T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PORPHYROMONAS GİNGİVALİS LİPOPOLİSAKKARİTİNİN İNSAN GİNGİVAL FİBROBLASTLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Şerife Buket BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KONYA, 2009

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PORPHYROMONAS GİNGİVALİS LİPOPOLİSAKKARİTİNİN İNSAN GİNGİVAL FİBROBLASTLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Şerife Buket BOZKURT

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

I.Danışman: Prof.Dr. Yusuf DURAK

II. Danışman: Doç. Dr. Sema S. HAKKI

2009, 76 sayfa

Jüri: Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Doç. Dr. Sema S. HAKKI
Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ
Yrd. Doç. Dr. Sadettin ÜNSAL

Bu çalışmada; *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)*'in önemli virülans faktörlerinden Lipopolisakkarit (LPS)'sinin gingival fibroblast (GF)'lerin, proliferasyonu, hücre canlılığı ayrıca immün modülasyon ve bağ dokusu organizasyonunda önemli rolü olan sitokinlerin, enzimlerin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi incelendi.

Farklı konsantrasyonlarda *P. gingivalis* LPS'siyle muamele edilen GF'lerin hücre canlılığı 24. ve 96. saatlerde 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) analiziyle; hücre proliferasyonu ise 3, 5, 8 ve 12. günlerde yapılan hücre sayımlarıyla gerçekleştirildi. *Porphyromonas gingivalis* LPS'siyle muamele edilen GF'ler üzerinde proenflamatuvar sitokinlerin yanı sıra ekstrasellüler matriks (EM) yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinaz (MMP)'ler ve bu enzimlerin doku inhibitörleri olan (Tissue inhibitors of metalloproteinase; TIMP)'ların mRNA ekspresyonlarına olan etkisi *quantitative polymerase chain reaction* (Q-PCR) ile incelendi. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda LPS muamelesi sonrası 3. ve 8. günlerde RNA izole edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Hücre canlılığının değerlendirildiği MTT sonuçlarına göre hem 24 hem de 96. saatte *P. gingivalis* LPS'sinin farklı konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). Proliferasyon deneylerinde ise 3, 5 ve 12. günlerde tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Bu sonuçlar kısa dönemde olmamakla birlikte, uzun dönemde *P. gingivalis* LPS'sinin hücrelerin proliferasyonunu baskıladığını gösterdi. Yapılan Q-PCR sonuçlarına göre de doza bağımlı bir şekilde *P. gingivalis* LPS'sinin interlökin (IL)-6, IL-8 mRNA ekspresyonunu artırdığı, MMP-1, 2, 3, TIMP-1 ve TIMP-2'de ise doza bağımlı olarak değişik günlerde farklı mRNA ekspresyonları olduğu tespit edildi.

Elde edilen sonuçlar *P. gingivalis* LPS'sinin GF'lerde proenflamatuvar sitokinlerin mRNA ekspresyonlarını regüle ettiğini, yıkım ve yıkımın inhibisyonundan sorumlu enzimlerin ekspresyonlarını da etkilediğini göstermiştir

Anahtar Kelimeler: *Porphyromonas gingivalis,* Lipopolisakkarit, Gingival Fibroblast , Quantitative PCR.

ABSTRACT

Master Thesis

The Effect of *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide on the Human Gingival Fibroblasts

Şerife Buket BOZKURT

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf DURAK
Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sema S. HAKKI
2009, 76 Page

Jury: Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Assoc. Prof. Dr. Sema S. HAKKI
Assist. Prof. Dr. Seyit Ali KAYIŞ
Assist. Prof. Dr. Sadettin ÜNSAL

In this study, the effects of Lipopolysaccharide (LPS), one of the important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), on the gingival fibroblast (GF) proliferation, cell survival as well as mRNA expressions of enzymes

and cytokines that have significant roles in immune modulation and connective tissue organization, were investigated.

Cell survival rate of GFs that were treated with different *P. gingivalis* LPS concentrations were evaluated with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) at 24 th and 96 th hours. Cell proliferation was determined by counting cells on days 3, 5, 8 and 12. The effects of *Porphyromonas gingivalis* LPS on GF were determined with *quantitative polymerase chain reaction* (Q-PCR) analysis of mRNA expressions of matrix metalloproteinases (MTTs) that are responsible from extracellular matrix (EM) destruction and the tissue inhibitors of metalloproteinase enzymes (TIMPs) in addition to the determination of their effects on proinflammatory cytokines. Thus, total RNAs from GFs with different concentrations of LPS treatments were isolated on days 3 th and 8 th and cDNAs were synthesized on these RNAs.

According to the results of MTT assay where cell survivals were evaluated, no statistically significant difference from the control group was detected on either 24 th or 96 th hours after treatments with different concentratios of *P. gingivalis* LPS ($p>0.05$). On the other hand, proliferation assays conducted on days 3, 5 and 12 revealed statistically significant ($p<0.05$) decrease in all treatment concentrations as compared with the control group.

These results have shown that while *P. gingivalis* LPS has no short term negative effects, on long term it suppresses cell proliferation. According to Q-PCR results, *P. gingivalis* LPS has increased mRNA expression of

interleukin (IL)-6 and IL-8 while has resulted in varying MMP-1, 2, 3, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression levels in different treatment days, in a dosage-dependent manner.

In conclusion, *P. gingivalis* LPS treatments of GFs have regulatory effects on mRNA expressions of proinflammatory cytokines while it also influences the expressions of the enzymes responsible from destruction as well as the inhibitors of destruction.

Key Words: *Porphyromonas gingivalis,* Lipopolysaccharide, Gingival Fibroblast, Quantitative PCR.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim ve tez dönemi boyunca severek yapmış olduğum tez çalışmamın konusunun belirlenmesinde, çalışma planının yapılmasında ve deney çalışmalarında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışmanlarım sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK'a (S. Ü. Fen Edb. Fak.) ve Doç. Dr. Sema S. HAKKI'ya (S. Ü. Dişhek. Fak.), moleküler genetik deneylerimin planlanması, yürütülmesi aşamalarındaki bilgi, yardım ve deneyimlerini paylaşan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI'ya (S.Ü. Ziraat Fak.), tez deneylerimin planlanmasından sonuçlanana kadar her basamağındaki yardımlarından dolayı saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Alpdoğan KANTARCI'ya (Boston Üni. Dişhek. Fak), istatistiksel değerlendirmelerdeki yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. Abdulkadir ŞENGÜN'e (S. Ü. Dişhek. Fak.), Q-PCR sonuçlarımın yorumlanmasındaki katkılarından dolayı sayın Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ'a (S.Ü. Ziraat Fak.), tez projemi 08201022 nolu proje ile destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve son olarak çalışmalarımın gerçekleşme aşamasındaki cesaret, sabır ve desteklerinden dolayı sevgili aileme, özellikle de bize her durumda ayakta kalabilmeyi kendi hayatıyla öğreten canım anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ş. Buket BOZKURT

2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
3. MATERYAL ve METOT	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Gingival fibroblast hücrelerinin eldesi	15
3.1.2. Gingival fibroblast hücrelerinin dondurulması	17
3.1.3. *P. gingivalis* LPS'sinden deney konsantrasyonlarının hazırlanması	18
3.2. Metot	19
3.2.1. Deney setlerinin kurulması	19
3.2.2. Gingival fibroblast canlılığının incelenmesi (MTT Analizi)	21
3.2.3. Proliferasyon deneyleri	22
3.2.4. Gingival fibroblast hücrelerinden RNA izolasyonu	24
3.2.5. RNA örneklerinin absorbanslarının ölçülmesi	26
3.2.6. *Complementary* DNA (cDNA) sentezi	28
3.2.7. Primer probların dizaynı ve dizilimleri	28

3.2.8. Quantitative PCR koşulları 31

3.2.9.İstatistiksel analiz 35

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 37

5. TARTIŞMA 58

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 67

7. KAYNAKLAR 69

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

Şekil 3.1.1.1 İnverted hücre kültürü mikroskobu 16

Şekil 3.1.1.2 Dişeti bağ dokusundan GF'lerin petri kabına ataçmanı 17

Şekil 3.1.1.3 GF'lerin petri kabının yaklaşık 1/4' ünü doldurmaları 17

Şekil 3.1.1.4 GF'lerin pasaj 1 aşaması 17

Çizelge 3.2.2.1 MTT'de uygulanan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları 21

Çizelge 3.2.3.1 Proliferasyon'da uygulanan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları 23

Şekil 3.2.3.1 Proliferasyon deneyinin aşamaları 24

Çizelge 3.2.4.1 RNA izolasyonunda *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları 25

Çizelge 3.2.5.1 RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık oranları 27

Çizelge 3.2.7.1 TaqMan prob setlerinin assay ID numaraları 29

Çizelge 3.2.7.2 SYBR Green miksle çalışılan primerler 29

Çizelge 3.2.8.1 TaqMan Probla hazırlanan 25 µl reaksiyon hacmi bileşenleri 31

Çizelge 3.2.8.2 TaqMan Probla Q-PCR amplifikasyon koşulları 32

Şekil 3.2.8.1 Q-PCR reaksiyon karışımlarının hazırlanma aşamaları 32

Şekil 3.2.8.2 Reaksiyon karışımlarının Q-PCR cihazına yerleştirilmesi 33

Çizelge 3.2.8.3 SYBR Green'le hazırlanan 25 µl reaksiyon hacmi bileşenleri 33

Çizelge 3.2.8.4 SYBR Green ile çalışılan MMP-1,2 ve TIMP-1 Q-PCR amplifikasyon koşulları 34

Çizelge 3.2.8.5 SYBR Green ile çalışılan MMP-3 ve TIMP-2 Q-PCR amplfikasyon koşulları 34

Şekil 4.1 Uygulanan *P. gingivalis* LPS'sinin GF'lerin morfolojik görünümlerine etkisi 37

Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda *P. gingivalis* LPS'sinin 24. saatte hücre canlılığı üzerine etkisi 38

Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda *P. gingivalis* LPS'sinin 96. saatte hücre canlılığı üzerine etkisi 38

Şekil 4.4 *P. gingivalis* LPS'sinin GF hücrelerinin proliferasyonuna etkisi 39

Şekil 4.5 IL-6'nın amplifikasyon grafiği 40

Şekil 4.6 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün IL-6 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 41

Şekil 4.7 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün IL-6 mRNA ekspresyonları 41

Şekil 4.8 IL-8'nın amplifikasyon grafiği 42

Şekil 4.9 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün IL-8 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 43

Şekil 4.10 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün IL-8 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 43

Şekil 4.11 MMP-1'in amplifikasyon grafiği 44

Şekil 4.12 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün MMP-1 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 45

Şekil 4.13 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün MMP-1 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 45

Şekil 4.14 MMP-2'nin amplifikasyon grafiği 46

Şekil 4.15 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün MMP-2 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 47

Şekil 4.16 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün MMP-2 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 47

Şekil 4.17 MMP-3'ün amplifikasyon grafiği 48

Şekil 4.18 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün MMP-3 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 49

Şekil 4.19 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün MMP-3 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 49

Şekil 4.20 TIMP-1'in amplifikasyon grafiği 50

Şekil 4.21 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün TIMP-1 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 51

Şekil 4.22 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün TIMP-1 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 51

Şekil 4.23 TIMP-2'nin amplifikasyon grafiği 52

Şekil 4.24 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün TIMP-2 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 53

Şekil 4.25 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün TIMP-2 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 53

Şekil 4.26 IL-1β 'nın amplifikasyon grafiği 54

Şekil 4.27 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün . IL-1β mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 55

Şekil 4.28 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün . IL-1β mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 55

Şekil 4.29 TNF-α'nın amplifikasyon grafiği 56

Şekil 4.30 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün . TNF-α mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 57

Şekil 4.31 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün . TNF-α mRNA ekspresyonları ortalamaları ve %95'lik güven aralıkları 57

SİMGELER

rpm	Dakikadaki devir sayısı
dH_2O	Distile su
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
^oC	Santigrad derece

KISALTMALAR

cDNA	*Complementary* DNA
CD14	*Cluster of differentiation 14*
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EM	Ekstrasellüler matriks
FBS	Fetal Bovine Serum
GAG	Glikozaminoglikan
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GF	Gingival fibroblast

GP	Glikoprotein
IL	İnterlökin
IL-1Ra	IL-1 *Receptor Antagonist*
LBP	LPS bağlayıcı protein
LPS	Lipopolisakkarit
MGB	*TaqMan minor groove binder*
MMP	Matriks metalloproteinaz
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PBS	Phosphate Buffer Saline
PG	Proteoglikan
PGE-2	Prostaglandin E2
PMNL	Polimorfonükleer lökosit
Q-PCR	*Quantitative polymerase chain reaction*
RANK	*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*
RANKL	*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*
RT-PCR	*Reverse transcription-polymerase chain reaction*
SPSS	*Statistical Package for the Social Sciences*
th1	*T helper hücreleri*
TIMP	Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri
TLR	*Toll-Like Receptor*
Tm	*Melting temperature*
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha

GİRİŞ

Dişlerin temel fonksiyonlarını sürdürebilmelerini sağlayan periodonsiyum; dişeti, alveoler kemik, periodontal ligament ve sement olmak üzere dört farklı dokudan oluşmaktadır. Hücresel ve biyokimyasal özellikleri farklı olan bu dokuların, birbirlerini tamamlayan işlevleri ile periodonsiyumun devamlılığı sağlanmaktadır (Bartold ve ark, 2000).

Periodontal hastalıklar, dişetinin enflamasyonu ve periodontal dokuların yıkımı ile başlayan, alveoler kemik kaybı ve dişlerin kaybedilmesi ile sonlanan enfeksiyöz karakterli hastalıklardır (Wang ve ark, 2001). Hastalığın oluşmasında birincil etiyolojik faktörün mikrobiyal dental plak olduğu bilinmektedir. Mikrobiyal dental plağın gelişimi üç safhada incelenmektedir; dental pelikılın oluşması plak oluşumunun ilk safhasını oluşturmaktadır. Temizlendikten hemen sonra ağız içindeki tüm yapılar, tükrük kökenli glikoprotein içerikli pelikıl ile kaplanmaya başlar. Yumuşak dokular sürekli alttan gelen yeni dokularla yenilendikleri ve yüzey kısımları döküldüğü için, bakteriler yoğun bir kolonizasyon gösteremezler. Fakat diş yüzeylerinde böyle bir yenilenme söz konusu olmadığı için pelikıl bakterilerin tutunacağı ve mikrobiyal dental plağı oluşturmak üzere çoğalacakları bir yapı görevi görmektedir. İkinci aşama bakterilerin diş yüzeyinde kolonize olmaya başladıkları başlangıç kolonizasyonu sürecidir. Birkaç saat içinde bakteriler dental pelikıl içinde belirir. Bunlar genellikle *Actinomyces viscosus, Streptococcus sanguis* gibi gram (+) fakültatif bakterilerdir. Zamanla bakterilerin sayı ve çeşitleri artar ve bir biyofilm haline gelirler. Biyofilm, diş yüzeyinde polisakkarit bir matriks içerisinde pek çok bakterinin birlikte bulunduğu ve organize bir matriksten oluşmaktadır. Bu biyofilmde

başlangıçta gram (+) aerob bir flora baskınken zamanla gram (-) anaerob bir flora üstünlük kazanır. Plak gelişiminin son safhasını ise sekonder kolonizasyon ve plak olgunlaşması oluşturur. İkincil yığılımı oluşturan türler pelikıl yüzeyine tutunamayan ancak pelikılda bulunan diğer bakterilere tutunabilen *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis), Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum), Prevotella intermedia (P. intermedia)* gibi türlerdir. Bakterilerin bu şekilde birbirine tutunmasına koagregasyon denir (Carranza ve ark, 2008). Enfeksiyon gelişimi bakterinin tipine, direnç durumuna, kişinin bağışıklık sistemine ve genetik yatkınlıklarına bağlı olarak değişebilmektedir (Bayındır 2003).

Ağız hijyeni bozulmuş bireyin mikroflorasında değişiklikler meydana gelir. Mikroflorada, 1-2 günlük süreçte koklar görülürken 2-4 gün içerisinde çubuk bakteriler izlenir. Ayrıca plakta artan polimorfonükleer lökosit (PMNL) sayısı ve 6-10 gün içerisinde ise vibrio ve spiroketler gözlenir. Böylece floranın % 45-60'ı gram (+) kok ve çubuk bakterilerinden meydana gelir (Lewis ve ark, 2005).

Periodontal dokularda oluşan enflamatuvar lezyonların gelişiminde, aralarında mast hücreleri, dermal dendrosit (histiyosit), nötrofil, monosit, makrofaj, T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerin de bulunduğu immün hücreler konağın savunma sisteminde oldukça önemli bir yer tutmaktadırlar. İmmün hücreler başka mikroorganizmalara ve onların yüzeylerinde bulunan moleküllere, spesifik reseptörler aracılığı ile bağlanarak immün yanıtı başlatmaktadırlar (Carranza ve ark, 2008).

Periodontal hastalıkların başlaması ve ilerlemesinde primer etiyolojik ajan olarak kabul edilen, mikrobiyal dental plakta 1000'den fazla farklı türde mikroorganizma bulunduğu bildirilmiştir (Jacob 2006). Bunlardan *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans (önceki adı Actinobacillus actinomycetemcomitans; A. actinomycetemcomitans), P. gingivalis, P. intermedia, Bacteroides forsythus (B. forsythus) ve *Campylobacter rectus (C. Rectus)* periodontal lezyonlarda yüksek oranlarda tespit edilmektedirler ve subgingival alanda kolonize olabilme yetenekleriyle periodontal hastalık etiyopatogenezinde önemli rol oynamaktadırlar (Akca ve ark, 2007).

Bu mikroorganizmalardan *P. gingivalis*; gram (-), anaerob ve siyah pigmentlidir. Bakteri sahip olduğu virülans faktörleri ile periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Özdemir ve Marakoğlu 2004). Bir bakterinin hastalık oluşturabilmesini sağlayan özelliklerine virülans faktörleri denilmektedir. Bu özellikler, bakterinin yığılımını, konağa girişini (invazyon), yayılmasını, konaktan kaçışını (evazyon) ve bakterinin konak dokularında direk ya da dolaylı olarak hasar oluşturabilmesini sağlamaktadırlar (Hake 1996). Önemli periodontopatojenlerden olan *P. gingivalis*'in virülans faktörleri kapsül, endotoksin (Lipopolisakkarit; LPS), fimbria, tripsin benzeri enzim ve sistein benzeri proteinaz (gingipain)'lerdir (Özdemir ve Marakoğlu 2004). Gingival fibroblastların hücre yüzeylerinde, hücre içerisinde virülans faktörlerine karşı immün yanıtı başlatacak sinyal yollarına sahip reseptörler bulunmaktadır. *Toll-like receptor* (TLR)'ler olarak isimlendirilen bu protein ailesinin günümüze kadar 10 farklı türü tanımlanmıştır. Bunlar arasından TLR-4, gram (-) bakteri LPS'sine karşı doğal bağışıklığın başlatılmasını sağlayan birincil tanımlayıcı görevindedir. Periodontal dokularda gingival fibroblast (GF)'ler ve gingival epitel hücreleri tarafından TLR'ler eksprese edilmektedirler (Sun ve ark, 2008, Zhou ve ark, 2005). Periodontal hastalık sürecinde, *P. gingivalis* LPS'si serumda bulunan LPS bağlayıcı protein (LBP)

tarafından tutulmaktadır. Bu protein, GF'lerdeki yüzey reseptör (*Cluster of differentiation 14*; CD14)'ü tanıyıp, LPS'yi CD14'e taşımaktadır. Lipopolisakkarit ile karşılaşan GF'lerdeki TLR-4 ve CD14 arasında ileti ve etkileşim gerçekleşmekte böylece aktive olan TLR-4, sinyal iletisi ile transkripsiyonu başlatan faktörleri uyarmaktadır. Bu uyarım sonucunda da GF'lerden proenflamatuvar sitokinler salınmaktadır. Böylece monosit ve GF'lerden *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF-α,), interlökin (IL)-1beta (IL-1β,) ve IL-6 gibi immün mediyatörlerin salınımı gerçekleşmektedir (Sarah ve ark, 2006, Suryono ve ark, 2003).

Dişeti; GF hücreleri ve hücreler arası ekstrasellüler matriks (EM)'ten oluşur. Gingival fibroblastlar, EM bileşenlerini [proteoglikan (PG), glikozaminoglikan (GAG), glikoprotein (GP)] sentezleyebilme ve sentezledikleri matriksi yıkabilen enzimleri [matriks metalloproteinaz (MMP)] üretebilme özelliğine sahip olan hücrelerdir. Aynı zamanda yıkım enzimleri olan MMP'lerin, doku inhibitörlerini (TIMP) de eksprese etmektedirler (Bartold ve ark, 2000). Gingival fibroblastlar fizyolojik koşullarda, EM'nin sentezlenmesi, yıkılması ve idamesi görevleriyle periodontal dokunun önemli hücreleri arasında yeralmaktadırlar. Patolojik koşullarda ise, EM'nin yıkımı ve lokal sitokin ekspresyonlarıyla periodontal hastalık sürecine katılmaktadırlar (Kent 1998).

Bu çalışmada; *P. gingivalis'*in önemli virülans faktörü olan LPS'sinin, GF'ler üzerine etkisi araştırıldı. Araştırmada, dişeti bağ dokusunun idamesindeki rolü, mikroorganizmalarla karşılaşma potansiyeli ve enflamasyonun sürekliliğinde rol oynaması açısından GF hücrelerinin çalışılmasının faydalı olacağı düşünüldü.

Bu kapsamda, *P. gingivalis* LPS'sinin GF hücreleri üzerinde doz cevap ilişkisi olup olmadığı, proenflamatuvar sitokinler ve MMP/TIMP'ların mRNA ekspresyonlarına etkisi incelendi.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Periodontal hastalıklar, dişetinde başlayan enflamasyonun destek periodontal dokulara yayılmasıyla oluşan periodontal ataçman kaybı, alveoler kemik yıkımı ve sonunda oluşan diş kaybı ile karakterizedir. Hastalık oluşumunda sadece bakteri ve ürünlerinin varlığı yeterli olmamakta, hastalığın gelişip ilerlemesinde, bakteri ile konak savunma sistemi arasındaki etkileşimlerin ve bireysel duyarlılığın da etkili olduğu bilinmektedir (Erdemir ve ark, 2007). Periodontal enfeksiyonla meydana gelen doku yıkımı, periodontopatojenler ile konak periodonsiyumunda yeralan hücreler arasındaki etkileşim sonucunda oluşmaktadır (Ren ve ark, 2005). Periodontal hastalığın oluşması ve ilerleyebilmesi, subgingival plakta bulunan gram (-) bakterilerin [*B. forsythus*, *Treponema denticola (T. denticola) ve P. gingivalis*] virülans faktörleri ile ilişkilidir (Boutaga 2007, O'Brien-Simpson 2005).

