



**MİNERALİZAN PEPTİD YAVAŞ SALINIM PREPARATLARININ İN VİTRO
OSTEOBLAST MİNERALİZASYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Cenkhan BAL

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2022

MİNERALİZAN PEPTİD YAVAŞ SALINIM PREPARATLARININ İN VİTRO
OSTEOBLAST MİNERALİZASYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ
(Doktora Tezi)

Cenkhan BAL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mart 2022

ÖZET

Periodontitis, doğal diş etrafındaki destek dokunun yıkımı nedeniyle diş kaybıyla sonuçlanabilen inflamatuvar bir hastalıktır. Bu hastalığın tedavisinde kaybedilen destek dokuların tekrar yerine konulması en ideal tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ile başarılı sonuçlar elde edilmeye çalışılmıştır. Ancak orijinal dokuların biyouyumlu ve biyoatraktan maddeler ile tamir ve rejenerasyon özelliklerinin artırılması ideal bir hedef haline gelmiştir. Bu amaçla sıklıkla amelogenin kaynaklı Emdogain yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızın amacı Emdogain'e alternatif olabilecek sentetik olarak üretilen ve çok daha ucuza mal edilebilen mineralizan peptidin osteoblast hücre kültürleri üzerindeki etkilerini kıyaslamaktır. Bu amaçla 0.4mM konsantrasyonda %3'lük jel kıvamında hazırlanan mineralizan peptid jel ile sade jelatin, Emdogain ve hiçbir şey katılmamış olan (kontrol) osteoblast hücre kültürü grupları hazırlanmıştır. Hazırlanan ortamlarda XTT(tetrazolium salt), alkalin fosfataz enzimi ve askorbik asit eklenen ve askorbik asit eklenmeyen gruplarda alizarin kırmızı testi sekizer adet örnekte incelenmiştir. Ayrıca hücre morfolojilerini ve siteskeleton yapılarını gözlemek için üçer adet örnekte tarama elektron mikroskobu ve immünfloresans görüntüleme teknikleri uygulanmıştır. Yapılan XTT analizinde sadece jelatin grubu %70 değerinin altında kalmış ve sitotoksik olarak düşünülmüştür. Mineralizan peptid grubu tüm test analizlerinde kontrol grubuna ve sade jelatin grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı ve olumlu sonuçlar vermiştir. Askorbik asit ilave edilen alizarin kırmızı testinde mineralizan peptid jel Emdogain ile benzer sonuçları vermiştir. Mineralizan peptid jel, Emdogain kadar yüksek seviyelerde olmasa da, osteoblast hücre kültürlerinde kontrol ve sade jelatin gruplarına nazaran olumlu sonuçlar vermiştir. Daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bilim Kodu : 1048
Anahtar Kelimeler : Periodontitis, emdogain, mineralizan peptid, osteoblast
Sayfa Adedi : 89
Danışman : Prof. Dr. M. Bülent KURTİŞ

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CONTROLLED RELEASING
MINERALIZING PEPTIDE PREPARATIONS ON IN VITRO OSTEOBLAST
MINERALIZATION

(Ph. D. Thesis)

Cenkhan BAL

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

ABSTRACT

Periodontitis is an inflammatory disease that can result in tooth loss due to the destruction of the supporting tissue around the natural tooth. The most ideal treatment of periodontal disease is, replacing the lost supporting tissues. Particularly successful results have been tried to be obtained with directed tissue regeneration. However, increasing the repair and regeneration properties of original tissues with biocompatible and bioattractant materials has become an ideal target. Emdogain from amelogenin is widely used for this purpose. The aim of our study is to compare the effects of synthetically produced mineralizing peptide, which can be an alternative to Emdogain, on osteoblast cell cultures. For this purpose, mineralizing peptide gel prepared in 3% gel consistency at 0.4mM concentration, plain gelatin, Emdogain and osteoblast cell culture groups with nothing added (control) were prepared. XTT (tetrazolium salt), alkaline phosphatase enzyme activity test and alizarin red test (ascorbic acid added and without ascorbic acid) were examined in the prepared medias with eight samples. In addition, scanning electron microscopy and immunofluorescence imaging techniques were applied to three samples in order to observe cell morphologies and skeleton structures. In the XTT analysis, only the gelatin group remained below 70% and was considered cytotoxic. Mineralizing peptide showed statistically significant and positive results in all test analyses compared to the control group and the plain gelatin group. Mineralizing peptide gel has similar results with Emdogain in the alizarin red test, in which ascorbic acid was added. As a result, although the mineralizing peptide gel was not as successful as Emdogain, it showed positive results in osteoblast cell cultures compared to the control and plain gelatin groups. Further investigations are needed.

Science Code : 1048

Key Words : Periodontitis, emdogain, mineralizan peptide, osteoblast

Page Number : 89

Supervisor : Prof. Dr. M. Bülent KURTİŞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her türlü tecrübesini ve bilgisini içtenlikle paylaşan Sayın Prof. Dr. M. Bülent KURTİŞ hocama,

Doktora sürecimi yardımları ve aktardıkları bilgiler ile kolaylaştıran çok kıymetli Sayın Prof. Dr. Altan DOĞAN'a, Sayın Prof.Dr. Ayşen BODUR'a ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜNGÖRMÜŞ hocama,

Bu süreçte hep yanımda olan ve bana desteğini hiç esirgemeyen sevgili dostum ve hocam Prof. Dr. Tolga F. TÖZÜM'e,

Doktora eğitimimin başlangıcında ve devamında her türlü desteği sağlayan değerli dostlarım Dr. Dt. Özkan ÖZKOÇER, Dt. Anıl KURUN'a ve Uzm. Dt. Onur ETÖZ'e,

Varlıkları ile bana enerji ve mutluluk veren kıymetli dostlarım; Dt. Bejna BOZYEL, Dt. Özge UZUNER BİLGİÇ, Dt. Yasemin ÇİÇEK, Dt. Ece GÜNER, Dt. Habibe AKKALE, Dt. Yusuf TATOĞLU, Dt. Beste İLASLAN HALLAÇ, Dt. Tolga TOPAL, Dt. Kemal BİNİCİ, Dt. Merve ALTIKAT, Dt. Ilgın MANAV, Dt. Cemre ALTAY, Dt. Seher ARSEVEN TUNÇ, Dt. Çağlar KALKAN, Dt. Duygu ÖZTÜRK, Dt. Seyide YURDUSEVEN'e,

Değerli kıdemlilerim ve kardeşlerim Dr. Dt. Samet TUNÇ, Dr.Dt. Alican BARAN, Dr. Dt. Levent HALLAÇ, Dr. Dt. Göktuğ EBERLİKÖSE, Dr. Dt. Cansu GÜRSOY ve Dr. Dt. Janset ŞENGÜL'e,

İyilik meleği, yardımsever, çok değerli; Fatma DÖNMEZTÜRK'e, Dilek ASGARİ'ye, Şeyma Er'e, Emine DEMİREZEN'e ve Erdoğan İBİŞ'e,

Yaşamıma anlam katan mutluluk kaynağım kızım Selen BAL ve oğlum Mehmethan BAL ve en yakın arkadaşım, yoldaşım, eşim Bilge TURHAN BAL'a,

Beni yetiştiren, her zaman yanımda olan; mükemmel bir anne ve baba olan; Aysun BAL ve Mehmet Fazıl BAL'a,

Bahsetmeden geçemeyeceğim ablam Müge BAL'a,

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viiiiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Periodontolojide rejeneratif yaklaşımlar	3
2.2. Dişin embriyogenik gelişimi	5
2.3. Mine Matriks Protein Türevleri (MMPT)	6
2.3.1. Mine matriks protein türevlerinin kök oluşumuna etkisi.....	8
2.4. MMPT'den Emdogain (EMD).....	8
2.5. Biyomimetik peptidler ile mineralizasyon	12
2.5.1. Sentetik amelogenin	14
2.5.2. Poli amido amin dendrimerler	14
2.5.3. Dentin fosfoprotein türevi 8DDS peptidler	15
2.5.4. Kendiliğinden birleşen peptidler.....	15
2.5.5. Mineralizasyon teşvik edici peptid 3 (MPP3)	16
2.6. Hücre Kültürü Çalışmalarının Periodontolojideki Yeri	18
2.6.1. Hücre kültürlerinin avantajları ve dezavantajları	19

	Sayfa
2.6.2. Hücrelerin elde edilmesi	20
2.6.3. Primer hücre kültür yöntemleri.....	20
2.6.4. Devamlı hücre kültürü dizini (Cell line)	21
2.7. Kemik Hücreleri	22
2.7.1. Osteoblast hücreleri.....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	23
3.1.1. Mineralizan peptidler	23
3.1.2. Emdogain	26
3.2. Tez Çalışması İçin Kullanılan Hücrelerin Elde Edilmesi.....	27
3.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	31
3.4. XTT(TERAZOLİUM SALT) Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	32
3.5. Alkalen Fosfataz (AF) Aktivitesinin Belirlenmesi	34
3.6. Alizarin Kırmızı Boyama	36
3.7. Tramalı (scanning) Elektron Mikroskop (SEM) Analizi.....	37
3.8. İmmünfloresan Görüntüleme	38
3.9. İstatistik Analizler	40
4. BULGULAR	41
4.1. XTT yöntemi ile Belirlenen Hücre Canlılığına İlişkin Bulgular	41
4.2. Alkalen Fosfataz Aktivitesi ile Tespit Edilen İstatistiksel Bulgular	42
4.3. Alizarin Kırmızı Testi Sonuçları	44
4.4. Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleri ve Değerlendirilmesi	47
4.5. İmmünfloresan Mikroskop Görüntüleri ve Değerlendirmesi	49

	Sayfa
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ	61
KAYNAKLAR	63
EKLER.....	85
EK-1. Doğa ilaç firmasından elde edilen yenilebilir sığır jelatininin sertifikası...	86
ÖZGEÇMİŞ	87



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan amino asit dizisi MPP3'ün fizikokimyasal özellikleri (pl: izoelektrik nokta, GRAVY: Ortalama hidrofobisite, mavi: negatif yük, kırmızı: pozitif yük) (P: prolin, G: Glisin, E: Glutamik asit, K: Lizin, A: Alanin, D: Aspartik asit, R: Arjinin).....	23
Çizelge 3.2. Çalışmanın içeriğindeki gruplar, yapılan uygulamalar ve örnek sayılarının tablosu	32
Çizelge 4.1. XTT hücre canlılığı sonuçlarının istatistiksel analiz tablosu (*: $p>0,05$).....	42
Çizelge 4.2. Alkalen fosfataz aktivitesi sonuçlarının betimleyici istatistikleri (*: $p>0,05$).....	44
Çizelge 4.3. Askorbik asit eklenmiş olan grupların alizarin kırmızı testi sonuçlarının betimleyici istatistikleri (*,+: $p>0,05$)..	47
Çizelge 4.4. Askorbik asit eklenmemiş olan grupların alizarin kırmızı testi sonuçlarının betimleyici istatistikleri (*: $p>0,05$).....	47

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. MPP3 peptidinin elde edilmesinin şematik gösterimi	24
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda spektrofotometre cihazında değerlendirilen jelatin+MPP3 karışımlarının sonuçları.....	26
Şekil 4.1. Hücrelerin canlılığının XTT analizine göre sonuçlarının oranı (*:p>0,05) ...	41
Şekil 4.2. Kontrol grubundaki hücre canlılığının XTT sonuçları %100 kabul edildiğinde diğer çalışma gruplarının oranı.....	42
Şekil 4.3. Laboratuvar çalışma koşullarında elde edilen alkale fosfat kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.4. Yapılan test sonucunda gruplarda elde edilen Alkale Fosfat aktivitesinin grafiği (*: p>0,05)	43
Şekil 4.5. Aa+ ve Aa- negatif olan test gruplarının alirazin kırmızı sonuçlarının grafiği (*,+,†:p>0,05)...	46

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Spektrofotometre cihazı (Varioscan flash, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD)	25
Resim 3.2. Flasklarda spektrofotometre cihazına yerleştirmek üzere hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki jelatin+MPP3 karışımları.....	25
Resim 3.3. Emdogain materyali (Emdogain, Straumann, Basel, İsveç).....	27
Resim 3.4. Elde edilen hücrelerin çalışma başlayıncaya kadar bekletildiği sıvı azot tankı (Biocane 34, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD).....	27
Resim 3.5. Su banyosu cihazı (Isolab banyo, ISOLAB GmbH, Eschau, Almanya	28
Resim 3.6. Çalışma süresince kullanılan santrifüj cihazı (NF 1200, Nüve, Ankara, Türkiye)	28
Resim 3.7. Çalışmada kullanılan fetal bovin serum (Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, Israel) ve penisilin streptomisin solüsyon karışımı (L002 Penisilin streptomycine solution 100X, Biowest, Nuaille, Fransa).....	29
Resim 3.8. DMEM solüsyonu (DMEM, PAN biotech, Aidenbach, Almanya) ve tripsin EDTA solüsyonu (Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, Israel).	30
Resim 3.9. Çalışma süresince hücrelerin içerisinde bekletildiği CO ₂ etüv cihazı (Galaxy 170S, New Brunswick, Eppendorf Inc., Connecticut, ABD).....	30
Resim 3.10. Çalışmada kullanılan ışık mikroskobu (Primo Vert, Zeiss, Oberkochen, Almanya)	31
Resim 3.11. Çalışma için hazırlanan %3'lük jelatin ve %3'lük jelatin 0.4mM MPP3 karışımlarının görüntüsü.	32
Resim 3.12. Otomatik hücre sayım cihazı (TC 20 Automated cell counter, Bio-rad, California, ABD).....	33
Resim 3.13. Çalışmada kullanılan XTT kiti (Cell proliferation kit, Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, İsrail).	34
Resim 3.14. Çalışmada kullanılan AF kiti (Sensolyte Assay Kit, Anaspec ATC group, California, ABD).....	35

Resim	Sayfa
Resim 3.15. Orbital alkalayıcı cihazı (Rocking platform, VWR, Pensilvanya, ABD).....	36
Resim 3.16. Vakum kaplama cihazı (Leica EM ACE200, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Almanya) ve SEM görüntüleme cihazı (Hitachi SU5000, Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japonya).....	38
Resim 3.17. İmmunfloresans görüntüleme amacı ile kullanılan FAK100 (Actin Cytoskeleton/Focal Adhesion Staining Kit, Sigma-Aldrich, Missouri, ABD).....	39
Resim 3.18. İmmunfloresans boyama için kullanılan ışık mikroskobu (CKX 41, Olympus, Tokyo, Japonya)	40
Resim 4.1. Askorbik asit ile muamele edilmeyen hücrelerin Alizarin kırmızı boyaması sonucundaki görüntüleri (üst sütun) ve 200x büyütme altındaki görüntüleri (alt sütun)	45
Resim 4.2. Askorbik asit ilave edilmiş ve edilmemiş olan gruplar arasındaki Alizarin Kırmızı sonrası boyanma farkı.....	45
Resim 4.3. Kontrol grubundaki 200x ve 1000x büyütme.....	47
Resim 4.4. Jelatin grubundaki 200x ve 1000x büyütme.....	48
Resim 4.5. Emdogain grubundaki 200x ve 1000x büyütme.....	48
Resim 4.6. Jelatin-MMP3 grubundaki 200x ve 1000x büyütme.....	48
Resim 4.7. Jelatin grubunun immunofloresans görüntülenmesi	49
Resim 4.8. EMD grubunun immunofloresans görüntülenmesi	50
Resim 4.9. Jelatin+MPP3 grubunun immunofloresans görüntülenmesi	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
A	Alanin
Aa	Askorbik asit
ADP5	Amelogenin Türevi Peptit-5
AF	Alkalen Fosfataz
AK	Ataşman Kazancı
amgCP	Amelogenin C- terminal peptid
ANOVA	Analysis of Variance (Tek Yönlü Varyans Analizi)
ARS	Alizarin Red Staining (Alizarin Kırmızı Boyama)
BMP-2	Kemik Morfogenetik Protein-2
BMRP	Biyomineralizasyonla İlişkili Protein
C⁰	Santigrat derece
Ca⁺⁺	Kalsiyum
CPC	Cetylpyridinium Chloride
CPP-ACFP	Kazein Fosfopeptid-Amorf Calsiyum Fosfat
D	Aspartik Asit
DPP	Dentin Fosfoprotein
DSS	Aspartat-Serin-Serin
E	Glutamik
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EGF	Epidermal Growth Faktör-2
EMD	Emdogain
FBS	Fetal Sığır Serumumu
G	Glutamik Asit
GRAVY	Ortalama Hidrofobisite
HAB	Hidroksi Apatit Bağlayıcı

Kısaltmalar	Açıklama
HEK	Hertwing Epitelyal Kını
IGF	Insulin-like Growth Factor (İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü)
FGF	Fibroblast Growth Factor) (Fibroblast Büyüme Faktörü)
İDR	İndüklenmiş Doku Rejenerasyonu
K	Lizin
KMP	Kemik Morfogenetik Proteini
MC3T3-E1	Mause Calvarian 3t3-et (Çalışmada Kullanılan Fare Kökenli Hücre Dizsinin Kısaltması)
MERLAB	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
MMP	Mine Matriks Proteinleri
MMPT	Mine Matriks Protein Türevleri
MPP3	Mineralizasyon Teşvik Edici Peptit 3
MTA	Mineral Trioksit Agregat
NaF	Sodyum florür
NHANES	National Health and Examination Survey (Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi)
OD	Optik Yoğunluk
P	Prolin
PAMAM	Poli Amido Amin
PBF	Poliipeptid Büyüme Faktörü
PBS	Fosfat Tamponlu Solusyon
PGA	Propilen Glikol Aljinat
pl	İzoelektrik nokta
pNPP	Para Nitrofenil Fosfat
R	Arjinin
SD	Sondlama Derinliği
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi

Kısaltmalar**Açıklama**

TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü beta
TNF-α	Tümör Nekroze Edici Faktör-alfa
TZP	Trombositten Zengin Plazma
XTT	Tetrazolium Salt Testi
YDR	Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu



1. GİRİŞ

Periodontitis, periodontal patojenik mikroorganizmalara karşı periodontal dokuların inflamatuvar cevabı ile karakterize, multi faktöryel ve kronik bir hastalıktır [1]. Herhangi bir dental müdahale yapılmadığı koşullarda bakteri kökenli enflamasyon periodontal ligament, alveoler kemik, sement ve dişeti boyunca yayılarak bu dokuları tahrip eder [2]. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi (the United States National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)) çalışmalarına göre erişkinlerde 3mm'den fazla klinik ataçman kaybı toplumun %53.1'inde görülebilmektedir [3]. Çoğu gelişmiş ülkelerde koruyucu sağlık sistemi uygulamaları ile gerek suların florlanması gerekse de erken yaşlarda lokal florid uygulamaları sayesinde çürük insidansında olumlu ilerlemeler kaydedilmiştir [4–6]. Ancak periodontal hastalıklara karşı çürüğe karşı olduğu gibi etkili ve kabul edilebilir bir tedavi henüz ortaya konmamıştır [7]. Wang ve arkadaşlarının verilerine göre periodontitis dünya üzerinde 743 milyon insanda tespit edilmiştir [8]. Dünya üzerindeki en yaygın altıncı kronik hastalıktır. Son zamanlarda periodontal hastalıkların sadece diş ve destek doku kayıplarına değil aynı zamanda çeşitli kronik rahatsızlıklara da sebebiyet verdiği ortaya çıkarılmıştır. Bu rahatsızlıklar arasında kalp hastalıkları, diyabet, Alzheimer hastalığı, kronik böbrek yetmezliği, romatoid artrit sayılabilmektedir [9–12]. Bu nedenle periodontitis ciddi bir halk sağlığı problemidir ve sağlık bilimlerinin temel hedeflerinden biri bu hastalıkla mücadele ve bu hastalığın verdiği zararı geri yerine koyarak tedavi etmek olmalıdır.

Birçok çalışma periodontal hastalıkların cerrahi ve cerrahi olmayan yöntemlerle kontrol altına alınabildiğini göstermektedir [13–15]. Ancak yapılan tedavilerin çok az bir kısmı kaybedilen dokuların tekrar kazanılmasına yöneliktir. Geleneksel periodontitis tedavisinde iyi bir oral hijyen eğitimi, diş taşı temizliği ve kök yüzeyi düzeltilmesi yapıldıktan sonra eğer hala ihtiyaç varsa flap cerrahisi ile kök yüzeylerinin ulaşılabilirliği sağlanarak daha derin ve daha etkili bir temizlik yapılmasıdır. Bu yapılan müdahaleler ile hastalığın akut belirtileri sonlandırılır, hatta bağ dokusu invazyonu ile uzun bağlantı epiteli tarzında bir iyileşme elde edilebilir.

Fakat iyi bir periodontal tedavinin ana bileşenlerinin:

1. Hastalığa sebebiyet veren etiyolojik faktörlerin temizlenmesi,
2. Enflamasyonun ortamdan uzaklaştırılması,
3. Kaybedilen periodontal dokuların geri yerine konulması olduğu unutulmamalıdır [16]. Periodontal dokunun bileşenlerinin alveol kemik, periodontal ligament ve sementin kompleks yapısı nedeniyle tekrar rejenere edilmesinde güçlüklerle karşılaşılır. Bu nedenle daha ileri rejeneratif teknikler ve doku mühendisliği uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Son zamanlarda özellikle doku mühendisliğindeki ve tasarımıındaki gelişmelerle kaybedilen dokuların oluşması amacıyla embriyonun büyüme-gelişim dönemindeki mediatörlere benzer şekilde sentetik aminosit türevleri oluşturulabilmektedir. Bu sayede rejeneratif periodontal işlemlerde bu ajanların kullanılmasıyla daha iyi bir doku cevabı alınabileceği ön görülmektedir. Bu tez çalışmasında 14 aminoasitten oluşmuş amelogeninin mineralizan bölgesindeki amino asit dizilimlerinden köken alan bir sentetik ajanın (MPP3), amelogenin menşei olan Emdogain (EMD) ile osteoblast hücre kültürlerindeki etkilerinin kıyaslanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontolojide Rejeneratif Yaklaşımlar

Mikroorganizmalar ile konak arasındaki dengenin bozulması nedeniyle açığa çıkan periodontal hastalıklar öncelikle periodontal cep oluşumuna ve enflamasyonun uzaklaştırılamadığı veya devam ettiği koşullarda yakın alveol kemik yoğunluğunda azalmaya ve kemik yıkımının ortaya çıkmasına neden olurlar [17]. Kronik periodontitisli hastalarda ortaya çıkan alveol kemik kaybı zamanla açılı bir halde radyografik olarak tespit edilebilir bir hale gelir. Oluşan bu tip kemik içi defektler yapılan klinik muayene eşliğinde bir duvarlı defekt, iki duvarlı defekt veya üç duvarlı defekt olarak adlandırılır. Bu tip defektlerin tedavisinde klasik periodontal flep operasyonunun dışında kemik greftleri, yönlendirilmiş doku rejenerasyon tekniği (YDR), mine matriks proteinleri (enamel matrix derivative) (EMD) ve trombositten zengin plazma (TZP) gibi biyolojik mediyatörler, kemik morfogenetik proteini(KMP), polipeptid büyüme faktörü (PBF) tek başına veya kombine halde kullanılmaktadır [7].

Anlamli bir periodontal rejenerasyon meydana gelebilmesi için ortamda bulunan bağ doku hücrelerinin osteoblastlara ve sementoblastlara histodifferansiye olabilmesi ve kök yüzeyinde yeni sement, epitelyal ataçman ve yeni kemik dokusunun organize bir şekilde oluşması gerekmektedir [18–20]. Kısaca başarılı bir periodontal doku rekonstrüksiyonu için sement, alveol kemik ve periodontal ligament olmak üzere 3 farklı dokunun organize bir şekilde oluşması gereklidir. Bu nedenle periodontal rejenerasyon amacı ile 100 yıla yakın bir süredir çalışmalar devam etmektedir. Bilinen ilk periodontal rejeneratif tedavi 1923 yılında otojen bir kemik grefti kullanılarak yapılmıştır [21]. Böylelikle kemik materyallerin osteoindüktif, osteokondüktif ve osteojenik etkilerinden faydalanılmaya çalışılarak otojen kemiklerin yanısıra allojenik, zenojenik ve sentetik kemik kemik substratları kullanılmıştır [22]. Bu farklı kemik materyalleri ile çeşitli çalışmalar yapılmış ve otojenik kemik greftlerinin en iyi sonuçları vermeleri nedeniyle altın standart olarak kabul edilmişlerdir. Kemik greftlerinin tek başına kullanıldıkları zaman, klasik flep operasyonu ile karşılaştırıldıklarında gerek sondalama derinliğinde (SD) azalma,

gerekse de ataşman kazancı (AK) gibi parametrelerde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir [23–25]. Ancak yapılan histopatolojik incelemelerde ortaya çıkan iyileşme uzun bağlantı epiteli ile olmuş ve %60-65 kemik dolumu tespit edilmesine rağmen çoğu zaman rezidüel kemik defektlerinin kaldığı görülmüştür [26–29]. Gerçek bir periodontal rejenerasyon amacıyla YDR tekniği 1980’lerde şekillenmeye başlamıştır. YDR tekniğinde amaç temizlenen kök yüzeyi ile kaldırılan flep dokusu arasına bir bariyer yerleştirmek kaydı ile epitelyal ve bağ dokusu hücrelerinin yara bölgesine göçünü yavaşlatarak periodontal ligament hücrelerine ve osteoblastlara tam bir rejenerasyon oluşturabilmeleri için fırsat tanımaktır [30–34]. Bu strateji yara iyileşme bölgesine doğru gerçekleşen hücre göçünün bir membran vasıtası ile kontrol edilmesi sayesinde peridontolojide ciddi bir moment oluşturmuştur. Ancak tekniğin önemli faydalarının bulunmasının yanı sıra, flebin primer olarak kapatılmasındaki zorluk, membranın yumuşak dokudan ekspoz olmas ve buna bağlı yara bölgesine yerleştirilen kemik greftinin enfekte olması ihtimali ve operasyon sırasındaki uygulama zorlukları tekniğin ilerletilmesini gerektirmiştir. Tüm bu olumsuzluklarla beraber yara bölgesinde oluşan yeni sement dokusunun çoğunlukla hücreli tip olduğu ve dentinden kolaylıkla ayrılabilirdi ifade edilmiştir [35]–[38]. Sistemde ortaya çıkan dezavantajların elemine edilebilmesi amacıyla biyoaktif rejeneratif materyallerin ortaya çıkması 90’lara denk gelmektedir. Bu sistemlere bazı çalışmalarda araştırmacılar tarafından indüklenmiş doku rejenerasyonu (İDR) materyalleri denilmektedir [1,39–41]. Bu noktada biyoaktif moleküller olarak dişin embriyojenik büyüme-gelişim dönemindeki pek çok hücre grubunun (periodontal ligament hücreleri, kemik hücreleri, sementoblastlar), sistemik hormonların, büyüme faktörlerinin ve ekstraselüler matriks proteinlerinin fonksiyon göstermesi ve böylece doğru hücrelerin doğru bölgeye yönelip yerleşim göstermeleri ve hücresel çoğalma farklılaşma için uygun ortamı sağlayacak doğru matriksi salgılamaları çalışmacılara ışık tutmuştur [42–45]. Bu gelişmeye ilave olarak, kronik periodontal hastalıkların oluşumu ve gelişimi ile beraber yara iyileşmesi ile ilgili hücresel olayların aydınlatılması ve biyolojik mediyatörlerin ortaya çıkartılması ile rejeneratif periodontal tedavi için yeni teknikler öne çıkarak doku mühendisliğinin önemi artmıştır. Hastalık sonucu kaybedilen dokuların yeniden oluşturulması ve geliştirilmesini amaçlayan, hücre biyolojisini ve gelişimsel biyolojiyi temel alan, tıp ve mühendisliğin içi içe geçtiği bilim dalına ‘doku mühendisliği’ adı verilmiştir[30,46,47].

