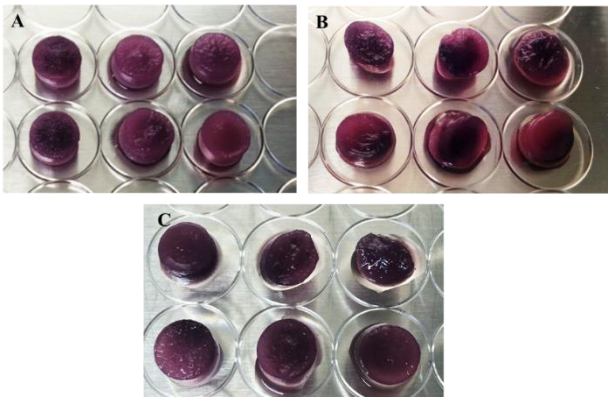
Şekil 4.15. (A) Diş kökü yüzeyinden periodontal tabakanın kazınması (B) Periodontal ligamentin kültür ortamına alınması (C) Periodontal tabakanın 4X mikroskop görünümü (D) Periodontal ligament hücrelerinin 3.gün (E) 7.gün (G) 9.gün (F) 11.gün mikroskop görünümü (4x)

4.3.2.1. MTT Verileri

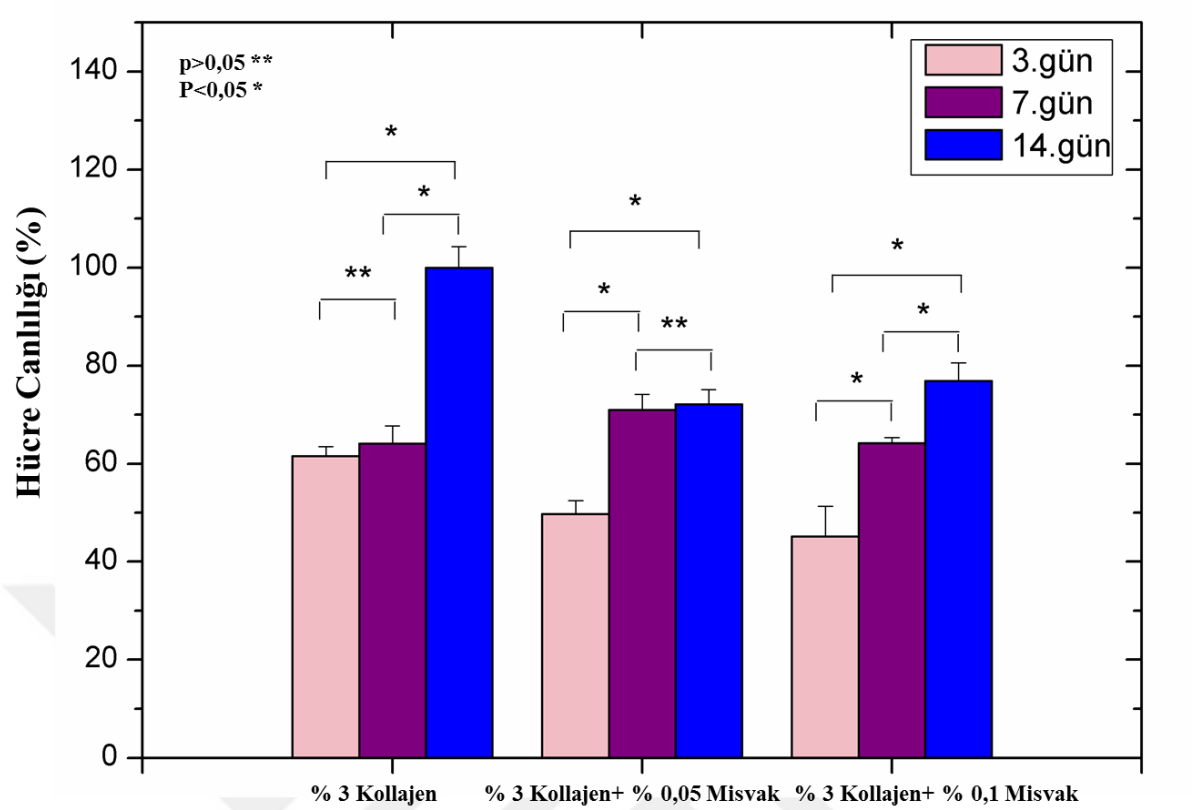
MTT verileri incelendiğinde, 3, 7 ve 14. günlerde hücre canılığında artış göze çarpmaktadır. % 3 kollajen ile elde edilmiş iskelede hücre canlılığının devamı görülmüştür. Misvak emdirilmiş iskeleler incelendiğinde ise misvak bitkisinin periodontal diş hastalıkları tedavisinde anti-bakteriyal ve anti- enflamatuar özellikleriyle rol aldığı, hücre proliferasyonu üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür.