Periodontal hastalık patojenitesindeki rolü açısından, Socransky'nin yaptığı sınıflamada, *P. gingivalis* en patojen bakterilerin yer aldığı kırmızı komplekste bulunmaktadır. Bakterinin kırmızı komplekste yer alması çevresel koşullara olan direncinin yanı sıra kolonizasyon, invazyon ve evazyon aşamalarında güçlü virülans faktörlere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Reife ve ark, 2006, Socransky ve Haffajee 2003).

Porphyromonas gingivalis, normal vücut sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda ve çeşitli oksijen seviyelerinde de yaşayabilmektedir. Bu şartlarda bakteri sıklıkla baskılanmakta ve yaşayabilmek için yarışmak zorunda kalmaktadır (Yuan ve ark, 2008). Potansiyel bir patojen olmasına rağmen sıklıkla sağlıklı bireylerde de tanımlanması konağa uyum sağlamış patojen olarak düşünülmesine

neden olmaktadır. Bakterinin periodontal cepte çoğalmasına paralel olarak, periodonsiyumdaki hücreler de proteolitik enzimleriyle doku yıkımını başlatırlar. Birbirini tetikleyen bu olaylar sonucunda periodontal hastalık gelişmektedir (Maeda ve ark, 2008).

Periodonsiyumda, hücreler arası EM'den tip I kollajen ve non-kollajen proteinler, PG, GAG'lar, GP'ler bulunmaktadır (Öztürk ve Bozkurt 2005). İçerisinde *P. gingivalis, P. intermedia, A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythia, T. denticola, Eikenella corrodens (E. corrodens)'*in bulunduğu subgingival plak ürünleri, periodontal hastalık için anahtar bir rol oynamaktadırlar. Bu bakterileri diğerlerinden ayıran enfeksiyon yapıcı özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler; subgingival bölgede kolonize olabilmeleri, doku içerisine yayılabilmeleri, sahip oldukları proteaz ve endotoksinlerinin özgünlüğü, immün cevabı kontrol edebilme ve baskılayabilme yeteneğine sahip olmalarıdır (Feng ve Weinberg, 2006).

Periodontal hastalıkta dental plakta bulunan *P. gingivalis'*ten salınan proteinazlar doku yıkımına neden olduğu gibi bakteriyal ürünlerin de bu mekanizmayı harekete geçirebildiği bilinmektedir. Bakteriyal ürünlerden *P. gingivalis*'in hücre duvar yapısında bulunan LPS'sinin immün hücrelerden yüksek oranda sitokin salınmasına neden olduğu bilinmektedir (Pattamapun ve ark, 2003). Bu virülans faktörü, *Enterobacteriaceae* üyelerinin LPS'lerinden kimyasal yapısı ve biyolojik özellikleriyle farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların kazandırmış olduğu patojeniteyle GF'lerden IL-1 alfa (IL-1α,), IL-1β, IL-6 ve IL-8 salınımını uyarmaktadır (Yamaji ve ark, 1995). Yapılan araştırmalar *Escherichia coli* (*E.coli*) LPS'sinin, T *helper* 1 (th1) hücrelerinden yüksek miktarda interferon gama salınımını uyarırken, IL-4, IL-5 ve IL-13 sentezlenmesine neden olmadığını; *P.*

gingivalis LPS'sinin ise IL-5, IL-10 ve IL-13 salınımını indüklerken düşük miktarda interferon gama salınımına neden olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda endotel ve epitel hücrelerinden diğer bakteri LPS'lerinin uyarımıyla düşük miktarda sitokin salınırken; monosit /makrofajlardan, *P. gingivalis* LPS'sinin uyarımıyla daha yüksek oranda sitokin salınmaktadır (Feng ve Weinberg 2006).

Periodontal hastalıkta enflamatuvar olayların başlamasına ve ilerlemesine neden olan sitokinler, bağ dokusu yıkımından kemik kaybına kadar pek çok patolojik olaydan sorumludurlar (Erdemir ve ark, 2007). Bağ dokusundaki lenfositler, enflamatuvar hücreler ve diğer hücresel elemanlar arasındaki kompleks etkileşimler, sitokinler olarak adlandırılan düşük molekül ağırlıklı bir dizi proteinle yönetilir. Lenfositler tarafından üretilen sitokinlere lenfokin, monositler tarafından üretilenlere monokin, kemotaksiste etkili olanlara kemokin ve lökosit tarafından üretilip diğer lökositler üzerinde etkisi olan sitokinlere ise interlökin denilmektedir.

Sitokinler, sadece immün sistem hücreleri lenfositler (özellikle T lenfositler), monosit/makrofaj ve granülositler tarafından üretilmekle kalmayıp, aynı zamanda epitel, endotel hücreler ve fibroblastlar tarafından da üretilmektedirler. Bu sitokinlerden bazılarının proenflamatuvar özellikleri; IL-1, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-12 bulunurken diğerlerinin antienflamatuvar; IL-1 *Receptor Antagonist* (IL-1Ra), IL-4, IL-10, IL-11 özellikleri bulunmaktadır (Takashiba ve ark, 2003).

Periodontal yıkımın, teşhisinde ve ilerlemesinin belirlenmesinde bazı sitokinlerin oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Periodonsiyumdaki hücresel enflamatuvar cevabı, sitokin ağının diğer üyeleri ile birlikte IL-1β, IL-4, IL-6 ve IL-8 düzenlemektedirler. Periodontal hastalıkta ortama salınan IL-6'nın miktarının artması dokudaki GF'lerin çoğalmasını yavaşlatmakta, osteoblast alkalen fosfataz

aktivitesini ve kollajen sentezini inhibe ederek osteoklast sayısının artmasına ve böylece kemik dokunun yıkılmasına neden olmaktadır. Ayrıca IL-1 ve IL-6 sinerjistik olarak kemik yıkımına katkıda bulunurken, IL-8 sitokininin de enflamasyon alanlarına lökosit göçünde anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir (Erdemir ve ark, 2007).

İnterlökinler üzerinde yapılan araştırmalar, bu moleküllerin periodontal hastalıkların patogenezinde önemli role sahip olan bir grup aracı molekül olduklarını göstermiştir. Proenflamatuvar bir sitokin olan IL-1, periodontal hastalıkta doku yıkımından sorumlu olan en önemli moleküldür. Bu sitokin; immünite, enflamasyon, doku yıkımı ve doku homeostazı gibi çeşitli görevleri olan bir polipeptitdir. Makrofaj/monosit, lenfosit, vasküler hücreler, beyin hücreleri, deri hücreleri ve fibroblastlar gibi değişik hücreler tarafından sentezlenir. Dokuda IL-1α ve IL-1β olmak üzere iki şekilde bulunur. Bu sitokinler % 27'lik bir yapısal benzerliğe sahip olmalarına rağmen, benzer fonksiyonları göstermektedirler. Bu bileşenlerden IL-1β'nın, dokuda IL-1α'dan 10-50 kat daha yüksek düzeyde sentezlendiği ve proenflamatuvar özelliklerinin daha güçlü olduğu bilinmektedir. Bu proenflamatuvar sitokinin, keratinosit, fibroblast ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimule ettiği ve fibroblastlardan tip-1 prokollajen, kollajenaz, fibronektin ve prostoglandin E2 (PGE-2) sentezini indüklediği bilinmektedir. Aynı zamanda IL'lerin periodontal hastalıkta, MMP'lerin üretiminin artmasına da neden oldukları yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Emecen 2005).

Farklı hücre tipleri tarafından sentezlenen IL-6'nın esas kaynağını monosit, fibroblast ve endotel hücreleri oluşturmaktadır. Bu sitokin, makrofaj, T ve B lenfosit hücrelerinin bakteriyal bir ürün tarafından uyarılmasıyla ortama salınmaktadır. Bu

durum, enflamatuvar dişeti dokusundaki IL-6 seviyesinin sağlıklı dişeti dokusundaki miktarına oranla daha yüksek olması ile gösterilmiştir (Okada ve Murakami 1998). Ayrıca periodontal hastalıklarda IL-6'nın periodontal dokudaki osteoklast oluşumunu uyararak kemik rezorbsiyonuna da neden olduğu bilinmektedir (J periodontol 1999).

Yapılan çalışmalarla, önceleri nötrofil aktive edici peptid-I olarak bilinen IL-8'in lökositler için güçlü bir kemotaktik faktör olduğu gösterilmiştir. Bu sitokin, monosit, fibroblast, lenfosit ve endotel hücreler tarafından salınmaktadır. Enflamasyonlu dişeti dokusunda epitel hücrelerinden ve makrofajlardan da sentezlenmektedir. Bununla birlikte IL-1α ve TNF-α'nın GF'lerden IL-8 salınımını indüklediği bildirilmiştir. Yapılmış olan araştırmalar sonucunda proenflamatuvar bir sitokin ve kemotaktik faktör olan IL-8'in, periodontal hastalık patogenezinde önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir (Carranza ve ark, 2008, Okada ve Murakami 1998).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar proenflamatuvar bir sitokin olan IL-17 üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmalarda IL-17'nin T *helper* hücrelerinden ve nötrofillerden salındığı bildirilmiştir. Bu proenflamatuvar sitokin, epitel, endotel ve fibroblastik hücrelerdeki IL-6, IL-8 ve PGE-2 sentezini düzenlemekte ve osteoblast hücrelerinden kemik hücrelerinin yıkımıyla ilgili *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B* (RANK) ve *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand* (RANKL) üretimini artırmaktadır. Periodontal lezyonlarda T lenfosit hücreleri tarafından lokal olarak üretilen IL-17, periodontal dokudaki GF'lerin enflamatuvar mediyatörleri yoluyla hem direk hem de indirek olarak enflamatuvar reaksiyonları şiddetlendirebilmektedir (Takahashi ve ark, 2005). Özellikle IL-1 ve TNF, IL-6 ve IL-8'in tetikleyici sitokinleridir. Aynı şekilde IL-17 de IL-1 ve TNF ile benzer etki

göstermektedir. Aktif hale gelmiş T lenfositleri tarafından üretilen IL-17, başlıca proenflamatuvar sitokinlerden biridir. Aynı zamanda IL-1β, TNF ve IL-17 sağlıklı dişeti dokusunda oldukça düşük seviyelerde bulunurken enflamasyonlu dişeti dokusunda yüksek oranlarda bulunmaktadırlar (Beklen ve ark, 2007).

Periodontal enflamasyonda; monosit/makrofajlardan, T ve B lenfosit hücrelerinden, GF'lerden, gingival epitel hücrelerinden ve endotel hücrelerinden sitokin salınımı gerçekleşmektedir. Bu GF hücreleri, dişeti dokusunda lokal sitokin üretimi ile immün düzenleyici ve katabolik fonksiyonları bulunan hücrelerdir. Bu hücre grubu üzerinde yapılan araştırmalar fizyolojik ve patolojik uyarımlar karşısında GF'lerden IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 ve TNF gibi sitokinlerin ortama salındığını göstermiştir (Okada ve Murakami 1998). Aynı zamanda *in vitro* sistemlerde GF kültürlerine *P. gingivalis* ve *P. intermedia* LPS'lerinin uygulanmasıyla yapılmış olan deney sonuçlarında, IL-1 ve IL-6 seviyelerinin artmış olduğu görülmüştür (Okada ve Murakami 1998, Takada ve ark, 1991).

Proenflamatuvar sitokinlerin enflamasyon alanına salınmasını takiben, aralarında IL-10'un da bulunduğu antienflamatuvar sitokinler ortama salınarak proenflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmaktadırlar. İmmün sistemde proenflamatuvar sitokinler ve antienflamatuvar sitokinler arasında hassas bir denge bulunmaktadır (Berker ve ark, 2005).

Dişetinde bulunan EM'nin, GF hücreleri arasında dinamik bir yapı oluşturduğu ve matriksin bütünlüğünün MMP'ler ve TIMP'lar arasındaki denge ile düzenlendiği bilinmektedir (Reel 2006, Gogly ve ark, 1998). Bu görev dişeti bağ dokusu hücreleri olan GF'ler tarafından yürütülmektedir. Gingival fibroblastlar, çeşitli enflamatuvar sitokinleri ve büyüme faktörlerini sentezlemekten aynı zamanda EM'nin yapımı ve

yıkımı arasındaki dengenin sağlanmasından sorumludurlar. Bu dengenin bozulması periodontal dokularda yıkıma neden olmaktadır (Takashiba 2003, Aksun ve ark, 2001).

Ekstrasellüler matriks, bağ dokusundaki hücrelerin bir arada tutunmasına yardımcı olmakla birlikte hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden pek çok hormon için de rezervuar görevi yapmaktadır. Aynı zamanda hücrelerin fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için gerekli olan hücre içi sinyal yolları ile direk ya da indirek olarak etkileşimlerini sağlamaktadır. Bağdokusu hücreleri ve EM'de meydana gelen etkileşimler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için kritik bir rol oynamaktadır.

Dişeti ekstrasellüler matriksinin; tip I kollajen temel olmak üzere tip III, IV, V ve VI kollajenlerinden oluştuğu, ayrıca elastin, fibronektin, laminin, tenascin, trombospondin, entaktin ve proteoglikanları da içerdiği bilinmektedir. Hücreler arası matriks bileşenlerinin çoğu GF'ler tarafından salınan MMP-1, -2, -3, -7 ve -11 tarafından yıkılmaktadırlar. Matriksmetalloproteinazların salınımı, hücre yüzey reseptörleri ile EM, sitokinler ve büyüme faktörleri arasındaki kompleks ilişkilere bağlıdır (Cury ve ark, 2007).

Matriksmetalloproteinaz ailesi yaklaşık olarak 25 üyeden oluşmaktadır ve bu enzimlerin aktivitesi çinko ve kalsiyum iyonlarına bağlıdır (Lorencini ve ark, 2009, Domeij ve ark, 2004). Ekstrasellüler matriksin enzimleri morfogenez, dokunun yapılanması, yaranın iyileşmesi, konak savunması ve immün düzenleyici reaksiyonlar gibi fizyolojik olaylara katılmaktadırlar (Guan ve ark, 2008). Ekstrasellüler matriksin yıkım enzimleri substratlarına ve yapılarına göre gruplandırılmış olup bunlardan MMP-1, ekstrasellüler matriksin yıkımı ve yıkımın

diğer aşamalarında MMP üyeleri arasındaki işbirliğini sağlamakla görevlidir. Bu enzimin aktivitesi doku inhibitörü olan TIMP-1 tarafından kontrol edilmektedir. Böylece MMP-1 ve TIMP-1 arasındaki denge dokunun yeniden şekillenmesini sağlamakta ve dengesizlik dokunun yıkılmasına neden olmaktadır (Domeij 2004). Proenflamatuvar sitokinlerden IL-1β ve TNF, GF'lerden MMP-1 ve MMP-3'ün salınımını indüklemektedirler (Beklen ve ark, 2007, Takashiba ve ark, 2003).

Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri olan TIMP ailesi en az dört elemandan oluşmaktadır. Bu dört eleman MMP molekülü üzerinde MMP aktivasyon ve fonksiyonunun bağlı olduğu bölgelerde düzenlemeler yapmaktadır. Bu eşleşmede TIMP-1, MMP-1; TIMP-2 ise özellikle MMP-2 ve aynı zamanda MMP-1'in aktivitesini inhibe etmektedir. Sağlıklı periodontal dokularda enflamasyonlu periodontal dokulardan daha yüksek konsantrasyonlarda TIMP bulunmaktadır (Cury ve ark, 2007). Makrofajlar başta olmak üzere pek çok hücreden TIMP-1 üretilmekte ve salgılanmaktadır. Bu inhibitörler, spesifik olarak metalloproteinazlara karşı aktivite gösterirler ve diğer metalloendopeptidazlar üzerine etkileri yoktur. Matriks metalloproteinazların inhibitör ailesinin iki üyesi olan TIMP-1 ve TIMP-2'nin aminoasit yapıları açısından % 40 oranında homoloji izlenmektedir (Aksun ve ark, 2001).

Literatürden elde edilen bu bilgiler doğrultusunda, periodontal hastalık etiyopatogenezinde rol oynayan *P. gingivalis'*in, önemli virülans faktörlerinden biri olan LPS'sinin GF hücrelerinin canlılığına, proliferasyonuna ve proenflamatuvar sitokinler (IL-1, 6, 8), doku yıkım enzimleri (MMP-1, 2, 3) ve onların inhibitörlerine (TIMP-1, 2) olan etkisinin incelenmesine karar verildi. Hastalık etiyopatogenezinde rol oynayan faktörlerin ve etki mekanizmalarının anlaşılması, bakterilere ve onların

virülans faktörlerine karşı konağın modülasyonu ve hastalığın durdurulabilmesinde önemli bilgiler temin edilmesine zemin hazırlayacağına inanılmaktadır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Gingival fibroblast hücrelerinin eldesi

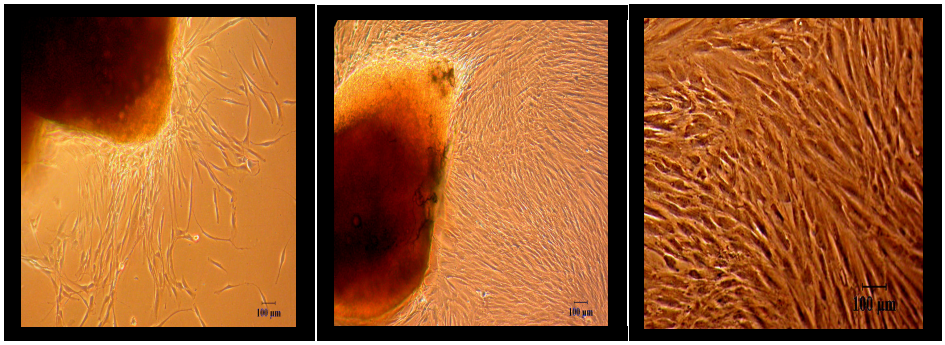
Gingival fibroblastlar, periodontal olarak sağlıklı, ortodontik çekim endikasyonu bulunan yaşları 13-18 arasında değişen kişilerden elde edildi. Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Etik Kurul Raporu (145 / 2008) ile birlikte alınmış olan Bilgilendirilmiş Onay Formlarıyla bu kişilerin onayları alındı. Ardından çekim soketinin yanındaki papilden 1x2 mm boyutlarında epitelsiz bağ dokusu örnekleri alınarak taşıma solusyonu Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium[1] (DMEM), % 10 Fetal Bovine Serum[1] (FBS), 250 µg/ml gentamisin sülfat[1], 5 µg/ml amfoterisin B[1] içerisinde laboratuvara getirildi. Bağ dokusu örnekleri, laminar flow kabin[2] içerisinde petri kabına transfer edilip taşıma solusyonu ile iki defa yıkandı. Ardından doku örnekleri 15 numaralı bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. Bölünen doku örnekleri 60 mm'lik petri kaplarına aktarılıp 3 kez daha % 10 FBS içeren DMEM ile yıkanarak başka bir 60 mm'lik petri kabına transfer edildi. Petri kabında dokuları kaplayacak şekilde 2 ml % 10 FBS içeren DMEM ilave edilerek inkübe edildi. Takibeden günde kültür ortamı % 10 FBS, 100 U/ml penisilin[1] ve 100 µg/ml streptomisin[1] içeren DMEM ile değiştirilerek idame edildi. Hücrelerin ataçmanı İnverted hücre kültürü mikroskobunda[3] takip edildi (Şekil 3.1.1.1, Şekil 3.1.1.2).

[1] Biological Industries, Kibbutz Beik Haemek, Israel
[2] NUAIRE, Fernbrook Lane N Plymouth, USA
[3] Nikon Eclipse TS100, Japan



Şekil 3.1.1.1 İnverted Hücre Kültürü Mikroskobu

Hücreler kabın yaklaşık 1/4'ünü doldurduklarında (Şekil 3.1.1.3) petri kabının içindeki 2 ml besiyeri aspire edildi. Petri kabı içerisindeki hücreler 2 ml serum içermeyen media ile yıkanarak ortamın tripsin enziminin çalışması için uygun hale gelmesi sağlandı ve 1,5 ml Tripsin-EDTA[1] kültür kabına ilave edildi. Beş dakika, % 5 CO_2 içeren su bazlı inkübatör[2] içerisinde bekletilerek hücrelerin birbirlerinden ve kap yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücre kültür kabının içerisine 2 ml % 10 FBS içeren DMEM besiyeri aktarıldı ve Tripsin-EDTA'nın aktivitesi sonlandırıldı. Petri kabından toplanan hücre süspansiyonu oda ısısında 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek tüpün tabanında hücre peletinin oluşması sağlandı. Oluşan hücre peleti 2 ml % 10 FBS içeren DMEM ile süspanse edilip 100 mm'lik petri kabı içerisinde bulunan media ile karıştırıldı. Böylece GF hücrelerinin 1. pasajları yapıldı. Yirmidört saat sonra kültür kabının içerisindeki besiyerinin tamamı alınarak 8 ml yeni besiyeri eklendi. Devam eden günlerde günaşırı petrilerin besiyeri değiştirildi. Hücreler kültür kabının 3/4'lük kısmını kapladığında, GF kültürü elde edilmiş oldu (Şekil 3.1.1.4).



Şekil 3.1.1.2 **Şekil 3.1.1.3** **Şekil 3.1.1.4**

Şekil 3.1.1.2 Dişeti bağ dokusundan GF'lerin petri kabına ataçmanı
Şekil 3.1.1.3 GF'lerin petri kabının yaklaşık 1/4'ünü doldurmaları
Şekil 3.1.1.4 GF'lerin pasaj 1 aşaması

3.1.2. Gingival fibroblast hücrelerinin dondurulması

Deneylerde erken pasaj GF'lerin kullanılması (ileri pasajlarda ekspresyonlarını kaybedeceklerinden) gerektiği için hücreler 2. pasajda dondurulduu. Bu işlem sırasında, pasaj 2 aşamasına getirilen hücrelerin üzerindeki % 10 FBS içeren DMEM toplanarak hücreler 2 ml serum içermeyen media ile yıkandı. Media uzaklaştırıldıktan sonra 3 ml tripsin ilave edilerek hücreler % 5 CO_2 içeren nemli inkübatörde 5 dakika bekletildi. Sürenin sonunda inkübatörden çıkarılıp laminar flow kabin içerisine alınan hücrelerin üzerine % 10 FBS içeren DMEM ilave edilerek tripsinin çalışması inhibe edildi. Serolojik pipet[4] yardımıyla hücre-tripsin-DMEM karışımı 15 ml'lik tüplere toplandı. Ardından bu karışım oda ısısında 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek hücrelerin, tüpün tabanında hücre peleti oluşturması sağlandı. Hücre peleti % 90 FBS ve % 10 Dimethylsulfoxide[5] (DMSO) karışımından oluşan dondurma mediası ile süspanse edildi. Elde edilen karışım 0.5 ml olarak hücre

[4] Corning, NY, USA
[5] Amresco, Cochran Road Solon, USA

dondurma kaplarına[4] paylaştırıldı. Dondurma işlemi uygulanan GF'ler 3 saat -20 ^{o}C'de dondurulup ardından -80 ^{o}C'de 1 ay bekletilerek deneylerde kullanılacakları zamana kadar -196 ^{o}C'de sıvı nitrojende muhafaza edildi. Böylece hücrelerin kademe kademe dondurulmaları sayesinde hemolize uğramalarının önüne geçildi.