Doku mühendisliğindeki gelişmeler sayesinde embriyolojik gelişim döneminde periodontal ligament, sement ve kemik yapılarının oluşumu esnasında ortaya çıkan mediatörlerin tespit edilmesiyle ve bu mediatörlerin yara iyileşmesi sırasında doğru hücre gruplarının organize bir şekilde harekete geçirilmesinde kullanılma olasılığı, yeni biyolojik yaklaşımların rejeneratif tedavide kullanılmasına imkân sağlamaktadır [48,49]. Bu biyolojik rejeneratif modeli daha iyi açıklayabilmek için, diş ve çevresel dokuların embriyolojik dönemdeki gelişimlerinin bilinmesi önem taşımaktadır.

2.2. Dişin Embriyojenik Gelişimi

Diş gelişiminin ilk aşaması intrauterin hayatın 6. haftasında ektodermden mezoderme doğru bir epitel kalınlaşması olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yapının adı 'primer epitel bant' olarak geçmektedir. 7. haftadan itibaren ağız epiteli ektodermal hücreleri kapsayan lamina propriaya doğru bir girinti yapar. Bu girinti gelişimi esnasında ikiye ayrılır. Diş kısmında bulunan uzantıya vestibüler lamina denir ve dental lamina ile dudak ve yanak dokuları arasında ayırıcı bir epitel band oluşturur. İç kısımdaki uzantıya dental lamina denir ve diş germelerinin kökenini oluşturur [50].

Diş germeleri, diş tomurcuğu ve ektomezenkim olmak üzere iki bölümden meydana gelir. Diş tomurcuğu yoğun bir hücre üremesi siklusundan geçerek kısaca tomurcuk, takke ve çan safhaları adı verilen dönemlerden geçer. Bu noktadan itibaren mine organı, diş papillası ve diş folikülü ayrı ayrı gelişimlerini sürdürürler. Mine organının konkav yüzüne komşu olan mezenkim 'diş papilla'sını oluşturur. Çan organı ile birlikte, yine bağ dokusunun farklılaşmasıyla 'diş folikülü' meydana gelir ve böylece dişin sert ve yumuşak dokularını oluşturacak kısımların gelişimi tamamlanır [50,51].

Çan döneminin sonuna doğru iç ve dış mine epiteli meydana gelir. İç mine epitelinin konkav iç kısmında ise yoğun miktarda hücre göçü ve üremesi vardır. Çan döneminin sona ermesiyle birlikte iç mine epitel hücreleri histodifferansiye olarak mineyi oluşturacak ameloblastlara, bu hücrelerin karşısına denk gelen hattaki mezenkimal hücreler de mevcut ekto-mezenşim etkileşimiyle dentini

oluşturacak odontoblastlara dönüşür. Bu dönemi yoğun bir minerilizasyon süreci takip eder. Mine organının gelişimi tamamlasıyla birlikte iç ve dış mine epitelleri kronun servikal kısmında birleşerek sementin gelişimini sağlayacak şekilde yoğun hücresel aktivitelerine devam ederler. İç ve dış mine epitelinin birleşimiyle ortaya çıkan dokuya 'Hertwing epitelyal kını'(HEK) adı verilir [51].

HEK, dental papillanın mezenkimal hücrelerini indükleyerek, kök yüzeyini terk etmeden önce manto dentinin yapımını uyarmaktadır [52–54]. Dentin matriksi hücrelerinin dental folikül hücreleri ile teması sonucunda hücre-matriks ilişkisi oluşmakta ve oluşan odontoblastik tabakaya denk gelen yerdeki HEK yıkılarak açığa çıkan mezenkim hücreleri sementoblastlara differansiye olmaktadır. Yeni oluşan dentin yüzeyine sement depolanması başlamaktadır [53]. Dentinogenezde hücre-hücre ilişkisi, sementogenezde ise hücre-matriks ilişkisi gerçekleşmektedir.

Tüm bu olayların gelişimi esnasında doku mühendisliği bilimi salınan mediatörlerin büyük kısmını tespit etmiştir. Bu noktada mine matriks proteinleri (MMP), PBF, TGF ve Epidermal growth faktör-2 (EGF) gibi biyoaktif moleküller orijinal doku iyileşmesini taklit edebilme potansiyelleri nedeniyle ön plana çıkmışlardır [21].

Son zamanlarda yara bölgesine sadece kemik greftleri ve mediatörlerin ilavesinin yanı sıra histodifferansiasyon yeteneği olan mezenkimal kök hücrelerinin de ilavesi gündeme gelmiş ve bu konudaki çalışmalar da hız kazanarak ilerlemelerini devam ettirmektedirler.

2.3. Mine Matriks Protein Türevleri (MMPT)

Günümüzde moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ekstrasellular matriks elemanlarının periodontal rejenerasyondaki önemini ortaya çıkarmıştır. Özellikle mine matriks protein türevleri (MMPT) sementogeneziste önemli bir rol üstlenmektedir. MMPT'ler arasında amelogenin diğer MMPT'lere nazaran daha ön plana çıkmaktadır [55–57]. Bu nedenle kayba uğrayan periodontal dokuların rejenere edilmesi amacıyla kökün büyüme gelişim döneminde ortamda bulunan MMPT'lerinin kullanılması yaklaşımı öne çıkmıştır [58–61].

Bosshart [61] yaptığı in vitro çalışma ile kemik oluşumu esnasında MMPT'lerin kemotaksis stimülasyonu yaptığını, hücre proliferasyonu, adhezyon ve hücre canlılığını artırdığını, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, ekstrasellüler matriks yapılarının ve moleküllerinin salınımını aktive etme yolu ile etki ettiğini göstermiştir. Kemikiçi periodontal defektlerin tedavisinde MMPT'lerin kullanımının önü böylelikle açılmış oldu. MMPT'lerin bu amaçla kullanıldığı çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında periodontal rejenarasyonun daha iyi meydana geldiği tespit edilmiştir [62–67].

Ayrıca Esposito ve ark.ı [68] ve Koop ve ark.ı [69] yaptıkları iki ayrı sistematik derleme ile MMPT'lerin kemikiçi periodontal defektlerin tedavisinde geleneksel periodontal tedavilere nazaran daha iyi sonuçlar verdiğini ortaya koymuşlardır.

Mine matriks proteinlerinin yapısı incelendiğinde ana yapısını amelogeninlerin oluşturduğu görülür. Mine proteinlerinin %90'nı bu grup proteinden oluşturmaktadır [70–72]. Kalan %10'luk kısmı ise nonamelogeninlerden, yani enamelin ve ameloblastinden oluşmaktadır.

Amelogeninler ameloblastlar tarafından salgılanan, 5-45 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip hidrofobik proteinlerdir [73,74]. Bu proteinler özellikleri dolayısıyla fizyolojik PH ve vücut ısısında çözünmez haldedirler. Mine kristallerinin oryantasyonu, şekillenmesi ve uzamasında görev alırlar [75,76].

Nonamelogeninlerden olan ameloblastin ise mine oluşum yüzeylerinin yakınında bulunan, 65-70 kDa ağırlığındaki mine proteinleridir. Mine oluşumunda salgılama aşamasında faaliyet gösterdiği düşünülmektedir [76].

Bir diğer nonamelogenin ise enamelinlerdir. 125 kDa ağırlığında hidrofilik yapıdaki glukoproteindir. Amelogeninlere komşu şekilde mine prizmalarının göbeğinde bulunur. Kristallerin kolajen ağının oluşmasından ve biyomineralizasyonundan sorumlu oldukları düşünülmektedir [76].

2.3.1. Mine matriks protein türevlerinin kök oluşumuna etkisi

İlk olarak Slavkin [77] 1976 yılında yaptıkları çalışma ile MMPT'lerin kök oluşumunda rolleri olduğunu ifade etmişlerdir. Klasik kök oluşumu teorisine göre, kuron oluştuktan sonra dişin servikal kısmında birleşen iç ve dış mine epitel HEK'i oluşturarak ektomezenkimal dokulara doğru hücre proliferasyonuna devam ederler. Ektomezenşim dokudan HEK'nın indüklemesiyle histodifferansiasyon sonucu odontoblastlara dönüşen hücreler ilk odontoblastik tabakayı oluşturmalarıyla beraber komşuluğundaki HEK parçalanarak apikale doğru göçünü devam ettirir. HEK'nın parçalanmasıyla beraber odontoblastların karşısındaki hücreler sementoblastlara differansiye olarak sementoid tabakayı yığmaya başlarlar. HEK artıklarından kalan malessez epitel kalıntıları periodontal ligamenti oluşturacak olan fibroblastların dönüşümünü indüklerler [78].

MMPT'lerin çalışma prensibi ile ilgili hipotezler şu şekilde sıralanabilir:

1. Dental folikül hücrelerinin sementoblastlara differansiye olmasında MMPT'lerin etkisinin olduğu ifade edilmiştir. Bu amaçla maymunlarda yapılan çalışmalarda temiz dentin yüzeylerine uygulanan MMPT'lerin ilgili bölgede hücresiz sement, periodontal ligament ve alveol kemiği oluşturduğu gösterilmiştir [79].
2. Bir diğer hipotez ise klinikte yapılan kök yüzeyi düzleştirme işleminden sonra açığa çıkan dentin tabakasının üzerinde hücresiz sement tabakası oluşmasına dayanmaktadır. Bu teoriye göre ortamdaki dokudan salınan MMPT'ler bu etkiyi sağlamaktadırlar [62,79].

2.4. MMPT'den Emdogain® (EMD)

Yapılan incelemeler ve gelişmelerin ışığında Emdogain® (EMD) ticari adı ile bir ürün Biaro (Malmö, İsveç) firması tarafından bulundu. 01.04.2004 tarihinde ilgili firma Straumann Biyolojik Departmanı ile entegre oldu [68].

EMD anne karnında bulunan 6 aylık domuzların embriyolarının diş tomurcuklarından elde edilir. Domuz embriyosuna ait bol miktarda amelogenin içeren asidik ekstrenin saflaştırılmış halidir. EMD'nin yapısı incelendiğinde %90'ını

amelogenin, %10'unu prolinden zengin nonamelogenin, tuft proteini, tuftelin, serum, amelin, ameloblastin ve tükürük proteinleri oluşturur [71].

Maycock ve ark.ı [80] yaptıkları çalışma ile EMD'nin etkisinin içeriğindeki amelogenine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra dokudan metaloproteazların ve serin proteazların EMD varlığında aktive göstermesi nedeniyle, bu proteolitik aktivitenin rejenerasyona olumlu etki ettiğini ifade etmişlerdir.

EMD'nin fiziksel özellikleri incelendiğinde; dokudan elde edilip hazırlandığı aşamada liyofilize ve steril halde bulunmaktadır [81–83]. EMD içerdiği yüksek orandaki prolin nedeniyle 4°C sıcaklıkta translusent halde bulunurken, oda sıcaklığında opak bir materyal olarak gözükmemektedir [84].

İlk üretildiği zamanlarda EMD'nin üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda propilen glikol aljinat (PGA) ile karıştırılarak kullanılması gerekmekte idi. Daha sonraları zamandan kazanmak ve tedavi prosedürlerini basitleştirmek amacı ile kullanıma hazır EMD'ler piyasaya sürüldü. Brathall ve ark.ı [85] erişkin kronik periodontitisli hastalarda yaptıkları çalışmada, geleneksel klinikte karıştırılan EMD ile kullanıma hazır EMD arasında klinik başarı açısından bir fark bulmamışlardır.

Üretici firmanın tavsiye ettiği EMD için en ideal taşıyıcı solüsyon propilen glikol aljinat'dır (PGA). PGA, aljinik asidin propilen glikol esteri olup, kimya ve gıda endüstrisinde kıvam artırıcı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. PGA, düşük pH değerlerinde ve düşük ısıda visköz kıvamda iken, ısı yükseldiğinde ya da ortam asiditesi çeşitli doku sıvıları gibi etkenlerin varlığında arttığında hemen nötralize olmakta ve EMD'nin uygulanacağı alana yapışmasına olanak tanımaktadır [79,81]. PGA'nın bu özelliği sayesinde EMD jel solüsyondan serbestleşebilmekte, kök yüzeyi tarafından emilebilmekte ve cerrahi alanda çökelerek işlev görebilmektedir [59,79,86]. Tüm bunlara ilaveten EMD'nin periodontal patojenlerin üzerindeki antibakteriyel etkisini taşıyıcı olan PGA'ya bağlayan çalışmaların olması da ilginçtir [87–89]. Taşıyıcı PGA'nın 2 gün içinde ortamdan uzaklaştığı EMD'nin ise en az 2 hafta ortamda kaldığı belirtilmiştir [90].

EMD klinikte uygulanmadan önce uygulama yapılacak kök yüzeyinin asitle demineralize edilmesi gerekmektedir. Asit uygulaması ile smear tabakasının uzaklaştırılması, kök yüzeyinin detoksifikasyonu ve yüzey demineralizasyonu ile kolajen liflerin açığa çıkması sağlanmaktadır [81,82]. Ayrıca asit uygulanması sonucunda dentin veya sement yüzeyindeki kolajenlerin uzaklaştırılmasıyla ıslanabilirliği ve biyouyumluluğu artan bir yüzey elde edilmektedir [91], [92]. Ancak EMD uygulaması öncesi asit uygulanan ve uygulanmayan grupların kıyaslandığı bir çalışmada Sculean ve ark.ının [93] doku iyileşmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamaması bu konuda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

EMD'nin doku iyileşmesi esnasında bir avantajı da epitel hücrelerini baskılaması olarak gözükmemektedir. EMD klinik olarak uygulandığında mezenkimal hücreler tarafından çözünmez bir matriks oluşturur ve bu matriks ağız epiteline ait hücrelerin iyileşme bölgesine göçünü engellemektedir [94]. Bu sayede doğal gelişim süreci taklit edilerek yeni kemik, periodontal ligament ve sement oluşumu gerçekleşebilmektedir [53].

EMD'nin kemik gelişimi üzerindeki etkisi incelendiğinde; EMD'nin içeriğindeki KMP derivesi, bağ dokusundan ortama gelen farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin osteoblastlara dönüşümünü sağlar. Bu aktivite, KMP'leri kemiğin rejenerasyonu için açık bir aday yapar. TGF- β (Transforme edici büyüme faktörü beta), IGF (İnsulin- benzeri büyüme faktörü) ve FGF (Fibroblast büyüme faktörü) kemik içinde mevcut olan farklılaşmamış mezenşimal hücrelere etki göstererek osteoblastların bölünmesini indüklerler. Bu bağlamda ekstrasellüler matriks proteinlerinin salınımını artırır. Kemiğin kendi hücrelerini etkileyerek sınırlı da olsa rejeneratif kapasiteye ulaşmasına yardımcı olurlar. BMP'ler defekt alanına girecek ve kemik hücrelerine ve kırıkdağa farklılaşacak olan defekti çevreleyen yumuşak doku ve ilikteki progenitör hücrelere etki gösterecektir. Bu nedenle yumuşak dokuya da EMD uygulandığı zaman kemik rejenerasyonu gösterebilmektedir. Bazı hücre tiplerinde hücre bölünmesine yönelik etki olsa da bu moleküllerin asıl aktivitesi diferansiyasyondur. Mezenşimal öncü hücrelerin fenotipini olgun osteoblastlara ve kondroblastlara dönüştürebilirler. Aynı zamanda osteoblastik soydan gelen bazı hücre tipleri için kemotaktiktirler [61]. EMD'nin kemik içi defektlerde osseoz doku

rejenerasyonunu teşvik etme etkinliği üzerine yapılmış sistematik bir incelemede; EMD, yalnız başına ve membranlarla kombine olarak kullanılmıştır. Histomorfometrik analizlerle beraber toplam 20 in vivo çalışma değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre EMD tedavisi açık flep debridmanı ile kıyaslandığında bariz şekilde kemik rejenerasyonunu arttırmaktadır [95].

Günümüz klinik pratiğinde EMD sadece periodontal rejenerasyon amacı için değil aynı zamanda;

- implantolojide,
- avulse olmuş travmalı dişlerin tekrar sokete yerleştirilmesinden önce kök yüzeylerinin şartlandırılmasında,
- maksillofasiyal cerrahi işlemlerden sonra kronik ve akut cilt yaralanmalarının tedavisinde ve
- vital pulpa kaplaması gibi tedavilerde geniş kullanım alanı bulmuştur [96].

EMD domuz-kökenli bir materyal olması dolayısıyla insanlarda immün reaksiyon oluşturma potansiyeli olduğu düşünülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda tüm memeli hayvan türlerinde benzer şekilde çok az veya hiç antijenik etki göstermemiştir [97].

Tüm bu olumlu özelliklerine rağmen EMD rekombinant veya sentetik bir ürün olmayıp, fetal domuzların gelişim aşamasındaki mine matrisinden elde edilen hayvansal bir üründür. Bu ürün büyük oranda amelogenin içerse de içeriğinde gelişim aşamasında rol oynayan başka birçok proteini de içermektedir. Periodontal tedavilerde bu bileşenlerin her birinin gözlemlenen etkiye olan katkıları veya etki mekanizmaları tam olarak açıklanmamış durumdadır. EMD ile ilgili klinik standartların henüz oluşmamış olmasının yanı sıra, düşük gelirli hastalar açısından maliyetinin yüksek olması, vegan hastalar açısından hayvan kaynaklı bir ürün olması, bazı inançlar açısından domuz kaynaklı bir ürün olması gibi tercih edilmeme sebebi oluşturacak etkenler de mevcuttur. 6 aylık domuz fetüslerinden elde edilmeleri dolayısı ile hayvan hakları savunucusu sivil toplum kuruluşlarının da tepkisini çekmektedir.

2.5. Biyomimetik Peptitler ile Mineralizasyon

Mineralizan peptitler; genel olarak *in vitro* çözelti ortamında veya kültüre edilmiş hücrelerde kalsiyum fosfat mineral oluşum kinetiğini artıran peptitler olarak tarif edilebilirler. Mineralizan peptitler, mineral oluşumunu çekirdeklenme ve/veya kristal büyüme süreçlerini hücre varlığından bağımsız olarak kinetik veya termodinamik etkilerle hızlandırarak etki ederler. Bazı mineralizan peptitlerin hücrelerin osteojenik yollarını aktive eden sinyal molekülleri gibi de davranabildikleri gösterilmiştir. Dolayısıyla rekombinant veya sentetik mineralizan peptitler, diş hekimliği alanında terapötik ajanlar olarak potansiyel vadetmektedir. Bu peptitler, diş hekimliğinde hâlihazırda kullanılmakta olan Emdogain ve BMP-2 gibi diğer protein tabanlı ajanlara göre daha düşük moleküler ağırlıkta olduklarından, raf veya *in vivo* stabiliteleri daha yüksektir. Aynı sebeple, immünojenik aktiviteleri ve üretim maliyetleri daha düşüktür.

Periodontal rejeneratif tedavilerin hedeflerinden biri de osteogenezin sağlanmasıdır. Oluşan kemiğin iyileşme süresini kısaltmak ve daha kaliteli bir kemik oluşumunu sağlamak amacıyla biyolojik ajanların kullanıldığı çeşitli çalışmalar yapılmıştır [98,99]. Doğal peptitlerden türetilen osteoindüktif özelliklere sahip peptitler gibi biyomoleküllerin kullanımının, yönlendirilmiş kemik onarımı için faydalı olduğu öne sürülmüştür. Kemik oluşumu, inorganik fazın kristalleşmesini yönlendiren kollajen olmayan proteinler tarafından düzenlendiğine inanılan yüksek düzeyde koordineli ve karmaşık süreçleri içerir [100–102]. Kemik rejenarasyonunda kullanılan peptidler iki ayrı sınıfta incelenebilir. Bunlardan biri kemik morfogenetik proteinlerinden köken alan ve büyüme faktörleri ve peptidlerden oluşan kemik oluşumunu tek yönlü regule eden ajanlardır [103–105]. Kemik morfogenetik peptidler (BMP-7 ve BMP-2'den türetilen peptidler), osteojenik büyüme faktörü, trombin-ilişkili peptidler ve fibroblast büyüme faktörü bu tiplere örnek verilebilir [106–109]. Diğer peptit dizileri, biyomimetik osteogenezi teşvik etmek için moleküler düzeyde şablonlanmış mineralizasyonun meydana gelebileceği bir koşul sağlar [110,111]. Hidroksil apatit bağlayıcı(HAB) peptidler pozitif şarjlı Ca^{++} iyonları için bağlanabilecekleri bir ara yüz oluşturarak doku mineralizasyonunu hızlandıran bir yapı oluşturabilirler [112-114].

Biyomineralizasyonla ilgili birçok protein (BMRP) tanımlanmıştır [115]. Tanımlanan BMRP'ler, mineralizasyonla ilişkili hastalıkların fizyopatolojisinin anlaşılmasına, aynı zamanda bu hastalıkların tedavileri için yenilikçi yaklaşımlara yol açmışlardır. Bununla birlikte, bu proteinlerin klinik kullanımı; maliyetlerinin yüksek oluşu ve karmaşık tanımlama, saflaştırma, üretim süreçlerine sahip olmaları nedeniyle sınırlı olmaktadır [116,117]. Bu nedenle; izole edilmiş veya rekombinant BMRP'lere düşük maliyetli alternatifler olarak, işlevlerini taklit edebilen sentetik yollarla elde edilebilen peptitler gündeme gelmiştir [118].

Mineralizan peptitler kombinatoriyal biyolojik yöntemler, biyoinformatik tasarım, rasyonel tasarım gibi yöntemlerle *de novo* olarak üretilbildikleri gibi biyomineralizasyon süreçlerinde rol oynadığı bilinen proteinlerin bünyesindeki küçük fonksiyonel bölgelerin (domain) tespit edilmesi ile de elde edilebilirler.

Mineralizan peptitler, başlangıç çürük lezyonlarının remineralizasyonunda ve geliştirilmiş osteointegrasyon gibi dental ve ortopedik uygulamalarda klinik olarak kullanılabilir ajanlardır.

Bilindiği üzere dişin oluşumu esnasında öncelikle odontoblastik ve ameloblastik hücrelerden salınan yüksek amelogenin içerikli enzim minerilizasyon için iskelet yapı oluşturacak organize bir kolajen ağ oluşturmakta daha sonra bu eşsiz organize yapı hidroksil apatitlere bağlanarak mineralize olmaktadır. Flor ve benzeri remineralizasyon ajanları mevcut elde kalan demineralize hidroksil apatitlere bağlanarak o bölgelerde fluoroapatid denilen daha dayanıklı bir yapı oluşturabilmektedir. Ancak ortama flor gibi minarellerin ilavesi yıkılan kolajen yapıların boşluklarını doldurabilmekte, o bölgelerde yeni ve organize kolajen oluşumunu teşvik edememektedir. Doku mühendisliğindeki kaydedilen ilerlemeler sayesinde biyomineralizasyon ile rejenerasyon sağlayabilecek biyomimetik yöntemler son zamanlarda ön plana çıkmaktadır [119,120]. Hatta elde edilen ilerlemeler sayesinde çürüklerin önlenmesi ve başlangıç mine çürüğü varlığında demineralizasyonun ilerlemesini önlemenin yanı sıra tükürüğün doğal remineralizasyon sürecine etkisi kullanılarak yüzey altı çürük lezyonu içindeki tüm hidroksiapatit kristallerinin rejenerasyonu hedeflenmektedir [119].

Biyomimetik yaklaşımda, geleneksel remineralizasyon ajanlarından farklı olarak yüzey altı çürük lezyonlarına diffüze olabilen moleküllerin, hidroksiapatit oluşumunu yönlendirebilecek bir iskelet yapı oluşturması sağlanmaktadır. Diş yüzeyinde iyonların çökmesine olanak veren bu iskelet yapı yoluyla mineral depozisyonu olmaktadır. Bu iskelet yapının oluşumu için amelogenin yapı taşı olan peptitlerin kullanılması, mine matriks yüzey özelliklerine sahip iskelet yapısını bünyesinde barındıran ve kendiliğinden birleşen sentetik peptitler kullanılması, dentin fosfoprotein türevi 8DSS peptitlerin kullanılması ve poli amido amin dendrimerlerin kullanılması şeklinde farklı yaklaşımlar mevcuttur [121,122].

2.5.1. Sentetik amelogenin

Minenin mineralizasyonu sırasında hidroksiapatit kristallerinin düzenini sağlamada rol oynamaktır [123]. Sentetik amelogenin esaslı sistemlerin mine yapısını çoğaltabildiği düşünülmektedir. Yapılan iki çalışmada; rekombinant domuz amelogeninin, mine kristallerinin büyümesini teşvik ettiği, kalsiyum fosfat kümelerini stabilize ettiği bulunmuştur. Sentetik amelogeninin elde edilmesi ve depolanması konusundaki zorluklar, teşvik ettiği mine tabakasının büyümesinin uzun zaman alması gibi dezavantajlarının bulunması sebebiyle klinik kullanımı uygun bulunmamıştır [123,124].

2.5.2. Poli amido amin dendrimerler

Poli amido amin (PAMAM) dendrimerler amelogenin esaslı çok dallı polimerlerdir [125]. Mineralizasyonu sağlamada organik matrikslerin fonksiyonlarını taklit edebildikleri için “yapay proteinler” olarak isimlendirilmektedirler. Birçok in vitro çalışmada, PAMAM dendrimerlerin minenin kristal yapılarına katılabildiği, oluşan yeni kristallerin, sağlıklı mine ile aynı yapı, dizilim ve mineral faza sahip olduğu gösterilmiştir [126,127].

Amelogeninin uygulanmasındaki bazı zorluklardan dolayı sentetik PAMAM dendrimerlerin amelogenin analogu olarak remineralizasyonda kullanılabileceği düşünülse de yapılan çalışmaların sınırlı olması, mineralizasyon sürecinin zaman

alıcı olması gibi dezavantajlarından dolayı klinik uygulamaları pratik bulunmamaktadır.

2.5.3. Dentin fosfoprotein türevi 8DSS peptidler

Dentin fosfoprotein (DPP); dentinin kollajen olmayan, diş mineralizasyonunda rol alan ekstraselüler bileşenidir. Mineralizasyonu arttırmada en etkili DPP türevinin, tekrarlayan aspartat-serin-serin(DSS) nükleotit dizisi içeren 8DSS peptidi olduğu bildirilmiştir [128]. 8DSS peptidi demineralize dentinden kalsiyum ve fosfat çözünmesini sınırlayarak, remineralizasyon sağlamak için bu iyonların yakalanmasını teşvik eder. Hidroksiapatit yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanma özelliğine sahiptir [126,127]. Yapılan bir çalışmada, biyomimetik 8DSS peptidinin demineralizasyonu engellemesinin yanı sıra florürün etkisini de arttırdığı belirtilmiştir. Bu olumlu etkileşim, küçük çocuklarda çürüğün önlenmesi için kullanılan florür konsantrasyonunu azaltması nedeniyle önem teşkil etmektedir [129]. Bugüne kadar, 8DSS peptidinin çalışmalarının sadece in vitro olması, bu peptitlerin oral kavitede enzimatik etkiye dirençli olup olmayacağının bilinmemesi gibi dezavantajları mevcuttur. Diğer dezavantajı ise; kalsiyuma güçlü bağlanmaları nedeniyle diş taşı oluşturma risklerinin bulunmasıdır. Yapılacak olan in vivo çalışmalar ile desteklenebilirse, umut vaad eden bir remineralizasyon ajanı olması muhtemeldir [127].