Addad ve arkadaşları (2011) denizanası kollajeni ile farklı hücre hatlarını etkileştirmişler ve canlılık testi uygulamışlardır. Deney sonucunda denizanası kollajeninin hiçbir hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermediğini tespit etmişlerdir. Hoyer ve arkadaşları (2013), denizanası kollajeninden kıkırdak iskele üretmişler ve insan mezenkimal kök hücresinin iskele üzerindeki kondrojenik aktivitesini takip etmişlerdir. 21. Günde MTT uygulanmış ve hücrelerin bugüne dek canlılığını koruduğunu gözlemlemişlerdir. Song ve arkadaşları (2006), denizanası kollajenini, sığır kolajeni, jelatin, hiyalüronik asit ve glukan gibi ticari olarak bulunan doğal yollarla üretilen biyolojik materyallerle karşılaştırmışlardır. Denizanası kolajeni, hücre türüne bakılmaksızın çok daha yüksek hücre yaşayabilirliği sergilemiştir. Literatür ile deney sonuçlarımız karşılaştırıldığında denizanası kollajeninin önemli bir sitotoksik etki göstermediği ortaya konmuştur.

Yapılan ANOVA analizleri sonucu % 3 kollajen 3 ve 7. gün, % 3 kollajen+%0.05 misvak 7 ve 14. gün hücre canlılığı açısından birbirinden farksızken ($p > 0,05$), diğer iskelelerdeki hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.16 Canlılık testi sonrasında iskelelerde formazana bağlı renk değişimi (A) 3. gün (B) 7.gün (C) 14.gün

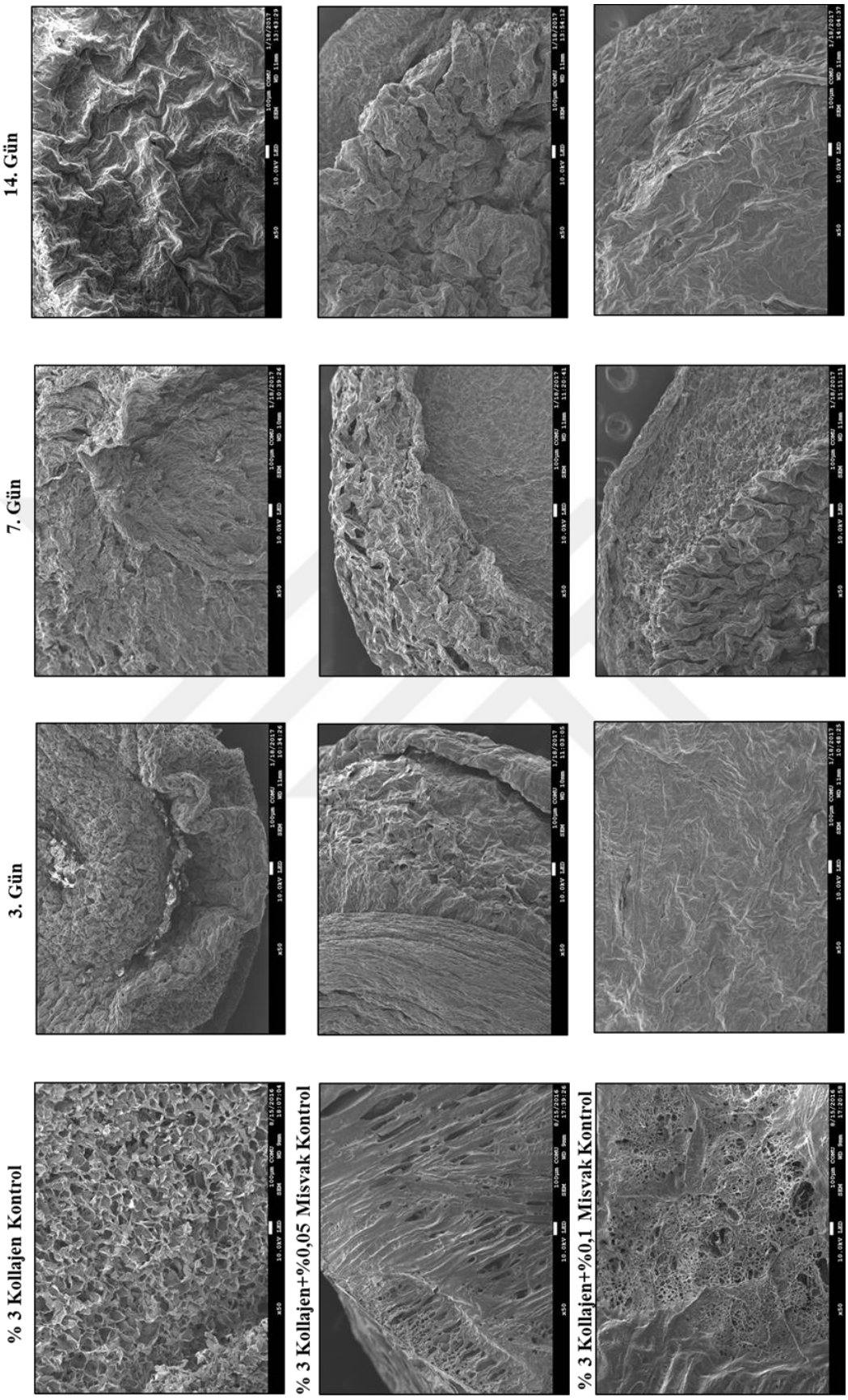


Şekil 4.17. İskelelerin 3,7 ve 14. Günlere ait MTT analizi sonuçlarına ait grafik