3.1.3. *P. gingivalis* LPS'sinden deney konsantrasyonlarının hazırlanması

Deneylerde kullanılan *P. gingivalis* LPS'si Boston Üniversitesi'nden Dr. Alpdoğan Kantarcı'dan temin edildi. Liyofilize halde bulunan stok LPS, uygun deney konsantrasyonları haline getirildi. Bunun için 3 mg'lık LPS, 1000 µl filtre edilmiş Phosphate Buffer Saline[1] (PBS) solusyonu içerisinde çözülerek 3 µg/µl'lik ilk stok solusyonu hazırlandı. Elde edilen solusyon ultrasonikatörde[6] 2 dakika sonike edilerek LPS'nin PBS içerisinde tamamen çözünmesi sağlandı. Hata payını en aza indirmek amacıyla ilk stok, PBS ile dilüe edilerek 30 ng/µl'lik ikinci stok solusyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solusyonlar deneylerde kullanılacakları zamana kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

[6] Bandelin, Germany

3.2. Metot

3.2.1. Deney setlerinin kurulması

Deneylerde tek bir kişinin dişeti dokusundan elde edilen GF hücreleri kullanıldı. Bu amaçla araştırma için izole edip sıvı nitrojen tankında muhafaza ettiğimiz pasaj 2 GF'lerden bir kişiye ait olan hücreler, 100 mm'lik 2 adet petri kabı içerisinde % 10 FBS içeren DMEM ile çözülerek % 5 CO_2'li su bazlı inkübatöre yerleştirildi. Ertesi gün inverted hücre kültürü mikroskobu altında incelenen hücrelerin kabın tabanına yapıştıkları ve mitoz bölünmeyle sayılarını artırmaya başladıkları gözlendi. Gün aşırı hücrelerin mediaları % 10 FBS içeren DMEM ile değiştirilerek yeterli sayıya ulaşmaları beklendi. Yeterli sayıya ulaşan ve morfolojik olarak sağlıklı görünen GF'ler tripsinize edilip 4 adet 100 mm'lik petri kabına paylaştırıldı. Gingival fibroblastlar, çoğalarak kabın tabanını tamamen kaplamasıyla deneylerde kullanıma hazır hale geldiler.

Deneyler, hücre ataçmanı ile uyumlu kültür kaplarında gerçekleştirildi. Yapılacak deneyin amacına ve gruplarına uygun kültür kapları tercih edildi. Bu amaçla 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) deneylerinde 2 zaman peryodu için 96 yuvalı 2 adet kültür kabı[7], proliferasyon deneylerinde kullanılacak 4 zaman peryodu için 24 yuvalı 4 adet kültür kabı[7] ve RNA izolasyonunda 2 zaman peryodu ve 8 farklı konsantrasyon için 16 adet 60 mm'lik petri kapları[4] kullanıldı. İnkübatördeki 4 adet 100 mm'lik petri kabında bulunan pasaj 3 GF'ler tripsinize edilerek kapların tabanından ayrılmaları sağlandı. Petri kaplarına ilave edilen % 10 FBS içeren DMEM ile tripsin enzimi inhibe edildi.

[7] Greiner, Frickenhausen, Germany

Onbeş ml'lik tüpler içerisinde bulunan hücre süspansiyonu oda ısısında 2500 rpm'de santrifüj edilerek hücrelerin tüpün dibinde pelet oluşturması sağlandı. Tüpün tabanında oluşan hücre peleti % 10 FBS içeren DMEM ile çözülüp 50 ml'lik tüp içerisinde süspanse edildi. Bu hücre süspansiyonunun 10 µl'si neubauer camında[8] sayılarak GF solusyonunun 1ml'sindeki hücre miktarı hesaplandı. Bu hesap doğrultusunda MTT analizi için 2 adet 96 yuvalı hücre kültür kabında her bir grup 6 yuva içerecek şekilde 11 adet grup oluşturuldu. Kullanılacak hücre miktarına göre 1 ml'sindeki hücre sayısı bilinen solusyondan hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu gruplardaki yuvaların her birine yapılan hesap doğrultusunda, 200 µl hücre süspansiyonu dağıtılarak inkübatöre kaldırıldı. Proliferasyon deneylerinde, 4 zaman peryodu için (3, 5, 8 ve 12. günler) 4 adet 24 yuvalı hücre kültür kabında, her deney grubu 3 adet yuva içerecek şekilde 8 adet grup oluşturuldu. Bir ml'sindeki hücre miktarını bildiğimiz süspansiyon, yuva başına 50.000 (25.000 hücre/ cm^2) GF düşecek şekilde yapılan hesap doğrultusunda 1'er ml dağıtıldı. Aynı şekilde RNA izolasyonu için de 2 zaman peryodu ve 8 farklı konsantrasyon için 16 adet 60 mm'lik petri kabı (20 cm^2) alınıp, 25.000 hücre/ cm^2 düşecek şekilde petri kaplarına 4'er ml GF süspansiyonu dağıtıldı. Bu işlemin ardından petri kapları % 5 CO_2'li su bazlı inkübatöre yerleştirildi. Deney gruplarının oluşturulmasını takip eden günde hücrelere uygun *P.gingivalis* LPS'leri uygulandı. Deneylerin devam eden günlerinde oluşturulan gruplara göre, GF'ler iki günde bir uygun *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları ile muamele edildi. Hücrelere *P. gingivalis* LPS'lerinin uygulandığı gün sıfır kabul edilerek planlanan günlerde gerekli deneyler gerçekleştirildi.

3.2.2. Gingival fibroblast canlılığının incelenmesi (MTT Analizi)

Gingival fibroblastların canlılığı, hücrelerin tetrazolium tuzunu, formazan boyasına dönüştürebilmesine dayalı olarak yapılan MTT analizi (Yaka 2006) ile 24 ve 96. saatlerde değerlendirildi. Deneyler 96 yuvalı hücre kültür kaplarında gerçekleştirildi. Gingival fibroblastlar kültür kabının ilk 6 yuvası hariç yuva başına 20.000 hücre düşecek şekilde dağıtıldı. Hücreler % 10 FBS içeren DMEM'de 24 saat inkübe edildikten sonra, deney grupları her bir konsantrasyon için 6 tekerrür olacak şekilde aşağıdaki *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları (Çizelge 3.2.2.1) ile muamele edilerek inkübatöre kaldırıldı

Çizelge 3.2.2.1 MTT Analizlerinde Uygulanan *P. gingivalis* LPS Konsantrasyonları

MTT (+), GF (-) Kontrol
MTT (-), GF (+) Kontrol
% 5 FBS içeren DMEM + 0.3 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 3 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 10 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 30 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 300 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 1000 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 3000 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 6000 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 10.000 ng/ml P. gingivalis LPS

Hücre canlılığının tespit edilmesi için yapılan deneyler, her bir yuvada 0.55 mg/ml MTT[8] olacak şekilde karanlık ortamda ve oda ısısında gerçekleştirildi. Hazırlama aşamasında 8.8 mg MTT hassas terazide tartılarak 16 ml % 5 FBS içeren

[8] MTT, SIGMA, USA

DMEM içerisinde çözülüp 0.20 µl'lik filtre ile steril hale getirildi. Yirmidört saatlik inkübasyonun bitiminde 96 yuvalı hücre kültür kabındaki medialar, çok kanallı pipetmanlar[9] aracılığıyla toplanarak her bir yuvaya 250 µl PBS ilave edildi. Yuvalardaki PBS'in aspire edilmesiyle her bir yuvaya hazırlanan MTT solüsyonundan 200 µl eklendi. Bu işlemin ardından hücre kültür kabı alüminyum folyoya sarılarak sonraki 2 saat için tekrar inkübatöre yerleştirildi. Doksan altı yuvalık hücre kültür kabının 2 saatlik MTT inkübasyonundan sonra, MTT içeren kültür ortamı çıkarılarak her bir yuva 200 µl PBS ile yıkandı. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Yuvalardan PBS'in uzaklaştırılmasının ardından petri kabı kurulanarak, her bir yuvaya 200 µl DMSO eklendi. Çözünen formazon'nın analizi için kültür kabı 30 dakika oda sıcaklığında çalkalanıp, Optik Densite 540 nm'de ELISA spektrofotometrede[10] absorbans değerleri okundu. Hazırlanmış olan ikinci 96 yuvalı deney kabı inkübatörde bekletilerek deneyin 2. zaman peryodu olan 96. saatin sonunda aynı işlemler uygulanarak tekrarlandı.

3.2.3. Proliferasyon deneyleri

Proliferasyon deneyleri her bir konsantrasyon grubu için 3 tekerrür içerecek şekilde 24 yuvalı hücre kültür kaplarında gerçekleştirildi. Kullanılacak olan GF miktarı 50.000 hücre/yuva (25.000 hücre/ cm^2) olacak şekilde hesaplandı. Gingival fibroblastlar, deney gruplarının oluşturulması ve hücre ataçmanı olduktan sonra takip eden günde aşağıdaki *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları (Çizelge 3.2.3.1) ile muamele edildi .

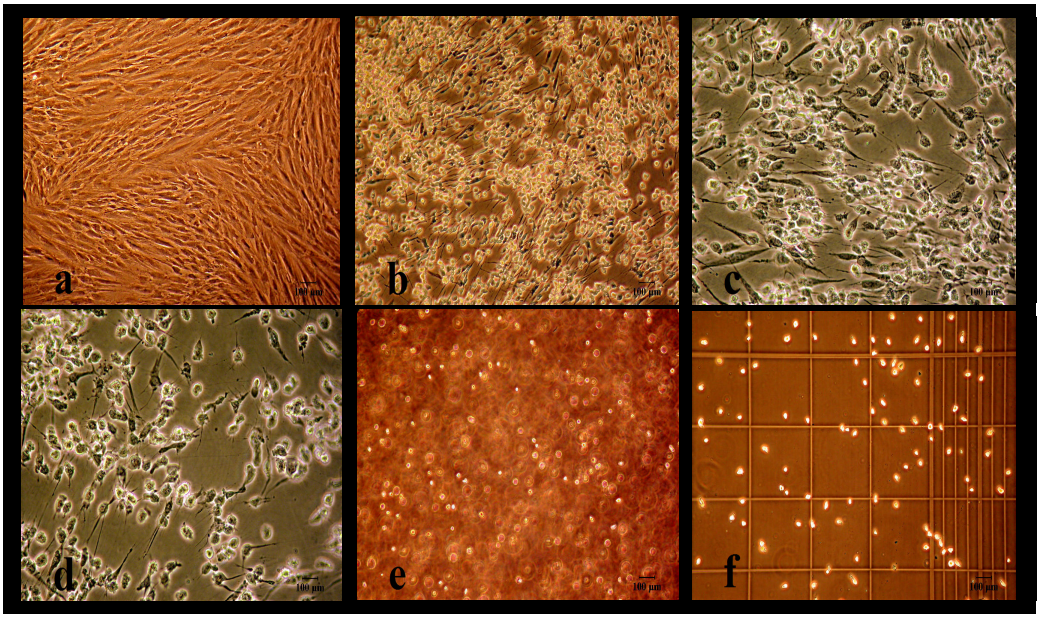
[9] Eppendorf, Hamburg, Germany
[10] µ Quant Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, USA

Çizelge 3.2.3.1 Proliferasyon Deneylerinde Uygulanan *P. gingivalis* LPS Konsantrasyonları

% 5 FBS içeren DMEM (Kontrol)
% 5 FBS içeren DMEM + 3 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 10 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 30 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 100 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 300 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 1000 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 3000 ng/ml P. gingivalis LPS

Gingival fibroblastların *P. gingivalis* LPS'si ile muamele edilmesinden sonra, 3. gün için hazırlanan kültür kabı inkübatörden çıkarılarak yuvalardaki % 5 FBS içeren DMEM-LPS'li karışımlar aspire edildi. Gingival fibroblastların 500 µl PBS ya da serum içermeyen media ile yıkanmasının ardından her bir yuvaya 500 µl tripsin ilave edilip inkübatöre kaldırıldı. İnkübatördeki 5 dakikalık beklemenin ardından hücrelerin kabın tabanından tamamen kalkmış oldukları mikroskopta kontrol edildi. Daha sonra her bir yuvaya 500 µl % 10 FBS içeren DMEM ilavesiyle tripsin inhibe edildi. Yuvalardaki GF'ler % 10 FBS içeren DMEM ile pipetaj yapılarak 1.5 µl'lik polipropilen tüplere aktarıldı. Kabın tabanında hücre kalıp kalmadığı mikroskopla kontrol edilerek, gerekli olduğunda kalan hücreler 500 µl daha % 10 FBS içeren DMEM ile toplandı. Bu bir proliferasyon deneyi olduğu için kabın tabanında hücre kalmaması sağlandı. Elde edilen 1.5 µl'lik tüpler içerisindeki hücre solusyonunun 10 µl'si neubauer camında sayıldı. Hücreler sayılırken hücre ölümlerinin tespiti için Trypan blue[1] kullanıldı ve boyanmış hücreler sayılmadı. Yapılan hücre sayımı ile

deneyin 3. günündeki hücre proliferasyonu elde edildi. Aynı işlemler 5, 8 ve 12. günlerde de tekrarlanarak proliferasyon deneyleri tamamlandı.



Şekil 3.2.3.1 Proliferasyon deneyinin aşamaları

Şekil 3.2.3.1.a Proliferasyon deneyi yapılacak GF hücrelerinin görüntüsü
Şekil 3.2.3.1.b Trypsin eklenmiş hücrelerin 1 dakikalık görüntüsü
Şekil 3.2.3.1.c Trypsin eklenmiş hücrelerin 2 dakikalık görüntüsü
Şekil 3.2.3.1.d Trypsin eklenmiş hücrelerin 3 dakikalık görüntüsü
Şekil 3.2.3.1.e Trypsinin serum içeren media ile inhibesiyle sayım için hazır GF'ler
Şekil 3.2.3.1.f Neubauer camının sayılan 1 karesindeki GF görüntüsü

3.2.4. Gingival fibroblast hücrelerinden RNA izolasyonu

Gingival fibroblast'lardan, RNA izolasyonlarının yapılması için, hücreler 25.000/cm^2 olacak şekilde 60 mm'lik hücre kültür kaplarına dağıtıldı. Deneylerde 2 zaman peryodu ve 8 grup oluşturularak, aşağıdaki *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları (Çizelge 3.2.4.1) ile muamele edildi.

Çizelge 3.2.4.1 RNA İzolasyonunda Uygulanan *P. gingivalis* LPS Konsantrasyonları

% 5 FBS içeren DMEM (Kontrol)
% 5 FBS içeren DMEM + 3 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 10 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 30 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 100 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 300 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 1000 ng/ml P. gingivalis LPS
% 5 FBS içeren DMEM + 3000 ng/ml P. gingivalis LPS

Hücrelere, planlanan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonlarının uygulandığı ilk gün sıfır kabul edilerek deneyin 3. ve 8. günlerinde RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Bu deney kapsamında oluşturulan 16 adet petri kabındaki % 5 FBS içeren DMEM-LPS'li karışımlar aspire edilip, 3'er ml PBS ile yıkandı. Ardından her bir petriye kullanmış olduğumuz RNA izolasyon kitinin[11] bileşenlerinden olan EZ-RNA A solusyonu 500 µl olarak ilave edildi. Diethyl pyrocarbonate[5] (DEPC) içeren su ile yıkanıp RNAse Zap[12] ile temizlenen hücre kazıyıcılarıyla bütün yüzeyde gezilerek elde edilen hücre karışımı polipropilen tüplere toplandı. Bu işlemin ardından tüplere izolasyon kitinin diğer bileşeni olan EZ-RNA B solusyonundan 500

[11] EZ-RNA Total RNA Isolation Kit, Kibbutz Beik Haemek, Israel
[12] Ambion, USA

µl ilave edildi. Tüplerin aynı süre vortekslenmesiyle elde edilen homojen karışımı içeren tüpler, 4 ^{o}C 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Böylece tüpler içerisindeki karışımın altta protein ortada DNA en üstte RNA olmak üzere 3 faza ayrılması sağlandı. Bunlardan RNA fazları diğerleriyle karıştırılmadan dikkatli bir şekilde başka tüplere toplandı. Tüplerin üzerlerine 500 µl izopropanol[5] ilave edilip vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından tüpler tekrar 4 ^{o}C 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Böylece tüplerin tabanında RNA peleti oluştuğu görüldü. Bu aşamada RNA'ların üzerindeki izopropanol aspire edilip yerine -20 ^{o}C'de muhafaza ettiğimiz % 75 EtOH % 25 DEPC ddH_2O'dan oluşan karışımın 250 µl'si ilave edildi. RNA örnekleri absorbanslarının ölçüleceği zamana kadar -80 ^{o}C'de muhafaza edildiler.

3.2.5. RNA örneklerinin absorbanslarının ölçülmesi

Hazırlanan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları ile yapılan deneyler sonucunda 8 tane 3. gün, 8 tane de 8. günde izole edilen toplam 16 adet RNA örneği muhafaza edildikleri -80 ^{o}C'den çıkarıldıktan sonra 4 ^{o}C 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan örneklerin üzerindeki EtOH-DEPC dH_2O karışımı dipteki RNA peletleri hareket ettirilmeden pipetman ile toplandı. Örneklerin ağzı açık bırakılarak içlerindeki alkol karışımın tamamen uçması sağlandı. RNA peletlerinin bulunduğu tüpler kapakları açık olarak heat block cihazında[13] 65 ^{o}C'de 5 dakika ısıtma işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından RNA peletleri 25 µl DEPC dH_2O karışımında çözülerek heat block cihazında 5 dakika ısıyla muamele edildi.

[13] LAB-LINE Multi Blok Heater, Maharashtra, INDIA

Böylece DEPC dH_2O'da homojenize edilen RNA örneklerinin 1µl'si spektrofotometrede[14] 260 nm'de okunarak her bir gruptan elde edilen total RNA miktarları ve saflık oranları elde edildi. Deney gruplarından elde edilen RNA konsantrasyonları ve saflık oranları aşağıdaki tabloda (Çizelge 3.2.5.1) gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.5.1 RNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflık Oranları

Deney grupları	**Konsantrasyon (ng/uL)**	**Oran (260 /280 nm)**
% 5 DMEM 0 ng P. gingivalis LPS 3.gün	637.1	1.87
% 5 DMEM 3 ng P. gingivalis LPS 3.gün	572.6	1.83
% 5 DMEM 10 ng P. gingivalis LPS 3.gün	679.4	1.87
% 5 DMEM 30 ng P. gingivalis LPS 3.gün	1046.9	1.85
% 5 DMEM 100 ng P. gingivalis LPS 3.gün	656.2	1.84
% 5 DMEM 300 ng P. gingivalis LPS 3.gün	749.4	1.78
% 5 DMEM 1000 ng P. gingivalis LPS 3.gün	647.8	1.80
% 5 DMEM 3000 ng P. gingivalis LPS 3.gün	674.8	1.83
% 5 DMEM 0 ng P. gingivalis LPS 8.gün	850.4	1.79
% 5 DMEM 3 ng P. gingivalis LPS 8.gün	795.7	1.78
% 5 DMEM 10 ng P. gingivalis LPS 8.gün	954.4	1.78
% 5 DMEM 30 ng P. gingivalis LPS 8.gün	1918	1.78
% 5 DMEM 100 ng P. gingivalis LPS 8.gün	1518	1.84
% 5 DMEM 300 ng P. gingivalis LPS 8.gün	658.2	1.81
% 5 DMEM 1000 ng P. gingivalis LPS 8.gün	1321.6	1.82
% 5 DMEM 3000 ng P. gingivalis LPS 8.gün	1102.1	1.83

[14] NanoDrop Spectrophotemeter ND-1000, Wilmington, USA

3.2.6. *Complementary* DNA (cDNA) sentezi

Complementary DNA sentezi, cDNA sentez kitinin[15] protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. RNA örneklerinin her birinden, içerisinde 1 µg RNA bulunacak miktar, 1 µl *Random Hexamer*, 1 µl dNTP alınarak karışım 10 µl'ye tamamlandı. Elde edilen karışım 65 ^{o}C de 5 dakika inkübe edilip örnekler buz üzerine taşındı. Polipropilen tüp içerisinde hazırlanan reaksiyon karışımı her bir örnek için; 2 µl 10x *Reaction Buffer*, 2 µl 0.1 M Dithiothreitol (DTT), 4 µl 25 mM $MgCl_2$, 1 µl 40 u/µl RNAase out ve 1 µl Supercript III RT enzim bileşenlerinden oluşturuldu. Bu reaksiyon karışımı tüplere 10'ar µl olarak ilave edildi. Örnekler *Polymerase chain reaction* (PCR) cihazında[16] 25 ^{o}C de 10 dakika, 50 ^{o}C de 50 dakika, 85 ^{o}C de 5 dakika inkübe edilip buz üzerine alındı. Bu işlemin ardından polipropilen tüp içerisindeki karışımlara 1'er µl RNAse H eklenip 37 ^{o}C'de 20 dakika PCR cihazında çalışmaya bırakıldı. İşlem sonunda elde edilen cDNA'lar quantitative PCR (Q-PCR) deneylerinde kullanılacakları zamana kadar -20 ^{o}C de muhafaza edildi.

3.2.7. Primer probların dizaynı ve dizilimleri

Proenflamatuvar sitokinlerin (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8) ve normalizasyon için Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genlerinin probları, Applied Biosystems tarafından Primer Express Software Version 3.0 Getting Started Guide (PN 4362460) programı kullanılarak tasarlandı.

Hedef gen ekspresyonlarını tespit etmek amacıyla yapmış olduğumuz Q-PCR deneylerinde kullanmış olduğumuz prob setleri, çizelge 3.2.7.1'de yeralan Assay ID

[15] SuperScript III First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR, Invitrogen, California, USA

[16] Eppendorf mastercycler (gradient model), Hamburg, Germany

numaraları ile Applied Biosystems'in www.appliedbiosystems.com adresinden sipariş edildi.