2.5.4. Kendiliğinden birleşen peptitler

Kendiliğinden birleşen peptitler; belirli çevresel başlatıcılara cevap olarak iyi karakterize edilmiş, ekstraselüler matriks yapısında var olan molekülleri taklit eden, üç boyutlu fibril yapı iskeletleri meydana getirmektedir. Oluşan bu iskelet yapı, doku rejenerasyonunu sağlamada hidroksiapatit için bir çekirdek görevi görmektedir [118,122,130]. Diş sert dokuları üzerinde, geleneksel remineralizasyon ajanlarından farklı olarak; zamanla minerallerin çökmesini sağlayan bir iskelet oluşturan ve mineralin kendisini yeniden oluşturarak doğal onarımı gerçekleştirme gibi ek bir avantaja sahip olan bu peptitler, artan mineral kazancı ve mineral kaybının inhibisyonunun birleşik etkisine bağlı olarak net

mineral kazanımını önemli ölçüde artırmış olduğundan remineralizasyonda kullanılmaktadır [130].

p11-4; 11 aminoasitli, remineralizasyon için kullanılan sentetik, kendiliğinden birleşen bir peptittir. p11-4 yan zincirlerinin anyonik (negatif) grupları, Ca^{++} iyonlarını çekerek HAP kristallerinin çökmesini uyarmakta ve böylece tükürük kaynaklı doğal remineralizasyonu artırıcı etki göstermektedir [122,131]. Düşük viskoziteli monomerik P11-4 kullanılarak yapılan bir in vivo çalışmada başlangıç çürük lezyonlarına infiltrasyonunun, lezyon içinde tetiklenen kendi kendine birleşmeye neden olduğu, lezyon içinde difüzyona bir bariyer sağlayarak çürüğün ilerlemesini durdurduğu ve yerinde mineral birikimini indükleyerek normal histogenezi tekrarlayabilen bir yüzey altı biyoaktif yapı iskeleti oluşturduğu bulunmuştur [130]. Yapılan çalışmalarda; P11-4'ün lezyon gövdesinde var olmasının hidroksiapatit oluşumunu hızlandırdığı ve düzenli teğetsel kristaller oluşturması sebebiyle yüzey altı lezyonunun mikrosertliğini artırdığı; florürün remineralize etme etkinliğine bile direnç gösteren başlangıç okluzal ve proksimal lezyonlar üzerinde de etkin olduğu gösterilmiştir [120,132,133]. Yapılan bir çalışmanın sonucuna göre; kendiliğinden birleşen peptitlerin flor ile beraber kullanımının; uygulaması kolay, düşük maliyetli bir koruyucu yaklaşım olarak tercih edilebileceği gündeme gelmiştir [132]. Ayrıca yapılan bir diğer çalışmada; p11-4 peptidi, sodyum florür (NaF) ve kazein fosfopeptid-amorf calsiyum fosfat (CPP-ACFP)'ın remineralizasyona etkileri değerlendirilmiş ve p11-4'te en başarılı sonuçlar bulunmuştur [134]. Yapılan çalışmalarda biyomimetik mineralizasyon ajanı olarak umut vaad etmesine rağmen; uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.5.5. Mineralizasyon teşvik edici peptit 3 (MPP3)

Prensipte, kısa peptitler laboratuvar ölçeğinde protein saflaştırması için mükemmel ligandlardır. Zengin ve çeşitli işlevsellik sunarlar, peptit sentezi yöntemleri iyi kurulmuş ve hızlıdır, öte yandan afinite ortamının üretimde olduğu kadar uzun süre dayanması beklenmediğinden proteolize ve alkaliye karşı direnç çok büyük bir sorun değildir; küçük kolonların sterilizasyonu ve depolanması da daha kolaydır [135]. Mineralizan peptitler kombinatoriyal biyolojik yöntemler, biyoinformatik tasarım, rasyonel tasarım gibi yöntemlerle de novo olarak üretilibildikleri gibi

biyomineralizasyon süreçlerinde rol oynadığı bilinen proteinlerin bünyesindeki küçük fonksiyonel bölgelerin (domain) tespit edilmesi ile de elde edilebilirler [135-137]. Amelogeninin remineralizyon mekanizması üzerine olan etkisi göz önüne alınarak amelogenin bünyesinde de izole edilebilecek fonksiyonel bölgeler olabileceği düşünülmüştür. Amelogeninin karboksil ucuna yakın bulunan ve lösinden zengin 59 amino asitlik bir bölgenin, HAP kristallerine bağlanma ve mineral oluşum kinetiğini hızlandırmada rolü olduğu gösterilmiştir [138,139]. Benzer şekilde tirozinden zengin 44 amino asitlik bir bölgenin benzer görevleri olduğu gösterilmiştir [140]. Bu bölgeler amelogeninin tamamına kıyasla daha küçük peptitler olsa da ekonomik bir terapötik ajan üretimi için görece uzun bölgelerdir. Bunlara alternatif olarak, kombinasyonel biyoloji ve biyoinformatik yöntemleri kullanılarak amelogenin bünyesinde fonksiyonel olabilecek bölgeler taranmıştır. Bir çalışmada amelogeninin 22 amino asitlik bir bölgesinin tek başına sentezlendiğinde HAP mineral oluşum kinetiğini ciddi oranda artırdığı gözlemlenmiştir. Amelogenin türevi peptit-5 (ADP5) adı verilen bu peptitin in vitro ortamda dentin üzerinde sementomimetik (sement benzeri) tabaka oluşturduğu gösterilmiştir [118]. Daha güncel bir çalışmada, amelogeninde ve mineralizasyonda rol alan diğer çoğu proteinde gözlemlenen bitişik zıt yüklü amino asitlerin varlığından yola çıkılarak tasarlanan 14 amino asitlik daha kısa ve mineral oluşum kinetiğini ADP5'e göre daha fazla artıran bir peptit elde edilmiştir [141].

BMRP'ler, negatif yüklü asidik fragmanlar (aspartik asit, glutamik asit) bakımından zengindir ve bu bölgelerin kristaller üzerindeki kalsiyum bölgeleri veya çözünür kalsiyum iyonları ile etkileşiminin biyomineralizasyon için gerekli olduğu düşünülmüştür [142–144]. BMRP'lerin asidik peptit fragmanlarının, in vitro mineralizasyon süreçlerini düzenlediği gösterilmiştir [144,145]. Asidik yapı, az sayıda hidrofobik aminoasit varlığı ve yapısal istikrarsızlık, BMRP'lerin karakteristik özelliği olarak kabul edilmiştir [146].

BMRP'lerde ve iyon veya inorganik yüzey bağlayıcı peptitlerde bitişik zıt yüklü amino asitlerin varlığı ve önemi son zamanlarda dikkat çekmiştir. Güngörmüş ve ark.nın [141], farklı yapısal özelliklere ve farklı sayıda bitişik zıt yüklü aminoasitlere sahip peptitler tasarlayarak yapmış oldukları çalışmada; bitişik zıt yüklü aminoasitlerin sayısının artmasıyla daha hızlı mineral oluşumu ve daha yüksek

oranda mineralleşme sağlandığı belirtilmiştir. Bu çalışmada tanımlanan MPP3'ün mineralizasyon kinetiğini önemli ölçüde artırarak iğne benzeri HAP parçacıklarına yol açtığı gösterilmiş, bitişik zıt yüklü aminoasitlerin, çözünür iyonlar için elektrostatik çekim yaratarak, çekirdeklenmeyi teşvik etmesinin, gözlemlenen etkinin temeli olduğu tahmin edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda, MPP3 mineralize dokuların tedavisini içeren tıbbi uygulamalarda kullanılabilecek bir ajan olarak bildirilmiştir.

2.6. Hücre Kültürü Çalışmalarının Periodontolojideki Yeri

Sağlık alanında kullanılacak olan materyallere karşı canlının nasıl reaksiyon göstereceğinin önceden kestirilebilmesi önemlidir. Bu noktada tıbbi deneylerin direk canlılar üzerinde yapılması ciddi etik problemler oluşturmaktadır. O nedenle canlı ortamının laboratuvar ortamında odaksal ve küçük kopyalarının elde edilmesi amacıyla mikro sistemler oluşturulması için hücre kültürü tekniklerinden faydaniılmaktadır [147].

Hücre kültürü çalışmaları, bir dokudan doğal migrasyon, mekanik veya enzimatik parçalanma ile elde edilen hücreler kullanılarak oluşturulur. Başlıca 3 tip hücre kültürü vardır:

1. Organ kültürleri
2. Doku eksplant kültürleri
3. Hücre dizisi ile yapılan kültürler

Organ kültürü ortamları organların belli bir süre boyunca vücut dışında canlı kalmalarını sağlamaktadır.

Doku eksplant kültürleri ise doku parçacıklarının canlılıklarını in vitro koşullarda sağlamaya yönelik kültür ortamlarıdır.

Hücre dizisi ile yapılan kültürler sadece belli bir hücre tipinin in vitro koşullarda canlı kalmasını sağlamaktadırlar.

2.6.1. Hücre kültürlerinin avantajları ve dezavantajları

Avantajları

1. Hücre kültürü ortamında sıcaklık, pH, ozmotik basınç, O₂ ve CO₂ kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar kontrol altında tutulabildiğinden bir materyalin diğer materyallere nazaran etkisinin incelendiği çalışmalarda daha stabil ve daha standart ortamlarda kıyaslama yapabilmek mümkün olmaktadır. Canlı vücudunda stabil ve standart koşulları oluşturarak bir takım testleri yapmak çok daha zordur.
2. Doku örnekleri genellikle heterojendir. Ancak bir-iki pasajlamadan sonra kültüre edilmiş örnekler homojen hale gelmektedir. Hücrelerin homojenitesi elde edilen sonuçların ve ürünlerin homojenitesi açısından önemlidir.
3. Hücre kültürü ortamları ekonomiktir. Canlı bir organizmaya verilen bir maddenin bir kısmı çeşitli yollarla itrah edilecek, bir kısmı da immün sistem tarafından yıkılacaktır. Verilen maddenin ancak %10'u kadarı çalışma bölgesindeki dokulara ulaşır. Hücre kültürlerinde ise bu oran %90'lara kadar çıkabilmektedir.
4. Hücre kültürlerinin bir diğer avantajı ile ürün elde edilmesi amacıyla endüstriyel amaçlı kullanılmasıdır [147–150].

Dezavantajları

1. Primer hücre kültürü oluşturulurken birbirini takip eden pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve bir miktar hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bu durum bazı çalışmalarda istenen saflık ve miktarda hücre elde edilememesine neden olmaktadır.
2. Bu tip hücre kültürü çalışmalarının çok hassas olması nedeniyle hijyene çok dikkat edilmeli ve negatif basınçlı korumalı kabinler gibi özel ekipmanlarla çalışılması gerekmektedir.
3. İn vitro çalışma esnasında kültürlerin hazırlanması, incelenmesi ve ortam hijyenitesi hem uzmanlık hem de tecrübe gerekmektedir.
4. Hücre kültürlerinde kullanılan hücre üretme medyumları ve diğer malzemelerin pahalı olması nedeniyle bu tip çalışmalar ekonomik olarak masraflı çalışmalar sınıfına girmektedir. Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi ve ilerlemesi ile

kullanılan malzemeler de geliştirilerek daha ucuz malzemelere erişim imkanı olmaktadır [147,148,150].

2.6.2. Hücrelerin elde edilmesi

Hücre ayrımı, benzer karakterdeki hücrelerin birbirinden ayrılarak çalışma için hedeflenen tek tip hücre topluluğuna ulaşmak olarak tanımlanabilir. Bu amaçla histolojik kesitler ile dokular boyanmakta ve hücrelerin morfolojileri hakkında bilgi edinilmektedir. Hücreler boyanarak hücredeki özgül moleküller tespit edilerek daha ayrıntılı biyokimyasal incelemeler yapılabilmektedir. Hücre elde edebilmek için öncelikle doku parçalanarak homojen bir hücre topluluğu elde edilmektedir. Ancak bu homojenitede birden fazla hücre grubu bulunabilmektedir. O nedenle istenilen hücreyi elde edebilmek için özel ayırma yöntemleri uygulanır.

Kısaca hücre ayrımında iki basamaktan söz etmek mümkündür:

1. Dokuların parçalanması ve görünüş olarak homojen hücre suspansiyonlarının elde edilmesi.
2. Tek tip hücre elde edilmesi.

Hücre ayrımı aşamasında öncelikle istenen dokunun temiz bir şekilde ve diğer çevre dokulardan izole edilerek alınması gerekir. Alınan doku ne kadar saf olursa hedeflenen hücreye ulaşmak o kadar mümkün olmaktadır. Daha sonrasında elde edilen doku mekanik veya kimyasal yöntemlerle parçalanır [148,149].

2.6.3. Primer hücre kültür yöntemleri

Hücrelerin mekanik veya enzimatik yollarla dokudan ayrılmasına primer kültür yöntemi denir. Eğer doku laboratuvarda alınıp kullanılacaksa işlem basamaklarında bir problemle karşılaşmamaktadır. Ancak eğer doku farklı bir ortamda alınıp laboratuvara taşınacaksa, mümkün olduğunca kısa zaman içerisinde laboratuvara ulaştırılmalı ve hemen hücre ayrıştırma işlemlerine başlanılmalıdır. Alınan dokunun taşınması için genellikle dengeli tuz çözeltileri doku taşıma ortamı olarak kullanılmaktadır. Bu sayede dokunun 4-8 C⁰'de 1-2 gün sağ kalması sağlanabilmektedir. Ayrıca hücre kültür medyumları da bu iş için

güvenle kullanılabilir. Bu işlemlerde en önemli aşama dokunun alınma anından itibaren aseptik koşullarda çalışılması ve sterilizasyona azami dikkat edilmesidir [147–149].

2.6.4. Devamlı hücre kültürü dizini (Cell line)

Primer kültür elde dildikten sonra pasajlama ve alt kültür (subculture) elde edilme işlemlerine geçilir. Pasajlama oluşan, sayıları artan ve olgunlaşan hücrelerin bir kaptan başka bir kaba taşınma işlemidir. Bu işlemin ilk sebebi mevcut besi yerinde hücre yoğunluğunun artmasıdır. Hücre yoğunluğunun artması ile birlikte ortam PH'ı düşmekte, besin maddeleri azalmakta ve artık ürünlerin miktarı artmaktadır. Tüm bu olumsuzlukların üstesinden gelmek amacı ile hücreler ya daha büyük bir hacme alınmakta ya da dilue edilerek(sayıları azaltılarak) yeni bir kaba aktarılmaktadır. Böylelikle hücre yoğunluğu azaltılmaktadır. Bir yüzeye bağlı olarak üreyen ve incelenen hücrelerde yani monolayer kültürlerde pasajlama işlemi tripsinizasyon ile yapılmaktadır. Tripsinizasyon yapmak için; öncelikle kaba tutunmuş olan hücrelerin içinde bulunduğu medya dökülür ve medyanın hücreler üzerindeki etkisinin kaldırılması amacıyla kap bir iki kere serumla yıkanır. Ardından hücrelerin üzerine tripsin dökülerek hücrelerin kaptan ayrılması sağlanır. Bu işleme tripsinizasyon denilir. Hücreler kaptan serbestleştikten sonra ortama bir miktar serum veya serumlu medya ilave edilerek tripsinin etkisi durdurulur. Tripsine edilen hücreler içindeki bulundukları sıvıyla beraber santrifüj cihazına alınarak hücrelerin alt tarafta tripsinli sıvısının üst katmanda ayrılması sağlanır. Sonrasında hücreler medyum ile süspanse edilerek yeni bir kültür kabında enkübe edilir [147–149].

Herhangi bir materyal doku veya doku sıvılarıyla temasa geçtiğinde materyal ve biyolojik çevre arasında çeşitli etkileşimler meydana gelmektedir. Biyolojik ortamda herhangi bir yan etkisi bulunmayan materyaller biyoyumlu olarak kabul edilmektedir. Materyalin biyoyumluluğunun olmadığı koşullarda çeşitli nöral ve deri lezyonları gelişebilmektedir. Bu noktada hücre kültürü çalışmaları dış hekimliğinde yeni bulunan ve deneme aşamasında olan biyomateriyallerin biyoyumluluğu hakkında ön bilgi verebilmesi açısından oldukça değerlidir [151].

2.7. Kemik Hücreleri

Kemik oluşumu esnasında hem apozisyon hem de rezorbsiyon olayları bir arada gerçekleşerek bu dokunun yapılanmasında ve şekillenmesinde görev almaktadır.

Bu amaçla iki hücre tipi ön plana çıkmaktadır:

1. Osteojenik hücreler (kemiği oluşturan hücreler)
2. Osteoklastik hücreler (kemiği rezorbe eden hücreler)

Osteojenik hücreler preosteoblastlar (osteojenik progenitör hücreler), osteoblastlar ve osteositlerden oluşan hücre grubudur [150].

2.7.1. Osteoblast hücreleri

Kolajen ve kolajen olmayan kemik matriksini salgılayan tek hücreli yapılardır. Bu matrikste öncelikle bol kolajenden oluşan henüz kalsifiye olmamış osteoid yapılar oluşur. Daha sonra bu yapılara kemiğin apatit kristalleri depolanır ve yoğunlaşır [150].

Post mitotik hücreler olarak tanımlanmalarına rağmen prenatal gelişme sürecinde ve postnatal büyüme döneminde osteoblastlar ve preosteoblastlar mitoz bölünme gösterebilirler. Bu hücrelerin yüzey membranlarında yüksek oranda alkalen fosfataz (AF) aktivitesi gözlemlenir. AF enzimi kemik mineral kristallerinin progresiv büyümesinde rol alır ve hücre kültürü deney şartlarında AF aktivitesinin tespiti dokunun nmineralizasyon açısından değerlendirilmesine olanak sağlar [150].

Osteoblastlar aktif haldeyken kübik hücrelerdir ve ortamda yeni salgılanmış osteoid doku (organik matriks) içerisinde bulunurlar. Bu matriks osteoblastlar tarafından salınmaktadır ve majör elemanları tip I ve tip V kolajenlerle birlikte protein-karbonhidrat karışımı bir amorf maddedir. Osteoblastlarda protein ve glikoprotein sentezi yüksek seviyededir ve golgi aygıtı çok gelişmiştir. Osteoid matriksin içinde mineralizasyon odakları ve kolajen olmayan (kemik sialoprotein ve osteopontin gibi) proteinler de görülmektedir [50], [150].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

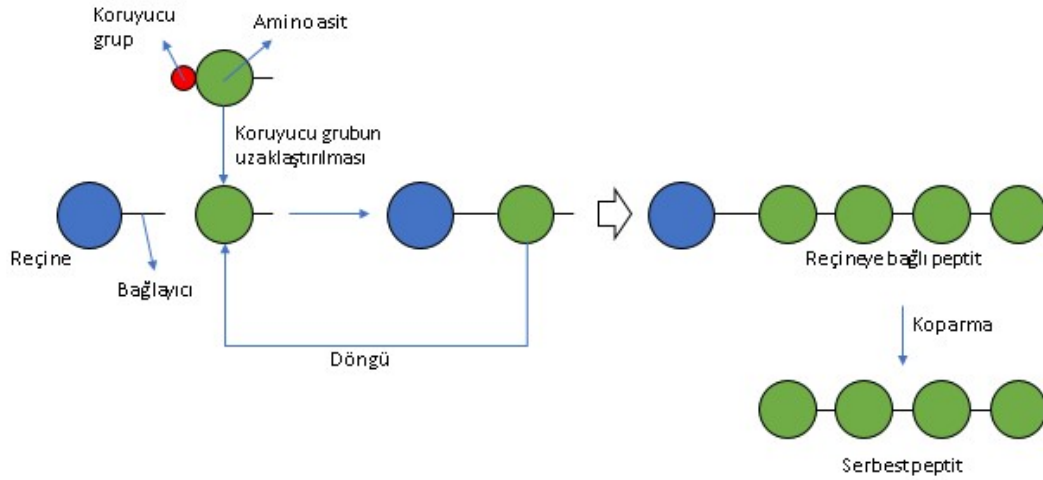
3.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller

3.1.1. Mineralizan peptidler

Tez çalışmasında kullanılan mineralizan peptid; mine matriks proteinlerinin en önemlilerinden biri olan amelogenin'den köken almıştır. İlk önce faj gösterim yöntemiyle hidroksiapatit mineraline bağlanan peptidler seçilmiş, bu peptidler bir bilgisayar algoritması ile amelogenin'in amino asit dizisi ile karşılaştırılmış ve hidroksiapatit mineralinin oluşum kinetiğini artıran 22 amino asitlik bir amelogenin türevi peptid tespit edilmiştir. Daha sonrasında Gungormus ve ark.ı [118] tarafından bu peptid optimize edilerek 14 amino asit uzunluğunda, hidroksiapatit mineral oluşumunu hızlandıran, sitotoksikite, sensitizasyon veya irritasyona neden olmadığı akredite laboratuvarlar tarafından gösterilmiş olan mineralizan peptid elde edilmiştir (Çizelge 3.1). Çalışmada bu peptid kullanılmıştır. İlgili peptidin sentetik yollar kullanılarak bilgisayar destekli matematiksel modellerle tasarlanması şekil 3.1'de şematize edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan amino asit dizisi MPP3'ün fizikokimyasal özellikleri (pI: izoelektrik nokta, GRAVY: Ortalama hidrofobisite, mavi: negatif yük, kırmızı: pozitif yük) (P: Prolin, G: Glisin, E: Glutamik asit, K: Lizin, A: Alanin, D: Aspartik asit, R: Arjinin)

Amino asit dizisi	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlığı	pI	GRAVY	Yük
PGEKADRAEKADRA	14	1513.63	6.63	-1.829	0 (+4, -4)



Şekil 3.1. MPP3 peptidinin elde edilmesinin şematik gösterimi

Ancak peptidin solüsyon halinde olması ve kıyaslama için kullanılacak olan Emdogain materyalinin jel olması nedeniyle ve ileride kullanılması düşünülen klinik koşulları için yavaş salınım preparatı şeklinde jel olarak elde edilmesinin daha uygun olacağına karar verilmiştir. Mineralizan peptid solüsyonunun jel kıvamına getirilebilmesi için Doğa İlaç firmasından %100 organik yenilebilir sığır jelatini (Yenilebilir toz jelatin, Doğa ilaç, İstanbul, Türkiye) toz halinde getirtilmiştir (Ek 1). Yavaş salınım materyalinin jel kıvamının tespiti amacıyla %1, %2, %3, %4, %5 ve %6'lık jel solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan jellerin 24 saat süresince kıvamını bulması beklenmiş ve %3'lük jelin çalışmada kıyaslama amacı ile kullanılacak olan Emdogain (Straumann, İsviçre) malzemesine en yakın kıvamda olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle %3'lük jel kıvamının çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir.

Materyalin elde edilmesinin ikinci aşamasında hem kullanılması gereken peptid miktarının konsantrasyonunu belirlemek, hem de hazırlanan jelin içerisinde peptid serbestleşebiliyor mu (salınabiliyor mu) yoksa jelin içerisinde hapis mi kalıyor tespit etmek amacı ile farklı konsantrasyonlarda jelatin+MPP3 hazırlanarak hazırlanan numunelerden alınan sıvılardaki peptid konsantrasyonları spektrofotometre cihazında (Varioscan flash, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) incelendi (Resim 3.1).



Resim 3.1. Spektrofotometre cihazı (Varioscan flash, Thermo Scientific, MA, ABD)

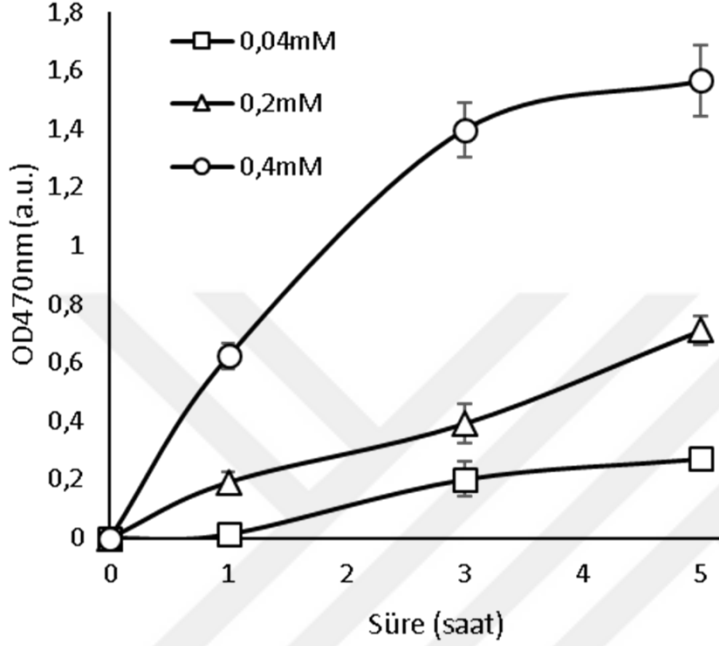
Bu amaçla 0.04mM, 0.2mM ve 0.4mM'lık konsantrasyonlardaki jelatin karışımlar hazırlandı (Resim 3.2). Elde edilen jel karışımların ne kadar mineralizasyon oluşturduğunu gözlemlemek için jel karışımlar etüv içerisinde 37°C ısı ve %100 nemli ortamda kalsiyum fosfat tamponlu solüsyonda bekletildi.



Resim 3.2.Flasklarda spektrofotometre cihazına yerleştirmek üzere hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki jelatin+MPP3 karışımları

Bekleme süresi boyunca 1., 3. ve 5. saat ölçümleri spektrofotometre cihazında yapıldı (Çizelge 3.2). Tabloda görüldüğü üzere 5. saatin sonunda 0.4mM

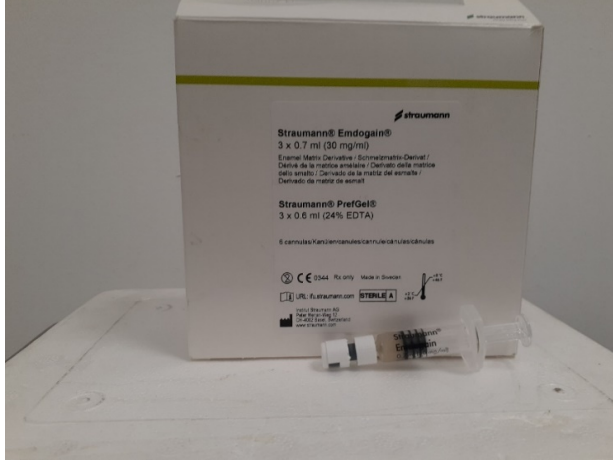
konsantrasyondaki eğrinin düzleşmeye başlaması, bu konsantrasyonun minimum sürede maksimum ve efektif pik değerine ulaştığını göstermektedir. Bu nedenle tez çalışılması için 0.4mM peptid içeren %3'lük jelatin konsantrasyonunda karar kılındı.



Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda spektrofotometre cihazında değerlendirilen jelatin+MPP3 karışımlarının sonuçları

3.1.2. Emdogain (EMD)

Emdogain® (Emdogain, Straumann, Basel, İsveç), Straumann tarafından üretilen taşıyıcı solüsyonu PGA olan, enjektör içinde visköz formda bulunan bir mine matriks türevidir (Resim 3.3). Mine matriks proteinleri, domuzların 3. büyük azı dişlerinin mine salgılanma aşamasında %10 asetik asit kullanılarak demineralize edilmesi sonrasında elde edilmektedirler. 3. büyük azı dişlerinde salgılama aşaması sırasında yüksek miktarlarda matriks bulunması, mine matriks proteinlerinin bu dişlerden elde edilmesinde tercih nedenidir. EMD'in mevcut tez çalışmasında kontrol grubu olarak seçilmesinin nedeni kökeni ve etki mekanizması bakımından mineralizan peptide en yakın ticari ürün olmasıdır. EMD'in başlıca bileşeni, çalışmada kullanılan mineralizan peptidin de türetildiği amelogenin'dir. Ayrıca uygulama yöntemleri de elde ettiğimiz jel peptid karışımı ile aynıdır.



Resim 3.3. Emdogain materyali (Emdogain, Straumann, Basel, İsveç)

3.2. Tez Çalışması İçin Kullanılan Hücrelerin Elde Edilmesi

Çalışmada Türkiye Şap Enstitüsü Kurumu'ndan temin edilen (American Type Cell Collection, ATCC) CRL-2593den MC3T3-E1 fare preosteoblast hücreleri kullanıldı. Çalışma Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MERLAB) yapıldı. Çalışmaya başlayıncaya kadar temin edilen hücreler sıvı azot tankı (Biocane 34, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) içerisinde muhafaza edildi (Resim 3.4).

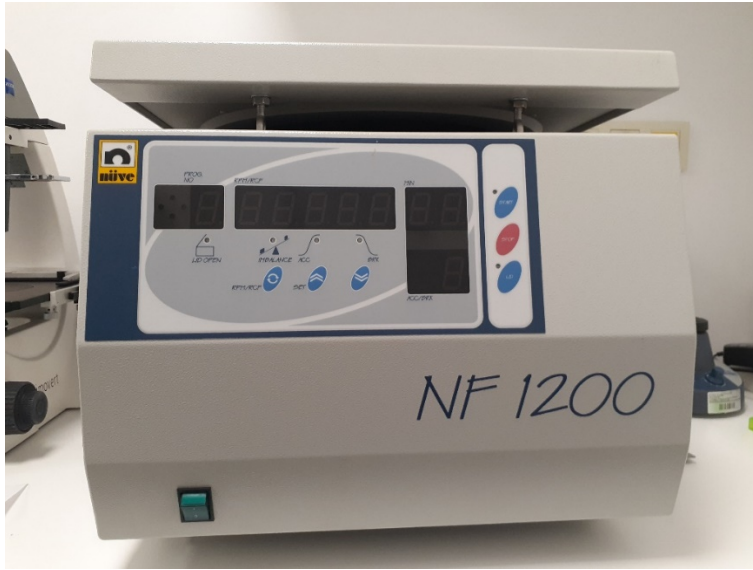


Resim 3.4. Elde edilen hücrelerin çalışma başlayıncaya kadar bekletildiği sıvı azot tankı (Biocane 34, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD)

Çalışmaya başlarken sıvı azottan çıkarılan hücreler öncelikle 37°C derecede su banyosunda (Isolab banyo, ISOLAB GmbH, Eschau, Almanya) çözüldü (Resim 3.5). Çözülen hücrelerin üzerine 3 ml PBS (fosfat tamponlu solusyon) eklendi ve 15ml'lik flakonda 800 rpm hızda 5 dakika süreyle santrifüj edildi (NF 1200, Nüve, Ankara, Türkiye) (Resim 3.6).

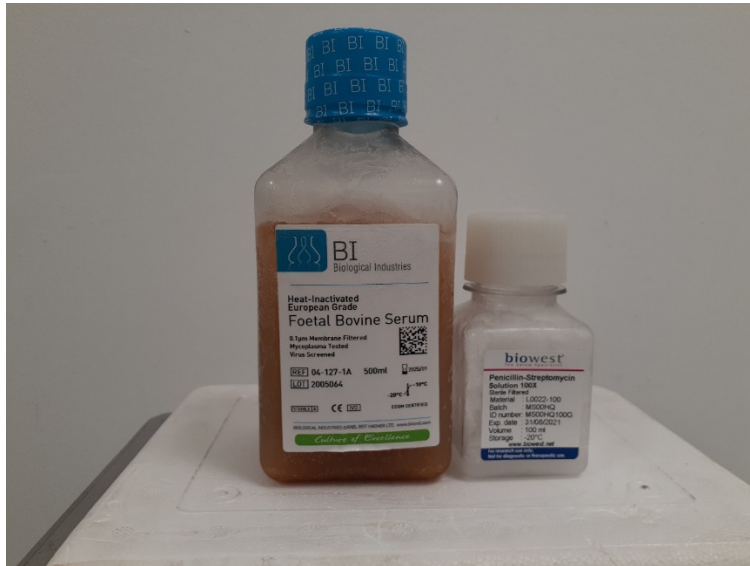


Resim 3.5. Su banyosu cihazı (Isolab banyo, ISOLAB GmbH, Eschau, Almanya)

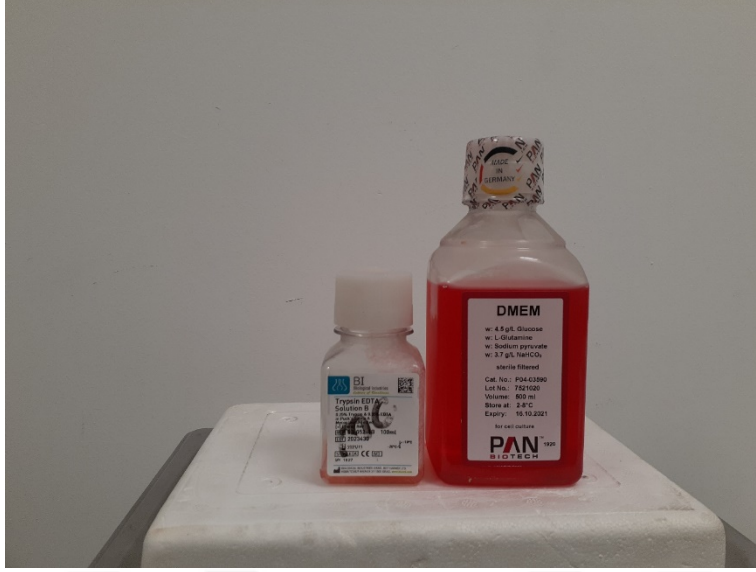


Resim 3.6. Çalışma süresince kullanılan santrifüj cihazı (NF 1200, Nüve, Ankara, Türkiye)

Santrifüj sonrasında flakondaki üst sıvı atılarak pellet 2 ml medyum ile süspanse hale getirildi. Elde edilen hücreler 25 cm²'lik polisitiren kültür şişeleri (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY 14831, ABD) içerisinde, % 10 fetal sığır serum (FBS)(Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, Israel) , %1 penisilin-streptomisin karışımı (L002 Penisilin streptomycine solution 100X, Biowest, Nuaille, Fransa) içeren DMEM (DMEM, PAN biotech, Aidenbach, Almanya) katılarak % 5' lik CO₂ etüvüne (Galaxy 170S, New Brunswick, Eppendorf Inc, Connecticut, ABD) yerleştirildi (Resim 3.7, Resim 3.8, Resim 3.9). Sonrasında her 2 günde bir hücrelerin medyumları yenilenerek polisitiren kültür şişelerinin tabanının tamamen hücre ile kaplanması sağlandı. Bir hafta sonunda, medyum ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 5 ml PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine % 0,05 tripsin + EDTA (etilendiamintetraasetik asit) (Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, Israel) karışımı ilave edildi ve 37 °C derecelik etüvde yaklaşık 10 dakika bekletildi (Resim 3.9). Hücrelerin yüzeyden kaldırıldıkları mikroskopa (Primo Vert, Zeiss, Oberkochen, Almanya) gözlemlenerek teyit edildi (Resim 3.10). Tripsinin etkisi ile kalkan hücreler tripsinle birlikte flakona alındı. Hücreler 800 rpm hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi (Resim 7).



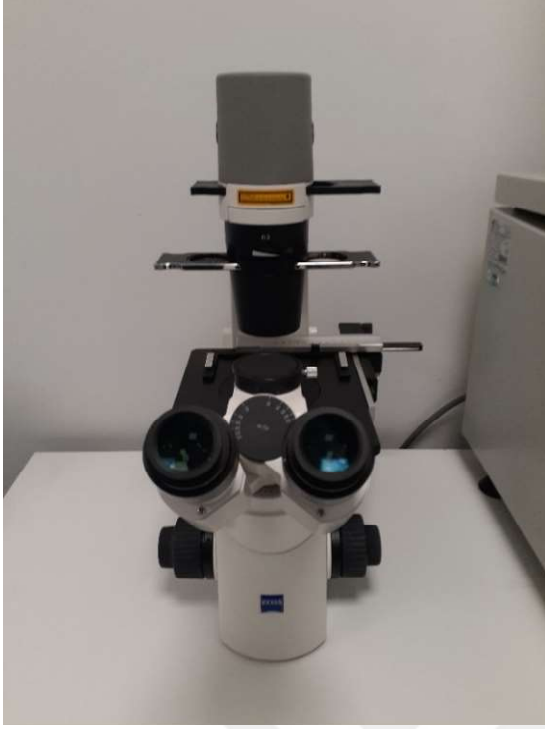
Resim 3.7. Çalışmada kullanılan fetal bovin serum (Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, Israel) ve penisilin streptomisin solüsyon karışımı (L002 Penisilin streptomycine solution 100X, Biowest, Nuaille, Fransa)



Resim 3.8. DMEM solüsyonu (DMEM, PAN biotech, Aidenbach, Almanya) ve tripsin EDTA solüsyonu (Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, Israel)



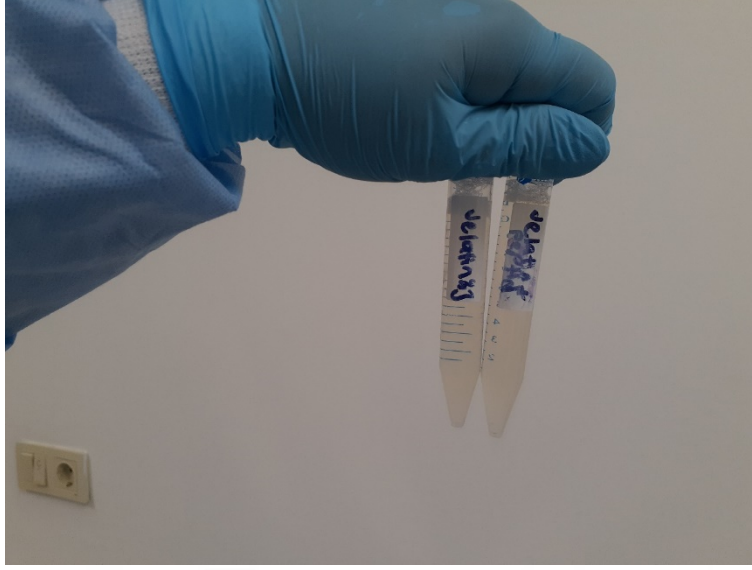
Resim 3.9. Çalışma süresince hücrelerin içerisinde bekletildiği CO₂ etüv cihazı (Galaxy 170S, New Brunswick, Eppendorf Inc., Connecticut, ABD)



Resim 3.10. Çalışmada kullanılan ışık mikroskobu (Primo Vert, Zeiss, Oberkochen, Almanya)

3.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada, hazırlanan MPP3 jel karışımının (Resim 3.11) fare preosteoblast hücreleri üzerindeki proliferatif özelliği ve diferensiasyona etkisini karşılaştırmak amacı ile dört grup belirlendi. Negatif kontrol grubunda hücreler jelatin veya emdogain uygulanmadan büyütüldü. Bir grupta herhangi bir ajan eklenmemiş jelatin kullanıldı. Bir grupta MPP3 eklenmiş jelatin kullanıldı. Pozitif kontrol grubu olarak da Emdogain kullanıldı. Kullanılan materyaller 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının tabanına uygulanıp tamamen yayıldıktan sonra hücreler plakalara ekildi. Toplamda 4 grup üzerinden çalışmalar planlandı. Bu amaçla XTT analizi için her grupta 6 adet örnek, alkalen fosfataz testi için her grupta 22 adet örnek, alizarin kırmızı boyama testinde askorbik asit içeren ve içermeyen olmak üzere her grup için sekizer örnek çalışıldı. Son olarak hücrelerin genel morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskopi (SEM) ve immünofloresan mikroskopi ile incelendi (Çizelge 3.3).



Resim 3.11. Çalışma için hazırlanan %3'lük jelatin ve %3'lük jelatin 0.4mM MPP3 karışımlarının görüntüsü

Çizelge 3.2. Çalışmanın içeriğindeki gruplar, yapılan uygulamalar ve örnek sayılarının tablosu

Çalışma grubu	XTT (Tetrazolium salt yöntemi)	Alkalen fosfataz	Alizarin kırmızı (Aa+)	Alizarin kırmızı (Aa-)	SEM	Floresans mikroskop
Kontrol	6	22	8	8	3	3
Jelatin	6	22	8	8	3	3
Emdogain®	6	22	8	8	3	3
Jelatin+MPP3	6	22	8	8	3	3

3.4. XTT (TETRAZOLIUM SALT) Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Çalışmada 6 kuyucuklu kültür kapları (well-plate) (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY 14831, ABD) kullanıldı. Öncelikle Emdogain®, Jelatin ve Jelatin+MPP3 jelleri flaskların tabanına ince bir katman halinde sürüldü. Kontrol grubunda kuyucukların tabanına herhangi bir ajan uygulanmadı. 3. pasajı tamamlanmış olan hücreler 75 cm²'lik polistiren kültür kaplarında (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY 14831, ABD) önce PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra %0,05 tripsin + EDTA ile kaldırılarak 800 rpm'de 5 dakika santrifüj (Resim 3.6) edildi. Üst sıvı atıldı. Pellet 1 ml medyum (Resim 3.8) ile sulandırıldı ve otomatik hücre sayım cihazında hücre sayımı yapıldı (TC 20 Automated cell counter, Bio-rad, California, ABD) (Resim 3.12). Hücreler önceden hazırlanan 6

kuyucuklu kültür kabının tabanına her bir kuyucukta 1000 hücre/cm² olacak şekilde eklendi. Her gruptaki örnekler üçlü tekrarlar şeklinde hazırlandı. Hücreler 24 saat %5 lik CO₂ etüvünde inkübe edildi. (Resim 3.9).



Resim 3.12. Otomatik hücre sayım cihazı (TC 20 Automated cell counter, Bio-rad, California, ABD)

24 saat sonunda kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılarak XTT kit üreticisinin (Cell proliferation kit, Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, İsrail) (Resim 3.13) talimatlarına göre XTT testi çalışıldı. Özetle, 8 ml XTT solüsyonu ve 160 µl aktivatör (N-metil dipenzoprozin metil sülfat) eklenerek vortekste homojen olarak karıştırıldı. 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine 1 ml XTT solusyonu eklendi. Boş (blank) grubu olarak XTT solüsyonu hücre içermeyen kuyucuklara eklendi ve % 5'lik CO₂ etüvüne kaldırıldı 5 saat beklendi. 5 saatin sonunda kuyucuktan alınan solüsyonlar çoklu plaka okuyucu spektrofotometre cihazında okundu. Kit üreticisinin talimatları doğrultusunda 600 nm ve 450 nm dalga boylarında absorbans (OD – optik yoğunluk (optical density)) okuması yapıldı. Kit üreticisinin talimatları doğrultusunda 600 nm ve 450 nm dalga boylarında absorbans (OD – optical density) okuması yapıldı. Non-spesifik abosorbansa tekabül eden 600 nm dalga boyundaki değerler 450 nm dalga boyundaki değerlerden çıkarıldı.

Formül 1: % canlılık = $(OD_{\text{deney grubu}} / OD_{\text{kontrol}}) \times 100$



Resim 3.13.Çalışmada kullanılan XTT kiti (Cell proliferation kit, Biological Industries, Kibbutz Bert Haemek 25115, İsrail)

3.5. Alkalen Fosfataz (AF) Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmada 6 kuyucuklu kültür kapları (well-plate) (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY 14831, ABD) kullanıldı. Öncelikle Jelatin ve Jelatin+MPP3 ve Emdogain® materyalleri flaskların tabanına ince bir katman halinde sürüldü. Herhangi bir materyal uygulanmayan kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanıldı. 3. pasajı tamamlanmış olan hücreler önceden hazırlanan 6 kuyucuklu kültür kabının tabanına her bir kuyucukta 1000 hücre/cm² olacak şekilde eklendi. 37°C ve %5 CO₂ inkübatörde yedi gün boyunca büyütüldü. Her iki günde bir medyumlar taze medyum ile değiştirildi. Yedi gün sonunda alkalen fosfataz aktivitesi ticari olarak temin edilen bir kit vasıtası (Sensolyte Assay Kit, Anaspec ATC group, California, ABD) ile kit üreticisinin talimatları doğrultusunda tayin edildi (Resim 3.14). Özetle ilk önce çalışma solüsyonları hazırlandı. 10X olarak temin edilen AF dilüsyon tamponu de-iyonize su ile 1X konsantrasyona dilüe edildi. Daha sonra kit bünyesinde temin edilen AF standardı, dilüsyon tamponu içerisinde 100, 50, 25, 12.50, 6.20, 3.10, 0.15 ve 0.075 ng/mL konsantrasyon serileri oluşturacak şekilde

dilüe edildi. 10X olarak temin edilen assay tamponu de-iyonize su ile 1X konsantrasyona dilüe edildi.



Resim 3.14. Çalışmada kullanılan AF kiti (Sensolyte Assay Kit, Anaspec ATC group, California, ABD)

Ardından hücrelerin medyumları uzaklaştırılarak assay tamponu ile iki kere yıkandı. Hücrelerin üzerine kit bünyesinde temin edilen Triton-X eklenerek hücre membranlarının geçirgenleşmesi sağlandı. Hücreler 4°C de 10 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda (Rocking platform, VWR, Pensilvanya, ABD) çalkalandı (Resim 3.15). AF standart dilüsyon serilerine ve hücrelerin bulunduğu her kuyucuğa 50 µl para nitrofenil fosfat (pNPP) eklendi (Resim 3.14). pNPP AF ile hidroliz edilerek pNP'ye dönüştürüldüğüne oluşan renk değişikliği spektrofotometre ile ölçülerek alkalin fosfataz aktivitesi belirlenmektedir. pNPP eklendikten sonra solüsyonlar 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. 30 dakika sonunda solüsyonların 405 nm'de absorbands değerleri spektrofotometre cihazı (Varioscan flash, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ile tayin edildi. Elde edilen absorbands değerlerinin AF konsantrasyon değerlerine dönüştürülmesi için başta hazırlanan AF standart dilüsyon serilerinden elde edilen değerlerden bir standart eğri hazırlandı. Standart eğrinin formülü MS Excel'de tayin edildi. Formülde hücrelerden elde edilen abosrbans değerleri yerine konularak absorbands değerleri konsanstrasyona dönüştürülmüş oldu.



Resim 3.15. Orbital çalkalayıcı cihazı (Rocking platform, VWR, Pensilvanya, ABD)

3.6. Alizarin Kırmızı Boyama

Solusyonları

- Alizarin kırmızı-boyama (Staining) (AR-S) 40mM, pH 4.2 (500ml suya 6.85g AR-S tozu (Camlab Ltd., Cambridge, UK) eklendi ve birkaç dakika karıştırıldı. AR-S suda çok az çözünür ve bu konsantrasyonda çok koyu mor-kahverengi bir karışım oluşturur. Az miktarda NaOH ile pH'ı ayarlandı.
- Buz soğukluğunda 70% etanol (hücreleri fikse etmek için) uygulandı.
- Etanol serileri (hücreleri dehidrate etmek ve kurutmak için): 50, 70, 80, 95, 100% etanol olarak yapıldı.
- PBS 10mM sodyum fosfat içinde 10% w/v cetylpyridinium chloride (CPC), pH 7.0 %10 w/v solüsyonu yapmak için 100ml hazırlanmış sodyum fosfat tamponu başına 10g CPC eklendi.

Protokol

- (1) Çalışmada 6 kuyucuklu kültür kapları (well-plate) (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY 14831, ABD) kullanıldı. Öncelikle Jelatin ve Jelatin+MPP3 ve Emdogain® materyalleri flaskların tabanına ince bir katman halinde sürüldü. Herhangi bir materyal uygulanmayan kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanıldı. 3. pasajı tamamlanmış olan hücreler önceden hazırlanan 6 kuyucuklu kültür kabının tabanına her bir kuyucukta 1000 hücre/cm² olacak şekilde eklendi. 37°C ve %5 CO₂ inkübatörde yedi gün boyunca büyütüldü. Her iki günde bir medyumlar taze medyum ile değiştirildi. Askorbik asit ilavesi yapılacak olan grupta hücre medyumlarına 50 µg/mL askorbik asit 2-fosfat eklendi.
- (2) Hücreler PBS ile kısaca yıkandı. En az 1 saat boyunca buz gibi soğuk %70 etanol ile hücreler fikse edildi.
- (3) Etanolu uzaklaştırmak için nanosaf suda hücreler durulandı. Hücreler 40 mM AR-S, pH 4.2 ile oda sıcaklığında 10 dakika döndürme ile boyandı. (1 ml AR-S / 35 mm petri).
- (4) Petri kabından bağlanmamış AR-S'yi çıkarmak için nanosaf su ile hücreler 5 kez durulandı. Non-spesifik boyamayı daha da azaltmak için rotasyonla 15 dakika boyunca PBS eklendi.
- (5) Fotoğraflar alınmadan önce dehidratasyon etanol serileri ile sağlandı (50, 70, 80, 95, 100%) ve fotoğraf çekiminden önce elde edilen örnekler hava ile kurulandı.
- (6) Kantitatif renklenme prosedürü: Oda sıcaklığında 15 dakika boyunca %10 w/v CPC eklendi. Bu AR-S ekstraktlarının alikotları daha sonra seyreltildi (%10 CPC solüsyonunda) ve konsantrasyon, aynı solüsyonda bir AR-S standart eğrisi kullanılarak çok plakalı bir okuyucuda 562 nm'de absorbans ölçümü ile belirlendi.

3.7. Tramalı (Scanning) Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

SEM analizi için, örnekler yukarıda tarif edildiği şekilde yuvarlak hücre kültürü lamelleri üzerine hazırlandı. Hücreler yüzeylerde 48 saat boyunca büyütüldükten sonra medyum uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı. Daha sonra %4 paraformaldehit

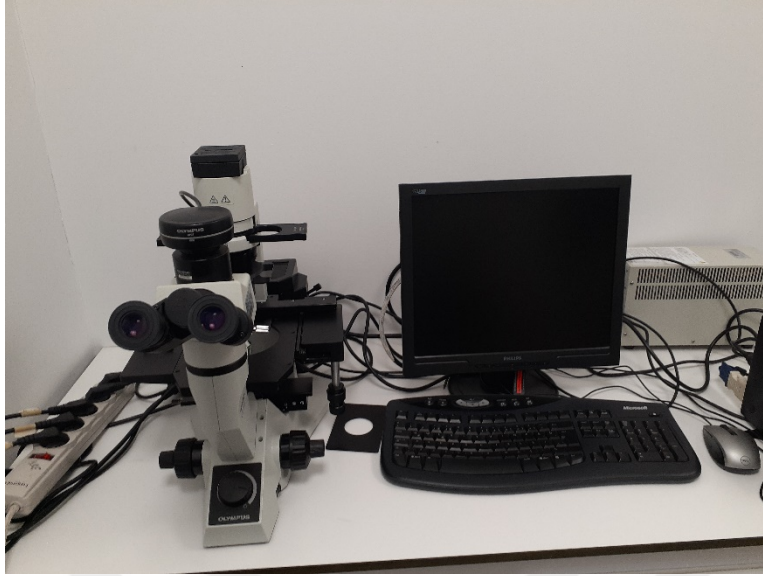
eklenerek 10 dakika boyunca fikse edildi. Paraformaldehit uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin dehidrate edilmesi için sırasıyla 10'ar dakika boyunca %10, %30, %50, %70 ve %100 etanol çözeltileri içerisinde bekletildi. SEM analizinden önce %100 etanol uzaklaştırılarak örneklerin yüzeyleri altın ile kaplandı (Leica EM ACE200, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Almanya). Hitachi SU5000 alan emisyonlu SEM cihazı (Hitachi SU5000, Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japonya) kullanılarak örnekler görüntülendi (Resim 3.16).