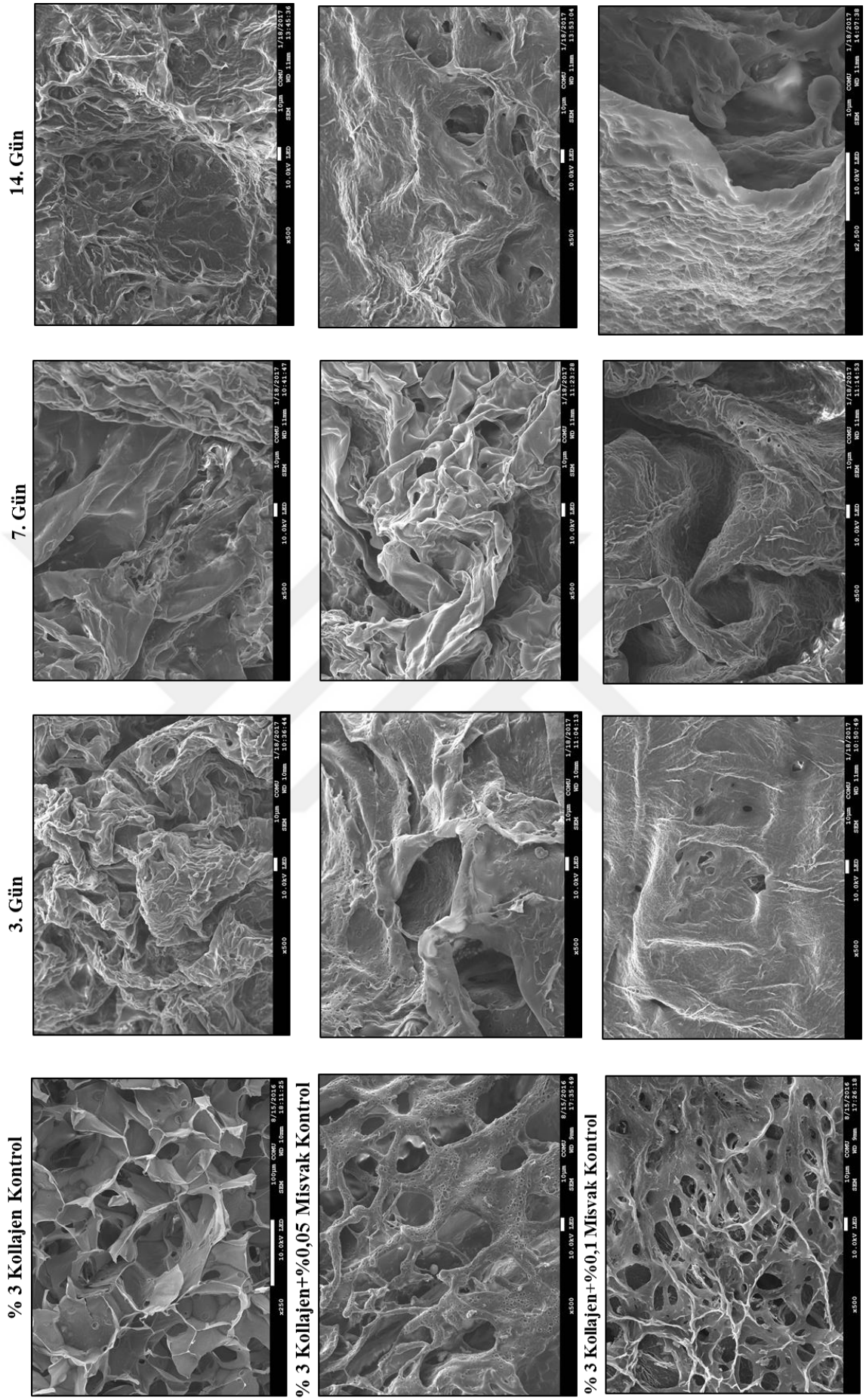
4.3.2.2. İskelelerin SEM Mikrografisi

Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da SEM analizine ilişkin mikrograflar verilmiştir. İskeleler, 50x, 500x ve 2500x değerlerinde büyütme kullanılarak analiz edilmiştir. %3 kollajen içeren iskelelerin ortalama gözenek genişliği 85,3µm olarak hesaplanmıştır. % 3 kollajen+% 0,05 misvak içeren iskelelerde gözenek genişliği 32,3 µm ve % 3 kollajen+% 0,1 misvak içeren iskelelerin gözenek genişliği ise 26,6 µm olarak ölçülmüştür. Misvak emdirilen iskelelerde, misvak özütünün gözeneklerde birikerek gözenek çaplarının küçülmesine neden olduğu görülmüştür.