Ekstrasellüler matriksi yıkan MMP'lerden MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP'lerin doku inhibitörleri olan TIMP-1, TIMP-2 ve normalizasyon için GAPDH genlerinin primerlerinin tasarımı için NCBI network ağları kullanılarak sekanslara ulaşıldı ve primerler DNA-Star gibi DNA sekans analiz programları kullanılarak tasarlandı.

Çizelge 3.2.7.1 TaqMan Prob Setlerinin Assay ID Numaraları

TaqMan Prob Seti	Assay ID
IL-1ß	Hs00174097_m1
IL-6	Hs00985641_m1
IL-8	Hs99999034_m1
TNF-α	Hs01113624_g1
GAPDH	Hs02758991_g1

Çizelge 3.2.7.2 SYBR Green Miks ile Çalışılan Primerler

Primerler	Sekansları	Uzunluk (mer)	Son Ürün (Basepair)
MMP-1	F 5`-GATGGGAGGCAAGTTGAAAA-3`	20	424
	R 5`-CTGGTTGAAAAGCATGAGCA-3`	20	
MMP-2	F 5`-ATGACAGCTGCACCACTGAG-3`	20	425
	R 5`-CTCCTGAATGCCCTTGATGT-3`	20	
MMP-3	F 5`-TCATTTTGGCCATCTCTTCC-3`	20	476
	R 5`-AGTGCCCATATTGTGCCTTC-3`	20	
TIMP-1	F 5`-GCTTCTGGCATCCTGTTGTT-3`	20	462
	R 5`-TTTGCAGGGGATGGATAAAC-3`	20	
TIMP-2	F 5`-GCAGCAAACACATCCGTAGA-3`	20	462
	R 5`-TCCTTCTCACTGACCGCTTT-3`	20	
GAPDH	F 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	20	451
	R 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	20	

Problar, kullanmış oduğumuz Q-PCR cihazının[17] özellikleriyle uyumlu olarak dizayn edildi. Prob içeriğinin, % 20-80 oranında Guanin (G) – Sitozin (C) içermesine, özellikle G ile benzer çalışan nükleotitlerden ve probun 5' ucuna G bazı gelmesinden kaçınılmasına, seçilen dizide G'den çok C bazı olmasına, *melting temperature* (T_m) sıcaklığının 68-70 ^oC olmasına dikkat edildi. Buna göre Q-PCR deneylerinde, *TaqMan gene ekspression assays* primer ve problarını kullandık. *TaqMan gene expression assay'*ler, Applied Biosystems 5'-nükleaz özelliklerine göre oluşturulmuş olarak hazır alındı. Her bir *TaqMan gene expression assay mix* çalışılacak gen bölgesine özgün 2 primer ve *TaqMan minor groove binder* (MGB) (6-FAM boyalı) probdan oluşmaktadır. Kullanmış olduğumuz TaqMan MGB problarının floresan işaretli 5' ucunda fluorophore (6-carboksyfloresin=6-FAM) *reporter* ve 3' ucunda nonfloresan *quencher* bulunmaktadır. Prob karışımı içerisinde bulunan MGB'ler, prob uzunluğuna bakılmaksızın T_m sıcaklığını artırarak en kısa probların bile tasarlanmalarını sağlamaktadırlar. Probun 3' ucundaki baskılayıcı boya (*quencher*), 5' uçtaki (*reporter*) FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Probun, hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile ölçülen floresan sinyal miktarı düşüktür. Gen bölgesinin çoğaltımı sırasında; hedef nükleik asit dizisi üzerine primerler, bağlanma bölgeleri arasına da TaqMan MGB problar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde *Taq DNA* polimeraz enzimi 5'→3'nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzadıkça ve her bir döngüde ürün miktarı arttıkça floresan ışıma da ona bağlı olarak artmaya devam eder.

[17] Strategene MX3000 P, USA

3.2.8. Quantitative PCR (Q-PCR) koşulları

Kullanmış olduğumuz *TaqMan gene expression assay mix*[18] protokolu, 50 µl'lik reaksiyon hacmi hazırlamak için 1-100 ng arasında cDNA eklenmesini önermektedir. Sentezlemiş olduğumuz cDNA'ların 20 µl hacmi içerisinde 1 µg RNA bulunması, örneklerimizin bu çalışma için uygun miktarlarda olduğunu gösterdi. Reaksiyon karışımını hazırlamak için *TaqMan gene expression master mix* kullanıldı. *TaqMan gene expression master mix*; AmpliTaq Gold DNA Polimeraz; (Ultra Pure), Uracil-DNA glycosylase, dNTP'ler, ROX pasif referans boya ve optimize buffer bileşenlerinden oluşmaktadır. Quantitative PCR deneylerinde, çizelge 3.2.8.1'deki bileşenler ve miktarlarından oluşan karışımla, her bir örnek için reaksiyon hacmi 25 µl'ye tamamlandı.

Çizelge 3.2.8.1 TaqMan Probla Hazırlanan 25 µl Reaksiyon Hacmi Bileşenleri

TaqMan Master Mix	12.5 µl
TaqMan Assay Mix	1.25 µl
cDNA	1.25 µl
ddH_2O	10 µl
Toplam	**25 µl**

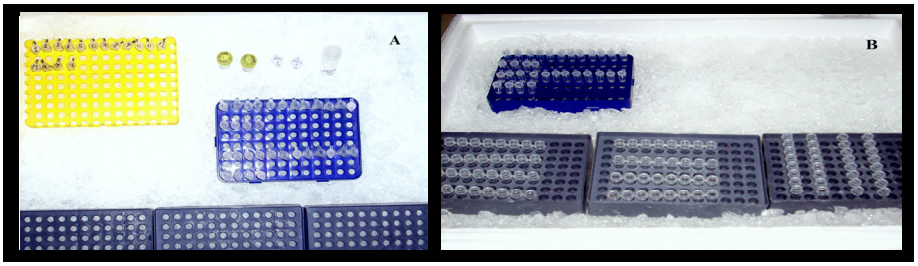
Deney gruplarından elde edilen 16 adet cDNA'nın her birinin 3 tekerrürünün çalışılmasıyla toplam 48 örneklik, hedef prob ve sonuçların normalizasyonu sağlayacak GAPDH probu için de hedef genle aynı koşullarda 48 örneklik reaksiyon hazırlandı. Her bir örnek için çizelge 3.2.8.1'deki reaksiyon karışımı kullanıldı.

[18] TaqMan gene ekspression master miks, Applied Biosytems, USA

Hazırlanan örnekler optik kapaklı tüpler içerisinde Q-PCR cihazına yerleştirildi. Deneylerin amplifikasyon koşulları, kullanmış olduğumuz TaqMan problar için optimize edilmiş sıcaklıklar ve döngü sayısına göre belirlendi (Çizelge 3.2.8.2).

Çizelge 3.2.8.2 TaqMan Prob ile Q-PCR Amplifikasyon Koşulları

95 °C	10 dakika	
95 °C	15 saniye	40 Döngü
60 °C	60 saniye	



Şekil 3.2.8.1 Q-PCR reaksiyon karışımının hazırlanma aşamaları
Şekil 3.2.8.1.A Q-PCR için 25 µl reaksiyon karışımının hazırlanması
Şekil 3.2.8.1.B Hazırlanan reaksiyon karışımlarının 8'li Q-PCR tüplerine paylaştırılması



Şekil 3.2.8.2.A Hazırlanan reaksiyon karışımlarının Q-PCR cihazına yerleştirilmesi
Şekil 3.2.8.2.B Hazırlanan reaksiyon karışımlarının Q-PCR cihazında inkübasyonu

Deneylerimizde MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyonları SYBR Green Q-PCR Master Mix[19] ile çalışıldı. Bu miks, PCR koşulları için gerekli tüm materyali içerisinde bulundurmakta ve SYBR Green boyası için FAM filtresi kullanılmaktadır. Deneylerde ekspresyonuna bakılacak primerlerin (Çizelge 3.2.7.2) çizelge 3.2.8.3'deki reaksiyon bileşenlerine eklenmesiyle, reaksiyon hacmi her bir örnek için 25 µl olarak hazırlandı.

Çizelge 3.2.8.3 SYBR Green Miksle Hazırlanan 25 µl Reaksiyon Hacmi Bileşenleri

Ekspresyonuna bakılacak forward primer (50 pmol /µl)	0.5 µl
Ekspresyonuna bakılacak reverse primer (50 pmol /µl)	0.5 µl
SYBR Green Master Miks	10 µl
cDNA	1 µl
ddH2O	13 µl
Toplam	**25 µl**

Hazırlanan örnekler optik kapaklı tüpler içerisinde Q-PCR cihazına yerleştirildi. Deneylerin amplifikasyon koşulları, her bir primer için SYBR Green Q-PCR Master Mixi kullanılarak optimize edildi. Primerlerden MMP-1, MMP-2, TIMP-1, GAPDH'in çalışmasında çizelge 3.2.8.4'deki Q-PCR koşulları uygulanırken; TIMP-2, MMP-3 ve GAPDH'in çalışmasında çizelge 3.2.8.5'deki Q-PCR koşulları uygulandı.

Çizelge 3.2.8.4 SYBR Green ile çalışılan MMP-1, 2 ve TIMP-1 Q-PCR Amplifikasyon Koşulları

[19] Brilliant SYBR Green QPCR Master Miks, Stratagene, USA

94 ^{o}C 3 dakika

94 ^{o}C 45 saniye

55 ^{o}C 50 saniye — 40 Döngü

72 ^{o}C 60 saniye

72 ^{o}C 10 dakika

Çizelge 3.2.8.5 SYBR Green ile çalışılan MMP-3 ve TIMP-2 Q-PCR Amplifikasyon Koşulları

94 ^{o}C 3 dakika

94 ^{o}C 45 saniye

54 ^{o}C 50 saniye — 45 Döngü

72 ^{o}C 60 saniye

72 ^{o}C 10 dakika

SYBR Green yöntemiyle yapılan Q-PCR'ın başlangıcında ortamda tek zincirli cDNA molekülü, primerler ve reaksiyon tampon çözeltisi içinde SYBR Green boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest cDNA molekülü tek zincirli olduğu için çok az bir floresan ışıma yapmaktadır. Primerler bağlanıp uzama başladığında ise SYBR Green, çift zincirli cDNA'nın arasına girerek floresan yayılımı başlatmaktadır. Başlangıçtaki döngülerde zayıf olan floresan sinyal; oluşan ekspresyona bağlı olarak belirli sayıda çoğaltım sonrasında ilerleyen döngülerde hızla artmaya başlamaktadır.

Yapmış olduğumuz MTT, proliferasyon ve RNA izolasyonları ikişer kez tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlar arasındaki farklar, gözardı edilecek kadar küçük oldukları için bu sonuçlardan sadece birer tanesi burada sunulmuştur.

3.2.9. İstatiksel analiz

Proliferasyon deneyinde, günler arasında farklılık olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonucunda aynı gün içerisinde, farklı konsantrasyonlar arasındaki değişiklik Tukey HSD Testi ile analiz edildi. Hücre canlılığının tespit edilmesi için yapılan MTT deney sonuçlarının analizinde bağımsız t testi kullanıldı.

Quantitative PCR ile elde edilen sonuçların değerlendirmesinde karşılaştırmalı Ct yöntemi kullanıldı (Giuiletti ve ark, 2001, Livak ve Schmittgen 2001, Pfaffl 2001). İlk aşamada eşitlik 1'deki formül kullanılarak normalizasyon yapıldı.

$$y_{ij} = 2^{-\Delta C_{T(ij)}} \qquad (1)$$

Bu eşitlikte:

y_{ij}: i. muamele gurubundaki j. tekerrürün eşitlik 1'e göre normalize edilmiş değeri (i=1, 2, …,8; n_i=3),

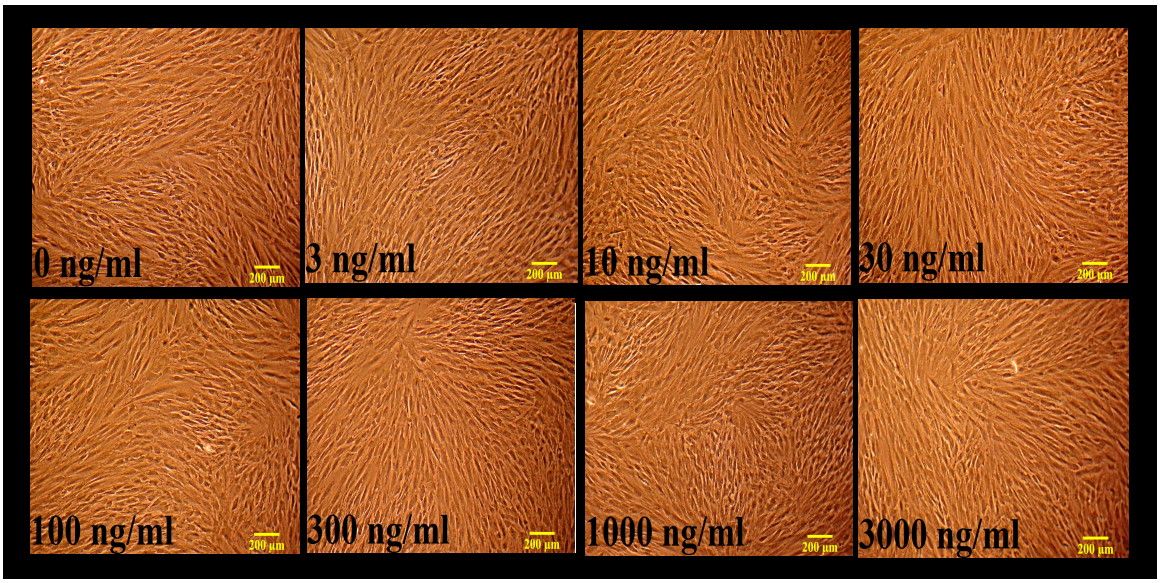
$\Delta C_{T(ij)}$: i. muamele gurubundaki j. tekerrürün ilgi duyulan gen ve normalizasyon için kullanılan gen (GAPDH)'in eşik değerindeki döngü sayıları farkını ifade etmektedir.

İkinci aşamada, normalize edilmiş değerler tek yönlü varyans analizi yapılarak karşılaştırıldı. Gruplardaki gen ekspresyonunun GAPDH'e göre artış ya da azalışları histogramlarla gösterildi. Ortalamalara ait % 95'lik güven aralıkları histogram üzerinde verildi. Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analiz sonuçları α=0.05 önem

seviyesine göre değerlendirildi. Deney sonuçlarının analizi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) bilgisayar programı kullanılarak yapıldı.

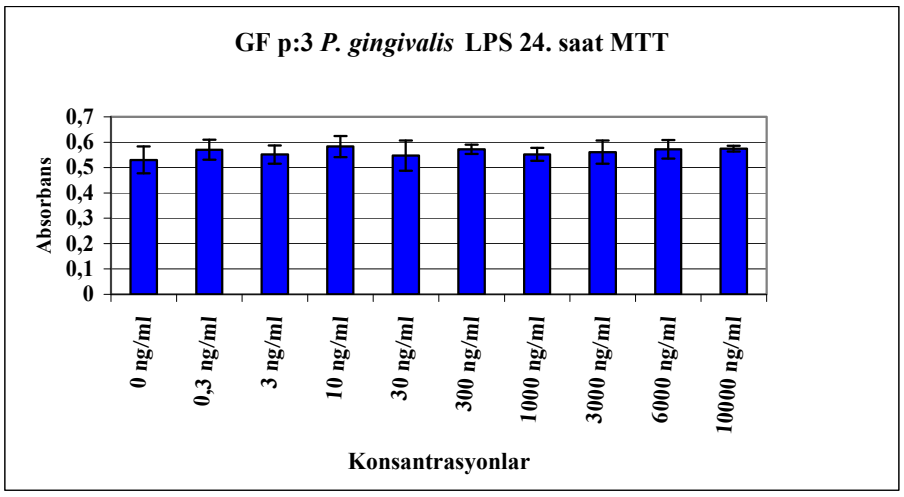
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

Dişeti bağ dokusu hücrelerine farklı konsantrasyonlarda *P. gingivalis* LPS'sinin uygulanması sonrası inverted mikroskopla yapılan incelemelerde GF'lerin morfolojik görünümlerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.1).

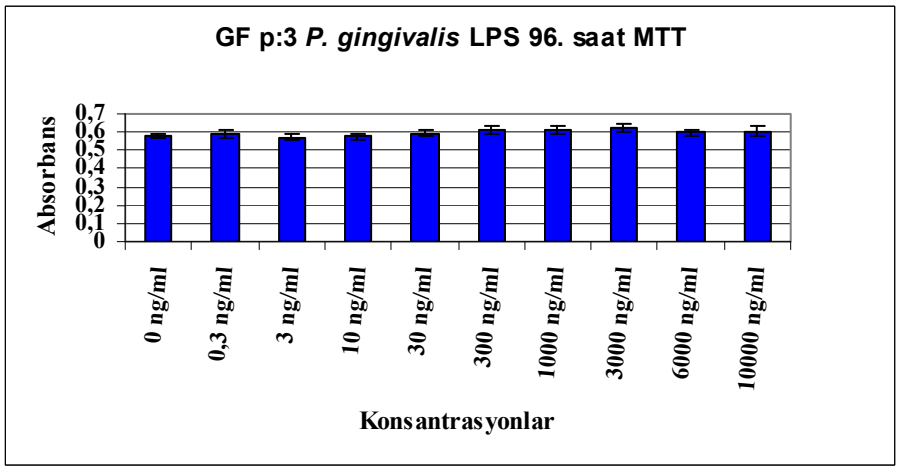


Şekil 4.1 Uygulanan *P. gingivalis* LPS dozlarının GF'lerin morfolojik görünümlerine etkisi

Gingival fibroblastların farklı *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları uygulanması sonrası hücre canlılık oranları 24. ve 96. saatlerde MTT deneyi ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre; 24. ve 96. saatlerin sonunda doza bağlı olarak hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmedi ($p>0.05$). MTT analiziyle, deneyin 24. ve 96. saatlerinde *P. gingivalis* LPS dozlarına bağlı olarak tespit edilen absorbansların ortalama ve % 95'lik güven aralıkları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

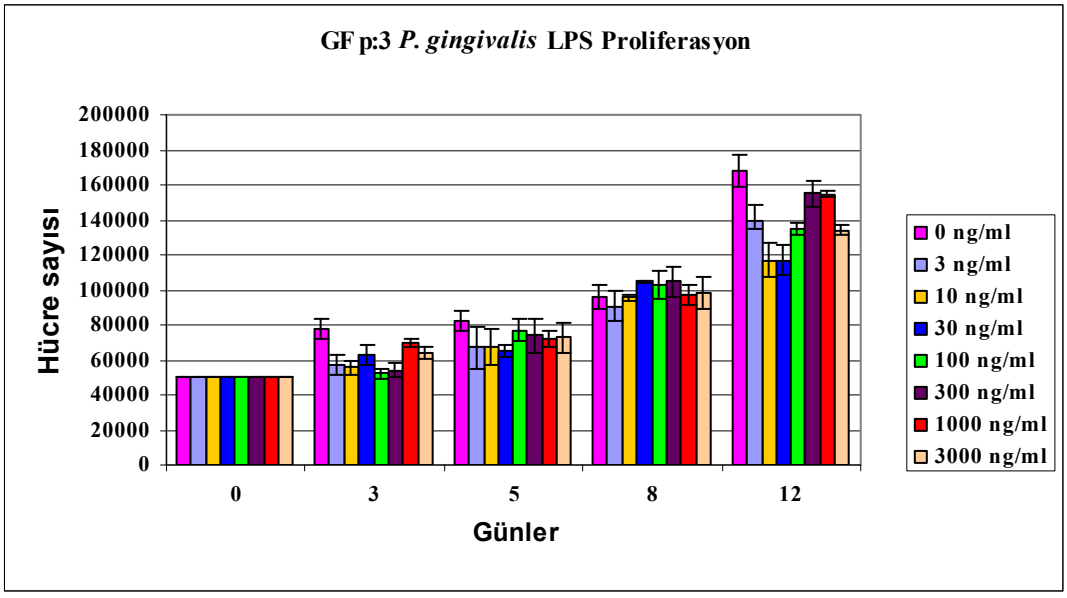


Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda *P. gingivalis* LPS'sinin 24. saatte hücre canlılığı üzerine etkisinin



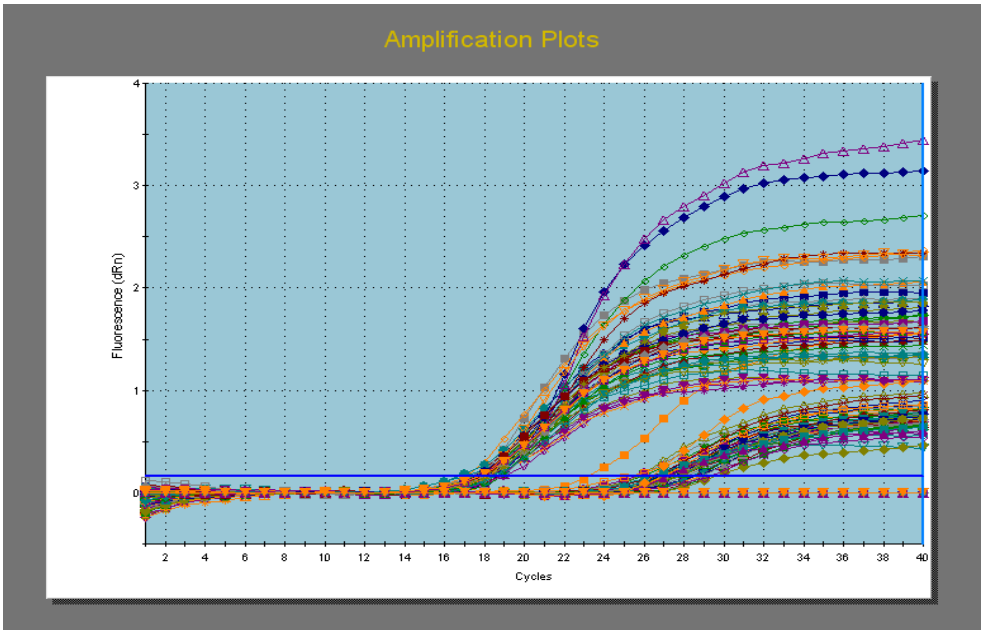
Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda *P. gingivalis* LPS'sinin 96. saatte hücre canlılığı üzerine etkisi

Porphyromonas gingivalis LPS'sinin GF'lerin proliferasyonunu 3, 5 ve 12. günlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltırken ($p<0.05$), 8. günde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p>0.05$) meydana getirmediği tespit edildi.