Resim 3.16. Vakum kaplama cihazı (Leica EM ACE200, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Almanya) ve SEM görüntüleme cihazı (Hitachi SU5000, Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japonya)

3.8. İmmü floresan Görüntüleme

Hücreler bir önceki bölümde tarif edildiği şekilde hücre kültürü lamelleri üzerinde 48 saat boyunca büyütüldü. Hücrelerin görüntülenmesi için FAK100 (Actin Cytoskeleton / Focal Adhesion Staining Kit, Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) kullanıldı (resim 3.17). Büyütülen hücreler fikse edilmesi amacıyla oda ısısında 20 dakika boyunca %4'lük formaldehitte bekletildi. 1X yıkama solüsyonu ile 2 kere



Resim 3.18. İmmunfloresans boyama için kullanılan ışık mikroskobu (CKX 41, Olympus, Tokyo, Japonya)

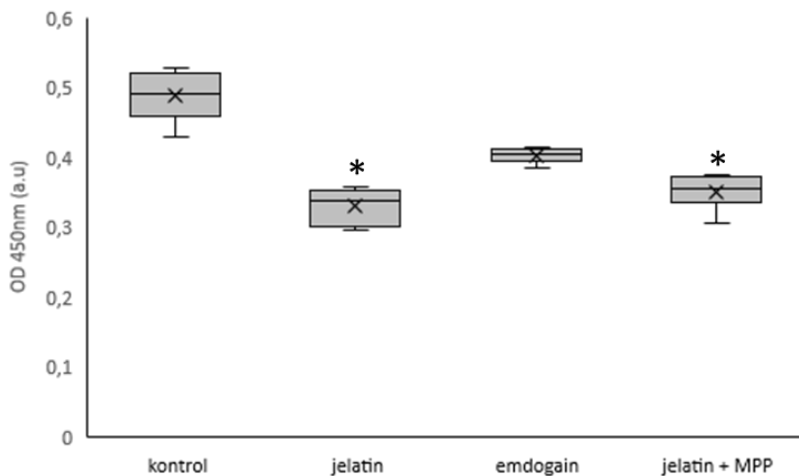
3.9. İstatistik Analizler

Verilerin kontrolü ve istatistiksel analizler IBM SPSS v25 yazılımı ile yapıldı (IBM, Chicago, IL, ABD). Verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile yapıldı. Normal dağılıma uyan değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterildi. Kategorik değişkenler için gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ve Tukey post-hoc testi ile değerlendirildi. Tüm istatistik testlerde $p < 0,05$ anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

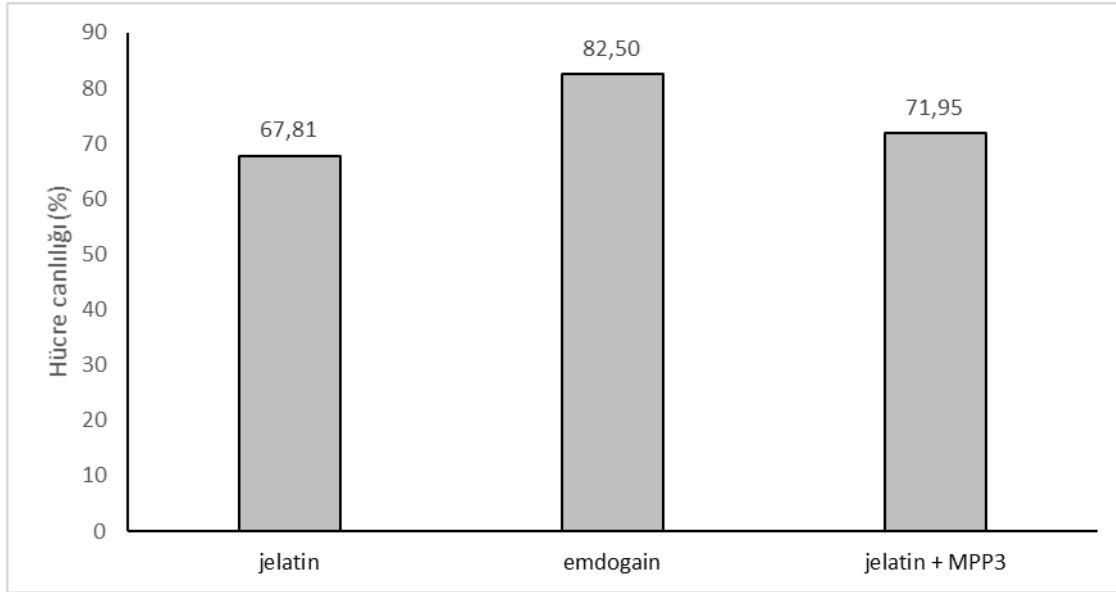
4. BULGULAR

4.1. XTT Yöntemi ile Belirlenen Hücre Canlılığına İlişkin Bulgular

Hücre canlılığı ve proliferasyonu XTT yöntemi ile tayin edildi. XTT testinden elde edilen absorbans değerleri ve % hücre canlılıkları şekil 4.1 ve şekil 4.2’de gösterilmiştir. En fazla hücre canlılığı hücrelerin en ideal koşullarda hiçbir ek katkı maddesi ile maruz kalmaksızın üretildiği koşullar olmuştur. Boş jelatin grubunda % hücre canlılığı %67,81 olarak tespit edilmiştir. Bu değer ISO 10993 standartlarında belirlenen %70 sınırının altında olduğundan boş jelatin grubu hafif sitotoksik olarak değerlendirilmiştir. EMD ve Jelatin+MPP3 gruplarında ise sırasıyla %82,50 ve %71,95 olarak tespit edilmiştir. Materyal uygulanan yüzeyler hücrelerin ideal yüzeylerinden farklı olduğu için doğal olarak hücre canlılığında bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak EMD ve Jelatin+MPP3 gruplarındaki düşüş sitotoksikite sınırının üzerinde kalmıştır. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılan değerlendirmede hücre canlılığı açısından jelatin ve jelatin+MPP3 grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.1). Gruplar arasındaki farklar şekil 4.1’de ve şekil 4.2’de gösterilmiştir. Tanımlayıcı istatistiksel analiz sonuçları ise çizelge 4.1’te gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Hücrelerin canlılığının XTT analizine göre sonuçlarının oranı (*: $p>0,05$)



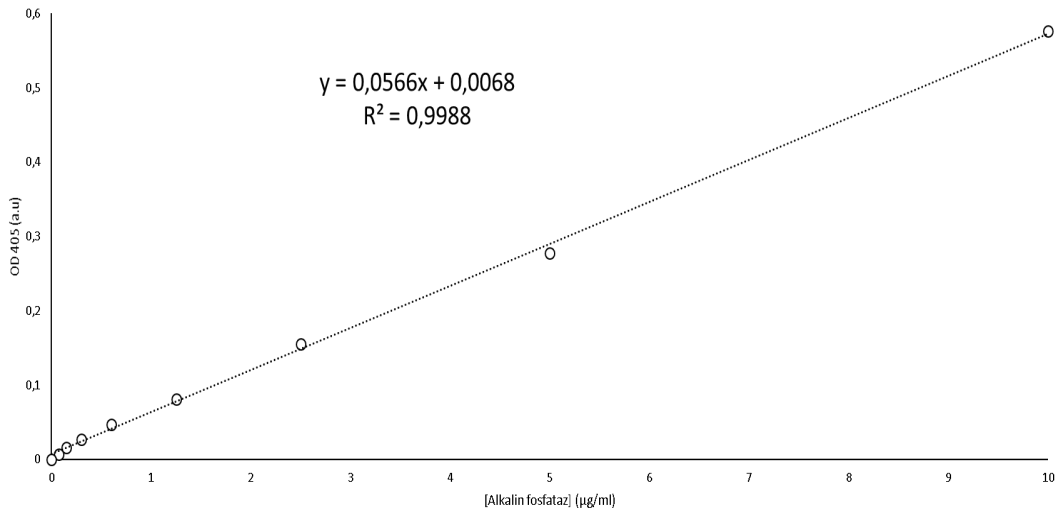
Şekil 4.2. Kontrol grubundaki hücre canlılığının XTT sonuçları %100 kabul edildiğinde diğer çalışma gruplarının oranı

Çizelge 4.1. XTT hücre canlılığı sonuçlarının istatistiksel analiz tablosu (*: $p > 0,05$)

	N	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	En küçük değer	En büyük değer
Kontrol	6	0,4886	0,03569	0,01457	0,43	0,53
Jelatin *	6	0,3314	0,02591	0,01058	0,30	0,36
Emdogain	6	0,4031	0,01103	0,00450	0,38	0,41
Jelatin + MPP3 *	6	0,3516	0,02538	0,01036	0,31	0,37
Toplam	24	0,3937	0,06663	0,01360	0,30	0,53

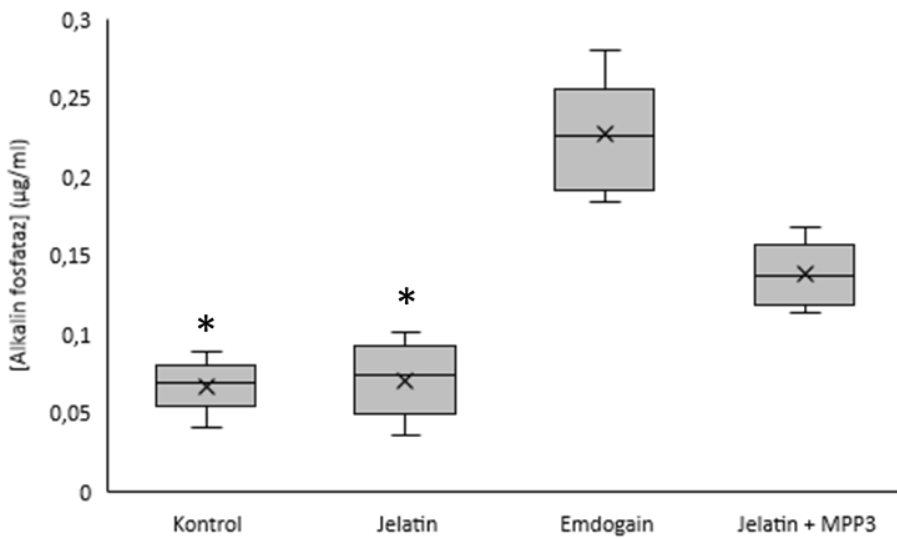
4.2. Alkalen Fosfataz Aktivitesi ile Tespit Edilen İstatistiksel Bulgular

Bu test için öncelikle içindeki alkelen fofataz seviyesi bilinen standart bir ürün laboratuvar koşullarında çalıştırılarak kalibrasyon eğrisi ve formülü elde edildi. Şekil 4.3 bu çalışma koşullarında elde edilen kalibrasyon eğrisini göstermektedir. Bu formülde x yerine spektrofotometre cihazında elde edilen absorbans değeri konulduğunda alkalen fosfataz konsantrasyon değerini vermektedir (y değeri).



Şekil 4.3. Laboratuvar çalışma koşullarında elde edilen alkalin fosfataz kalibrasyon eğrisi

Standart eğri ve formül elde edildikten sonra her grupta 22 örnek hedeflenerek çalışıldı. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi. Yapılan incelemeler sonucunda sadece kontrol ve jelatin grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$) (şekil 4.4). Emdogain ve jelatin+MPP3 gruplarındaki AF seviyeleri kontrol ve boş jelatin gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu. EMD grubundaki AF seviyesi ise Jelatin+MPP3 grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. Şekil 4.4 ve çizelge 4.2’de sonuçlar ortaya kondu.



Şekil 4.4. Yapılan test sonucunda gruplarda elde edilen Alkalen Fosfataz aktivitesinin grafiği (*: $p > 0,05$)

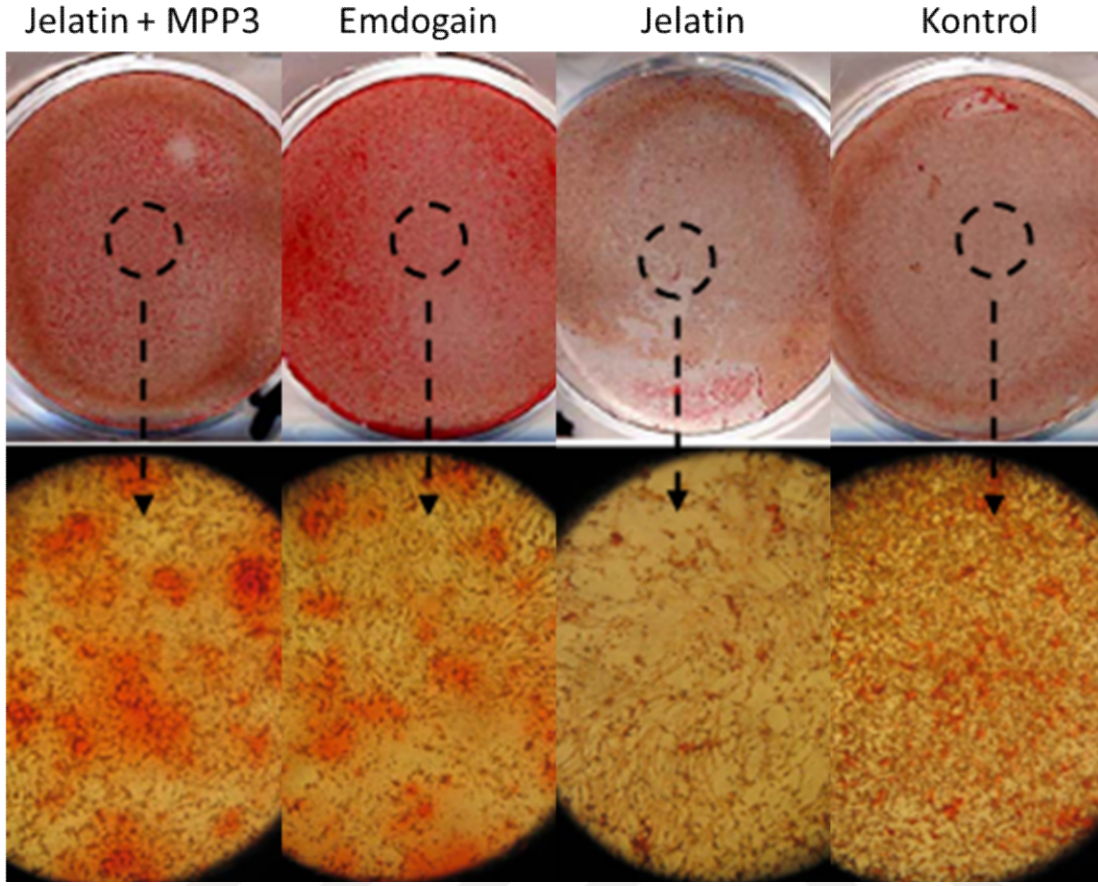
Çizelge 4.2. Alkalen fosfataz aktivitesi sonuçlarının betimleyici istatistikleri. (*: $p>0,05$)

	N	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	En küçük değer	En büyük değer
Kontrol *	22	0,0666	0,01498	0,00319	0,04	0,09
Jelatin *	22	0,0707	0,02131	0,00454	0,04	0,10
Emdogain	23	0,2268	0,03317	0,00692	0,18	0,28
Jelatin + MPP3	21	0,1387	0,01927	0,00421	0,11	0,17
Toplam	88	0,1267	0,07010	0,00747	0,04	0,28

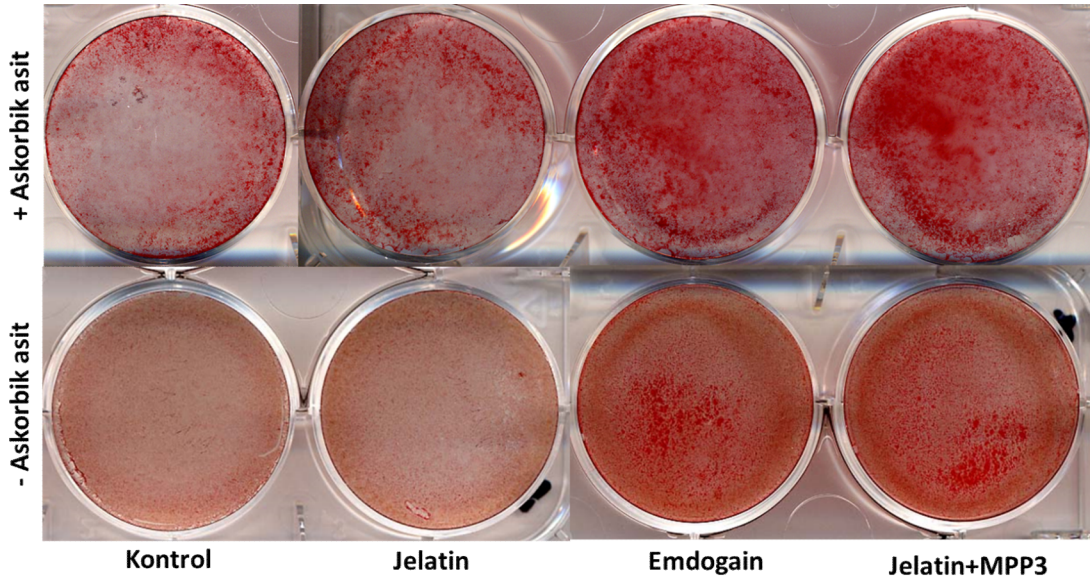
4.3. Alizarin Kırmızı Testi Sonuçları

Alizarin kırmızı ile boyanan hücrelerin görüntüsü resim 4.1 ve Resim 4.2’de gösterilmiştir. Askorbik asit ilave edilmiş ve ilave edilmemiş grupların kantitatif analiz sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri çizelge 4.3 ve çizelge 4.4’de gösterilmiştir. Askorbik asit eklenmeyen gruplarda kontrol ve boş jelatin grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi. EMD ve Jelatin+MPP3 grupları ise kontrol ve boş jelatin gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu (çizelge 4.4).

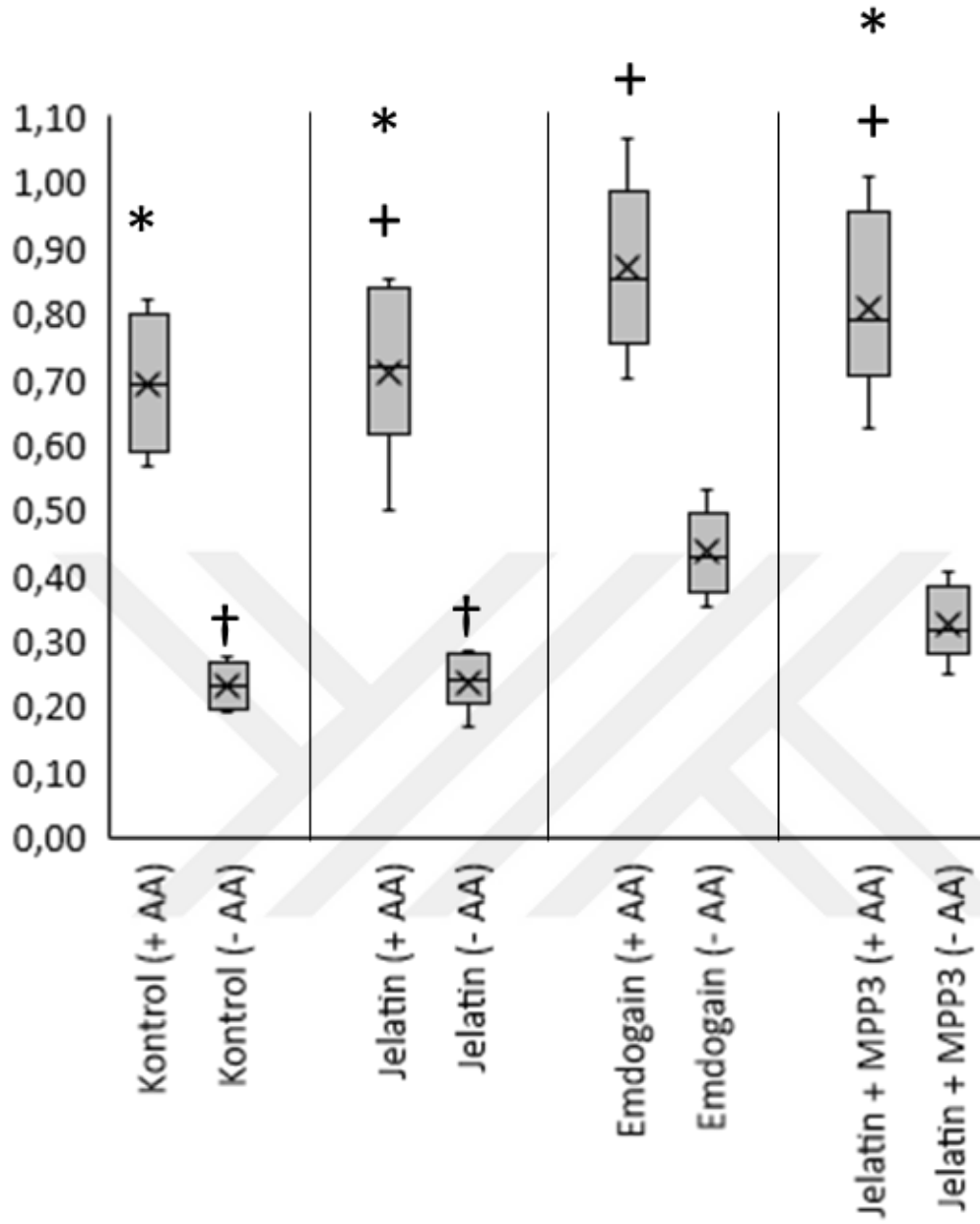
Askorbik asit eklenen gruplarda kontrol, jelatin ve jelatin+MPP3 grupları arasında ve Jelatin, EMD ve Jelatin+MPP3 grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (çizelge 4.3). Askorbik asit ilavesinin yarattığı farkı gözlemllemek için hem ilavesi yapılmış grup hem de askorbik asit ilavesi olmayan grup aynı şekil içersinde şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Resim 4.1. Askorbik asit ile muamele edilmeyen hücrelerin Alizarin kırmızı boyaması sonucundaki görüntüleri (üst sütun) ve 200x büyütme altındaki görüntüleri (alt sütun)



Resim 4.2. Askorbik asit ilave edilmiş ve edilmemiş olan gruplar arasındaki Alizarin Kırmızı sonrası boyanma farkı.



Şekil 4.5. Aa+ ve Aa- negatif olan test gruplarının alirazin kırmızı sonuçlarının grafiği (*,+ ,†:p>0,05).

Çizelge 4.3. Askorbik asit eklenmiş olan grupların alizarin kırmızı testi sonuçlarının betimleyici istatistikleri (*,+: $p>0,05$)

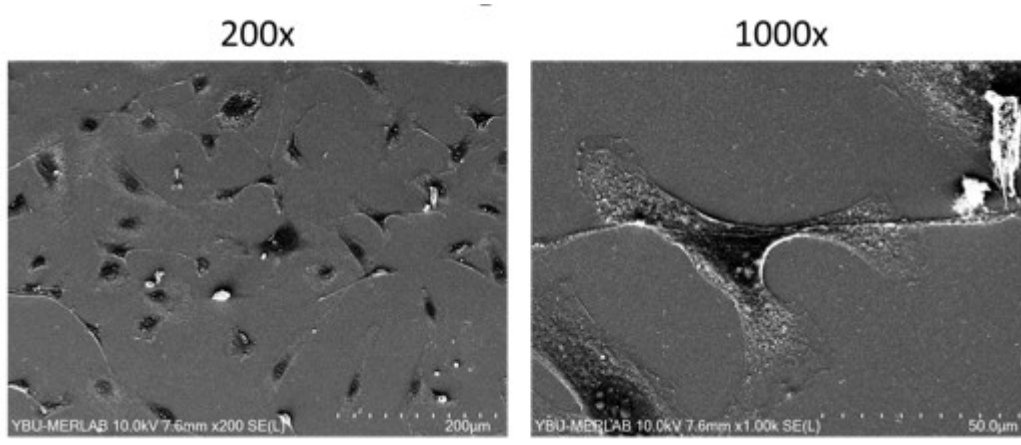
	N	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	En küçük değer	En büyük değer
Kontrol *	8	0,6887	0,10146	0,03587	0,56	0,82
Jelatin *,+	8	0,7086	0,13182	0,04660	0,50	0,85
Emdogain +	8	0,8707	0,12895	0,04559	0,70	1,06
Jelatin + MMP3 *,+	8	0,8079	0,13765	0,04867	0,62	1,01
Toplam	32	0,7690	0,14122	0,02496	0,50	1,06

Çizelge 4.4. Askorbik asit eklenmemiş olan grupların alizarin kırmızı testi sonuçlarının betimleyici istatistikleri (*: $p>0,05$)

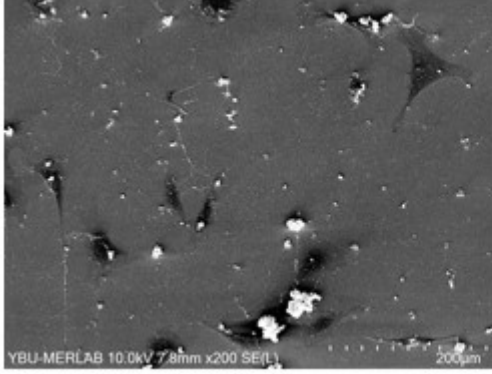
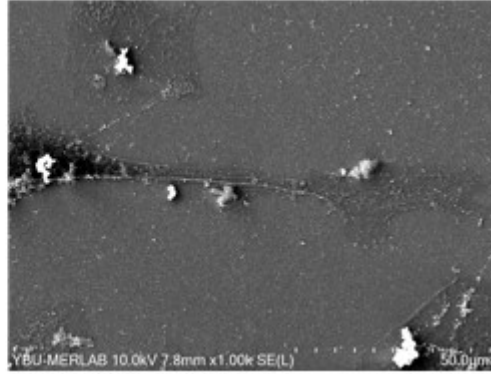
	N	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	En küçük değer	En büyük değer
Kontrol *	8	0,2296	0,03382	0,01196	0,19	0,27
Jelatin *	8	0,2362	0,04394	0,01553	0,17	0,28
Emdogain	8	0,4353	0,06447	0,02280	0,35	0,53
Jelatin + MMP3	8	0,3232	0,05506	0,01947	0,25	0,40
Toplam	32	0,3061	0,09734	0,01721	0,17	0,53

4.4. Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleri ve Değerlendirilmesi

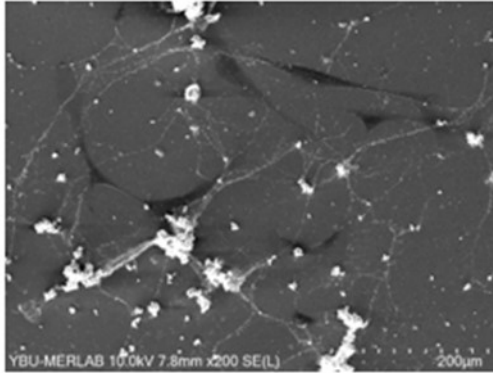
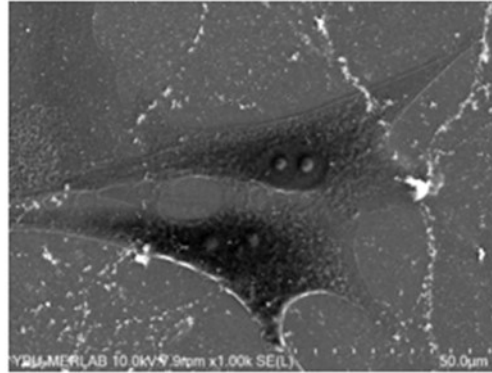
Hücrelerin genel morfolojik özelliklerinin tayin edilmesi amacıyla SEM görüntülemesi yapılmıştır. Yapılan incelemelerde x200 ve x1000 büyütmeleri ele alındığında oluşan hücrelerin fizyonomilerinin herhangi bir anomali göstermediği tespit edilmiştir. Resim 4.3'de kontrol grubunun, Resim 4.4'de Jelatin grubunun, Resim 4.5'de Jelatin-MMP3 grubunun ve Resim 4.6'da EMD grubunun SEM görüntüleri verilmiştir.