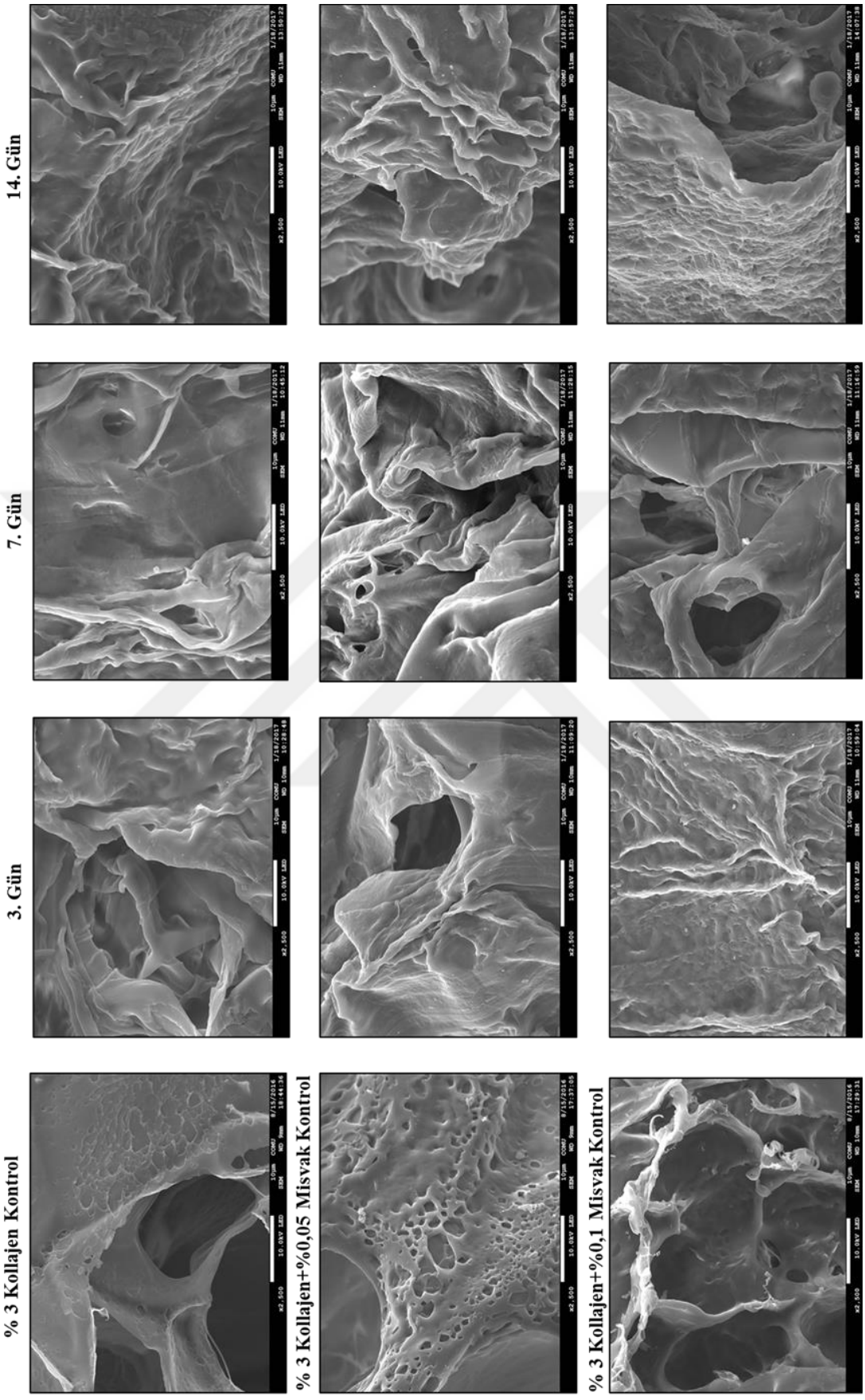
PDLF hücreleri ile etkileştirilen iskelelerde hücre yayılımı ve tutunması izlenmiştir. 3,7 ve 14. günlerde takip edilen hücre proliferasyonu tüm iskelelerde artış göstermiştir. Ancak misvak emdirilen iskelelerde, hücre artışı, yalnızca kollajen içeren iskelelere göre daha düşüktür. Misvak oranı arttıkça da hücre proliferasyonunun hızı azaldığı da tespitler arasındadır. Misvak özütü, sitotoksik etki göstermemiş olup hücre proliferasyonunu da desteklemediği görülmüştür.



Şekil 4.18. Hücresiz ve hücreli iskelelerin 50x büyütmede SEM mikrografları



Şekil 4.19. Hücresiz ve hücreli iskelelerin 500x büyütmedeki SEM mikrografları



Şekil 4.20. Hücresiz ve hücreli iskelelerin 2500x büyütmedeki SEM mikrografları

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Kollajen, doku mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılan bir ekstraselüler matriks proteinidir. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, karasal kaynaklar yerine denizel kaynaklar ilgi görmektedir. Denizel kaynaklara olan yönelimin sebebi, kaynağın ekonomik olarak uygun oluşu, az sitotoksik etki göstermesi, memeli kollajeniyle uyumlu yapıya sahip olması gibi önemli özellikleri sebebiyledir. Çalışmanın amacı, Rhizostoma pulmo türüne ait denizanasından kollajen izole ederek periodontal hastalıklarda kullanılmak üzere iskele geliştirmek ve bu iskelelerin diş bakımında kullanılan misvak bitkisi ile güçlendirerek periodotanl doku mühendisliğine yeni bir bakış açısı getirmektir. Çalışmada, *Rhizostoma pulmo* türüne denizanasından kollajen izolasyonu gerçekleştirmek üzere çeşitli yöntemler denenmiş ve optimizasyon çalışmaları sonucunda %61,15 mg/ml verimlilikle kollajen tip I elde edilmiştir. Kollajne için FTIR, SDS-PAGE, aminoasit analizi, hidroksiprolin testi gibi karakterizasyon yöntemleri uygulanmıştır. İzolasyonda uygulanan yöntemde denizanası kollajeni pepsinde çözünür hale getirilmiştir. Ardından, NHS/EDC ile çapraz bağlanarak iskele yapısı daha kararlı bir hale ulaştırılmıştır.