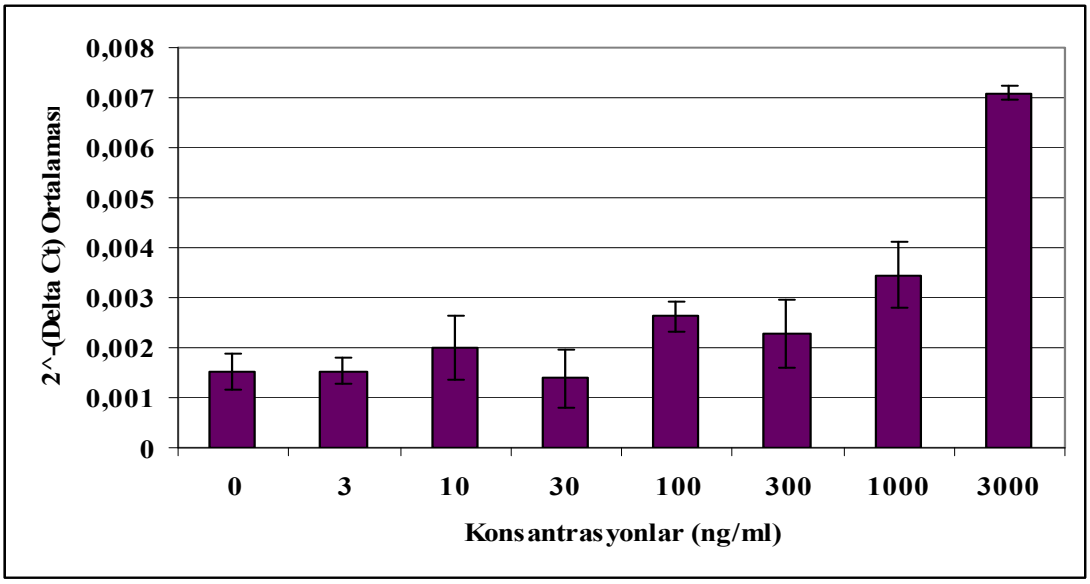


Şekil 4.4 *P. gingivalis* LPS'sinin GF hücrelerinin proliferasyonuna etkisi

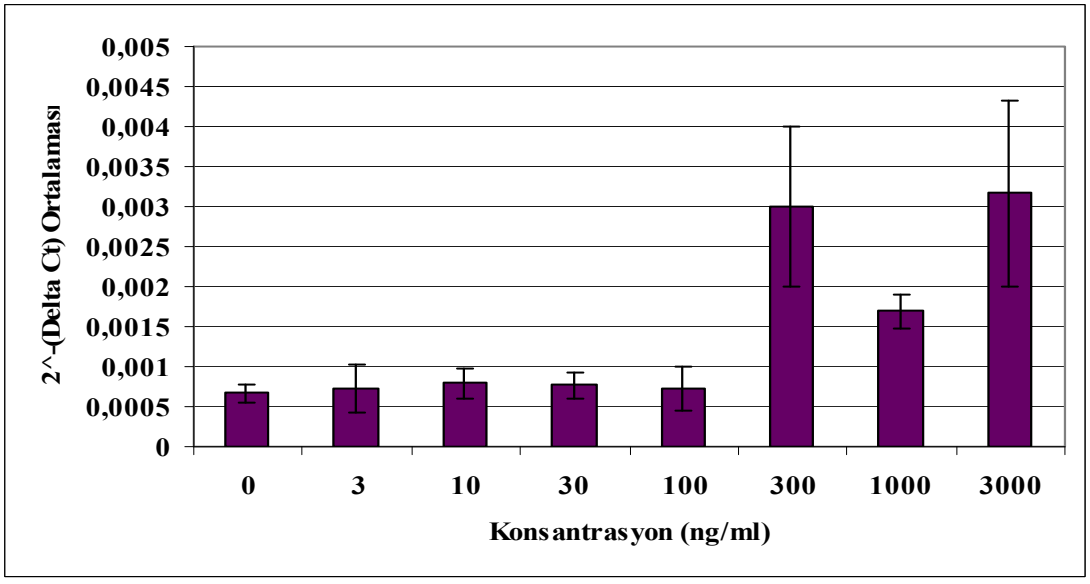
Gingival fibroblastların, *P. gingivalis* LPS'si içeren media ile muamele edilmesi sonrasında IL'ler, MMP'ler ve TIMP'ların mRNA ekspresyonları Q-PCR ile çalışıldı. Çalışma sonunda IL-6'nın ve normalizasyon için kullanmış olduğumuz GAPDH'in amplifikasyon eğrilerinden oluşan grafik elde edildi (Şekil 4.5). Bulunan sonuçlara göre proenflamatuvar sitokin olan IL-6'nın kısa dönemde (3. gün), uzun dönemden (8. gün) daha fazla olmak üzere doza bağımlı olarak ekspresyonunun arttığı $y_{ij} = 2^{-\Delta C_{T(ij)}}$ formülüyle tespit edildi (Şekil 4.6 , Şekil 4.7).



Şekil 4.5 IL-6'nın amplifikasyon grafiği

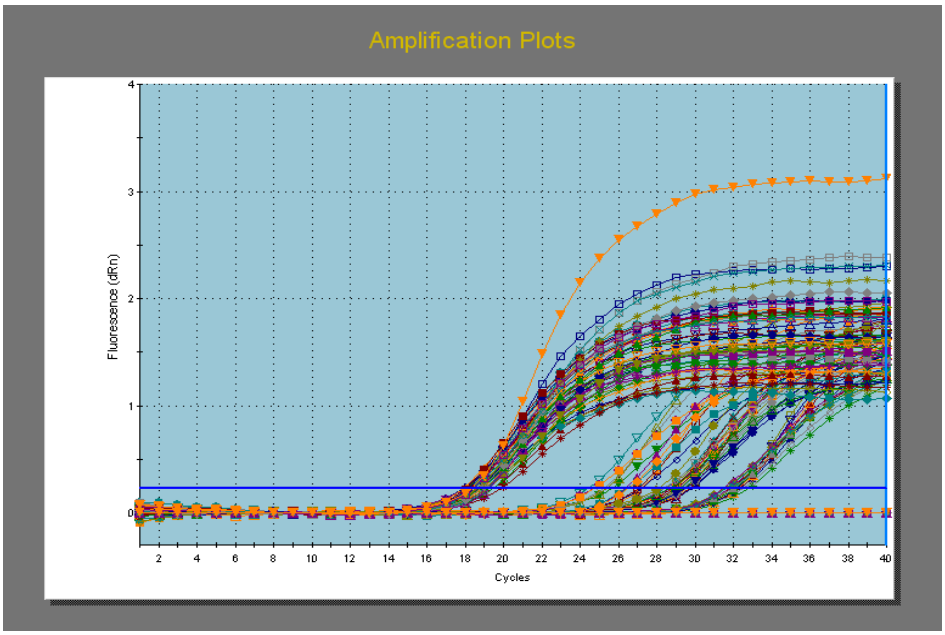


Şekil 4.6 ***P. gingivalis*** **LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün IL-6 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları**

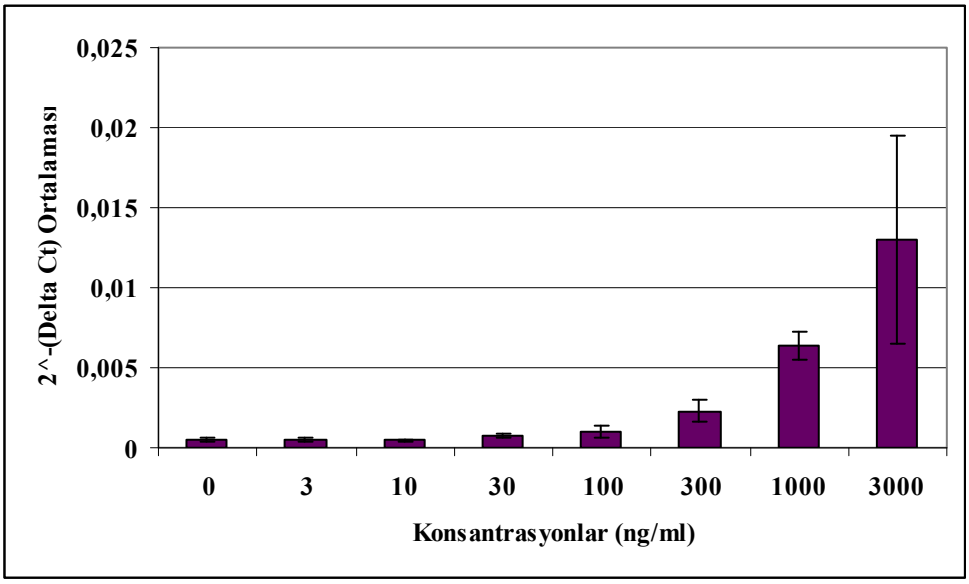


Şekil 4.7 ***P. gingivalis*** **LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün IL-6 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları**

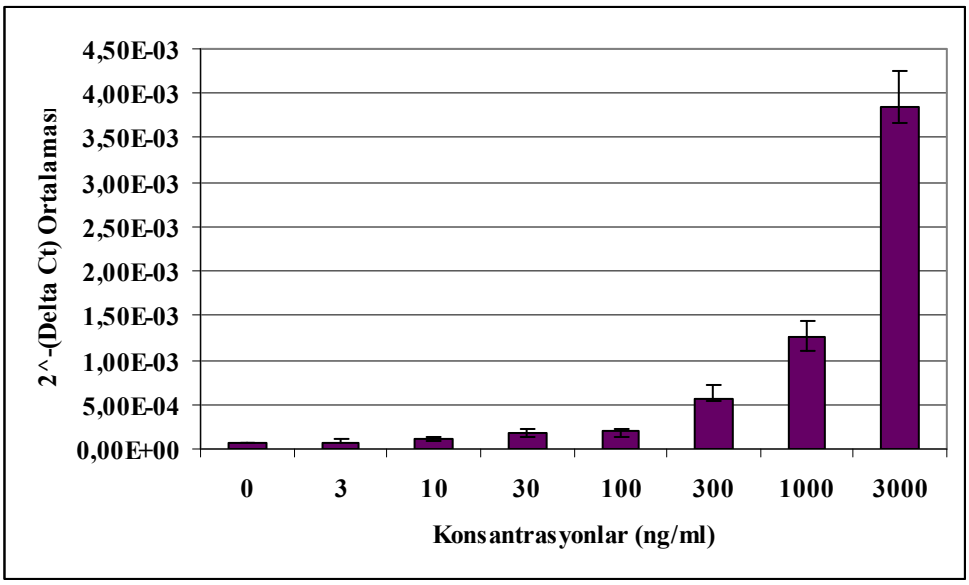
Periodontal enflamasyonun önemli belirleyicilerden proenflamatuvar bir sitokin olan IL-8'in mRNA ekspresyonunu belirlemek amacıyla yapılan deneyin sonucunda, Q-PCR cihazından alınan amplifikasyon grafiği şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Elde edilen bilgiler sonucunda IL-8 mRNA ekspresyonunun, uzun dönem ve kısa dönemde *P. gingivalis* LPS'sinin doz artışı ile beraber kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu $y_{ij} = 2^{-\Delta C_{T(ij)}}$ formülüyle elde edilen sonuçlardan yapılan grafikle tespit edildi (Şekil 4.9 , Şekil 4.10).



Şekil 4.8 IL-8'in amplifikasyon grafiği

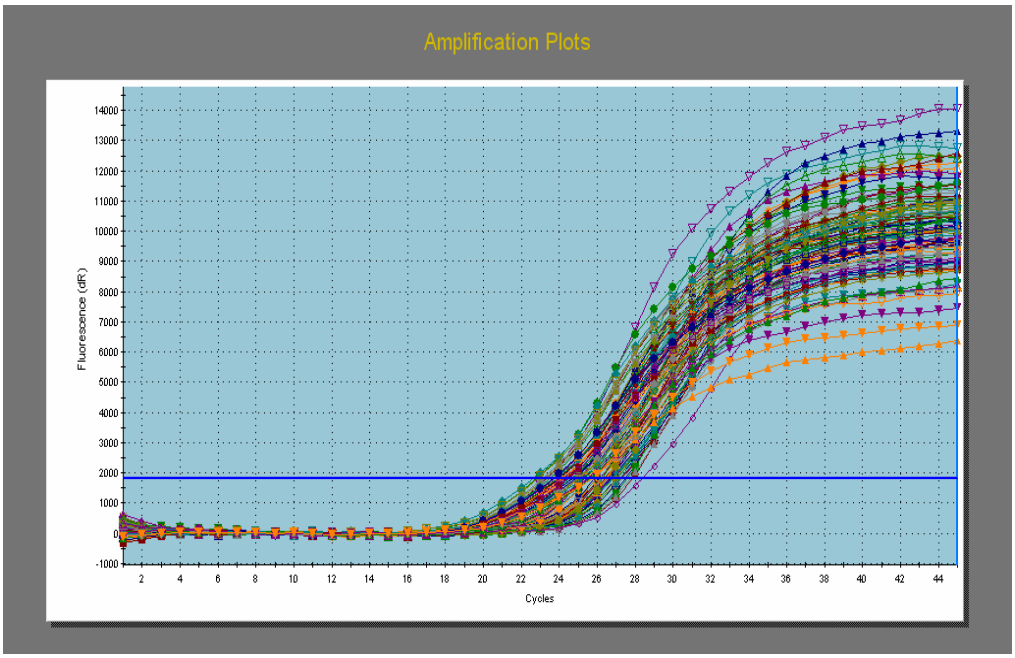


Şekil 4.9 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün IL-8 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

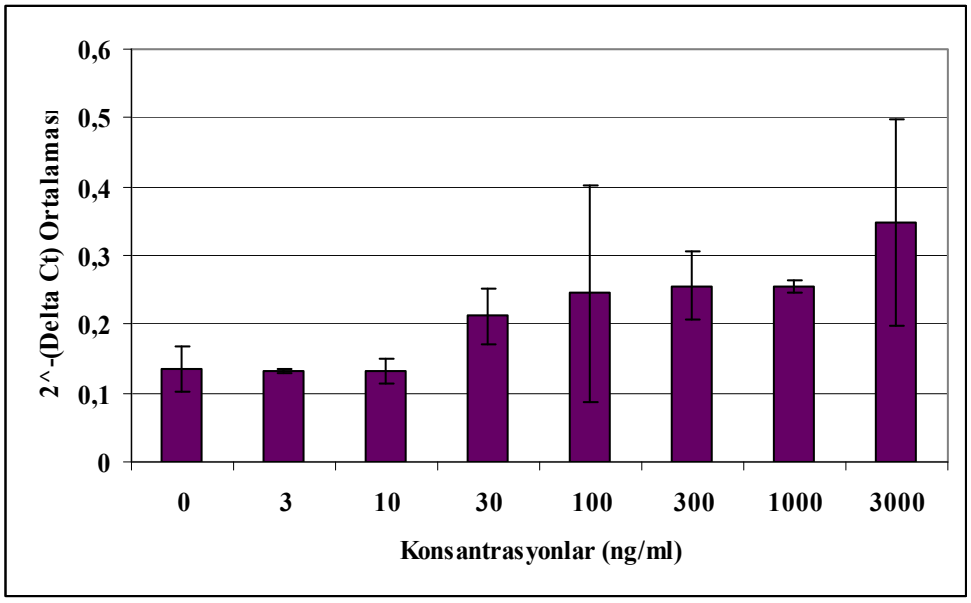


Şekil 4.10 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün IL-8 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

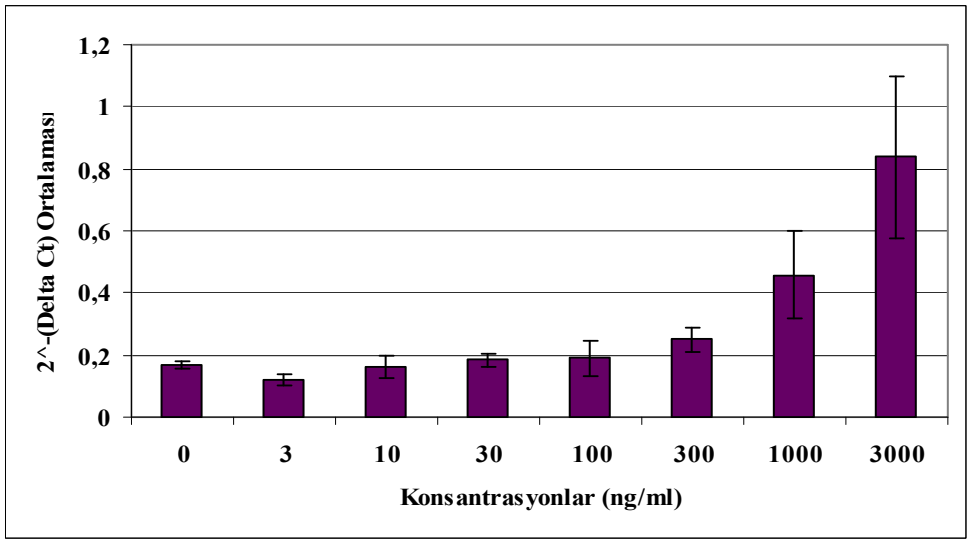
Ekstraselüler matriksi yıkan MMP'lerin ve yıkım enzimlerini inhibe eden TIMP'ların, uygulanan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonlarına vermiş oldukları etkiyi belirlemek için yapılan gen ekspresyonu deneyleri sonucunda, Q-PCR cihazından amplifikasyon grafiği elde edildi. Bunlardan şekil 4.11. grafiği MMP-1'in amplifikasyon eğrilerini göstermektedir. Çalışılan MMP-1'in ve GAPDH'in, Ct değerlerinin $y_{ij} = 2^{-\Delta C_{T(ij)}}$ formülüyle elde edilen sonuçlarının ortalamalarıyla elde edilen grafik, uzun dönem ve kısa dönemde doza bağlı MMP-1 mRNA ekspresyon artışıyla birlikte 8. günde doza bağlı cevabın daha belirgin olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12 , Şekil 4.13).



Şekil 4.11 MMP-1'in amplifikasyon grafiği

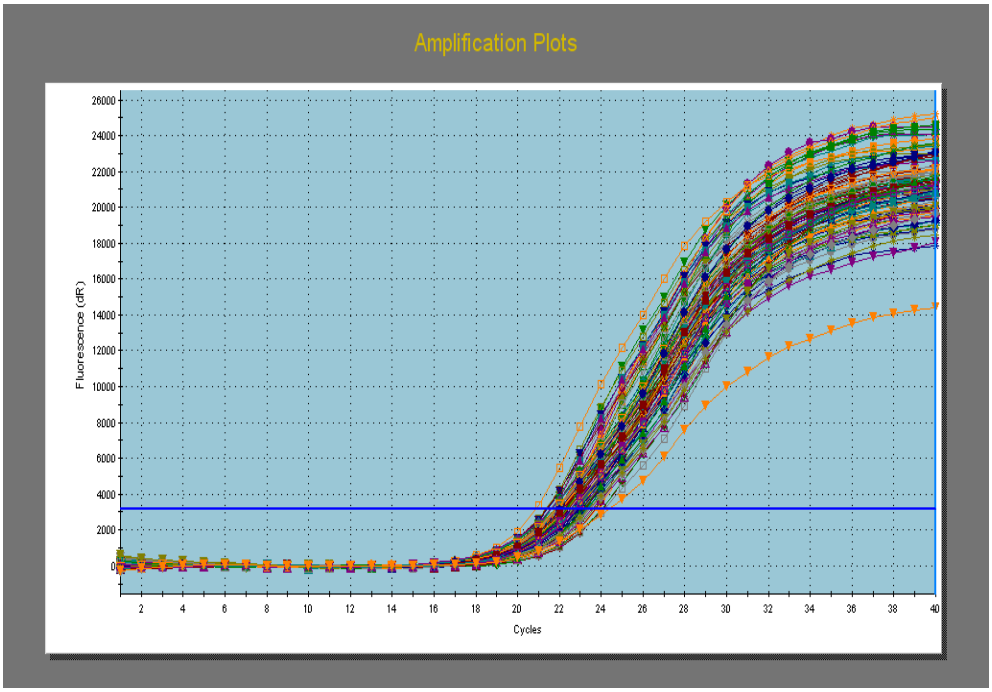


Şekil 4.12 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün MMP-1 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

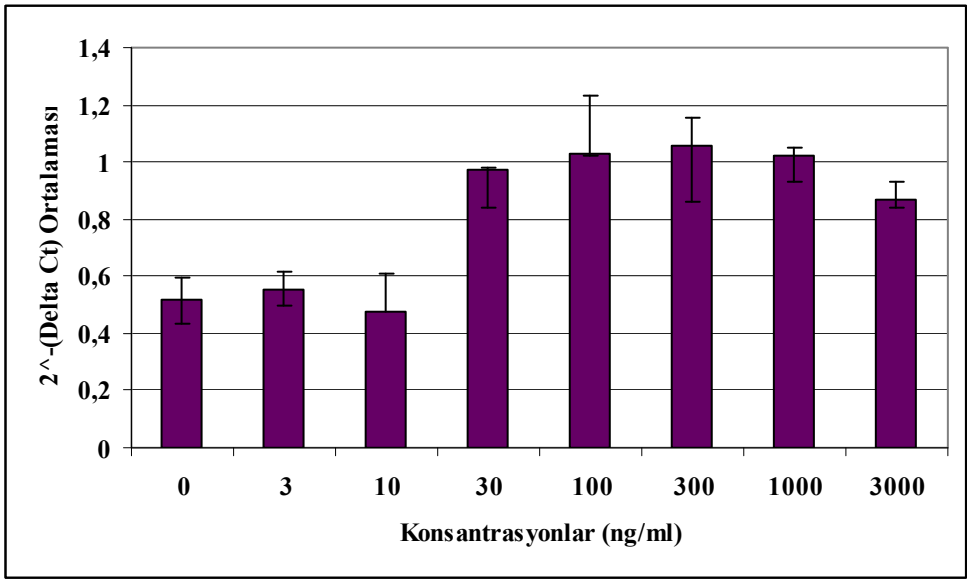


Şekil 4.13 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün MMP-1 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

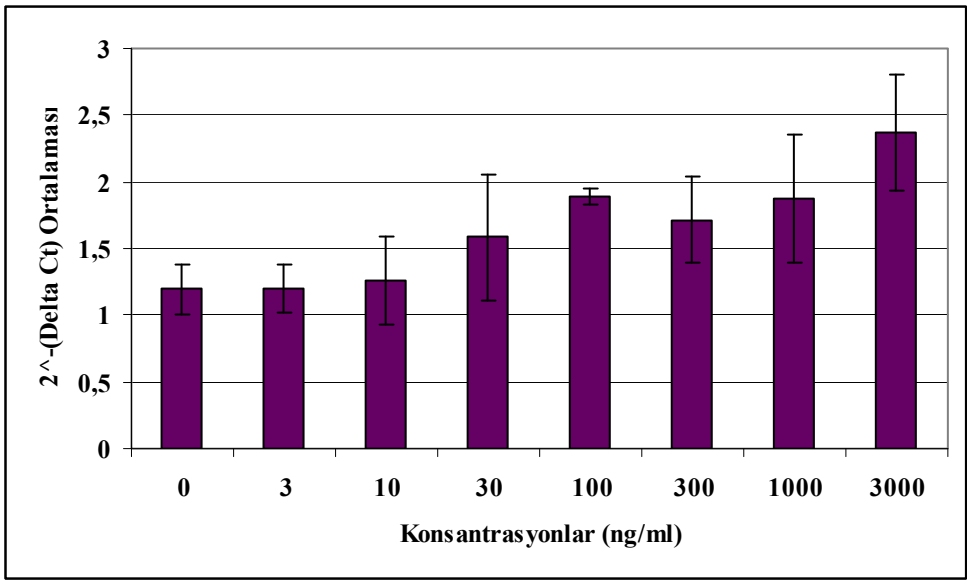
Gingival fibroblastlara *P. gingivalis* LPS'sinin uygulanması sonrasında MMP-2 mRNA ekspresyonu Q-PCR deneyleriyle çalışıldı. Çalışma sonunda MMP-2 amplifikasyon grafiği (Şekil 4.14) elde edildi. Alınan MMP-2'nin ve GAPDH'in Ct değerlerinin $y_{ij} = 2^{-\Delta C_{T(ij)}}$ formülüne göre yapılan hesaplamalarıyla elde edilen grafikden, 3. günde 30 ng'dan itibaren kontrol grubuna kıyasla MMP-2 mRNA ekspresyonunda belirgin bir artış olduğu gözlendi (Şekil 4.15). Benzer bir artış deneyin 8. gününde de tespit edildi (Şekil 4.16).