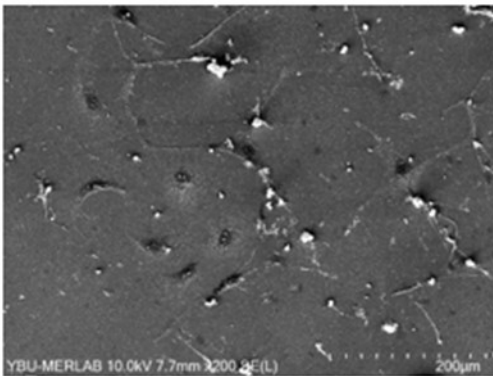
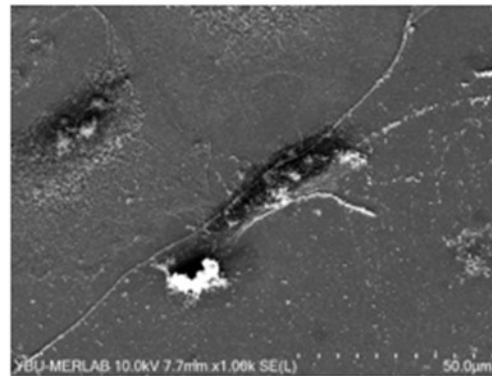
Resim 4.3. Kontrol grubundaki 200x ve 1000x büyütmeler

200X**1000X**

Resim 4.4. Jelatin grubundaki 200x ve 1000x büyütmelemler

200X**1000X**

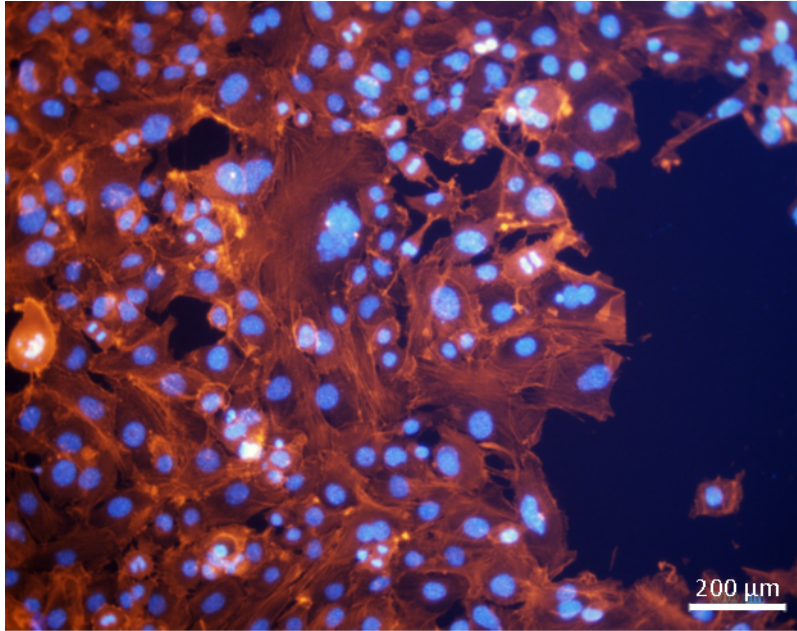
Resim 4.5. Emdogain grubundaki 200x ve 1000x büyütmelemler

200X**1000X**

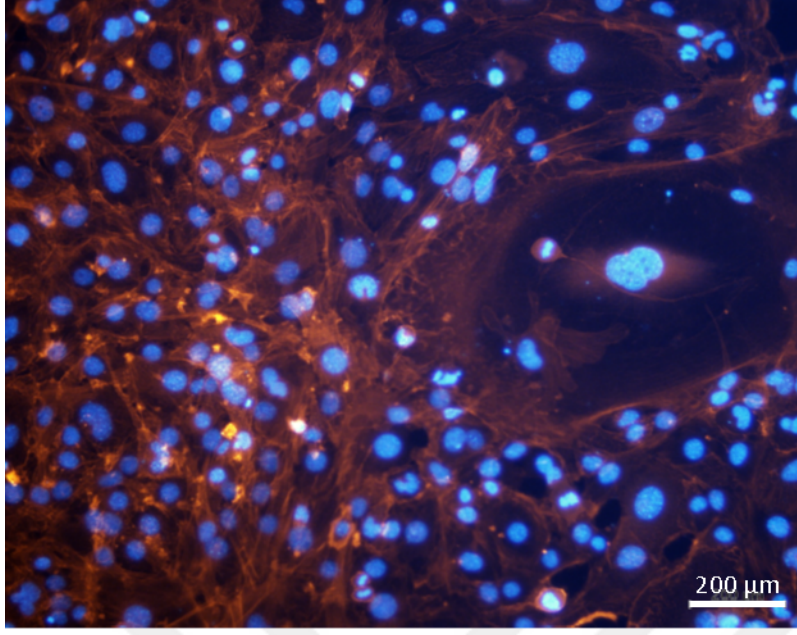
Resim 4.6. Jelatin-MMP3 grubundaki 200x ve 1000x büyütmelemler

4.5. İmmünoFloresan Mikroskop Görüntüleri ve Değerlendirmesi

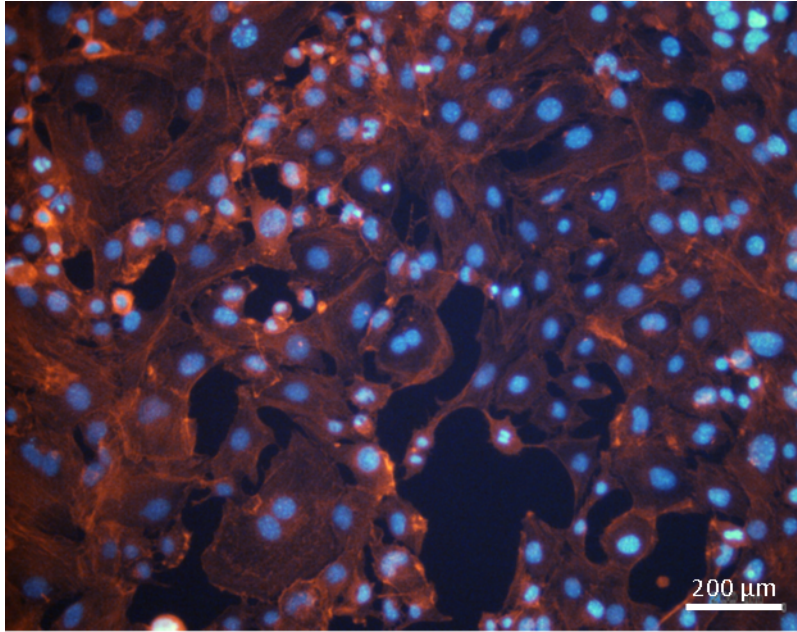
Hücrelerin test edilen materyaller üzerinde genel morfolojilerini kalitatif olarak değerlendirmek amacıyla ikili boyama (DAPI + Phalloidin-Texas Kırmızı) ile floresan mikroskopi incelemesi yapıldı. Jelatin, EMD ve Jelatin+MPP3 uygulanan yüzeylerin hepsinde hücrelerin iyi tutunma ve yayılma gösterdiği gözlemlendi. Sitoiskelet (Aktin) yapılarının düzgün olduğu gözlemlendi. Jelatin uygulanan yüzeylerdeki hücrelerin çekirdek morfolojisinin Emdogain veya Jelatin+MPP3 uygulanan yüzeylere göre daha heterojen olduğu gözlemlendi (Resim 4.7, Resim 4.8, Resim 4.9).



Resim 4.7. Jelatin grubunun immunofloresans görüntülenmesi



Resim 4.8. EMD grubunun immunofloresans görüntülenmesi



Resim 4.9. Jelatin+MPP3 grubunun immunofloresans görüntülenmesi.

5. TARTIŞMA

Çeşitli seviyelerde periodontal ataşman kaybı ve kemik yıkımı ile karakterize olan iltihabi hastalıklara periodontal hastalık tanısı konmaktadır [81,152]. Oluşan mikrobiyal dental plağın uzaklaştırılması, patojen mikroorganizmaların kontrol altına alınması ve kaybedilen periodontal dokuların tekrar yerine konularak işlevsel hale getirilmesi periodontal tedavinin amaçlarından sayılabilir [79, 81, 153, 154]. Ancak periodontal dokulardan köken alan hücrelerin farklılığı ve çeşitliliğinden dolayı ideal bir rejenerasyon tekniği henüz geliştirilememiştir. Son yıllarda moleküler ve gelişimsel biyolojideki gelişmelerle birlikte sinyal moleküllerinin ve progenitör hücrelerin periodontal rejenerasyondaki önemi ön plana çıkmış ve çeşitli biyolojik ajanların kullanımı gündeme gelmiştir [20]. Tarif edilen biyolojik ajanlardan en önemlilerinden bir tanesi anne karnındaki domuz embriyosunda bulunan gelişmekteki diş tomurcuklarından elde edilen ve embriyodaki amelogeninleri de içeren asidik ekstrenin saflaştırılmış hali olan EMD'dir [65,82,155].

Diş kökü oluşurken meydana gelen olayları taklit etmek amacı ile EMD ile periodontal rejenerasyon tekniği ön plana çıkmıştır. Yapılan in vitro çalışmalarda, diş kökü oluşumu sırasında, HEK'nın parçalanmasıyla beraber iç katmanlarından EMD'nin ortama salındığı gösterilmiştir [77]. EMD içeriğindeki proteinler diş folikülünden kaynaklanan mezenkimal hücrelerin sementoblastlara differansiye olmasını ve bu hücrelerin de hücresiz sementi oluşturmasını sağlar [52,77]. EMD hücrel ataşmanın oluşumuyla beraber periodontal ligament hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü etkileyerek rejenerasyon için gerekli olan matriks görevini görür [52,77,156]. EMD'nin bir diğer önemli rolü epitel hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkisiyle, ağız epiteline ait hücrelerin yara bölgesine göç etmesini engellemesidir. Böylece rejenerasyon için gerekli olan hücrelerin yara bölgesinde yerleşmelerine ve gerekli dokuları oluşturmalarına zaman ve olanak tanınmasıdır [52,79,86]. Bu bilgilerin ışığında EMD'nin kemik içi defektlerde kullanımına yönelik birçok histolojik [63,157,158] ve klinik [22,57,58,155] çalışma yapılmış ve rejenerasyonda etkinliği kabul edilen bir materyal haline gelmiştir [159]. Bu nedenlerle bu çalışmaya karşılaştırma amacıyla dahil edilmiştir.

EMD'nin periodontal rejenerasyondaki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen periodontal ligament hücrelerinin ataşmanında, gelişmesinde ve oluşmasında katkısı olduğu ortaya konmuştur [156]. EMD ayrıca osteoblastların proliferasyon, differansiasyon ve mineralizasyonunu teşvik ederek olgun kemik hücrelerinin aktivasyonunu sağlar [49,83]. Ayrıca EMD tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α)'yı inhibe ederek osteoblastların apoptozunu engeller ve böylelikle indirekt yoldan kemik iliği hücrelerinin osteojenik kapasitesini artırır [160,161]. EMD aynı zamanda yara iyileşmesinin erken dönemindeki iltihabi genleri baskılayarak ve yara iyileşmesine katkı sağlayacak olan genleri de artırarak etkisini gösterebilmektedir [162].

Jiang ve arkadaşları [163] EMD'nin MC3T3-E1 osteblast hücrelerine etkisini hem direkt hücrelerle kontakt halde hem de arada geçirgen bir bariyer varken karşılaştırdıkları çalışmada EMD'nin osteoblast proliferasyonunu ve hücre sayısını artırdığını bulmuşlardır. Araştırmacılar EMD'nin bu etkisini salgıladığı çözünür biyoaktif moleküllere bağlamışlardır. Bu nedenle EMD'nin yara bölgesinde bulunmasının etkisini göstermesi için yeterli olabileceğini, osteoblastlarla sıkı bir temasın gerekmediğini ifade etmişlerdir. EMD'den salınan TGF- β 1 ve BMP benzeri yapılar ve artık amelogenin ürünleri ile matris oluşumu için hücre sinyalleşmesinde ve mineralizasyonunda aktif rol oynadığını ifade etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada da benzer şekilde EMD uygulanan hücre kültürü gruplarında kontrol grubuna nazaran daha fazla osteoblast hücre sayısı tespit edilmiştir.

Yapılan literatür incelemelerinde osteoblastların hücre kültürü çalışmalarında BMP-2'nin ön plana çıktığı gözlenmiştir. BMP'ler TGF- β 'nın süper ailesi olarak görev yapan multifonksiyonel sitokinlerdir ve ektoik kemik oluşumunu indükleyebilecek yetenekleri vardır [109,164]. Erken dönem iskeletsel oluşum ve embriyonejik dönemde önemli bir rol oynarlar ve kemik ve kıkırdak doku büyümesinde güçlü bir etki gösterirler [165]. BMP-2 etkisini undifferansiye mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara ve adipositlere dönüşümünü aktive ederek gösterir [166]. Ayrıca osteoblast aktivasyonu ile beraber alkalen fosfataz ekspresyonunu da kontrol eder [167]. El-Sayed ve arkadaşları [168] yaptıkları çalışmada BMP-2 ve EMD'yi osteoblast hücre kültürlerinde karşılaştırmışlar ve alkalen fosfataz aktivitesi ve

alizarin kırmızı boyama açısından yaptıkları değerlendirmelerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Araştırmacılar sonuç olarak osteojenik aktiviteye ihtiyaç duyulan olgularda EMD, BMP-2 veya her ikisinin de kombine kullanılmasının arasında in vitro koşullarda bir fark oluşmadığını belirtmişlerdir [168].

Öte yandan Miron ve arkadaşları [169] yaptıkları çalışmada EMD uygulaması sonrası gen ekspresyonlarını inceledikleri çalışmalarında BMP-2 ve TGF- β 1 salınımının arttığını ve interlökin-1 β salınımının azaldığını bulgulamışlardır.

Miyaji ve arkadaşları [170] ise beagle köpeklerinde yaptıkları çalışmada BMP-2 kullanılarak kök yüzeyi şartlandırılan periodontal defektlerde ciddi ankilozla iyileşme problemi yaşadıklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu sonucu iki ana etkene bağlamışlardır. Birincisi BMP-2'lerin osteoblastlara etkisinin periodontal ligament hücrelere etkisinden fazla olmasıdır. İkincisi ise BMP-2'nin arttırdığı alkalen fosfataz aktivitesi nedeniyle periodontal ligament yapılarının mineralizasyonuna sebebiyet vermesidir. Yapılan bu tez çalışmasında hem BMP-2 ve EMD'nin osteoblastlar üzerindeki etkileri arasında anlamlı bir fark bulunmaması, hem de deney amacıyla incelenen MPP3 proteinin sentetik bir amelogenin yapısında olması nedeniyle MPP3 ile EMD'nin kıyaslanmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür.

Ekstraselüler matriks proteinlerinin biyomineralizasyon süreçlerinde oynadıkları önemli roller sadece biyomineralizasyon süreçlerinin ve fizyo-patolojilerinin daha iyi anlaşılmasına yol açmakla kalmamış, bu hastalıkların tedavilerinde yeni olasılıkların kapılarını açmıştır. Ancak bu proteinlerin klinikteki kullanımı; bu proteinlerin tanımlanması, saflaştırılması ve üretilmesi aşamalarındaki zorluklar nedeniyle kısıtlı kalmıştır. Ayrıca klinik kullanıma girmiş olan biyomineralizasyon proteinleri pahalı tedavilerdir ve çoğu ülkede sosyal güvence veya sigorta kapsamı dışında kalmaktadır [116].

Biyomineralizasyon proteinlerinin fonksiyonlarını en azından kısmen taklit edebilen peptidler, bu proteinlere ucuz bir alternatif olarak geliştirilmeye çalışılmıştır. Büyük biyomineralizasyon proteinlerinin yıkım ürünlerinin araştırılması ve kombinasyonel

biyoloji yöntemleri (faj gösterim veya hücre gösterim teknikleri) gibi teknikler kullanılarak biyomineralizasyon proteinlerinin yerine kullanılabilecek peptidler üretilmeye çalışılmıştır. Son olarak da bilgisayar destekli matematiksel modellerle yeni peptidler tasarlanması veya var olanların optimize edilmesi denenmiştir [118].

Doku mühendisliği ve tasarımındaki ilerlemelerle birlikte insan vücudundaki genetik dizilimleri taklit edebilen amino asit dizilimlerinin tasarlanabilmesi ve endüstriyel olarak üretilmesi günümüzdeki mevcut koşullarla yapılabilmektedir. Sentetik olarak üretilen bu dizilimler hem köken aldığı protein yapısını taklit ederek biyolojik ortamlarda çalışabilmekte, hem de herhangi bir canlı donör ihtiyacı olmaksızın istenebildiği kadar üretilmektedir [171]. Awada ve arkadaşları [171] yaptıkları incelemeler sonucunda insan amelogenin C- terminal peptid (amgCP) adı altında tam uzunlukta insan amelogeninden esinlenen ve hidrofilik C-terminalini içeren 11 aminoasit uzunluğunda bir ürün sentezlemişlerdir. MC3T3-E1 hücre kültürü ortamında elde ettikleri ürünün osteoblastlara etkisini incelemişlerdir. Hücre proliferasyonunu, gerçek zamanlı PCR analizi ile hücre differansiasyonunu ve alirazin kırmızı boyama yöntemi ile ortam mineralizasyonunu inceledikleri çalışmanın sonucunda amgCP materyalinin MC3T3-E1 hücrelerine olumlu etkiler sağladığını bulmuşlardır.

MPP3 materyali adını mineral indükleyici peptid'den (mineralization-promoting peptide) almaktadır [172]. Çalışmamızda kullanılan peptid dizini (PGEKADRAEKADRA) >98% saflıkta ticari olarak sentezlenmiş (GenScript Biotech Corp. NJ, ABD) amelogeninin mineralizasyon yapabilen kısmını taklit edebilen 14 aminoasit uzunluğunda bir dizindir. Yapılan çalışmalarda diş sert yapılarına uygulandığında uygulandığı bölgelerde remineralizasyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir [118,137,172]. Hem amelogenin yapısını taklit edebilmesi, hem de osteoblastik kemik rejenerasyonunda mineralizasyona ihtiyaç duyulması nedeniyle çalışmada incelenmesine karar verilmiştir.

Kemik oluşumu, yeniden şekillenme ve iyileşme süreci, çeşitli hücre tiplerinin koordineli bir eylemini içerir. Bu süreçler sırasında osteoblast hücrelerinin biyolojisinin anlaşılmasındaki ilerlemeler, farklı kökenlerden çeşitli in vitro kültür modellerinin kullanılmasıyla sağlanmıştır. Yoğun kemik dokusu mühendisliği

araştırmaları döneminde, bu hücre modelleri, primer insan osteoblast hücrelerinin sınırlı mevcudiyeti nedeniyle giderek daha sık uygulanmaktadır [173]. Yapılan literatür incelemelerinde çeşitli tiplerde osteoblast hücre kültürlerinin kullanılmakta olduğu tespit edilmiştir. Ancak her bir hücre kültürü tipinin birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu hücre kültürleri kısaca primer insan kökenli hücreler, primer sıçan/fare kökenli hücreler, primer sığır/tavşan hücreleri, SaOs-2 (osteosarkom hücre dizisi), MG-63 (Jukstakortikal osteosarkom hücre dizisi) ve MC3T3-E1 (fare hücre dizisi) hücreleridir. Yapılan çalışmanın amacına ve benzer çalışmalarda kullanılan hücre kültürü tipine göre çalışmada kullanılacak olan hücre kültürünün belirlenmesi direk sonuçları etkileyebileceğinden çok önemlidir. MC3T3-E1, pre-osteoblastik fenotipin temsilcisi olan popüler bir osteoblast hücre dizisidir. Mineralizasyonunu askorbik asit ve inorganik fosfat ilavesi ile gösterir [174]. MC3T3-E1 hücreleri inkübe edildikleri andan itibaren 3. günde tip I kolajen sentezlemeye başlarlar. AF enzim aktivitesi 3. günden 21. güne kadar artarak devam eder. İlk mineral depozisyonlarını 14. günde gösterirler [175]. MC3T3-E1 hücrelerinin farklılaşması kültür ortamında kullanılan serum tipi ve serumda bulunan sitokinler ve büyüme faktörlerinden etkilenir. MC3T3-E1 hücre dizisi olmasına rağmen yüksek pasajlamalarda (36 ve üzeri) azalmış proliferasyon göstermeye başlar. Daha yüksek pasajlamalarda ise (60 ve üzeri) tutarsız hücre döngüsü sergilemeye başlar ki, bu da replikatif yaşlanmanın göstergesidir. İnsan hücrelerinde de bu sonuçlar benzerlik göstermektedir. Bu  zellikleri de kemiğin remodeling ve oluşumu için yapılan in vitro çalışmalarda MC3T3-E1 hücre dizisini ön plana çıkartır [176]. Yeni doğan farelerin kalvaryum kemiklerinden elde edilen MC3T3-E1 hücreleri in vivo koşullardaki osteoblast hücrelerine benzer davranış sergilemeleri nedeniyle bu çalışmada seçilmiştir. MC3T3-E1 hücreleri osteoblastik karakterde genler salgılamakta ve uygun koşullar sağlandığında osteoblast hücrelerine diferensiasyonu gerçekleşmektedir [168]. Bu nedenlerden ötürü yapılan tez çalışmasında EMD ve MPP3' n osteoblastlara etkisinin incelenmesi amacıyla MC3T3-E1 hücre dizisi kullanılmıştır.

Gerek EMD gerekse de jelatin+MPP3 materyali hücre kültürlerine uygulanırken hücrelerin ekiminin yapılacakları kuyucukların yüzeyine sürülmesi yoluyla hücrelerle uygulanan materyallerin direk teması sağlanmıştır. Bu konuda Jiang ve arkadaşları [163] MC3T3-E1 hücre dizisinde yaptıkları çalışmada EMD jeli bir

grupta hücre kültürü besiyeri içerisinde hücrelerle direk temasını sağlayacak şekilde, diğer bir grupta ise hücrelerle aralarında bir temas bulunmaksızın aynı ortamda aralarında geçirgen bir bariyer olacak şekilde bir düzenek oluşturmuşlardır. Çalışmanın sonucunda EMD jelin direk hücrelerle temasta olduğu grup ile direk temasın olmadığı grup arasında hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmamışlardır. Bu sonuç He ve arkadaşlarının [177] yaptıkları benzer çalışmalarla da desteklenmektedir. O nedenle bizim çalışmamızda EMD, jelatin ve jelatin+MPP3 gruplarında uygulanan materyallerin MC3T3-E1 hücreleri ile direk temasının sağlanması için hücreler ekilmeden önce kuyucukların tabanına jeller sürülmüştür.

Tıbbi materyal biyoyumluluk testi, ilgili materyale maruz kalmanın dokular üzerindeki olumsuz etki riskini değerlendirmek için kullanılır. Materyalin biyoyumlu olup olmadığını belirlemek için genellikle düzenleyici standartlara uygun olarak bir dizi test önerilir. Standartların önemli bir unsuru olan in vitro sitotoksitesite, her türlü tıbbi materyal için gerekli bir noktadır. Doğrulanmış her sitotoksitesite yönteminin, belirli bir testin seçimini etkileyebilecek farklı metodolojisi ve kabul kriterleri vardır. Ayrıca, bazı kılavuzlar, önerilen test yöntemleriyle ilgili olarak diğerlerinden daha spesifiktir. Örneğin, Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) nitel yöntemlere (örn. elüsyon, agar kaplama) göre nicel yöntemlerin (örn. tetrazolium (MTT/XTT), nötr kırmızı (NR) veya koloni oluşturma deneyleri (CFA)) tercihinden bahseder [178]. MTT/XTT analizleri nicel olarak objektif ve rakamsal değerler verebildikleri için genellikle tercih edilirler. Bu analizleri yapabilmek için metabolik aktivite gösteren hücrelerin substratlarının renkli solüsyonlar haline getirilmesi gerekmektedir, ancak MTT çözünebilir bir ürün olmadığı için hücrelerin incelemenden önce lizis edilmesi gerekmektedir. XTT prosedüründe ise lizise gerek yoktur [179], [180]. Bu nedenle çalışmamızda XTT analiz yöntemi tercih edilmiştir. XTT biyokimyasal yöntemlerin kullanıldığı hücre fonksiyon testleridir. Hücre büyümesinin inhibisyonunu dolaylı olarak ölçer. “Temel hücre fonksiyonlarında” (yani mitokondri, plazma zarı bütünlüğü, vb. gibi hücre fonksiyonu üzerindeki) spesifik olmayan değişimlerin ve etkilerin bir sonucudur. Daha sonra hücrenin bozulmasına veya ölümüne yol açabilecek bu etkiler üzerinde yoğunlaşılır [180,181]. Schwarz ve arkadaşları [182] hücre canlılığını EMD ile değerlendirdikleri çalışmalarında birinci günün sonunda ideal kontrol

koşullarına nazaran daha düşük seviyelerde, ama sitatoksisite sınırına ulaşmayan sonuçlar bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada Qu ve arkadaşları [183] farklı konsantrasyonlardaki EMD'nin osteoblast MG-63 hücrelerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar kontrol grubunun %100 olarak kabul edildiği koşullarda farklı konsantrasyonlardaki EMD değerleri için %90-75 arası değerler bulduklarını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla %82,5 değeri bulunmuştur. Herhangi bir şekilde MPP3 değerlerini kıyaslama yapabileceğimiz bir çalışma olmaması nedeniyle, EMD değerlerinde benzer çalışmalardan elde edilen bulgularla benzerlik gösteren sonuçlar metodolojimizin çalıştığıının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.

AF enzimi, mineralize doku hücrelerinde ekspresyonu bir hayli yüksek olan, sert doku oluşumunun önemli bir bileşenidir. Enzim, hücrelerin plazma membranlarının dış kısmında ve matriks veziküllerinin membranında lokalizedir. AF, ortamdaki inorganik fosfat lokal oranlarını artırır ve mineralizasyonu kolaylaştırır, ayrıca mineral oluşumunun bir inhibitörü olan hücre dışı pirofosfat konsantrasyonunu azaltır. Enzim ekspresyonunun yeni doku mineralizasyonunda iyi bir belirteç olduğu bilinmektedir [184]. Bu nedenle AF testine başvurulmuştur.

EMD'nin MC3T3-E1 ve C2C12 osteoprogenitör hücrelerde AF aktivitesini arttırdığı ve osteoblastik farklılaşma sırasında mezenkimal kök hücrelerde mineralize nodül oluşumunu desteklediği çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir [185,186]. Öte yandan, amelogeninlerin, MC3T3-E1 hücreleri ve sementoblastlar dahil olmak üzere mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını inhibe ettiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur [187,188]. Takayashi ve arkadaşları [189] yaptıkları bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer bir şekilde farklı rekombinant amelogenin türevi bir peptidi, EMD ile hem HAT-7 (dental epitel hücreleri) hücre kültüründe hem de MC3T3-E1 hücre kültüründe çalışmışlardır. Araştırmacılar değişen konsantrasyonlarda uyguladıkları EMD ile elde ettikleri AF değerlerini kıyasladıklarında EMD konsantrasyonunun 0.01-1 µg/mL aralığında olduğu koşullarda AF değerlerinin kontrol grubuna nazaran arttığını. Ancak EMD konsantrasyonunun 100 µg/mL değerinde kullanıldığında AF değerlerinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Çalışmacılar, EMD konsantrasyonunun artmasıyla beraber MC3T3-E1 hücrelerinin bifazik bir feed-back mekanizması ile ankilozu engellemek için anti-amelogenin

yapılar salgılayabilecekleri savını ortaya atmışlardır. Bizim çalışmamızda ticari olarak kullanılan EMD, MC3T3-E1 hücre dizisinde AF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağlamıştır. Bunun yanı sıra Jelatin+MPP3 grubu da saf Jelatin ve kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağlayarak kendini belli etmiştir.

He ve arkadaşları [190] yaptıkları çalışmada EMD'nin osteoblast proliferasyonu ve diferensiyasyonunu ve osteoproteglerin ekspresyonunu artırdığını iddia etmişler ve MC3T3-E1 hücrelerinde çalışmışlardır. AF değerlerini inceledikleri çalışmada EMD grubu kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek çıkmıştır. Bu sonuçlar da bizim çalışmamızla uygun veriler göstermektedir.

Çalışmada aynı zamanda alizarin kırmızı boyama (Alizarin Kırmızı Staining-ARS) testi yapılmıştır. Alizarin kırmızı canlılarda kemikleşmenin belirlenmesinde kullanılan, özellikle kemiksi yapılardaki kalsiyum fosfata özgü olan, organik kökenli bir boya maddesidir. Hücre kültürlerine eklendiği zaman ne kadar Ca^{++} 'a bağlanırsa o kadar kırmızı renk alır ve ortamda o kadar çok mineral var demektir. ARS, kalsiyum birikimi için tahlil olarak kolayca uygulanabilir ve spektrofotometrik olarak ölçülerek rakamsal sonuçlar verebilen bir yöntemdir [190]. Çalışmamızda ARS yapılırken tüm gruplar hem askorbik asit ilave edilen, hem de askorbik asit olmaksızın boyamaya sokuldu.