Salvadora persica L., ağız sağlığında erken dönemlerden beri kullanılan bir bitki olma özelliği taşımaktadır. Günümüzde ticari olarak diş macunları ve ağız bakım ürünlerinde etkin olarak kullanılmaktadır. Ayrıca anti-bakteriyal, anti-fungal, anti-enflamatuar özelliklerinin yanı sıra dişeti hastalıkları ve dişeti kanamalarını önlediğide bilinmektedir. Çalışma süresince üretilen kollajen iskelelere belirli oranlarda misvak özütü ilave edilmiş ve PDLF hücreleri üzerindeki etkileri takip edilmiştir.

Misvak, 18.2 MΩ ultra saf su ile iki farklı yolla ekstrakte edilmiştir. İlk yöntem, oda sıcaklığında üç gün karıştırıca ekstraktsiyon, ikinci yöntem ise 80°C'de 1 saat demleme ile ekstraksiyondur. Her iki yöntemi ile de elde edilen ekstratlara, toplam fenol içeriği analizi, toplam anti-oksidan kapasitesi testi (CUPRAC) ve verimlilik hesaplaması yapılmıştır. Analizler doğrultusunda yapılan ANOVA sonucunda iki ekstraksiyon yönteminde birbiri ile eşdeğer olduğu görülmüştür. Çalışma esnasında zaman tasarrufu sağlayacağı düşünülerek 80°C, 1 saat demleme usulü ile yapılan ekstraktsiyon yöntemi tercih edilmiştir. Liyofilizasyon sonrasında ekstratların havanın neminden çabuk etkilendiği ve saklama koşullarının sağlanmaması durumunda yapışkan bir yapıya büründüğü görülmektedir. İskelelerde kullanılmak üzere denenen oranlar arasında % 0,05 ve %0,1

(v/w) seçilmiştir. İskelelerdeki misvak oranının aşırı artışıyla, iskelelerde oda sıcaklığında büzülme ve yapışkanlık görülmüştür.

İskelelerin optimizasyonu ardından, çapraz bağlama aşamasına geçilmiştir. Çapraz bağlama yöntemi sonucunda iskelelerin su içerisinde çözünmediği ve mekanik dayanım kazandığı görülmüştür. Kollajenin EDC / NHS ile çapraz bağlanması, lizin veya hidroksilisin kalıntılarının varlığında amid bağlarının oluşmasının yanı sıra glutamik ve aspartik asit kalıntılarının karboksil gruplarının aktivasyonunu içerir. Bu nedenle, denizanaları kolajen iskeletlerinin bozunma kinetiğinin EDC / NHS-çapraz bağlanması ile kontrol edilebileceğini düşünülmektedir (Song ve ark.,2006). İskele yapısının dayanıklılığı, İskelenin periodontitis sonucu hasara uğramış bölgeye implant edildiğinde, tükrük sıvısıyla karşılaştığında tedavi sürecinde morfolojisini koruyacağını işaret etmektedir.

İskelelerin morfolojisi SEM mikrograflarında incelenmiştir. Ürettiğimiz iskelelerde gözenekliliğin yeterli seviyede olduğu görülmüştür. Gözeneklilik, hücrelerin iskeleye tutunması açısından önemli bir parametredir. SEM mikrokrograflarında nanoliflerin lokalizasyonları ve hücre tutunması ve yayılmasına elverişli gözenekli yapıları açık bir şekilde görülmektedir.

Periodontal ligament fibroblast hücreleri, diş kökü yüzeyinden kazınarak elde edilmiş ve laboratuvar ortamında eksplant kültüre alınmıştır. Hücre kültürü protokollerinin uygulanması sonucunda hücreleri 4-6 haftalık süreçte doluluk seviyesine ulaştığı görülmektedir. PDLF hücrelerinin proliferasyonunun düşük olduğu gözlemlenmiştir. Süreç sonunda hücre sayımı yapılmış ve iskele başına 20 µl hücre süspansiyonu (240.000 hücre/iskele) ekilmiştir. Besiyeri düzenli olarak değiştirilmiş,3, 7 ve 14. günlerde MTT uygulanmıştır. Denizanası kollajeninin hücre canlılığı üzerinde sitotoksik özellik göstermediği bilinmektedir (Song ve ark., 2006). MTT sonucunda 3,7 ve 14. günlerde denizanası kollajeni içerikli iskelelerde hücre sayılarında artma görülmüştür. Ancak, misvak emdirilen hücrelerde hücre sayında önemli bir artış görülmemekle birlikte hücrelerin stabilizasyonunu koruduğu görülmektedir. Misvak bitkisinin periodontal hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde anti-mikrobiyal ve anti- enflamatuvar olarak etki gösterdiği yapılan hücrü kültürü çalışmalarıyla gösterilmiştir.

Tez sonucu; periodontal diş hastalıklarının tedavisinde kullanılan sığır ve domuz kaynaklı kollajen yerine; memeli hayvanlara benzer çözünürlük, ısı, ve isoelektrik pH dahil olmak üzere bir çok benzer özellik gösterdiği gösteren, ekonomik olarak kar sağlayan denizanası kollajeni kullanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

Addad S., Exposito J. Y., Faye C., Ricard-Blum S. ve Lethias C. 2011. Isolation, characterization and biological evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications. Marine Drugs, 9:967–983.