Şekil 4.14 MMP-2'nin amplifikasyon grafiği

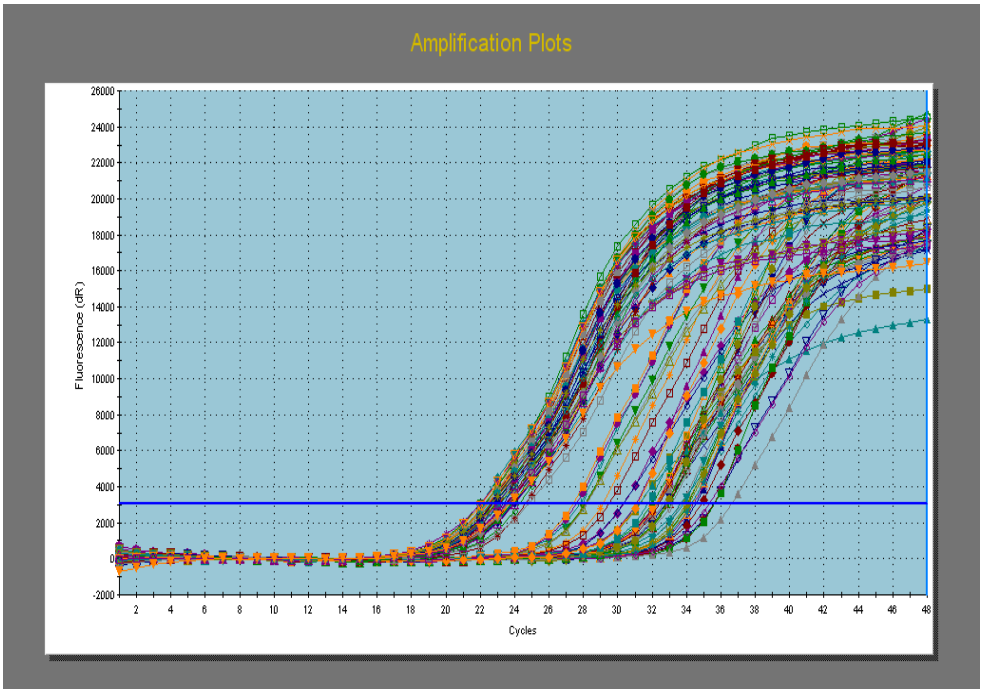


Şekil 4.15 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün MMP-2 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

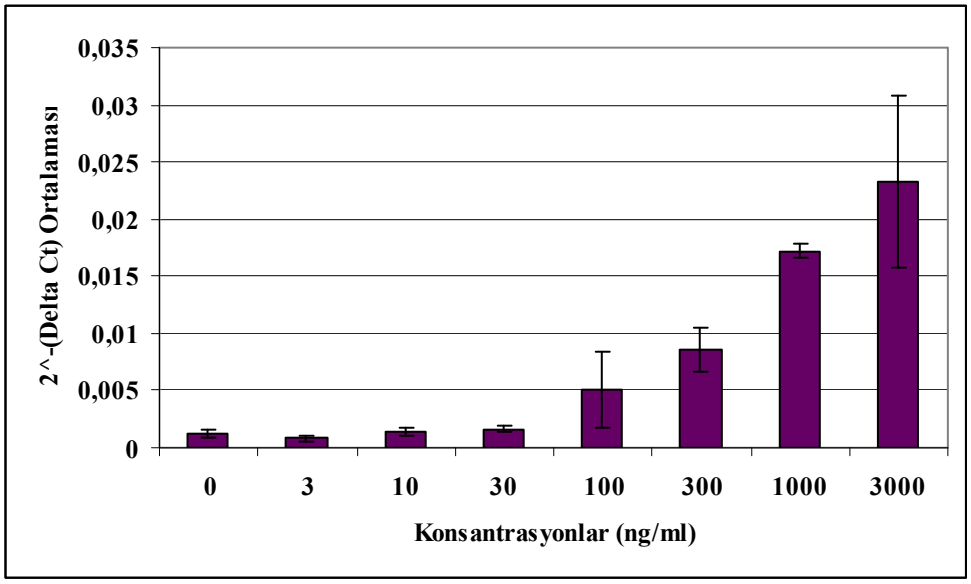


Şekil 4.16 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün MMP-2 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

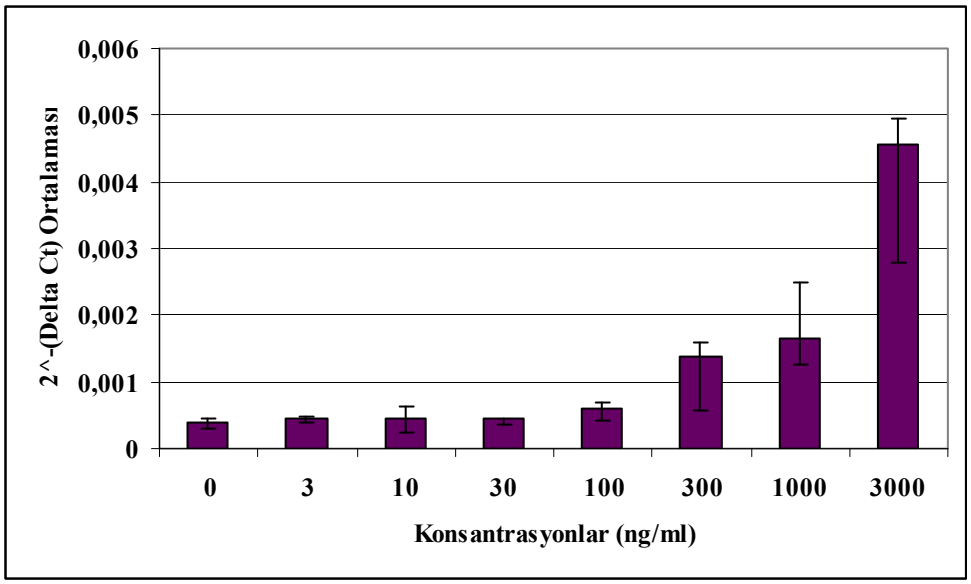
Quantitative PCR deneyleri sonucunda MMP-3'ün amplifikasyon grafiği elde edildi (Şekil 4.17). Örneklerden elde edilen Ct değerlerinin $y_{ij} = 2^{-\Delta C_{T(ij)}}$ formülüne göre yapılan hesaplamaları sonucunda, 3. ve 8. günlerde kontrol grubuna kıyasla MMP-3 mRNA ekspresyonunda artış izlendi. Bu artışın doza bağımlı olduğu tespit edildi (Şekil 4.18, Şekil 4.19).



Şekil 4.17 MMP-3'ün amplifikasyon grafiği

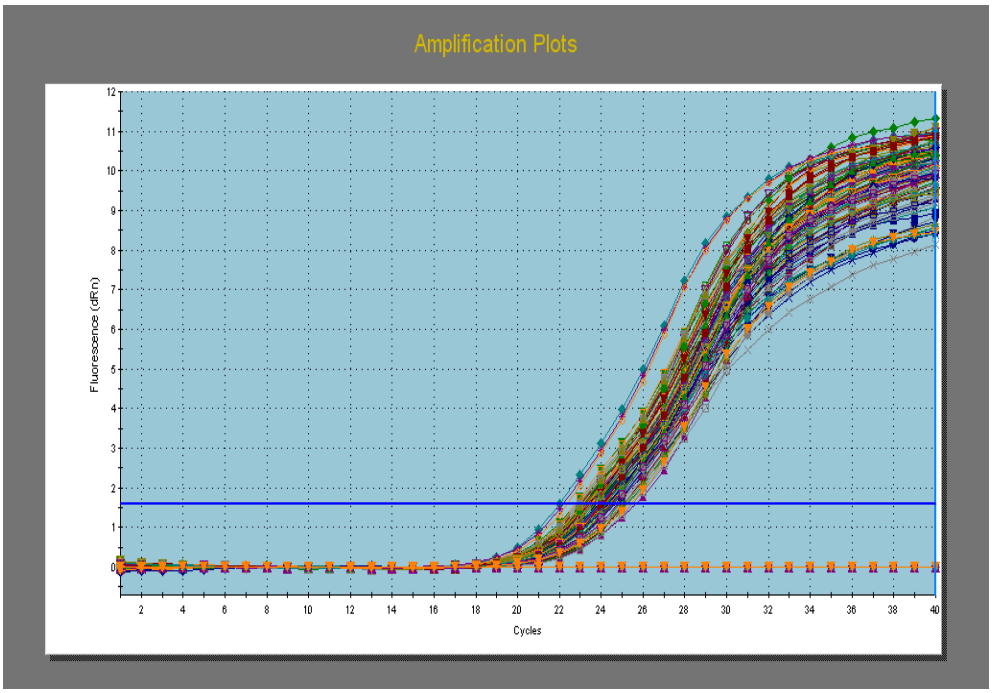


Şekil 4.18 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün MMP-3 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

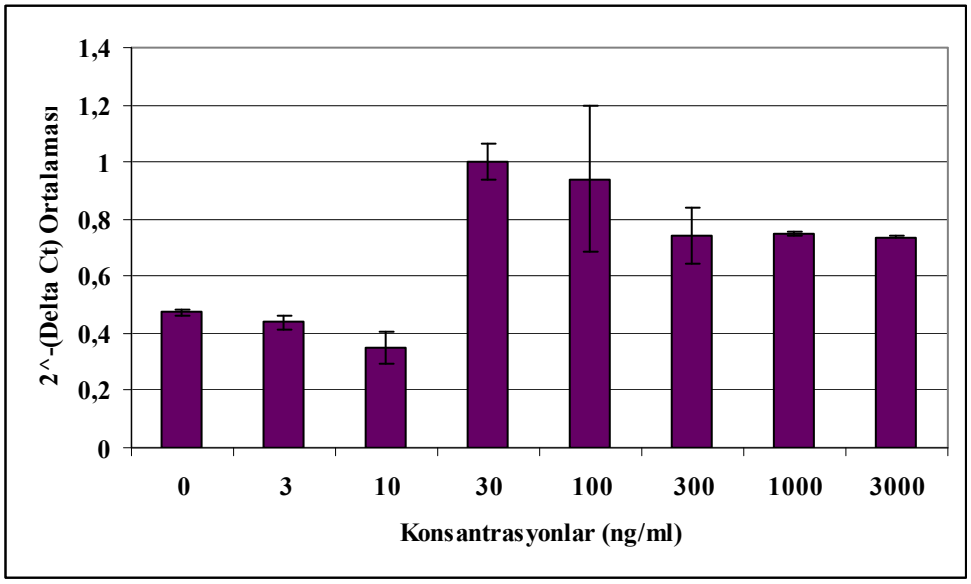


Şekil 4.19 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün MMP-3 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

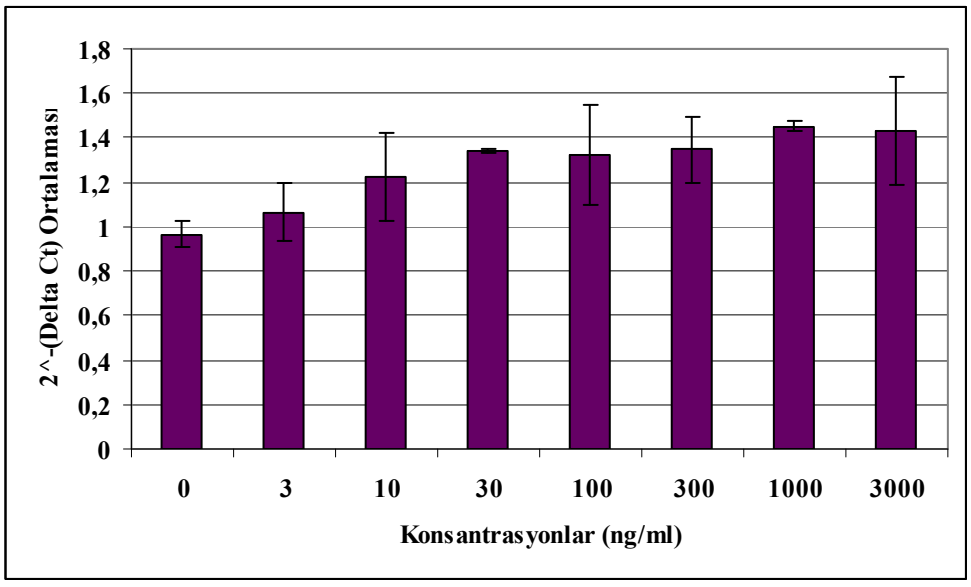
Matriks metalloproteinazların doku inhibitörlerinden TIMP-1'in *P. gingivalis* LPS'si uygulaması sonrası GF hücrelerindeki mRNA ekspresyonunun Q-PCR yöntemiyle incelenmesiyle şekil 4.20.'deki amplifikasyon grafiği elde edildi. Deney sonucunda, *P. gingivalis* LPS'si uygulanmış gruplardan elde edilen Ct değerlerinin $y_{ij} = 2^{-\Delta C_{T(ij)}}$ formülüne göre yapılan hesaplamalarıyla elde edilen grafikden, deneyin 3. gününde 30 ng ve 100 ng'da daha belirgin, 300, 1000 ve 3000 ng'da bunlardan daha az ama kontrol grubuna göre artan TIMP-1 mRNA ekspresyonu olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.21). Deneyin 8. gününde ise artan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları ile TIMP-1 mRNA ekspresyonun da arttığı izlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.20 TIMP-1'in amplifikasyon grafiği

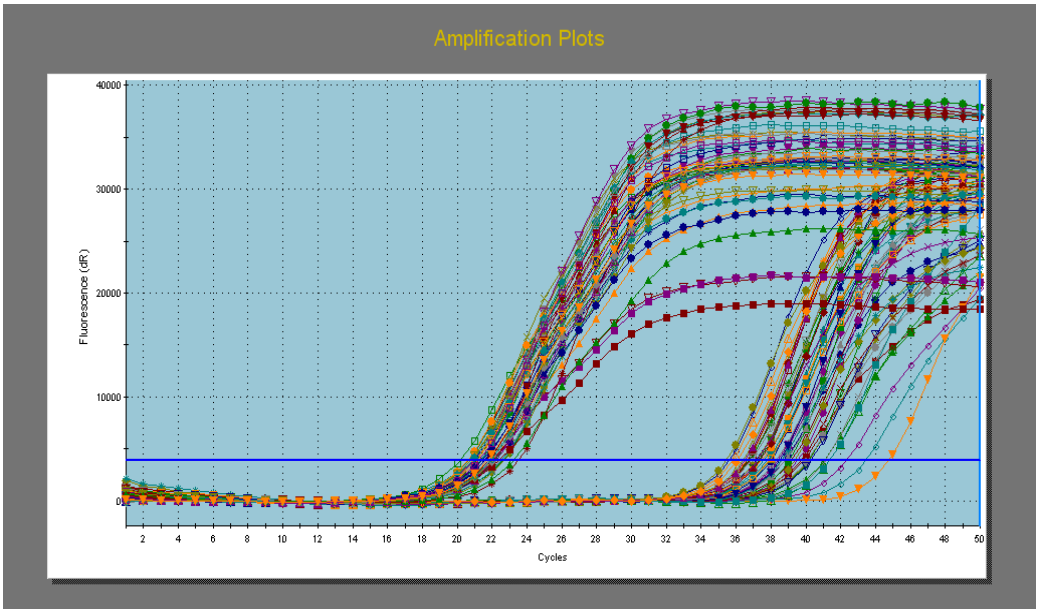


Şekil 4.21 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün TIMP-1 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

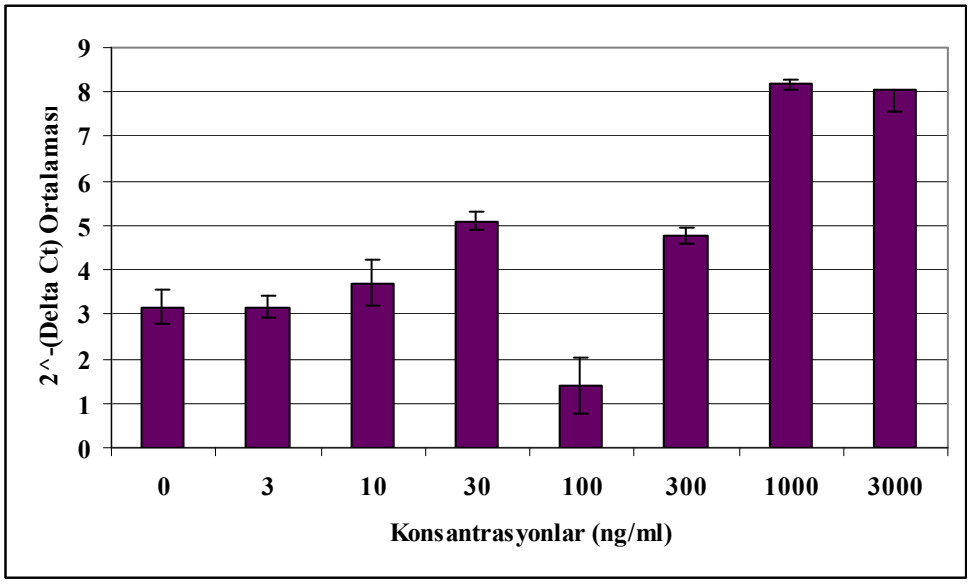


Şekil 4.22 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün TIMP-1 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

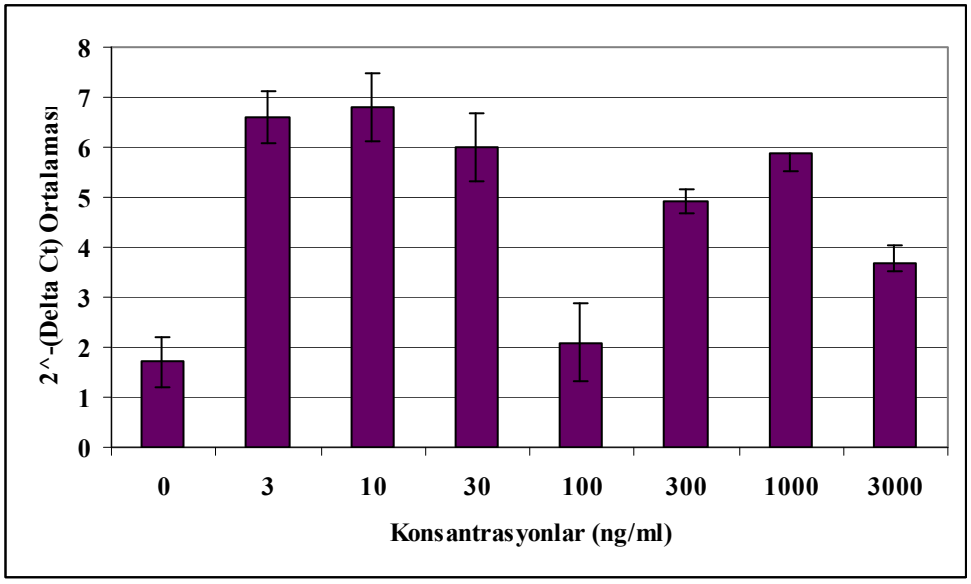
Ekstraselüler matriks, fizyolojik koşullar altında MMP'ler tarafından belirli oranlarda yıkıma uğrarken periodontal hastalık gibi patolojik durumlarda yıkımın hızlandığı bilinmektedir. Gelişen bu savunma mekanizması, GF'lerden salınan MMP'lerin ve TIMP'ların artan seviyeleriyle gösterilmektedir. Uygulanan *P. gingivalis* LPS'sinin GF'lerdeki TIMP-2 ekspresyonuna olan etkisini belirlemek amacıyla yapmış olduğumuz Q-PCR deneyi sonucunda elde etmiş olduğumuz amplifikasyon grafiği Şekil 4. 23 'de gösterilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen TIMP-2 ve GAPDH ekspresyon Ct'lerinin $y_{ij} = 2^{-\Delta C_{T(ij)}}$ formülüne göre yapılan hesaplamalarıyla oluşturulan grafiklerden (Şekil 4.24, Şekil 4.25) deneyin 3. gününde uygulanan doz ile uyumlu artan TIMP-2 ekspresyonu, 8. gününde ise kontrol grubuna göre artan fakat yüksek konsantrasyonlarda düşük konsantrasyonlara göre daha az TIMP-2 ekspresyonu olduğu sonucuna varıldı. Deneyin hem 3. gününde hem de 8. gününde GF'lere uygulanan 100 ng *P. gingivalis* LPS konsantrasyonunda 3. günde 8. günden daha az olmak üzere TIMP-2 ekspresyonu gözlendi.