Askorbik asitin direk osteoblast fonksiyonuna katıldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [191–193]. Hücre kültürü ortamına askorbik asit kofaktör olarak katıldığı zaman, oluşmakta olan kolajen içersindeki prolin ve lizinleri hidroksilasyona (Bileşikteki hidrojen atomunun hidroksil grubu ile yer değiştirmesi: Hidroksillenme) uğratarak düzgün kolajen ekstrasellüler matriks oluşumu için hücre kültürü medyasında ideal bir ortam yaratır [194]. Askorbik asit hücre kültürü ortamında unstabil olduğu için, uzun süre etki gösterebilmesi amacıyla askorbik asit 2-fosfat kullanılır [195]. Askorbik asitin osteoblast hücre kültürüne ilavesi ile hücre proliferasyonu, kolajen ve AF gen ekspresyonu ve protein sentezi artmaktadır. Çalışmamızda ARS tekniğinde elde edilen bulgularda askorbik asit ilave edilen tüm gruplarda bu artış gözlenmiştir. Osteoblast hücre kültürleri için 50 µg/mL askorbik asit 2-fosfat konsantrasyonu yeterli bulunmaktadır [196]. Bu

nedenden ötürü bizim çalışmamızda da ilave edilen askorbik asit aynı konsantrasyonda uygulanmıştır.

Jeong ve arkadaşları [197] Mineral Trioksit Agregat (MTA), BMP-2 ve EMD'yi MC3T3-E1 hücre kültürü ortamında kıyasladıkları çalışmalarında ARS testini askorbik asit ilavesi yapmaksızın kullanmışlar ve sonuçları grupların arasında o koşullarda değerlendirmişlerdir. Çalışmalarının sonuçlarına göre BMP-2 ve BMP-2/MTA kombinasyonu olan gruplarda EMD, EMD/MTA kombinasyon ve MTA gruplarına nazaran daha fazla ARS sonucu bulguladıklarını belirtmişlerdir. Takahashi ve arkadaşları [189] ise MC3T3-E1 hücre dizisi çalıştıkları uzun zincirli sentetik amelogenin türevi peptidlerinin hücrelere etkisini incelemişler, ARS çalışmasını askorbik asit eklenen hücre kültürlerinde yapmışlardır. Bizim tez çalışmasında askorbik asit eklenen tüm gruplarda literatür bilgisi ile uyumlu bir şekilde daha yüksek ARS değerleri tespit edilmiştir. Ayrıca askorbik asit ilavesi olmayan hücre kültürü sonuçlarında EMD ile Jelatin+MPP3 grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan fark, askorbik asit ilavesi ile ortadan kalkmıştır. Bu sonuç Jelatin+MPP3 materyalinin askorbik asit ilaveli ortamda EMD ile benzer mineralizan cevap verdiği şeklinde yorumlanmıştır.

SEM incelemesi daha detaylı büyütmelelerde ortaya çıkan hücre morfolojilerinin görüntülenmesi için çalışmaya katılmıştır. Yapılan incelemelerde ortaya çıkan görüntülere göre hücre morfolojilerinin birbirlerine benzerlik gösterdiği ve uygulanan materyallerin hücrelerin ideal koşullarda gelişimini tamamladığı kontrol grubuna nazaran anormal yapılar sergilemedikleri gözlenmiştir. Bu konuda yapılan literatür incelemesinde benzer hücre kültürü çalışmalarında SEM görüntülemelerinin sadece hücre morfolojisi incelemek için değil aynı zamanda hücrelerin etrafındaki mineral depozisyonlarını da görüntülemek için daha fazla büyütmelelerle kullanıldığı tespit edilmiştir [169].

Floresan kelimesi farklı bir dalga boyunda ışık emisyonunu tanımlamaktadır. Bu teknik, bir numunenin belirli kısımlarını boyayabilmek için floresanla etiketlenmiş antikoları kullanır. Bu sayede aynı hücrenin aynı kesitte membran ve sitoplazmasını ayrı bir renge boyarken çekirdeğini farklı renge boyamak mümkün olmaktadır [198]. Farklı materyaller uygulanmış olan yüzeylerde benzer hücre

morfolojilerinin gözlemlenmesi; mineralizasyonda AF aktivitesi ve Alizarin Kırmızı boyaması ile tespit edilen farklılıkların hücre tutunması veya yayılmasına bağlı dolaylı bir etkiden ziyade, doğrudan mineralizasyon mekanizmalarına bağlı bir etkiden kaynaklandığına işaret etmektedir.

Emdogain'in içeriğindeki bileşenlerin moleküler yolları etkileyerek (mineralizasyonla ilgili genleri aktive ederek) mineralizasyonu teşvik ettiğine işaret eden çalışmalar vardır[56,60,158,185]. MPP3'ün moleküler yollar üzerinde bir etkisi olup olmadığına dair bir çalışma ise henüz yapılmamıştır. Hücre içermeyen in vitro mineralizasyon modelleri ile yapılan bir çalışmada, MPP3'ün yüksek kalsiyum ve fosfat iyonları içeren lokal çekirdeklenme noktaları oluşturarak mineralizasyonu teşvik ettiği öne sürülmüştür [141]. Bu çalışmada hücre kültürü modelinde gözlemlenen mineralizasyon artışının da aynı mekanizma aracılığıyla gerçekleşmiş olması kuvvetle muhtemeldir. Literatürlerde EMD'nin dahil olduğu osteoblast çalışmalarında floresans görüntüleme tekniği kullanılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu teknikle elde edilen hücre görüntülemelerinin SEM tekniğinde benzer şekilde hücre morfolojilerinde bir fark yaratmaması uyguladığımız yöntemin geçerliliğinin dayanak noktası olmuştur.

Yaptığımız tez çalışmasının literatürde MPP3 materyalinin osteoblast hücre kültürlerinde yapıldığı ilk çalışma olması nedeniyle tartışma kısmında elde edilen sonuçların değerliliği ve güvenilirliği fazla irdelenememiştir. Bu nedenle daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Yapılan bu tez çalışmasının ışığında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. AF aktivitesinin incelendiği gruplarda Jelatin+MPP3 grubu EMD kadar olmasa da hücre kültürlerinde kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermiştir. Bu bulgular MPP3 materyalinin osteoblast hücre kültürlerinde aktif olarak çalıştığı şeklinde yorumlanmıştır.
2. Uygulanan materyallerin sitotoksitesinin değerlendirildiği XTT gruplarında Jelatin grubu sitatoksik sonuçlar verirken Jelatin+MPP3 grubu sitatoksik olmayan değerler ortaya çıkarmıştır.
3. ARS çalışmalarında özellikle askorbik asit ilavesi yapılan gruplarda Jelatin+MPP3 grubu ve EMD grubu arasında istatistiksel olarak bir fark çıkmaması MPP3 lehine olumlu olarak yorumlanmıştır.
4. EMD'nin hayvansal kökenli olması, hayvan hakları savunucuları tarafından üretim şeklinin çeşitli tepkilere neden olması, bazı inanç ve inanışlara göre domuz menşeli bir ürüne sıcak yaklaşılması ve çok pahalı olması nedeniyle mevcut bulgular ışığında Jelatin+MPP3 materyalinin ileride yapılacak klinik çalışmalar için umut verici olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Annunziata, M., Piccirillo, A., Perillo, F., Cecoro, G., Nastri, L., and Guida, L. (2019). Enamel Matrix Derivative and Autogenous Bone Graft for Periodontal Regeneration of Intrabony Defects in Humans: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Materials* (Basel, Switzerland), 12(16). <https://doi.org/10.3390/MA121626342>.
2. Onizuka, S., and Iwata, T. (2019). Application of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets for Periodontal Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 20, Page 2796, 20(11), 2796. <https://doi.org/10.3390/IJMS20112796>.
3. Slots, J. (2017). Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontology* 2000, 75(1), 7–23. <https://doi.org/10.1111/PRD.122214>.
4. Crocombe, L. (2015). Three Years of Water Fluoridation May Lead to a Decrease in Dental Caries Prevalence and Dental Caries Experience in a Community With High Caries Rates. *The Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 15(3), 124–125. <https://doi.org/10.1016/J.JEBDP.2015.07.0086>.
5. McLaren, L., Patterson, S., Thawer, S., Faris, P., McNeil, D., Potestio, M. L., and Shwart, L. (2017). Exploring the short-term impact of community water fluoridation cessation on children's dental caries: a natural experiment in Alberta, Canada. *Public Health*, 146, 56–64. <https://doi.org/10.1016/J.PUHE.2016.12.040>.
6. Elias-Boneta, A. R., Toro, M. J., Rivas-Tumanyan, S., Murillo, M., Orraca, L., Encarnacion, A., Cernigliaro, D., Toro-Vizcarrondo, C., and Psoter, W. J. (2016). Persistent oral health disparity in 12-year-old Hispanics: A cross-sectional study. *BMC Oral Health*, 16(1), 1-10. doi: 10.1186/s12903-016-0162-7.
7. Wu, Y. C., Lin, L. K., Song, C. J., Su, Y. X., and Tu, Y. K. (2017). Comparisons of periodontal regenerative therapies: A meta-analysis on the long-term efficacy. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(5), 511–519. <https://doi.org/10.1111/JCPE.12715>
8. Wang, M., Xie, J., Wang, C., Zhong, D., Xie, L., and Fang, H. (2020). Immunomodulatory Properties of Stem Cells in Periodontitis: Current Status and Future Prospective. *Stem Cells Int.*, 8, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2020/98365189>.
9. Kotronia, E., Brown, H., Papacosta, A. O., Lennon, L. T., Weyant, R. J., Whincup, P. H., Wannamethee, S. G., and Ramsay, S. E. (2021). Oral health and all-cause, cardiovascular disease, and respiratory mortality in older people in the UK and USA. *Scientific Reports*, (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-95865-Z>.

10. Madore, F. (2009). Periodontal disease: A modifiable risk factor for cardiovascular disease in ESRD patients? *Kidney International*, 75(7), 672–674. <https://doi.org/10.1038/KI.2009.15>.
11. Chen, Y. T., Shih, C. J., Ou, S. M., Hung, S. C., Lin, C. H., and Tarng, D. C. (2015). Periodontal Disease and Risks of Kidney Function Decline and Mortality in Older People: A Community-Based Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 66(2), 223–230. <https://doi.org/10.1053/J.AJKD.2015.01.010>.
12. Kshirsagar, A. V., and Grubbs, V. (2015). Periodontal Disease and CKD-Associated Morbidity: Is There Now Enough Evidence to Move from Observation to Intervention? *American Journal of Kidney Diseases*, 66(2), 181–183. <https://doi.org/10.1053/J.AJKD.2015.05.009>.
13. Aimetti, M. (2014). Nonsurgical periodontal treatment. *The International Journal of Esthetic Dentistry*, 9(2), 251–267.
14. Drisko, C. L. (2014). Periodontal debridement: Still the treatment of choice. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 14(SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/J.JEBDP.2014.02.007>.
15. Heitz-Mayfield, L. J. A., and Lang, N. P. (2013). Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontology 2000*, 62(1), 218–231. <https://doi.org/10.1111/PRD.12008>.
16. Kulakauskienė, R., Aukštakalnis, R. Š. (2020). Enamel matrix derivate induces periodontal regeneration by activating growth factors: A review. *Stomatologija*, 22(2), 49–53.
17. Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54 Suppl 1, S11–S26. <https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2009.01140.X>.
18. Ramseier, C. A., Abramson, Z. R., Jin, Q., and Giannobile, W. V. (2006). Gene therapeutics for periodontal regenerative medicine. *Dental Clinics of North America*, 50(2), 245–263. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2005.12.001>.
19. Ripamonti, U., and Reddi, A. H. (1997). Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 8(2), 154–163. <https://doi.org/10.1177/10454411970080020401>.
20. Bartold, P. Mark, McCulloch, C. A. G., Narayanan, A. S., and Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000*, 24(1), 253–269. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0757.2000.2240113.X>.
21. Onizuka, S., and Iwata, T. (2019). Molecular Sciences Application of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets

- for Periodontal Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11):2796. <https://doi.org/10.3390/ijms20112796>.
22. Sculean, Anton, Nikolidakis, D., Nikou, G., Ivanovic, A., Chapple, I. L. C., and Stavropoulos, A. (2015). Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontology 2000*, 68(1), 182–216. <https://doi.org/10.1111/PRD.12086>.
 23. Reynolds, M. A., Aichelmann-Reidy, M. E., Branch-Mays, G. L., and Gunsolley, J. C. (2003). The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Annals of Periodontology*, 8(1), 227–265. <https://doi.org/10.1902/ANNALS.2003.8.1.227>.
 24. Kao, R. T., Nares, S., and Reynolds, M. A. (2015). Periodontal Regeneration – Intrabony Defects: A Systematic Review From the AAP Regeneration Workshop. *Journal of Periodontology*, 86(2-s), S77–S104. <https://doi.org/10.1902/JOP.2015.130685>.
 25. Murphy, K. G., and Gunsolley, J. C. (2003). Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Annals of Periodontology / the American Academy of Periodontology*, 8(1), 266–302. <https://doi.org/10.1902/ANNALS.2003.8.1.266>.
 26. Froum, S. J., Thaler, R., Scopp, I. W., and Stahl, S. S. (1975). Osseous Autografts: II. Histological Responses to Osseous Coagulum-Bone Blend Grafts. *Journal of Periodontology*, 46(11), 656–661. <https://doi.org/10.1902/JOP.1975.46.11.656>.
 27. Hiatt, W. H., Schallhorn, R. G., and Aaronian, A. J. (1978a). The Induction of New Bone and Cementum Formation: IV. Microscopic Examination of the Periodontium Following Human Bone and Marrow Allograft, Autograft and Nongraft Periodontal Regenerative Procedures. *Journal of Periodontology*, 49(10), 495–512. <https://doi.org/10.1902/JOP.1978.49.10.495>.
 28. Hawley, C. E., and Miller, J. (1975). A histologic examination of a free osseous autograft. Case report. *Journal of Periodontology*, 46(5), 289–293. <https://doi.org/10.1902/JOP.1975.46.5.289>.
 29. Hernández-Monjaraz, B., Santiago-Osorio, E., Monroy-García, A., Ledesma-Martínez, E., and Mendoza-Núñez, V. M. (2018). Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, Page 944, 19(4), 944. <https://doi.org/10.3390/IJMS19040944>.
 30. Chen, F. M., and Jin, Y. (2010). Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(2), 219–255. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2009.0562>.

31. Bartold, P. M., Gronthos, S., Ivanovski, S., Fisher, A., and Hutmacher, D. W. (2016). Tissue engineered periodontal products. *Journal of Periodontal Research*, 51(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/JRE.12275>.
32. Rabalais, M. L., Yukna, R. A., and Mayer, E. T. (1981). Evaluation of Durapatite Ceramic as an Alloplastic Implant in Periodontal Osseous Defects: I. Initial Six-Month Results. *Journal of Periodontology*, 52(11), 680–689.
33. Kenney, E. B., Lekovic, V., Han, T., Carranza, F. A., and Dimitrijevic, B. (1985). The use of a porous hydroxylapatite implant in periodontal defects. I. Clinical results after six months. *Journal of Periodontology*, 56(2), 82–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2984404>.
34. Meffert, R. M., Thomas, J. R., Hamilton, K. M., and Brownstein, C. N. (1985). Hydroxylapatite as an alloplastic graft in the treatment of human periodontal osseous defects. *Journal of Periodontology*, 56(2), 63–73. <https://doi.org/10.1902/JOP.1985.56.2.63>.
35. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., and Lindhe, J. (1982). The regenerative potential of the periodontal ligament: An experimental study in the monkey. *Journal of Clinical Periodontology*, 9(3), 257–265. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.1982.TB02065.X>.
36. Houston, F., Sarhed, G., Nyman, S., Lindhe, J., and Karring, T. (1985). Healing after root reimplantation in the monkey. *Journal of Clinical Periodontology*, 12(9), 716–727. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.1985.TB01397.X>.
37. Bowers, G. M., Chadroff, B., Carnevale, R., Mellonig, J., Corio, R., Emerson, J., Stevens, M., and Romberg, E. (1989a). Histologic Evaluation of New Attachment Apparatus Formation in Humans. Part I. *Journal of Periodontology*, 60(12), 675–682. <https://doi.org/10.1902/JOP.1989.60.12.675>.
38. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., and Rylander, H. (1982). New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 9(4), 290–296. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.1982.TB02095.X>.
39. Xu, X. Y., Li, X., Wang, J., He, X. T., Sun, H. H., and Chen, F. M. (2019). Concise Review: Periodontal Tissue Regeneration Using Stem Cells: Strategies and Translational Considerations. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(4), 392–403. <https://doi.org/10.1002/SCTM.18-0181>.
40. Hu, L., Liu, Y., and Wang, S. (2018). Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Diseases*, 24(5), 696–705. <https://doi.org/10.1111/ODI.12703>.
41. Guida, L., Annunziata, M., Carinci, F., Di Feo, A., Passaro, I., and Oliva, A. (2007). In vitro biologic response of human bone marrow stromal cells to enamel matrix derivative. *Journal of Periodontology*, 78(11), 2190–2196. <https://doi.org/10.1902/JOP.2007.070185>.

42. Chen, F. M., Zhang, J., Zhang, M., An, Y., Chen, F., and Wu, Z. F. (2010). A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*, 31(31), 7892–7927. <https://doi.org/10.1016/J.BIO MATERIALS.2010.07.019>.
43. Wang, H.L., Greenwell, H., Fiorellini, J., Giannobile, W., Offenbacher, S., Salkin, L., Townsend, C., Sheridan, P, and Genco, R.J. (2005). Periodontal regeneration. *Journal of Periodontology*, 76(9), 1601–1622. <https://doi.org/10.1902/JOP.2005.76.9.1601>.
44. Wang, H. L., and Cooke, J. (2005). Periodontal regeneration techniques for treatment of periodontal diseases. *Dental Clinics of North America*, 49(3 SPEC. ISS.), 637–659. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2005.03.004>.
45. Miron, R. J., Moraschini, V., Fujioka-Kobayashi, M., Zhang, Y., Kawase, T., Cosgarea, R., Jepsen, S., Bishara, M., Canullo, L., Shirakata, Y., Gruber, R., Ferenc, D., Calasans-Maia, M. D., Wang, H. L., and Sculean, A. (2021). Use of platelet-rich fibrin for the treatment of periodontal intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 25(5), 2461–2478. <https://doi.org/10.1007/S00784-021-03825-8>.
46. Carmagnola, D., Pellegrini, G., Dellavia, C., Rimondini, L., and Varoni, E. (2019). Tissue engineering in periodontology: Biological mediators for periodontal regeneration. *The International Journal of Artificial Organs*, 42(5), 241–257. <https://doi.org/10.1177/0391398819828558>.
47. Rios, H. F., Lin, Z., Oh, B., Park, C. H., and Giannobile, W. V. (2011). Cell- and Gene-Based Therapeutic Strategies for Periodontal Regenerative Medicine. *Journal of Periodontology*, 82(9), 1223–1237. <https://doi.org/10.1902/JOP.2011.100710>.
48. Karring, T. (2000). Regenerative periodontal therapy. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 2(4), 101–109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12666967>.
49. Schwartz, Z., Carnes, D. L., Pulliam, R., Lohmann, C. H., Sylvia, V. L., Liu, Y., Dean, D. D., Cochran, D. L., and Boyan, B. D. (2000). Porcine Fetal Enamel Matrix Derivative Stimulates Proliferation But Not Differentiation of Pre-Osteoblastic 2T9 Cells, Inhibits Proliferation and Stimulates Differentiation of Osteoblast-Like MG63 Cells, and Increases Proliferation and Differentiation of Normal Human Osteoblast NHOst Cells. *Journal of Periodontology*, 71(8), 1287–1296. <https://doi.org/10.1902/JOP.2000.71.8.1287>.
50. Soydan N. (1993). Diş Hekimleri için gelişim ve büyüme. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi yayınları*, 80-130, İstanbul,Türkiye.
51. Ten Gate, A. R. (1996). The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support. *Oral Diseases*, 2(1), 55–62. <https://doi.org/10.1111/J.1601-0825.1996.TB00204.X>.

52. Hammarström, L. (1997a). Enamel matrix, cementum development and regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(9 Pt 2), 658–668. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.1997.TB00247.X>.
53. Hammarström, L. (1997b). The role of enamel matrix proteins in the development of cementum and periodontal tissues. *Ciba Foundation Symposia*, 205, 246–260. <https://doi.org/10.1002/9780470515303.CH17>.
54. Fong, C. D., and Hammarström, L. (2000). Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 90(2), 218–223. <https://doi.org/10.1067/MOE.2000.107052>.
55. Giannobile, W. V., and Somerman, M. J. (2003). Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Annals of Periodontology / the American Academy of Periodontology*, 8(1), 193–204. <https://doi.org/10.1902/ANNALS.2003.8.1.193>.
56. Kalpidis, C. D. R., and Ruben, M. P. (2002). Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *Journal of Periodontology*, 73(11), 1360–1376. <https://doi.org/10.1902/JOP.2002.73.11.1360>.
57. Cochran, D. L., Jones, A., Heijl, L., Mellonig, J. T., Schoolfield, J., and King, G. N. (2003). Periodontal Regeneration with a Combination of Enamel Matrix Proteins and Autogenous Bone Grafting. *Journal of Periodontology*, 74(9), 1269–1281. <https://doi.org/10.1902/JOP.2003.74.9.1269>.
58. Froum, Stuart J., Weinberg, M. A., Rosenberg, E., and Tarnow, D. (2001). A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a 12-month re-entry study. *Journal of Periodontology*, 72(1), 25–34. <https://doi.org/10.1902/JOP.2001.72.1.25>.
59. Velasquez-Plata, D., Todd Scheyer, E., and Mellonig, J. T. (2002). Clinical Comparison of an Enamel Matrix Derivative Used Alone or in Combination With a Bovine-Derived Xenograft for the Treatment of Periodontal Osseous Defects in Humans. *Journal of Periodontology*, 73(4), 433–440. <https://doi.org/10.1902/JOP.2002.73.4.433>.

60. Scheyer, E. T., Velasquez-Plata, D., Brunsvold, M. A., Lasho, D. J., and Mellonig, J. T. (2002). A Clinical Comparison of a Bovine-Derived Xenograft Used Alone and in Combination With Enamel Matrix Derivative for the Treatment of Periodontal Osseous Defects in Humans. *Journal of Periodontology*, 73(4), 423–432. <https://doi.org/10.1902/JOP.2002.73.4.423>.
61. Bosshardt, D. D. (2008). Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), 87–105. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2008.01264.X>.
62. Sculean, A., Donos, N., Reich, E., Karring, T., and Brex, M. (1998). Regeneration of oxytalan fibres in different types of periodontal defects: a histological study in monkeys. *Journal of Periodontal Research*, 33(8), 453–459. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0765.1998.TB02344.X>.
63. Yukna, R. A., and Mellonig, J. T. (2000). Histologic evaluation of periodontal healing in humans following regenerative therapy with enamel matrix derivative. A 10-case series. *Journal of Periodontology*, 71(5), 752–759. <https://doi.org/10.1902/JOP.2000.71.5.752>.
64. Sallum, E. A., Pimentel, S. P., Saldanha, J. B., Nogueira-Filho, G. R., Casati, M. Z., Nociti, F. H., and Sallum, A. W. (2004). Enamel Matrix Derivative and Guided Tissue Regeneration in the Treatment of Dehiscence-Type Defects: A Histomorphometric Study in Dogs. *Journal of Periodontology*, 75(10), 1357–1363. <https://doi.org/10.1902/JOP.2004.75.10.1357>.
65. Wachtel, H., Schenk, G., Böhm, S., Weng, D., Zuhr, O., and Hürzeler, M. B. (2003). Microsurgical access flap and enamel matrix derivative for the treatment of periodontal intrabony defects: A controlled clinical study. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(6), 496–504. <https://doi.org/10.1034/J.1600-051X.2003.00013.X>.
66. Fickl, S., Thalmair, T., Kebschull, M., Böhm, S., and Wachtel, H. (2009). Microsurgical access flap in conjunction with enamel matrix derivative for the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(9), 784–790. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2009.01451.X>.
67. Meyle, J., Hoffmann, T., Topoll, H., Heinz, B., Al-Machot, E., Jervøe-Storm, P. M., Meiß, C., Eickholz, P., and Jepsen, S. (2011). A multi-centre randomized controlled clinical trial on the treatment of intra-bony defects with enamel matrix derivatives/synthetic bone graft or enamel matrix derivatives alone: Results after 12 months. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(7), 652–660. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2011.01726.X>.
68. Esposito, M., Grusovin, M. G., Papanikolaou, N., Coulthard, P., and Worthington, H. V. (2009). Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *The Cochrane Database*

of Systematic Reviews, 2009(4).
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD003875.PUB3>.

69. Koop, R., Merheb, J., and Quirynen, M. (2012). Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in reconstructive periodontal therapy: a systematic review. *Journal of Periodontology*, 83(6), 707–720. <https://doi.org/10.1902/JOP.2011.110266>.
70. Robinson, C., Brookes, S. J., Shore, R. C., and Kirkham, J. (1998). The developing enamel matrix: nature and function. *European Journal of Oral Sciences*, 106 Suppl 1(1 SUPPL.), 282–291. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.1998.TB02188.X>.
71. Brookes, S. J., Robinson, C., Kirkham, J., and Bonass, W. A. (1995). Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Archives of Oral Biology*, 40(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(94\)00135-X](https://doi.org/10.1016/0003-9969(94)00135-X).
72. Hu, J. C. C., Sun, X., Zhang, C., and Simmer, J. P. (2001). A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *European Journal of Oral Sciences*, 109(2), 125–132. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0722.2001.00998.X>.
73. Simmer, J.P., Lau, E.C., Hu, C.C., Aoba, T., Lacey, M., Nelson, D., Zeichner-David, M., Snead, M.L., Slavkin, H.C., Fincham, A.G. (1994) Isolation and characterization of a mouse amelogenin expressed in Escherichia coli. *Calcif Tissue Int.* 54(4):312-9. doi: 10.1007/BF00295956. PMID: 8062146.
74. Bowers, G. M., Chadroff, B., Carnevale, R., Mellonig, J., Corio, R., Emerson, J., Stevens, M., and Romberg, E. (1989b). Histologic Evaluation of New Attachment Apparatus Formation in Humans. Part II. *Journal of Periodontology*, 60(12), 683–693. <https://doi.org/10.1902/JOP.1989.60.12.683>.
75. Fincham, A. G., Moradian-Oldak, J., and Simmer, J. P. (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *Journal of Structural Biology*, 126(3), 270–299. <https://doi.org/10.1006/JSBI.1999.4130>.
76. Zeichner-David, M. (2001). Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 20(5–6), 307–316. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00155-X).
77. Slavkin HC. (1976). Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. Cementogenesis revisited. *Journal of Dental Research*, 47(5),249-55. doi: 10.1902/jop.1976.47.5.249.
78. Zeichner-David, Margarita. (2006). Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontology 2000*, 41(1), 196–217. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0757.2006.00162.X>.