Ahmad H. ve Rajagopal K. 2013. Biological Activities of Salvadora persica L. (Meswak). Medicinal & Aromatic Plants, 2(4):2–6.

Al-Bayaty F.H., Abdulla M.A., Abu Hassan M.I., Roslan S.N.B., Hussain S.F. ve Bt Said H.B. 2010. Effect of mouthwash extracted from Miswak (salvadora persica) on periodontal pathogenic bacteria an in-vitro study. CSSR 2010 - 2010 International Conference on Science and Social Research, 5(7):178–181.

Alireza R.G.A., Afsaneh R., Seied Hosein M. S., Siamak Y., Afshin K., Zeinab K., Mahvash M. J. ve Amir Reza R. 2014. Inhibitory activity of Salvadora persica extracts against oral bacterial strains associated with periodontitis: An in-vitro study. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research, 4(1):19–23.

Anatomy of the Tooth from, https://www.shutterstock.com/tr/image-illustration/anatomy-tooth-93462538.

Apak R., Güçlü K., Ozyürek M. ve Karademir S. E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. Journal of agricultural and food chemistry, 52(26):7970–7981.

Arora M., Siddiqui A.A. ve Paliwal S. 2013. Separation of flavonoids from alcoholic extract of Salvadora persica by HPLC. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(4):207–210.

Arslan Y.E. 2007. Elektrodöndürme tekniğiyle oluşturulan polimer nano-liflerin memeli hücresi etkileşimlerinin incelenmesi. Ankara Üniversitesi.

Barzideh Z., Latiff A.A., Gan C.Y., Benjakul S. ve Karim A.A. 2014. Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (Chrysaora sp.). International Journal of Food Science and Technology, 49(6):1490–1499.

Bayındır Y. 2003. Dental İ nfeksiyonlarda Doğru Antibiyotik Kullanımı, 10(4):213–216.

Berberoğlu D.A. 2007. Periodontal Dokuların İyileşmesinde Büyüme Faktörlerinin Rolü Role of Growth Factor on Periodontal Tissue Healing, 3:114–121.

Buttafoco L., Kolkman N.G., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A.A., Dijkstra P.J., Vermes I. ve Feijen J. 2006. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. Biomaterials, 27(5):724–734.

Chelli-Chentouf N., Tir Touil Meddah A., Mullie C., Aoues A. ve Meddah B. 2012. In vitro and in vivo antimicrobial activity of Algerian Hoggar Salvadora persica L. extracts against microbial strains from children's oral cavity. Journal of Ethnopharmacology, 144(1):57–66.

Chronic Adult Periodontitis: Cause and Symptoms (b.t.), Retrieved December 11, 2009 from, http://www.intelligentdental.com/2009/12/11/chronic-adult-periodontitis-cause-and-symptoms/.

Darout I.A., Christy A.A., Skaug N. ve Egeberg P.K. 2000. Antimicrobial Anionic Components in Miswak Extract Identification and Quantification of Some Potentially Antimicrobial Anionic Components in Miswak Extract. Indian Journal of Pharmacology, 32:11–14.

Derkus B., Arslan Y.E., Bayrac A. T., Kantarcioglu I., Emregul K.C. ve Emregul E. 2016. Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various neurodisease. Sensors and Actuators, B: Chemical, 228:725–736.

Fuentes V., Straehler-Pohl I., Atienza D., Franco I., Tilves U., Gentile M., Acevedo M., Olariaga A. ve Gili J. M. 2011. Life cycle of the jellyfish Rhizostoma pulmo (Scyphozoa: Rhizostomeae) and its distribution, seasonality and inter-annual variability along the Catalan coast and the Mar Menor (Spain, NW Mediterranean). Marine Biology, 158(10):2247–2266.

Gupta A., Verma S., Kushwaha P., Srivastava S. ve Rawat A.K.S. 2015. Phytochemical and antioxidant studies of Salvadora persica L. Stem & Twig. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 49(1):71–75.

Han J., Menicanin D., Gronthos S. ve Bartold P.M. 2014. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. Australian Dental Journal, 59(SUPPL. 1), 117–130.

Hoyer B., Bernhardt A., Lode A., Heinemann S., Sewing J., Klinger M., Notbohm H. ve Gelinsky M. 2014a. Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. Acta Biomaterialia, 10(2):883–892.

Hoyer B., Bernhardt A., Lode A., Heinemann S., Sewing J., Klinger M., Notbohm H. ve Gelinsky M. 2014b. Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. Acta Biomaterialia, 10(2):883–892.

Hughes F.J., Ghuman M. ve Talal A. 2010. Periodontal regeneration: a challenge for the tissue engineer? Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine, 224(12):1345–1358.

Inanç B., Arslan Y.E., Seker S., Elçin A.E. ve Elçin Y.M. 2009. Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 90(1):186–195.

Iwata T., Yamato M., Ishikawa I., Ando T. ve Okano T. 2014. Tissue engineering in periodontal tissue. Anatomical Record, 297(1):16–25.

Jankangram W., Chooluck S. ve Pomthong B. 2016. Comparison of the properties of collagen extracted from dried jellyfish and dried squid. African Journal of Biotechnology, 15(16):642–648.

Jin Q. M., Anusaksathien O., Webb S.A., Rutherford R.B. ve Giannobile W.V. 2003. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. Journal of periodontology, 74(2):202–13.