Şekil 4.23 TIMP-2'nin amplifikasyon grafiği

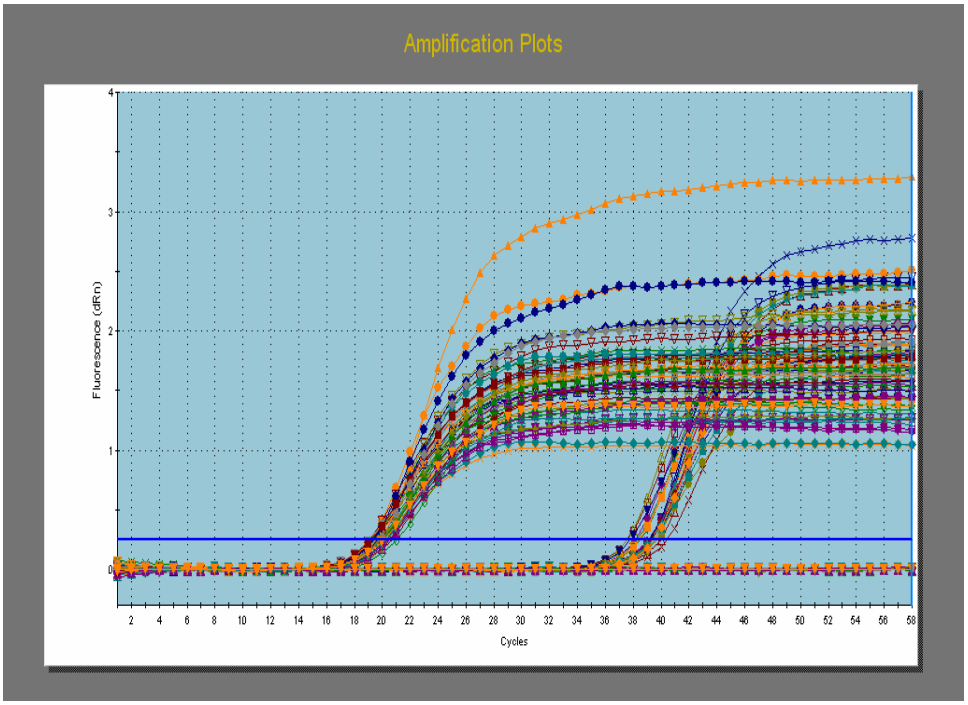


Şekil 4.24 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün TIMP-2 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

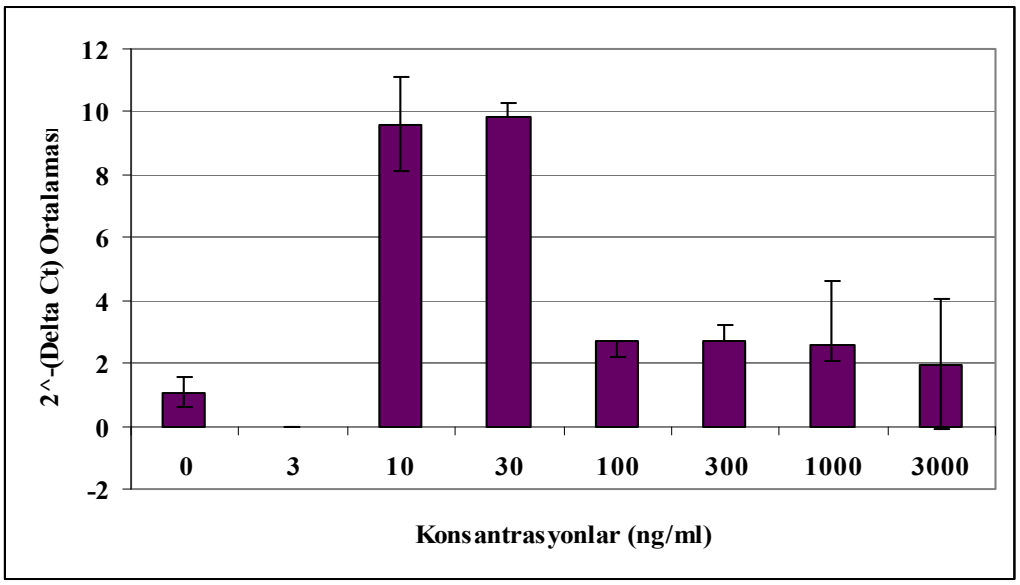


Şekil 4.25 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün TIMP-2 mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

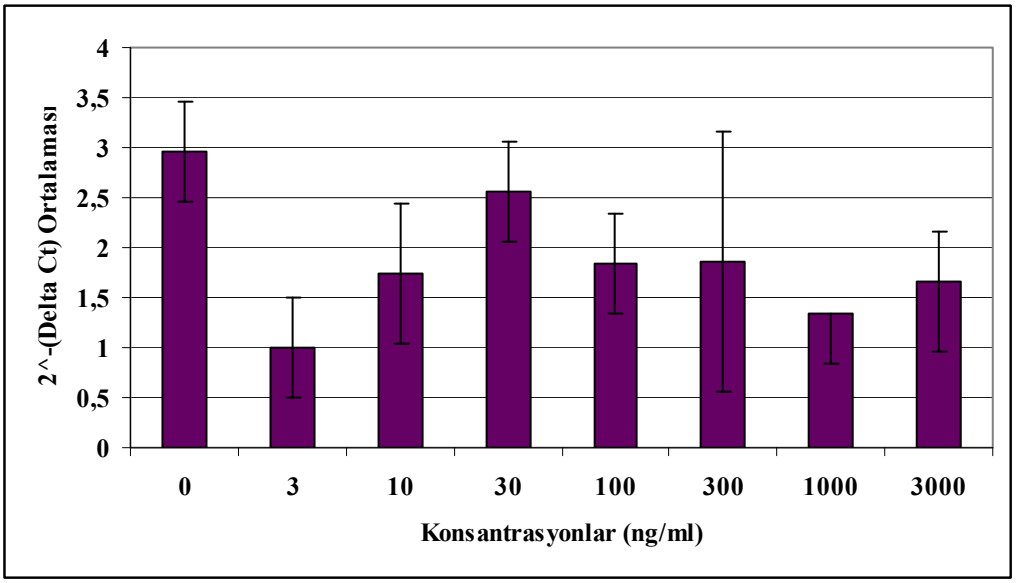
Proenflamatuvar sitokinlerden IL-1β ve TNF-α'nın mRNA ekspresyonlarının, *P. gingivalis* LPS konsantrasyonlarının GF'lere uygulanmasıyla yapılan Q-PCR deneyleri sonucunda elde edilen amplifikasyon grafikleri şekil 4.26., şekil 4.29.'da gösterilmiştir. Elde edilen bilgilerden IL-1β ve TNF-α mRNA seviyelerinin bazı *P. gingivalis* LPS konsantrasyonlarında izlenmediği sonucuna varıldı (Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.30, Şekil 4.31).



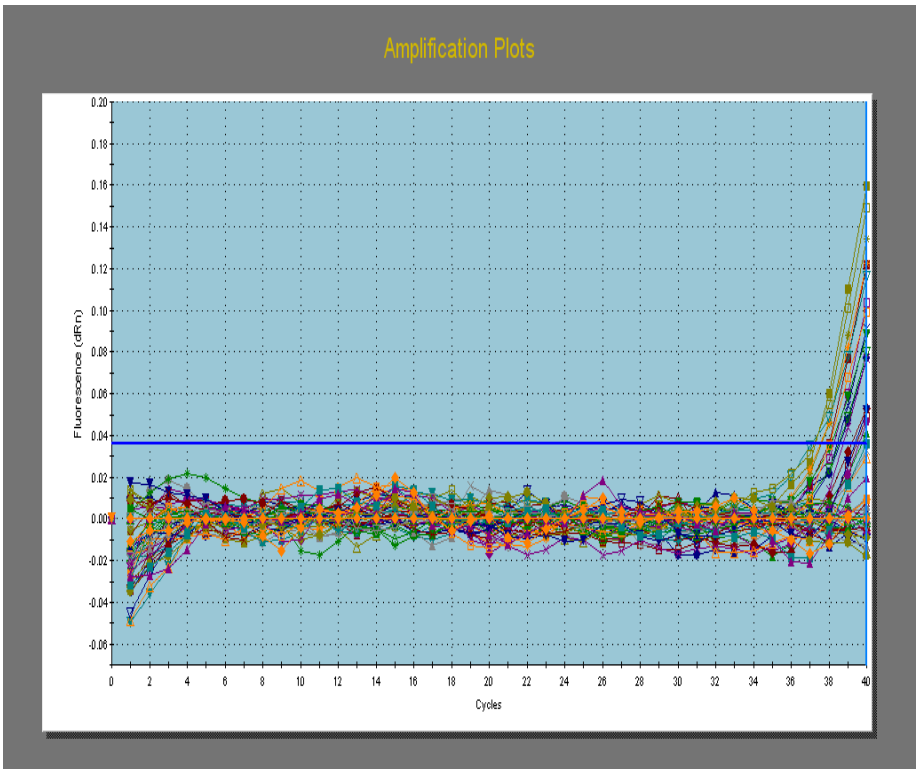
Şekil 4.26 IL-1β'nin amplifikasyon grafiği



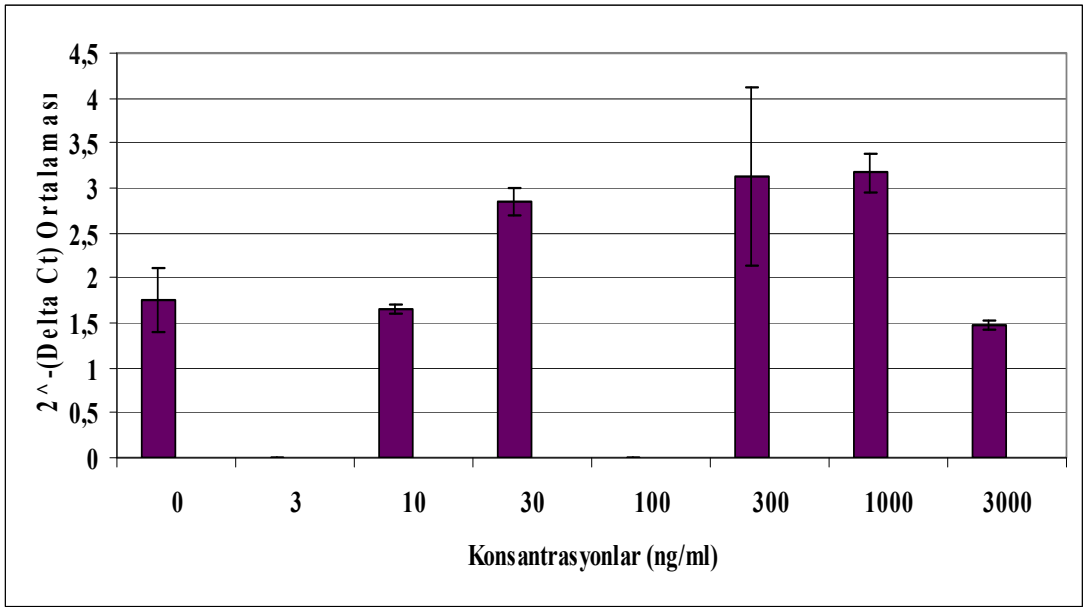
Şekil 4.27 ***P. gingivalis*** **LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün IL-1β'nın mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları**



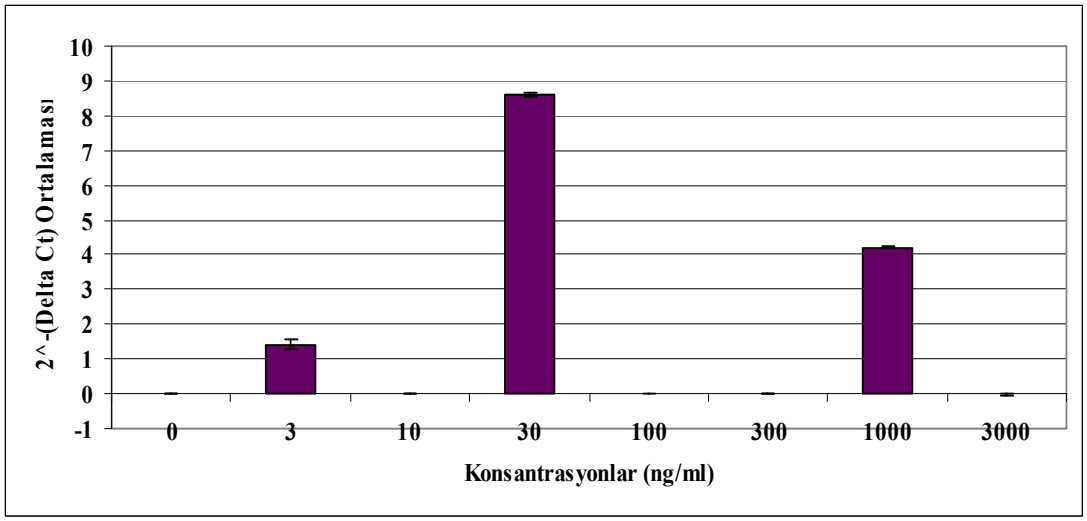
Şekil 4.28 ***P. gingivalis*** **LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün IL-1β'nın mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları**



Şekil 4.29 TNF-α'nın amplifikasyon grafiği



Şekil 4.30 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 3. gün TNF-α mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları



Şekil 4.31 *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrası GF hücrelerinde 8. gün TNF-α mRNA ekspresyonları ortalamaları ve % 95'lik güven aralıkları

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, *P. gingivalis* LPS'sinin GF'lerin canlılığına, proliferasyonuna ve mRNA ekspresyonlarına etkisi incelendi. Uygulanan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları sonucunda hücrelerin doza bağımlı canlılığı 24. ve 96. saatlerde yapılan MTT analiziyle, proliferasyonları ise deneyin 3, 5, 8 ve 12. günlerinde yapılan hücre sayımlarıyla tespit edildi. Proenflamatuvar sitokinlerin ve MMP/TIMP'ların mRNA ekspresyonlarına etkisi ise 3. ve 8. günlerde izole edilen RNAlar'dan cDNA sentezlenmesi ve hedef problarla yapılan Q-PCR deneyleriyle belirlendi.

Gingival fibroblast hücrelerinin canlılığını, *P. gingivalis* LPS'sinin etkileyip etkilemediğini anlaşılması için yapılan MTT deneylerinin sonucuna göre; hem 24. hem de 96. saatlerde, LPS uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Kısa dönemde *P. gingivalis* LPS'sinin hücre canlılığına olumsuz bir etkisi olmadığı sonucuna varıldı. Literatürde daha önce yapılmış araştırmalar arasında *P. gingivalis* LPS'sinin periodontal hücrelerin canlılığı üzerine etkisini inceleyen çok fazla çalışmaya rastlanmamakla birlikte, 1000 ng/ml *E.coli* LPS'sinin GF hücrelerinin (Zhou ve ark, 2007) canlılığını olumsuz yönde etkilemediği bildirilen bir çalışma mevcuttur. Ayrıca, Yamaji ve ark.'nın (1995) yaptığı bir çalışmada, periodontal ligament fibroblast (PDF) hücrelerinin 1, 10 ve 100 µg/ml *P. gingivalis* LPS'siyle 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hücre canlılığında olumsuz bir etkisi olmadığını göstermişlerdir. Uygulanan konsantrasyonların hücre canlılığına etkisinin incelenmesi, yapılacak

mRNA ekspresyonu deneyleri ve elde edilen değerlerin kıyaslanabilmesi için kritik önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, *P. gingivalis* LPS'sinin kısa dönemli olumsuz etkisi izlenmemekle birlikte, uzun dönemli GF proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Proliferasyon deneylerinde, *P. gingivalis* LPS'sinin 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ve 3000 ng/ml dozlarının GF'lere uygulanması sonucunda 3, 5 ve 12. günlerde yapılan hücre sayımlarında, kontrol grubuna kıyasla proliferasyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe ettiği ($p<0.05$), 8. günde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Farklı *P. gingivalis* LPS dozları ile muamele edilen GF hücrelerinde morfolojik olarak bir farklılık oluşmadığı tespit edildi. Yamaji ve ark.'ları (1995) *E. coli* ve *P. gingivalis* LPS'lerinin PDF proliferasyonuna olan etkilerini incelemişler ve uygulamış oldukları çeşitli *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları sonrasında PDF hücrelerinin proliferasyonunda olumsuz bir etkisi olmadığını ve LPS'nin hücrelerin morfolojik görünümlerinde bir değişiklik oluşturmadığını gözlemlemişlerdir. Periodonsiyumda yer alan benzer hücre grupları üzerinde yapılan iki çalışmanın sonucu *P. gingivalis* LPS'sinin hem GF hem de PDF hücrelerinin morfolojik görünümlerinde değişiklik oluşturmaması bakımından uyum göstermektedir. İki çalışma arasındaki proliferasyon sonuçları arasındaki farklılığın Yamaji ve ark.'larının deneyleri için 1, 10 ve 100 µg/ml *P. gingivalis* LPS konsantrasyonlarıyla 24 saatlik inkübasyon zamanını ve bizim ise deneylerimizde 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ve 3000 ng/ml *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları uygulaması sonrasında 3, 5, 8 ve 12. günlerde yapılan hücre sayımlarını kullanmamızdan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yamaji ve ark.'ları (1995) yaptıkları deneyde hücrelerin proliferasyonunu sadece kısa dönemde

(24. saat) incelemişlerdir. Hücre canlılığını, MTT deneyi ile incelediğimiz 24. saatle kıyaslandığında sonuçlarımız benzerlik göstermektedir. Ancak uzun dönemde bizim yaptığımız çalışmada, *P. gingivalis* LPS'sinin negatif yönde etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Gingival fibroblastlar, periodontal bağ dokusunun yapımı ve idamesinde önemli roller üstlenmektedirler. Bu hücreler periodontal hastalık sürecinde ekstrasellüler matriksi yıkmakla ve enflamatuvar sitokinleri salgılamakla görevlidirler. Deneylerimizde GF'lere belirli dozlarda *P. gingivalis* LPS'si uygulanması sonrasında salınan proenflamatuvar sitokin mRNA ekspresyonları Q-PCR yöntemiyle çalışıldı. Farklı *P. gingivalis* LPS dozlarına karşı, proenflamatuvar sitokinlerden IL-6'nın mRNA ekspresyonunun doz ve zaman bağımlı olarak kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu sonucuna varıldı. Bulmuş olduğumuz bu sonuç Almasri ve ark.'nın (2007) GF'lere 1µg/ml *P. gingivalis* LPS uygulaması sonrasında, aralarında IL-6'nında bulunduğu birçok sitokinin ekspresyonunu *cytokine protein array* yöntemiyle çalıştıkları araştırmalarıyla benzerlik göstermektedir. Başka bir çalışmada Kent ve ark.'ları (1999) GF'lerin IL-1 ve *P. gingivalis* LPS'si ile stimüle edildiklerinde, hücrelerde IL-6 üretiminin arttığını, hücre kültürü süpernatantını kullanarak *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yöntemi ile tespit etmişlerdir. Ayrıca, hücrelerden elde ettikleri mRNA'yla *P. gingivalis* LPS yüzey reseptörü olan CD14'ün varlığını *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) metoduyla göstermişlerdir. Yapılmış olan bu araştırma sonucu bizim sonucumuzu desteklemektedir.

Literatürde LPS-hücre etkileşimleri ve hücrelerin LPS'ye verdiği cevap açısından yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler de bu doğrultudadır. Takada ve

ark.'ları (1991) GF'lere *Bacteroides (P. gingivalis)* LPS'si uyguladıkları zaman, ortama salınan IL-1 ve IL-6 seviyesini tespit etmişlerdir. Benzer bir deneyde Kubota ve ark.'ları (2006) Retionic acid-inducible gene-I (RIG-I)'in GF'lerden IL-1β, IL-6 ve IL-8 ekspresyonuna neden olurken, RIG-I geninin LPS ile uyarılması halinde GF'lerdeki IL-1β, IL-6 ve IL-8'in üretiminin arttığını Q-PCR ve ELISA yöntemiyle çalışmışlardır. Wang ve ark.'larının (1998) *P. gingivalis* LPS'sinin stimüle ettiği GF'lerden IL-6 salınımı olduğunu ve bu salınımın üzerinde IL-10'nun inhibisyon etkisi olup olmadığını *flow cytometric* yöntem ile çalışmışlar ve IL-10 reseptörü aracılığıyla IL-10'un IL-6 üretimi üzerinde inhibitör etkisi olduğunu göstermişlerdir (Wang ve ark, 1999). Periodontal hastalık sürecinde monosit/makrofajlar, IL-1β, TNF- α ve IL-6 gibi proenflamatuvarlar aracılığıyla periodontal bağ dokusu yıkımı ve kemik rezorbsiyonuna katılmaktadırlar. Zhang ve ark.'larının (2008) human monositik hücreleri (THP-1) üzerinde *P. gingivalis LPS*'sinin etkisini araştırmaları sonucunda bu virülans faktörünün THP-1 hücrelerinden aralarında IL-6'nın da bulunduğu proenflamatuvar sitokinleri TLR2-JNK sinyal yoluyla eksprese ettiklerini göstermişlerdir. Farklı hücre tipleri kullanılmakla birlikte, periodontal dokudaki lokal bağışıklıkta etkili olan monositlerin, *P. gingivalis* LPS'si ile uyarım sonrasında IL-6 eksprese etmesi, bizim çalışmamızda kullandığımız GF hücrelerinin cevabına benzerlik göstermektedir.

Benzer şekilde Yamaji ve ark.'ları (1995) *P. gingivalis* ve *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS'lerinin PDF'lerden enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu ve üretimine etkisini *Nothern (RNA) blot* ve ELISA yöntemleriyle çalışmışlardır. Araştırmaları sonucunda periodontal ligament hücrelerinden IL-6 ve IL-8 ekspresyonları bulmuş olmaları bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Imatani ve ark.'ları (2001) da

GF'lerin üzerinde *P. gingivalis* LPS'si, polisakkariti ve *P. gingivalis*'in başka bir hücre duvarı proteini olan ATCC53977'nin IL-1β, IL-6 ve IL-8 üretim seviyeleri üzerindeki etkisini *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* yöntemiyle kıyaslamışlar ve buldukları sonuçlar deneylerinde kullanmış oldukları *P. gingivalis* bileşenlerinin üçünün de GF'lerden IL-1β, IL-6 ve IL-8 üretimini artırdığını göstermesi bizim sonuçlarımızı güçlendirmektedir.

Sitokinler, immün cevabı düzenleyen hormon benzeri moleküllerdir. Kent ve ark.'larının (1999) *P. gingivalis* LPS'sinin, IL-1α, IL-1β ve TNF-α'nın GF'ler üzerindeki IL-6 üretimine etkisini RT-PCR ve ELISA yöntemleriyle incelemeleri sonucunda proenflamatuvar sitokinlerin *P. gingivalis* LPS'sinden daha güçlü uyaran olduğu sonucuna varmışlardır. Kent ve ark.'ları (1999) hücrelerin muamelesinde LPS yanı sıra farklı sitokinleri de kullanmışlardır. LPS kullandıkları deneylerden elde ettikleri sonuçlar, bizim sonuçlarımızla tutarlıdır.

Periodontal hastalığın önemli belirleyicilerinden olan IL-8'in Q-PCR sonuçları, uygulanan *P. gingivalis* LPS doz artışı ile uyumlu olarak deneyin hem 3. gününde hem de 8. gününde kontrol grubuna göre arttığını göstermektedir. Periodontal hastalık sürecinde PMNL'lerin kan dolaşımından periodontal dokuya geçip birincil savunma hattını kurabilmesi için periodontal dokuda IL-8 ekspresyonunun olması gereklidir. Araştırmamızda kullanmış olduğumuz periodontal hastalık etkenlerinden *P. gingivalis* LPS'si uyarımı karşısında GF'lerden IL-8 ekspresyonunun artmış olması, periodontal dokulardaki enflamasyonun devamında GF'lerin önemli rol oynadığını ortaya çıkarmaktadır. Araştırmamızdan elde edilen bu sonuç Tamura ve ark.'larının (1992) GF hücre kültürlerine *P. gingivalis* ve *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) LPS'lerini uygulamaları sonucunda GF'lerden IL-8 salınımı olduğunu

Nothern (RNA) blot analiziyle tespit etmeleriyle benzerlik göstermektedir. Başka bir çalışmada Wang ve ark.'ları (2003) sağlıklı ve enflamasyonlu periodontal dokulardaki GF'lerden CD14, TLR2 ve TLR4 yoluyla IL-1β, IL-1α, IL-6 ve IL-8 ekspresyonlarını *DNA microarray* yöntemiyle incelemişler ve enflamasyonlu periodontal dokularda bu sitokinlerin ekspresyonunun artmış olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda sağlıklı dokudan izole edilen GF hücreleri kullanılmakla birlikte, *P. gingivalis* LPS'sinin GF'ler üzerindeki IL-8 ekspresyonunu artırıcı yöndeki etkisi Wang ve ark'nın sonuçları ile uyum göstermektedir. Farklı bir araştırmada Wendell ve Stein'in (2001) çalışma sonuçları, *P. gingivalis* LPS'sinin IL-6 ve IL-8 ekspresyonunu artırmadığını göstermektedir. Elde edilen sonuçların farklı olması, Wendell ve ark.'larının ELISA yöntemini kullanmaları ve sadece 100 ng/ml *P. gingivalis* LPS dozunu kullanmış olmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bizim yaptığımız çalışmada 3. ve 8. günlerdeki mRNA ekspresyonu incelenirken, Wendell ve ark.'nın yaptığı çalışmada 12, 24 ve 48. saatlerde değerlendirme yapılmıştır. Farklı zaman periyodlarının değerlendirilmiş olmasının da sonuçlarda farklılık yaratabileceği düşünülmektedir.

Ara ve ark.'nın (2009) yaptığı çalışmada, GF ve mononükleer hücrelerin *P. gingivalis* ve *E. coli* LPS'si ile muamele edilmesi sonrası, koşullandırılmış hücre kültürü mediasında ELISA yöntemi ile IL-6 ve IL-8'i incelemişler ve mononükleer hücreler ile kıyaslandığında GF hücrelerinde kaydadeğer ölçüde sitokin üretimi olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada yapılan LPS muamele ve sitokin tayin yöntemi, bizim çalışmamızdan farklı olmakla birlikte, sitokin üretimine dair elde edilen sonuçlar açısından benzerlik göstermektedir.

Q-PCR sonuçlarına göre; *P. gingivalis* LPS'si uygulaması sonrası, bazı konsantrasyonlarında IL-1β ve TNF-α mRNA ekspresyonlarının tespit edilmediği gözlendi. Daha önce yapılmış benzer deneysel kurgusu olan bir çalışmada Yamaji ve ark.'ları (1995) PDF'lerin *P. gingivalis* LPS'si ile stimüle edilmesi sonrasında IL-6, IL-8 mRNA ekspresyonu bulunurken IL-1β ve IL-1α mRNA ekspresyonlarının tespit edilmediğini, RT-PCR yöntemiyle göstermişlerdir. Hücre orjinleri farklı olmakla birlikte, elde edilen sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyumluluk göstermektedir. Literatürde yer alan farklı bir çalışmada ise, Imatani ve ark.'ları (2001) GF'lerde *P. gingivalis* LPS'si ile stimüle edilmesi halinde, IL-1β ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Bizim araştırma sonucumuzla bu çalışma arasındaki IL-1β ekspresyonu tespiti arasındaki farklılık, Imatani ve ark.'nın deneylerinde kullanmış oldukları yüksek doz *P. gingivalis* LPS (0.1, 1, 10 μg/ml)'sinden ve sitokin ekspresyonunu tespit etmek için kullandıkları ELISA yönteminden kaynaklanıyor olabileceği kanısına varılmıştır.

Periodontal dokuların devamlılığı hücreler arası matriks makromoleküllerinin, kollajenlerin, elastinin, GAG'ların ve GP'lerin bütünlüğünün bozulmamasına bağlıdır. Matriks metalloproteinazlar, hücreler arası matriks yenilenme ve yıkım arasındaki dengeyi belirleyen enzimlerdir. Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP)'lar, MMP'lerin doku orjinli spesifik inhibitörleridir (Ertuğrul 2008). Periodontal hastalık süresince, MMP'ler EM'nin yıkımını sağlayarak enflamasyonun kontrol altına alınmasına yardımcı olurlar. Periodontal hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülen doku yıkım enzimlerinden MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA ekspresyonları Q-PCR ile çalışıldı. Elde edilen sonuçlar deneyin 3.

ve 8. günlerinde LPS uygulaması sonrası MMP-1, 2 ve -3 mRNA ekspresyonlarında doza bağımlı olarak artış olduğunu gösterdi.

Pattamapun ve ark.'ları (2003) *P. gingivalis*'in çeşitli konsantrasyonlarını PDF'lere uygulamışlar ve MMP-2 ekspresyonunun artışını RT-PCR yöntemiyle tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, *P. gingivalis*'in virülans faktörlerinden LPS'nin benzer etkiyi GF'ler üzerinde meydana getirdiği ve MMP-2 ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir. Pattamapun ve ark'nın (2003) çalışmasında bakterinin LPS'si değil kendisi kullanılmakla birlikte, benzer sonuçların elde edilmesi, hücrelerin hem mikroorganizmanın kendisine hem de LPS'sine aynı cevabı verdiğini düşündürmektedir. Beklen ve ark.'ları (2007) ise, GF'lerin IL-1β, TNF-α ve IL-17 ile muamele edilmesi sonrasında, MMP-1 ve MMP-3 üretiminin arttığını ELISA yöntemiyle göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da *P. gingivalis* LPS uyarımıyla ortama salınan proenflamatuvar sitokinlerin, doku yıkımında öenmli rol oynayan enzimlerden MMP-1 ve MMP-3 ekspresyonunu artırmış olabileceği öngörülmektedir. Yani, GF hücresinin kendi sentezlediği sitokinlerin, hücrenin enzim profilini de etkileyebileceği düşünülmektedir.

Fizyolojik şartlarda MMP'ler periodontal bağ dokusunun remodelasyonununda rol oynarken, mikroorganizmaların kolonizasyonu sonrası, yerleşik bağ dokusu hücrelerini etkileyerek, periodontal dokunun yıkımında da görev almaktadır. Periodontal hastalıkta oluşan doku hasarı ya MMP'lerin üretiminin artmasından ya da MMP'lerin doku inhibitörleri olan TIMP'ların sekresyonlarının azalmasından kaynaklanmaktadır (Bodet ve ark, 2007). Araştırmamızda MMP'lerin doku inhibitörlerinden TIMP-1 mRNA ekspresyonunun, bazı *P. gingivalis* LPS konsantrasyonlarında daha belirgin olmakla birlikte kontrol grubuna göre arttığı

tespit edildi. Aynı şekilde MMP'lerin diğer bir doku inhibitörü olan TIMP-2 mRNA ekspresyonun da uygulanan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonlarıyla, bazı gruplarda daha fazla olmak üzere ve 100 ng/ml konsantrasyonu hariç hepsinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış oluşturduğu belirlendi. Bilgilerimiz dahilinde, literatürde direkt olarak *P. gingivalis* LPS'sinin GF hücrelerin TIMP ekspresyonlarına etkisine yönelik bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle kıyaslama olanağı bulunamamıştır. Ancak uygulanan *P. gingivalis* LPS konsantrasyonları sonucunda artan TIMP-1 ve TIMP-2 mRNA ekspresyonlarının varlığı, MMP enzimleriyle oluşan doku yıkımına karşı, hücrenin dokunun bütünlüğünü korumak ve yıkımı sınırlamak amacıyla geliştirmiş olduğu bir savunma mekanizması olarak düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlar, *P. gingivalis* LPS'sinin dişeti dokusunun bütünlüğünde önemli rol oynayan GF hücrelerinin sitokin ve enzim profilini etkileyebildiği aynı zamanda GF hücrelerinin dişeti dokusunun yıkımı ve enflamasyonun devamlılığı ile direkt ilişkili olduğunu göstermektedir. Gingival fibroblast hücrelerinin LPS'ye verdiği cevabın doza bağımlı olması, bakterilerin virülans faktörlerinin miktarının ve konağın bu virülans faktörlerine maruz kalma süresinin artmasının, oluşan konak cevabında etkili olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *P. gingivalis* LPS'sinin

- kısa dönemli (24 ve 96. saatlerde) hücre canlılığını olumsuz yönde istatistiksel olarak anlamlı biçimde etkilemediği saptandı ($p>0.05$).
- Uzun dönemli proliferasyon deneyinde ise 3, 5 ve 12. günlerde GF proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe ettiği tespit edildi ($p<0.05$).
- Q-PCR sonuçlarına göre, IL-6, IL-8, MMP-1, MMP-2 ve MMP-3 mRNA ekspresyonlarını doza bağlı olarak artırdığı, ayrıca TIMP-1 ve TIMP-2 mRNA ekspresyonlarının da LPS uygulaması ile arttığı gözlendi.

Elde edilen sonuçlar, *P gingivalis* LPS'sinin GF hücrelerinin proliferasyonu ve mRNA ekspresyonlarını etkileyebildiği, biyolojik hücre davranışını da regüle edebildiğini göstermektedir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalar;

-*P. gingivalis* LPS'sinin kısa dönemli (dakika ve saat düzeyinde) GF hücreleri üzerine etkisinin incelenmesi,

- *P. gingivalis* LPS'sinin farklı sitokinler (özellikle de antienflamatuvar) ve büyüme faktörlerinin mRNA ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması,

- Mikroorganizma-dişeti hücreleri ve dişeti-kemik hücrelerinin etkileşimlerinde, kemik yıkım mekanizmalarında önemli rol oynayan Osteoprotogerin ve RANKL mRNA ekspresyonlarına etkisinin incelenmesi,

- Hem kısa dönem hem de uzun dönem LPS uyarımının GF'lerde hücre içinde, uyaranın hangi sinyal ileti yollarını kullandığına dair mekanizma çalışmaları üzerine odaklanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

Akca, G., Akca, A.E., Ökte, E., Sultan, N. 2007 Periodontitisli bireylerde *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*'in tespitinde kültür ve direk immünofloresan değerlendirme yöntemlerinin karşılaştırılması. Hacet Dişhek Fak Derg; 31 (1): 19-24.

Aksun, A.S., Özmen, D., Bayındır, O. 2001 Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. T Klin Tıp Bilimleri; 21: 332-342.

Almasri, A., Wisithphrom, K., Windsor, L.J., Olson, B. 2007 Nicotine and Lipopolisaccharide affect cytokine expression from gingival fibroblasts. J periodontol; 78: 533-541.

Ara, T., Kurata, A.T., Hirai, K., Uchihashi, T., Uematsu, T., Imamura, Y., Furusawa, K., Kurihara, S., Wang, P-L 2009 Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. J Periodont Res; 44: 21-27.

Bartold, P.M., Walsh, L.J., Narayanan, A.S. 2000 Moleculer and cell biology of the gingiva. Periodontol 2000; 24: 28-55.

Bayındır, Y. 2003 Dental infeksiyonlarda doğru antibiyotik kullanımı. İnönü Üni. Tıp Fak. Derg; 10 (4): 213-216.

Beklen, A., Ainola, M., Hukkanen, M., Gürgan, C., Sorsa, T., Konttinen, Y.T. 2007 MMPs, IL-1 and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. Dent Res; 86 (4): 347-351.

Berker, E., Kantarci, A., Hasturk, H., Van Dyke, T.E. 2005 Effect of neutrophil apoptosis on monocytic cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. J Periodontol; 76: 6.

Bodet, C., Andrian, E., Tanabe, S., Greiner, D. 2007 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase tissue inhibitors of matrix metalloproteinase and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: A potential role in connective tissue destruction. J Cell Physiol; 212: 189-194.

Boutaga, K., Savelkoul, P.H.M., Winkel, E.G., Winkelhoff, A.J. 2007 Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. J Periodontol; 78: 79-86.

Carranza, F.A, Newman, M.G. 2008 Clinical Periodontology. 9th edition, W.B. Saunders Company.USA

Cury, P.R., Arau'jo, V.C., Canavez, F., Furuse, C., Arau'jo, S.N. 2007 Hydrocotisone affects the expression of matrix metalloproteinases (MMP-1, -2,- 3,-7) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1) in human gingival fibroblasts. J Periodontol; 78: 1309-1315.

Cury, P.R., Arau'jo, V.C., Canavez, F., Furuse, C., Leite, K.R.M, Arau'jo, S.N. 2007 The effect of epidermal growth factor on matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases gene expression in cultured human gingival fibroblasts. Arch. of Oral Bio; 52: 585-590.

Domeij, H., **Modeer, T., Yucel-Lindberg, T. 2004** Matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 production in human gingival fibroblasts: the role of protein kinase C. J Periodont Res; 39: 308-314.

Emecen, P. 2005 Periodontal hastalıkta interlökin-1A, interlökin-1B ve interlökin-1RN gen polimorfizmlerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Erdemir, E.O., Mısırlıoğlu, M., Nalçacı, R., Apan, T., Demirer, S. 2007 Kronik periodontitisli tedavinin klinik parametreler ve dişeti oluğu sıvısı IL-6 ve IL-8 miktarı üzerine etkisi. T Klin J Dental Sci; 13: 41-47.

Ertuğrul, S.A., 2008 Liken planus hastalarının periodontal, biyokimyasal ve immunohistokimyasal incelenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Feng, Z., Weinberg, A. 2006 Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. Periodontol 2000; 40: 50-76.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. 2001 An overwiew of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. Methods 25; 386-401.

Gogly, B., Hornebeck, W., Groult, N., Godeau, G., Pellat, B. 1998 Influence of heparin(s) on the interleukin-1-b- induced expression of collagenase, stromelysin-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in human. Biochem Pharmacol; 56: 1447-1454.

Guan, S.M., Shu, L., Fu, S.M., Liu, B., Xu, X.L., Wu, J.Z. 2008 *Prevotella intermedia* induces matrixmetalloproteinase-9 expression in human periodontal ligament cells. FEMS Microbial Lett; 283: 47-53.

Hake, S.K. 1996 Periodontal Microbiology in "Clinical Periodontology" Ed.by FA Carranza, MG Newman 84-103,WB Saunders Co Newyork.

Imatani, T., Kato, T., Okuda, K. 2001 Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell surface preparations of *Porphyromonas gingivalis.* Oral Microbiol Immunol; 16: 65-72.

Jacob, M. 2006 Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. Odontology; 94: 1-9.

Kent, L.W., Rahemtulla, F., Michalek, S.M. 1999 Interleukin 1 and *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblasts derived from healthy or periodontally diseased human gingival tissue. J Periodontol; 70: 274-282.

Kubota, K., Sakaki, H., Imaizumi, T., Nakagawa, H., Kusumi, A., Kobayashi, W., Satoh, K., Kimura, H. 2006 Retinoic acid-inducible gene-I is induced in gingival fibroblasts by lipopolysaccharide or poly IC: possible roles in interleukin-1B, -6 and -8 expression. Oral Microbiol Immunol; 21: 399-406.

Lewis, A. H., Kay, L.N., Raymond, H.H., Chol, C.H. 2005 American board of general dentistry board review material 2005, pp 11.

Livak, K. J., Schmittgen, T.D. 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-}Delta Ct method. Methods 25; 402-408.

Lorencini, M., Silva J.A.F., De la Hoz, C.L.R., Carvalho, H.F., Stach-Machado, D.R. 2009 Changes in MMPs and inflammatory cells in experimental gingivitis. Histol Histopathol; 24: 157-166.

Maeda, K., Tribble, G.D., Tucker, C.M., Anaya, C., Shizukuishi, S., Lewis, J.P., Demuth, D.R., Lamont, R.J. 2008 A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine

phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes. Moleculer Microbiology; 69 (5): 1153-1164.

O'Brien-Simpson, N.M., Pathirana, R.D., Paolini, R.A., Chen, Y.Y., Veith, P.D., Tam, V., Ally, N., Pike, R.N., Reynolds, R.C. 2005 An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes protects against *Porphyromonas gingivalis*- induced periodontal bone loss. J Immunol; 175: 3980-3989.

Okada, H., Murakami, S. 1998 Cytokine expression in periodontal health and disease. Crit Rev Oral Biol Med; 9 (3): 248-266.

Özdemir, H., Marakoğlu, İ. 2004 Periodontopatojenler. C Ü Dişhek Fak Derg; 7 (2): 52-59.

Öztürk, M.K., Bozkurt, F.Y. 2005 Periodontal rejenerasyonda yeni bir yaklaşım: Trombositten zengin plazma. C Ü Dişhek Fak Derg; 8 (2): 119-127.

Pattamapun, K., Tiranathanagul, S., Yongchaitrakul, T., Kuwatanasuchat, J., Pavasant, P. 2003 Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells. J Periodont Res; 38: 115-121.

Pfaffl, M. 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research; 29: 900.

Reel, B. 2006 Matrix metalloproteinases and atherosclerosis: Review. T Klin J Med Sci; 26: 527-537.

Reife, R., Coats, S.R., Al-Qutub, M., Dixon, D.R., Braham, P.A., Billharz, R.J., Howald, W.N., Darveau, R.P. 2006 *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activites of tetra- and

penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. Cell Microbiol; 8 (5): 857-868.

Ren, L., Leung, W.K., Darveau, R.P., Jin, L. 2005 The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membran-bound CD14, and Toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. J Periodontol; 76: 1950-1959.

Sarah, S.M., Tamilselvan, S., Kamatchiammal, S., Suresh, R. 2006 Ekspression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic gingivitis. Ind J Dent Res; 17 (3): 114-116.

Socransky, S.S., Haffajee, A.D. 2003 Micrabiology of Periodontal Disease in "Clinical Periodontology and implant dentistry" Ed.by J Lindhe, T Karring, NP Lang, 106-139.

Sun, Y., Shu, R., Zhang, M., Wu, A. 2008 Toll-like receptor 4 signaling plays a role in triggering periodontal infection. FEMS Immunol Med Microbial; 52: 362-369.

Suryono, Kido, J.İ., Hayashi, N., Kataoka, M., Nagata, T. 2003 Effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-a (TNF-a), and interleukin-1b (IL-1b) on calprotectin release in human monocytes. J Periodontol; 74: 1719-1724.

Takada, H., Mihara, J.T., Morisaki, T.I., Hamada, S. 1991 Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with Bacteriodes lipopolysaccharides. Infect Immun; 59 (1); 295-301.

Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D.F., Kitetsu, S. 2005 The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. J Clin Periodontol; 32: 369-374.

Takashiba, S., Naruishi, K., Murayama, Y. 2003 Perspective of cytokin regulation for periodontal treatment: Fibroblast biology. J Periodontol; 74: 103-110.

Tamura, M., Tokuda, M., Nagaoka, S., Takada, H. 1992 Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* and *Bacteroides gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Infect Immun; 60 (11): 4932-4937.

The pathogenesis of periodontal diseases 1999. J Periodontol; 70: 457-470.

Wang, P.L., Sato, K., Oido, M., Fujii, T., Kowashi, Y., Shinohara, M., Ohura, K., Tani, H., Kuboki, Y. 1998 Involment of CD14 on human gingival fibroblasts in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 secretion. Archive Oral Biol; 43: 687-694.

Wang, P.L., Shirasu, S., Shinohar, M., Azuma, Y., Daito, M., Yasuda, H., Ohura, K. 1999 IL-10 inhibits *Porphyromonas gingivalis*-LPS stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. Biochem Biophys Res Commun; 263 (2): 372-377.

Wang, P.L., Oido-Mori, O., Fujii, T., Kowashi, Y., Kikuchi, M., Suetsugu, Y., Tanaka, J., Azuma, Y., Shinohara, M., Ohura, K. 2001 Heterogeneous expression of toll-like receptor 4 and downregulation of toll-like receptor 4 expression on human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. Biochem Biophys Res Commun; 288 (4): 863-867.

Wendell, K., Stein, S.H. 2001 Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide. J Periodontol; 72: 1038-1044.

Yaka, E., Eğrilmez, M.Y., Keskinoğlu, P., Çavdar, Z., Genç, Ş., Genç, K., İyilikçi, L., Yener, G.G. 2006 Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında biyolojik belirteçler ve BOS'un PC12 hücre hattı canlılığı üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi. T journal Geriatrics; 9(1): 1-7.

Yamaji, Y., Kubota, T., Sasaguri, K., Sato, S., Suzuki, Y., Kumada, H., Umemoto, T. 1995 Inflammatory cytokin gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. Infect Immun; 63 (9): 3576-3581.

Yuan, L., Rodrigues, P.H., Be'langer, M., Dunn, W.A., Progulske-Fox, J.A. 2008 *Porphyromonas gingivalis* htrA is involved in cellular invasion and in vivo survival. Microbiology; 154: 1161-1169.

Zhang, D., Chen, L., L, S., G, Z., Y, J. 2008 Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1B, TNF-a and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of Escherichia coli LPS. Innate Immunity; 14 (2): 99-107.

Zhou, Q., Desta, T., Fenton, M., Graves, D.T., Amar, S. 2005 Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis,* its lipopolysaccharides, or its FimA protein. Infect Immun; 73 (2): 935-943.

Zhou, J., Olson, B.L., Windsor, L.J. 2007 Nicotine increases the collagen-degrading ağabeylity of human gingival fibroblasts. J Periodont Res; 42: 228-235.