Khan W., Atar M., Shaikh T., Rashmi, Tambe, Katekar S. ve Rub R.A. 2010. PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL PROFILE OF MISWAK (salvadora persica Linn salvadoraceae): AN OVERVIEW. Pharmacologyonline, 548:534–548.

Kim J.H., Park C. H., Perez R. a, Lee H.Y., Jang J.H., Lee H.H., Wall I.B., Shi S. ve Kim H.W. 2014. Advanced Biomatrix Designs for Regenerative Therapy of Periodontal Tissues. Journal of dental research,93(12):1203–1212.

Kumar S.B.B., Aruna D.R., Gowda S.V. ve Galagali R.S. 2013. Evaluation of a bioresorbable collagen membrane of fish origin in the treatment of periodontal intrabony defects: A prospective clinical study. Dental research journal, 10(2):225–31.

Kurşunlu S.F. ve Öztürk V.Ö. 2013. Periodontal hastalikta yaşlilik ile kemik markirlarinin ilişkisi, (2):183–186.

Laemmli U.K. 1970. © 1970 Nature Publishing Group. Nature Publishing Group, 227:680–685.

Lee C.H., Singla A. ve Lee Y. 2001. Biomedical applications of collagen. International Journal of Pharmaceutics, 221(1–2):1–22.

Leone A., Lecci R. M., Durante M., Meli F. ve Piraino S. 2015. The bright side of gelatinous blooms: Nutraceutical value and antioxidant properties of three Mediterranean jellyfish (Scyphozoa). Marine Drugs, 13(8), 4654–4681.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. ve Randall R. 1951. The folin by oliver. Readings, 193:265–275.

Mariottini G.L. ve Pane L. 2010. Mediterranean jellyfish venoms: A review on scyphomedusae. Marine Drugs, 8(4):1122–1152.

Masood Y., Masood M., Hassan M. I.A. ve Al-Bayaty F.H.M.A. 2010. Biological effects of miswak (Salvadora persica). Current Topics in Nutraceutical Research, 8(4):161–168.

Meseli S., Kuru B. ve Kuru L. 2015. Relationship Between Initial Probing Depth and Residual Pockets Following Mechanical Periodontal Treatment. Journal of Marmara University Institute of Health Sciences, 5(1):15.

Minh Thuy L.T., Okazaki E. ve Osako K. 2014. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. Food Chemistry, 149:264–270.

Naeini A., Jalayer Naderi N. ve Shokri H. 2014. Analysis and in vitro anti-Candida antifungal activity of Cuminum cyminum and Salvadora persica herbs extracts against pathogenic Candida strains. Journal de Mycologie Medicale, 24(1):13–18.

Nagai T., Worawattanamateekul W., Suzuki N., Nakamura T., Ito T., Fujiki K., Nakao M. ve Yano T. 2000. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (Rhopilema asamushi). Food Chemistry, 70:205–208.

Noumi E., Snoussi M., Trabelsi N., Hajlaoui H., Ksouri R., Valentin E. ve Bakhrouf A. 2011. Antibacterial, anticandidal and antioxidant activities of Salvadora persica and Juglans regia L. extracts. Journal of Medicinal Plants Research, 5(17):4138–4146.

Orbak P.R. 2006. Per Odontal Hastali % in Ba Langiç Tedav S , Kar Ila Ilan Kompl Kasyonlar Ve Bu Kompl Kasyonlarin G Der Lme Stratej Ler Initial Treatment of Periodontal Disease Treatment and Complications After Strategies of Eliminating These Complications, 16(3):33–41.

Pal P., Srivas P.K., Dadhich P., Das B., Maity P.P., Moulik D. ve Dhara S. 2016. Accelerating full thickness wound healing using collagen sponge of mrigal fish (Cirrhinus cirrhosus) scale origin. International Journal of Biological Macromolecules, 93:1507–1518.

Patki P.S., Mazumdar M., Majumdar S. ve Chatterjee A. 2013. Evaluation of the Safety and Efficacy of Complete Care Herbal Toothpaste in Controlling Dental Plaque, Gingival Bleeding and Periodontal Diseases. Journal of Homeopathy & Ayurvedic Medicine, 2(2):2167–1206.

Petersen P.E. ve Ogawa H. 2005. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. The Journal of periodontology, 76(12):2187–2193.

Purcell J. E., Atienza D., Fuentes V., Olariaga A., Tilves U., Colahan C. ve Gili J. M. 2012. Temperature effects on asexual reproduction rates of scyphozoan species from the northwest Mediterranean Sea. Hydrobiologia, 690(1):169–180.

Putra A.B.N., Nishi K., Shiraishi R., Doi M. ve Sugahara T. 2015. Jellyfish collagen stimulates maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells. Journal of Functional Foods, 14:308–317.

Rezaei A., Khorsand A., Yaghoobee S., Shayesteh Y.S., Rokn A.R., Paknejad M. ve Moslemi N. 2014. Methanol Extracts of Salvadora Persica Control Periodontitis By Quench of Quorum Sensing. Rumanian Journal of Biochemistry, 51(1):43–55.

Robinson J.J. 1997. Comparative biochemical analysis of sea urchin peristome and rat tail tendon collagen. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, 117(2):307–313.

Sadeghi M. ve Hosseinzadeh H. 2013. COLLAGEN- g -POLY (SODIUM ACRYLATE- co -2- HYDROXYETHYLACRYLATE), 30(2):379–389.

Shalumon K.T., Sowmya S., Sathish D., Chennazhi K. P., Nair S. V. ve Jayakumar R. 2013. Effect of incorporation of nanoscale bioactive glass and hydroxyapatite in PCL/chitosan nanofibers for bone and periodontal tissue engineering. Journal of Biomedical Nanotechnology, 9(3):430–440.

Singleton V. ve Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. journal of Enology and Viticulture, 16, 144–158.

Skopinska-Wisniewska J., Olszewski K., Bajek A., Rynkiewicz A. ve Sionkowska A. 2014. Dialysis as a method of obtaining neutral collagen gels. Materials Science and Engineering C, 40:65–70.

Sofrata A.H. 2010. Salvadora persica (MISWAK): an effective way of killing oral pathogens. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Sofrata A., Santangelo E.M., Azeem M., Borg-Karlson A.K., Gustafsson A. ve P??tsep K. 2011. Benzyl isothiocyanate, a major component from the roots of Salvadora persica is highly active against Gram-Negative bacteria. PLoS ONE, 6(8):e23045

Sokos D., Everts V. ve de Vries T. J. 2015. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: A review. Journal of Periodontal Research, 50(2):152–159.

Song E., Yeon Kim S., Chun T., Byun H. J. ve Lee Y. M. 2006. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. Biomaterials, 27:2951–2961.

Subhan F., Ikram M., Shehzad A. ve Ghafoor A. 2014. Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. Journal of Food Science and Technology, 1–5.

Şener N. 2004. perio.pdf. Ege Üniversitesi.

Taha M.Y.M. 2008. Antiviral Effect of Ethanolic Extract of Salvadora Persica (Siwak) on Herpes Simplex Virus Infection . Concentration of Salvadora Persica Figure (1): Effect of Salvadora persica on viral growth of HSV – 1 in BHK cells ., 8(1), 50–55.

Tyagi P. ve Dhindsa M. K. 2009. Tissue engineering and its implications in dentistry, 20(2):222–226.

University of Michigan and the NOAA (b.t.), Water Density Calculator from, http://www.csgnetwork.com/h2odenscalc.html.

Uslu B. ve Arbak S. 2010. Doku Mühendisliğinde Kitozanın Kullanım Alanları. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1(3):128–135.

Vaquette C., Fan W., Xiao Y., Hamlet S., Hutmacher D. W. ve Ivanovski S. 2012. A biphasic scaffold design combined with cell sheet technology for simultaneous regeneration of alveolar bone/periodontal ligament complex. Biomaterials, 33(22):5560–5573.

Wang L., An X., Yang F., Xin Z., Zhao L. ve Hu Q. 2008. Food Chemistry Isolation and characterisation of collagens from the skin , scale and bone of deep-sea redfish (Sebastes mentella). Food Chemistry, 108:616–623.

Wang Y., Zhang W., Yuan J. ve Shen J. 2016. Differences in cytocompatibility between collagen, gelatin and keratin. Materials Science and Engineering C, 59:30–34.

Ye Q., Zünd G., Benedikt P., Jockenhoevel S., Hoerstrup S. P., Sakyama S., Hubbell J. A. ve Turina M. 2000. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. European Journal of Cardio-thoracic Surgery, 17(5):587–591.

Zeytinoğlu M., Erol B., Zeytinoğlu B. ve Akay M. C. 2013. Estetik bölge kompleks implant vakalarında ileri derecede kemik defekti bulunan kretlerin ogmentasyonu Augmentation of advanced bone defects for complicated implant placement in the aesthetic zone, 52(1):52–56.

Zhang J., Duan R., Huang L., Song Y. ve Regenstein J. M. 2014. Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (Cyanea nozakii Kishinouye). Food Chemistry, 150:22–26.

Zhao J., Zhao J., Qian Y., Zhang X., Zhou F., Zhang H., Lu H., Chen J., Wang X. ve Yu W. 2015. Solution combustion synthesis of calcium phosphate particles for controlled release of bovine serum albumin. Materials Science & Engineering C, 50:194–200.

MTT reaksiyonu, (b.t.) http://www.wikiwand.com/en/MTT_assay.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: İlkim Kantarcıoğlu

Doğum Yeri: Bakırköy

Doğum Tarihi: 27/02/1991

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Yayınlar -SCI -Diğer

Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various Neurodisease

a) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

Derkuş B., Arslan Y.E., Bayrac A.T., Kantarcioglu I*, Emregul K.C., Emregul E.,2016. Çeşitli Nörolojik Hastalıkların Teşhisinde Kullanılmak Üzere Denizanası Kollajeni Matriksli Trombin Tespit Edebilen Yeni Nesil Bir Apta- Sensörün Geliştirilmesi. Trakya Üniversiteler Birliği Lisanüstü Öğrenci Kongresi, Sözlü Sunum.

Katıldığı Projeler

TUBİTAK 3001 Lipozomlar İçerisine Enkapsüle Edilmiş Kıkırdak Hücre Dışı Matriks Bileşenlerinin İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Denizanası Kollajeni/Misvak Hibrit Membranların Üretimi ve Periodontal Doku Grefti Olarak Kullanımının Araştırılması

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : -

İLETİŞİM

E-posta Adresi : kantarciogluilkim@gmail.com

ilkimkantarcioglu@hotmail.com