79. Gestrelus, S., Andersson, C., Johansson, AC., Persson, E., Brodin, A., Rydhag, L., and Hammarström, L. (1997). Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(9 Pt 2), 678–684. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.1997.TB00249.X>.
80. Maycock, J., Wood, S. R., Brookes, S. J., Shore, R. C., Robinson, C., and Kirkham, J. (2002). Characterization of a porcine amelogenin preparation, EMDOGAIN, a biological treatment for periodontal disease. *Connective Tissue Research*, 43(2–3), 472–476. <https://doi.org/10.1080/03008200290000880>.
81. Garrett, S. (1996). Periodontal regeneration around natural teeth. *Annals of Periodontology*, 1(1), 621–666. <https://doi.org/10.1902/ANNALS.1996.1.1.621>.
82. Heijl, L. (1997). Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(9 Pt 2), 693–696. <https://doi.org/10.1034/J.1600-051X.1997.00693.X>.
83. Jiang, J., Safavi, K. E., Spangberg, L. S. W., and Zhu, Q. (2001). Enamel matrix derivative prolongs primary osteoblast growth. *Journal of Endodontics*, 27(2), 110–112. <https://doi.org/10.1097/00004770-200102000-00013>.
84. Margolis, H. C., Beniash, E., and Fowler, C. E. (2006). Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *Journal of Dental Research*, 85(9), 775–793. <https://doi.org/10.1177/154405910608500902>.
85. Bratthall, G., Lindberg, P., Havemose-Poulsen, A., Holmstrup, P., Bay, L., Söderholm, G., Norderyd, O., Andersson, B., Rickardsson, B., Hallström, H., Kullendorff, B., and Sköld Bell, H. (2001). Comparison of ready-to-use EMDOGAIN-gel and EMDOGAIN in patients with chronic adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(10), 923–929. <https://doi.org/10.1034/J.1600-051X.2001.028010923.X>.
86. Kawase, T., Okuda, K., Momose, M., Kato, Y., Yoshie, H., and Burns, D. M. (2001). Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *Journal of Periodontal Research*, 36(6), 367–376. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0765.2001.360604.X>.
87. Arweiler, N. B., Auschill, T. M., Donos, N., and Sculean, A. (2002). Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality. *Clinical Oral Investigations*, 6(4), 205–209. <https://doi.org/10.1007/S00784-002-0185-0>.
88. Sculean, Anton, Auschill, T. M., Donos, N., Brex, M., and Arweiler, N. B. (2008). Effect of an enamel matrix protein derivative (Emdogain®) on ex vivo dental plaque vitality. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(11), 1074–1078. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2001.281113.X>.

89. Spahr, A., Lyngstadaas, S. P., Boeckh, C., Andersson, C., Podbielski, A., and Haller, B. (2002). Effect of the enamel matrix derivative Emdogain on the growth of periodontal pathogens in vitro. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(1), 62–72. <https://doi.org/10.1034/J.1600-051X.2002.290110.X>.
90. Cuisinier, F. J. G., Steuer, P., Senger, B., Voegel, J. C., and Frank, R. M. (1992). Human amelogenesis. I: High resolution electron microscopy study of ribbon-like crystals. *Calcified Tissue International*, 51(4), 259–268. <https://doi.org/10.1007/BF00334485>.
91. Blomlöf, J. (1996). Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(1), 50–55. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.1996.TB00504.X>.
92. Blomlöf, J., and Lindskog, S. (1995). Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. *European Journal of Oral Sciences*, 103(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.1995.TB00005.X>.
93. Sculean, Anton, Berakdar, M., Willershausen, B., Arweiler, N. B., Becker, J., and Schwarz, F. (2006). Effect of EDTA root conditioning on the healing of intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative. *Journal of Periodontology*, 77(7), 1167–1172. <https://doi.org/10.1902/JOP.2006.050300>.
94. Harrison, J. W., and Roda, R. S. (1995). Intermediate cementum. Development, structure, composition, and potential functions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 79(5), 624–633. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(05\)80106-4](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(05)80106-4).
95. Shimizu-Ishiura, M., Tanaka, S., Lee, W. S., Debari, K., and Sasaki, T. (2002). Effects of enamel matrix derivative to titanium implantation in rat femurs. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(2), 269–276. <https://doi.org/10.1002/JBM.10064>.
96. Özerol, N.B., Yılmaz, N.A., Bodrumlu, E. (2014). Diş Hekimliğinde Emdogain. *Acta Odontol Turc*, 31(1), 43–48.
97. Zetterström, O., Andersson, C., Eriksson, L., Fredriksson, A., Friskopp, J., Heden, G., Jansson, B., Lundgren, T., Nilveus, R., Olsson, A., Renvert, S., Salonen, L., Sjöström, L., Winell, A., Ostgren, A., Gestrelus, S. (1997) Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol*. 24(9 Pt 2):697-704. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00252.x. PMID: 9310875.
98. Mandu-Hirit, M., Haque, T., Lauzier, D., Kotsioprifitis, M., Rauch, F., Tabrizian, M., Handerson, J.E., and Hamdy, R.C. (2006). Early injection of OP-1 during distraction osteogenesis accelerates new bone formation in rabbits. *Growth Factors* (Chur, Switzerland), 24(3), 172–183. <https://doi.org/10.1080/08977190600621362>.

99. Rachke, MJ., Bail, H., Windhagen, HJ., Kolbeck, SF., Weiler, A., Raun, K., Kappelgard, A., Skiaerbaek, C, and Haas, NP. (1999). Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone*, 24(2), 81–88. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(98\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(98)00158-6).
100. Liu, Y., Luo, D., and Wang, T. (2016). Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small* (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany), 12(34), 4611–4632. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201600626>.
101. Beniash, E. (2011). Biominerals--hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(1), 47–69. <https://doi.org/10.1002/WNAN.105>.
102. Sfeir, C., Fang, P. A., Jayaraman, T., Raman, A., Xiaoyuan, Z., and Beniash, E. (2014). Synthesis of bone-like nanocomposites using multiphosphorylated peptides. *Acta Biomaterialia*, 10(5), 2241–2249. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2014.01.007>.
103. Kim, H. K., Lee, J. S., Kim, J. H., Seon, J. K., Park, K. S., Jeong, M. H., and Yoon, T. R. (2017). Bone-forming peptide-2 derived from BMP-7 enhances osteoblast differentiation from multipotent bone marrow stromal cells and bone formation. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(5). <https://doi.org/10.1038/EMM.2017.40>.
104. Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4), 233–241. <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>.
105. Kim, HK., Kim, JH., Park, DS., Park, KS., Kang, SS., Lee, JS., Jeong, MH., and Yoon, TR. (2012). Osteogenesis induced by a bone forming peptide from the prodomain region of BMP-7. *Biomaterials*, 33(29), 7057–7063. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.06.036>.
106. Shi, Z., Neo, KG., Kang, ET., Poh, CK., and Wang, W. (2009). Surface functionalization of titanium with carboxymethyl chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2 for enhanced osseointegration. *Biomacromolecules*, 10(6), 1603–1611. <https://doi.org/10.1021/BM900203W>.
107. Robinson, D., Bab, I., and Nevo, Z. (1995). Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(5), 690–696. <https://doi.org/10.1002/JBMR.5650100504>.
108. Amir, LR., Li, G., Schoenmaker, T., Everts, V., and Bronckers, AL. (2007). Effect of thrombin peptide 508 (TP508) on bone healing during distraction osteogenesis in rabbit tibia. *Cell and Tissue Research*, 330(1), 35–44. <https://doi.org/10.1007/S00441-007-0448-9>.

109. Wosney, JM., Rosen, V., Celeste, AJ., Mitsock, LM., Whittser, MJ., Kriz, RW., Hewick, RM., and Wang, EA. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* (New York, N.Y.), 242(4885), 1528–1534. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3201241>.
110. Carvalho, M. S., Cabral, J. M. S., da Silva, C. L., and Vashishth, D. (2021). Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: Creating new bone by mimicking the extracellular matrix. *Polymers*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/POLYM13071095>.
111. Schin, H., Zyrgourakis, K., Farach-Carson, MC., Yaszemski, MJ., and Mikos, AG. (2004). Attachment, proliferation, and migration of marrow stromal osteoblasts cultured on biomimetic hydrogels modified with an osteopontin-derived peptide. *Biomaterials*, 25(5), 895–906. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00602-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00602-1).
112. Addadi, L., and Weiner, S. (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4110–4114. <https://doi.org/10.1073/PNAS.82.12.4110>.
113. Fujisawa, R., and Tamura, M. (2012). Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Frontiers in Bioscience*, 17(5), 1891–1903. <https://doi.org/10.2741/4026>.
114. Lv, X., Yang, Y., Han, S., Li, D., Tu, H., Li, W., Zhou, X., and Zhang, L. (2015). Potential of an amelogenin based peptide in promoting remineralization of initial enamel caries. *Archives of Oral Biology*, 60(10), 1482–1487. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2015.07.010>.
115. Rao A, C. H. (2016). Morphology control and molecular templates in biomineralization. In G. M.-P. Aparicio C (Ed.), *Biomineralization and Biomaterials* (pp. 51–93). Woodhead Publishing.
116. Dahabreh, Z., Calori, GM., Kanakaris, NK., NikolaouVS., and Ginnoidis, PV. (2009). A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7. *International Orthopaedics*, 33(5), 1407–1414. <https://doi.org/10.1007/S00264-008-0709-6>.
117. Maria, C. G., Rodolfo, C., Massimiliano, C., Pietro, D. B., Carol, O., Valentina, C., and Costanza, C. (2013). Cost effectiveness of tibial nonunion treatment: A comparison between rhBMP-7 and autologous bone graft in two Italian centres. *Injury*, 44(12), 1871–1879. <https://doi.org/10.1016/J.INJURY.2013.08.012>.
118. Güngörmüş, M., Oren, EE., Horst, JA., Fong, H., Hnilova, M., Somerman, MJ., Snead, ML., Samudrala, R., Tamerler, C., and Sarikaya, M. (2012). Cementomimetics-constructing a cementum-like biomineralized microlayer via amelogenin-derived peptides. *International Journal of Oral Science*, 4(2), 69–77. <https://doi.org/10.1038/IJOS.2012.40>.

119. Kind, L., Stenovic, S., Wuttig, S., Wimberger, S., Hoter, J., Müller, B., and Pieves, U. (2017). Biomimetic Remineralization of Carious Lesions by Self-Assembling Peptide. *Journal of Dental Research*, 96(7), 790–797. <https://doi.org/10.1177/0022034517698419>.
120. Takahashi, F., Kurokawa, H., Shibasaki, S., Kawamoto, R., Murayama, R., and Miyazaki, M. (2016). Ultrasonic assessment of the effects of self-assembling peptide scaffolds on preventing enamel demineralization. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(2), 142–147. <https://doi.org/10.3109/00016357.2015.1066850>.
121. Carneiro, KM., Zhai, H., Zhu, L., Horst, JA., Sitlin, M., Nguyen, M., Wagner, M., Simpliciano, C., Milder, M., Chen, CL., Ashby, P., Bonde, J., Li, W., and Habelitz, S. (2016). Amyloid-like ribbons of amelogenins in enamel mineralization. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP23105>.
122. Kirkham, J., Firth, A., Vernals, D., Boden, N., Robinson, C., Shore, RC., Brookes, SJ., and Aggeli, A. (2007). Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *Journal of Dental Research*, 86(5), 426–430. <https://doi.org/10.1177/154405910708600507>.
123. Ruan, Q., and Moradian-Oldak, J. (2015). Amelogenin and Enamel Biomimetics. *Journal of Materials Chemistry. B*, 3(16), 3112–3129. <https://doi.org/10.1039/C5TB00163C>.
124. Fan, Y., Sun, Z., and Moradian-Oldak, J. (2009). Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*, 30(4), 478–483. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.10.019>.
125. Chen, J., Cao, X., Guo, R., Shen, M., Peng, C., Xiao, T., and Shi, X. (2012). A highly effective polymerase chain reaction enhancer based on dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *The Analyst*, 137(1), 223–228. <https://doi.org/10.1039/C1AN15816C>.
126. Hsu, C. C., Chung, H. Y., Yang, J. M., Shi, W., and Wu, B. (2011). Influence of 8DSS peptide on nano-mechanical behavior of human enamel. *Journal of Dental Research*, 90(1), 88–92. <https://doi.org/10.1177/0022034510381904>.
127. Yang, Y., Lv, XP., Shi, W., Li, JY., Li, DX., Zhou, XD., and Zhang, LL. (2014). 8DSS-promoted remineralization of initial enamel caries in vitro. *Journal of Dental Research*, 93(5), 520–524. <https://doi.org/10.1177/0022034514522815>.
128. Yarbrough, DK., Hagerman, E., Eckert, R., He, J., Choi, H., Cao, N., Le, K., Hedger, J., Qi, F., Anderson, M., Rutherford, B., Wu, B., Tetradis, S., and Shi, W. (2010). Specific binding and mineralization of calcified surfaces by small peptides. *Calcified Tissue International*, 86(1), 58–66. <https://doi.org/10.1007/S00223-009-9312-0>.

129. Yang, Y., Lv, X., Shi, W., Zhou, X., Li, J., and Zhang, L. (2016). Synergistic Inhibition of Enamel Demineralization by Peptide 8DSS and Fluoride. *Caries Research*, 50(1), 32–39. <https://doi.org/10.1159/000442896>.
130. Brunton, PA., Davies, RP., Burke, JL., Smith, A., Aggeli, A., Brookes, SJ., and Kirkham, J. (2013). Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides--a clinical safety trial. *British Dental Journal*, 215(4). <https://doi.org/10.1038/SJ.BDJ.2013.741>.
131. Jablonski-Momeni, A., and Heinzl-Gutenbrunner, M. (2014). Efficacy of the self-assembling peptide P11-4 in constructing a remineralization scaffold on artificially-induced enamel lesions on smooth surfaces. *Journal of Orofacial Orthopedics = Fortschritte Der Kieferorthopädie: Organ/Official Journal Deutsche Gesellschaft Fur Kieferorthopädie*, 75(3), 175–190. <https://doi.org/10.1007/S00056-014-0211-2>.
132. Alkilzy, M., Santamaria, RM., Schmoeckel, J., and Splitz, CH. (2018). Treatment of Carious Lesions Using Self-Assembling Peptides. *Advances in Dental Research*, 29(1), 42–47. <https://doi.org/10.1177/0022034517737025>.
133. Schlee, M., Shad, T., Koch, JH., Cattin, PC., and Rathe, F. (2018). Clinical performance of self-assembling peptide P 11 -4 in the treatment of initial proximal carious lesions: A practice-based case series. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 9(1). <https://doi.org/10.1111/JICD.12286>.
134. Üstün, N., and Aktören, O. (2019). Analysis of efficacy of the self-assembling peptide-based remineralization agent on artificial enamel lesions. *Microscopy Research and Technique*, 82(7), 1065–1072. <https://doi.org/10.1002/JEMT.23254>.
135. Gaskin, DJ., Starck, K., Turner, NA., and Vulfston, EN. (2001). Phage display combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9–10), 766–772. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00330-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00330-1).
136. Nayabi, N., Cetinel, S., Omar, SI., Tuszyński, JA., and Montemagno, C. (2017). A computational method for selecting short peptide sequences for inorganic material binding. *Proteins*, 85(11), 2024–2035. <https://doi.org/10.1002/PROT.25356>.
137. Güngörmüş, M., Fong, H., Kim, IW., Evans, JS., Tamerler, C., and Sarıkaya, M. (2008). Regulation of in vitro calcium phosphate mineralization by combinatorially selected hydroxyapatite-binding peptides. *Biomacromolecules*, 9(3), 966–973. <https://doi.org/10.1021/BM701037X>.
138. Le Norcy, E., Kwark, SY., Wiedemann-Bidlack, FB., Beniash, E., Yamakoshi, Y., Simmer, JP., and Margolis, HC. (2011). Leucine-rich amelogenin peptides regulate mineralization in vitro. *Journal of Dental Research*, 90(9), 1091–1097. <https://doi.org/10.1177/0022034511411301>.

139. Shaw, WJ., Campell, AA., Paina, ML., and Snead, ML. (2004). The COOH terminus of the amelogenin, LRAP, is oriented next to the hydroxyapatite surface. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40263–40266. <https://doi.org/10.1074/JBC.C400322200>.
140. Le, W., Gao, C., Yan, Y., and DenBesten, P. (2003). X-linked amelogenesis imperfecta may result from decreased formation of tyrosine rich amelogenin peptide (TRAP). *Archives of Oral Biology*, 48(3), 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(02)00170-X).
141. Güngörmüş, M., Özdoğan, MS., Ertem, SY., Tulumbacı, F., Kra, H., and Orhan, M. (2020a). Accelerated Calcium Phosphate Mineralization by Peptides with Adjacent Oppositely Charged Residues. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(7), 3791–3798. <https://doi.org/10.1021/ACSBOMATERIALS.0C00194>.
142. Fujisawa, R., Wada, Y., Nodasaka, Y., and Kuboki, Y. (1996). Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1292(1), 53–60. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00190-5](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00190-5).
143. Weiner, S., and Addadi, L. (1991). Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(7), 252–256. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90098-G](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90098-G).
144. Shimotoyodome, A., Kobayshi, H., Tokimitsu, I., Matsukubo, T., and Takaesu, Y. (2006). Statherin and histatin 1 reduce parotid saliva-promoted *Streptococcus mutans* strain MT8148 adhesion to hydroxyapatite surfaces. *Caries Research*, 40(5), 403–411. <https://doi.org/10.1159/000094286>.
145. Sugawara, A., Nishimura, T., Yamamoto, Y., Inoue, H., Nagasawa, H., and Kato, T. (2006). Self-organization of oriented calcium carbonate/polymer composites: effects of a matrix peptide isolated from the exoskeleton of a crayfish. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45(18), 2876–2879. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200503800>.
146. Hunter, GK, O'Young, J., Grohe, B., Karttunen, M., and Goldberg, HA. (2010). The flexible polyelectrolyte hypothesis of protein-biomineral interaction. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 26(24), 18639–18646. <https://doi.org/10.1021/LA100401R>.
147. Davis JM. (2002). Basic Cell Culture (2nd ed.). *Oxford University Press*, London, UK, 25-50.
148. John, P. (1973). Cell and tissue culture (4th ed.). *Edinburgh and London*. Churchill Livingstone, UK, 38-84.
149. Picot, J. (2002). Human cell culture protocols (2nd ed.). *Humana Press*. Totowa, New Jersey, USA, 128-156.

150. Majeska, R.J. (2001). Bone Mechanics handbook (2nd ed.). *CRS Press*. Boca Ranton, Florida, USA.
151. Van Noort, R. (2002). Introduction to dental materials (2nd ed.). *Mosby Incorporated* Maryland Heights, Missouri, USA.
152. Reddy, M. S., and Jeffcoat, M. K. (1999). Methods of assessing periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 19(1), 87–103. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0757.1999.TB00149.X>.
153. Macneil, R. L., and Somerman, M. J. (1999). Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontology 2000*, 19(1), 8–20. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0757.1999.TB00144.X>.
154. Becker, W., and Becker, B. E. (1999). Periodontal regeneration: a contemporary re-evaluation. *Periodontology 2000*, 19(1), 104–114. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0757.1999.TB00150.X>.
155. Zetterström, O., Andersson, C., Endersson, L., Fredriksson, A., Friskop, J., Heden, G., Jansson, B., Lundgren, T., Nilveus, R., Olsson, A., Renvert, S., Sallonen, L., Sjöström, L., Winnel, A., Ostgren, A., and Gestrelus, S. (1997). Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(9 Pt 2), 697–704. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.1997.TB00252.X>.
156. Hoang, A. M., Oates, T. W., and Cochran, D. L. (2000). In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *Journal of Periodontology*, 71(8), 1270–1277. <https://doi.org/10.1902/JOP.2000.71.8.1270>.
157. Windisch, P., Sculean, A., Klein, F., Tóth, V., Gera, I., Reich, E., and Eickholz, P. (2002). Comparison of clinical, radiographic, and histometric measurements following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins in human periodontal defects. *Journal of Periodontology*, 73(4), 409–417. <https://doi.org/10.1902/JOP.2002.73.4.409>.
158. Sculean, A., Donos, N., Windisch, P., Brecx, M., Gera, I., Reich, E., and Karring, T. (1999). Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. *Journal of Periodontal Research*, 34(6), 310–322. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0765.1999.TB02259.X>.
159. Palmer, R. M., and Cortellini, P. (2008). Periodontal tissue engineering and regeneration: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), 83–86. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2008.01262.X>.

160. He, J., King, Y., Jiang, J., Safavi, K. E., Spångberg, L. S. W., and Zhu, Q. (2005). Enamel matrix derivative inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 99(6), 761–767. <https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2004.07.022>.
161. Keila, S., Nemcovsky, C. E., Moses, O., Artzi, Z., and Weinreb, M. (2004). In vitro effects of enamel matrix proteins on rat bone marrow cells and gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 83(2), 134–138. <https://doi.org/10.1177/154405910408300210>.
162. Parkar, M. H., and Tonetti, M. (2004). Gene expression profiles of periodontal ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: analysis using cDNA arrays. *Journal of Periodontology*, 75(11), 1539–1546. <https://doi.org/10.1902/JOP.2004.75.11.1539>.
163. Jiang, J., Goodarzi, G., He, J., Li, H., Safavi, K. E., Spångberg, L. S. W., and Zhu, Q. (2006). Emdogain-gel stimulates proliferation of odontoblasts and osteoblasts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 102(5), 698–702. <https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2006.02.011>.
164. Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y.)*, 150(3698), 893–899. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.150.3698.893>.
165. Bessa, P. C., Casal, M., and Reis, R. L. (2008). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(2–3), 81–96. <https://doi.org/10.1002/TERM.74>.
166. Kato, S., Kawabata, N., Suzuki, N., Ohmura, M., and Takagi, M. (2009). Bone morphogenetic protein-2 induces the differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26, into mature osteoblasts and adipocytes. *Life Sciences*, 84(9–10), 302–310. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2008.12.011>.
167. Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R., and Roman-Roman, S. (2003). BMP-2 Controls Alkaline Phosphatase Expression and Osteoblast Mineralization by a Wnt Autocrine Loop. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(10), 1842–1853. <https://doi.org/10.1359/JBMR.2003.18.10.1842>.
168. Fawzy El-Sayed, K. M., Dörfer, C., Ungefroren, H., Kassem, N., Wiltfang, J., and Paris, S. (2014). Effect of Emdogain enamel matrix derivative and BMP-2 on the gene expression and mineralized nodule formation of alveolar bone proper-derived stem/progenitor cells. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 42(5), 568–576. <https://doi.org/10.1016/J.JCMS.2013.07.028>.

169. Miron, R. J., Chandad, F., Buser, D., Sculean, A., Cochran, D. L., and Zhang, Y. (2016). Effect of Enamel Matrix Derivative Liquid on Osteoblast and Periodontal Ligament Cell Proliferation and Differentiation. *Journal of Periodontology*, 87(1), 91–99. <https://doi.org/10.1902/JOP.2015.150389>.
170. Miyaji, H., Sugaya, T., Ibe, K., Ishizuka, R., Tokunaga, K., and Kawanami, M. (2010). Influence of root dentin surface conditioning with bone morphogenetic protein-2 on periodontal wound healing in beagle dogs. *J Periodontol Res*. 45(5),658-63. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01281.x.
171. Awada, T., Kunimatsu, R., Yoshimi, Y., Hirose, N., Mitsuyoshi, T., Sumi, K., and Tanimoto, K. (2017). Effects of C-terminal amelogenin peptides on the metabolism of osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 1154–1159. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.12.003>.
172. F, Tulumbaci, and Güngörmüş, M. (2020). In vitro remineralization of primary teeth with a mineralization-promoting peptide containing dental varnish. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 28, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2020-0259>.
173. Hayes, J. (n.d.). Osteoblast models for matrix research. *European Cells and Materials*, 24(2012), 1–17. <https://doi.org/10.22203/eCM.v024a01>.
174. Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., and Franceschi, R. T. (1999). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(6), 893–903. <https://doi.org/10.1359/JBMR.1999.14.6.893>.
175. Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., and Wenstrup, R. J. (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 7(6), 683–692. <https://doi.org/10.1002/JBMR.5650070613>.
176. Grigoriadis, A. E., Petkovich, P. M., Ber, R., Aubin, J. E., and Heersche, J. N. M. (1985). Subclone heterogeneity in a clonally-derived osteoblast-like cell line. *Bone*, 6(4), 249–256. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(85\)90008-0](https://doi.org/10.1016/8756-3282(85)90008-0).
177. He, J., Jiang, J., Safavi, K. E., Spångberg, L. S. W., and Zhu, Q. (2004b). Direct contact between enamel matrix derivative (EMD) and osteoblasts is not required for EMD-induced cell proliferation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 98(3), 370–375. <https://doi.org/10.1016/S1079210404002057>.

178. Liu, X., Rodeheaver, D. P., White, J. C., Wright, A. M., Walker, L. M., Zhang, F., and Shannon, S. (2018). A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 97, 24–32. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2018.06.003>.
179. Fiume, M. M., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Andersen, F. A., and Gill, L. J. (2015). Safety Assessment of Boron Nitride as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 34, 53S-60S. <https://doi.org/10.1177/1091581815617793>.
180. Riss, TL., Moravec, RA., Niles, AL., Duellman, S., Benink, HA., Worzella, TJ., Minor, L. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [updated 2016 Jul 1]. In: Markossian, S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, CP., Baell, J., Chung, TDY., Coussens, NP., Dahlin, JL., Devanarayan, V., Foley, TL., Glicksman, M., Hall, MD., Haas, JV., Hoare, SRJ., Inglese, J., Iversen, PW., Kales, SC., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Saradjian, P., Sittampalam, GS., Tarselli, M., Trask, OJ. Jr., Wang, Y., Weidner, JR., Wildey, MJ., Wilson, K., Xia, M., Xu, X., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly and Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004–. PMID: 23805433. *Cell viability assays*. Ncbi.Nlm.Nih.Gov. Retrieved November 22, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader>.
181. O'Brien, M. A., Moravec, R. A., Riss, T. L., and Bulleit, R. F. (2015). Homogeneous, Bioluminescent Proteasome Assays. *Methods in Molecular Biology*, 1219, 95–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1661-0_9.
182. Schwarz, F., Rothamel, D., Herten, M., Sculean, A., Scherbaum, W., and Becker, J. (2004). Effect of enamel matrix protein derivative on the attachment, proliferation, and viability of human SaOs(2) osteoblasts on titanium implants. *Clinical Oral Investigations*, 8(3), 165–171. <https://doi.org/10.1007/S00784-004-0259-2/FIGURES/6>.
183. Qu, Z., Andrukhov, O., Laky, M., Ulm, C., Matejka, M., Dard, M., and Rausch-Fan, X. (2011). Effect of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of osteoblast cells grown on the titanium implant surface. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 111(4), 517–522. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.10.011>.
184. Vimalraj, S. (2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, 754. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2020.144855>.
185. Dean, D. D., Lohmann, C. H., Sylvia, V. L., Cochran, D. L., Liu, Y., Boyan, B. D., and Schwartz, Z. (2002). Effect of porcine fetal enamel matrix derivative on chondrocyte proliferation, differentiation, and local factor production is dependent on cell maturation state. *Cells, Tissues, Organs*, 171(2–3), 117–127. <https://doi.org/10.1159/000063705>.

186. Tokiyasu, Y., Takata, T., Saygin, E., and Somerman, M. (2000). Enamel factors regulate expression of genes associated with cementoblasts. *Journal of Periodontology*, 71(12), 1829–1839. <https://doi.org/10.1902/JOP.2000.71.12.1829>.
187. Viswanathan, H. L., Berry, J. E., Foster, B. L., Gibson, C. W., Li, Y., Kulkarni, A. B., Snead, M. L., and Somerman, M. J. (2003). Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *Journal of Periodontology*, 74(10), 1423–1431. <https://doi.org/10.1902/JOP.2003.74.10.1423>.
188. Noro, D., Kurashige, Y., Shudo, K., Takahashi, A., Abiko, Y., and Saitoh, M. (2015). Effect of epithelial cells derived from periodontal ligament on osteoblast-like cells in a Transwell membrane coculture system. *Archives of Oral Biology*, 60(7), 1007–1012. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2015.02.016>.
189. Takahashi, A., Morita, T., Murata, K., Minowa, E., Jahan, A., Saito, M., and Tanimura, A. (2019). Effects of full-length human amelogenin on the differentiation of dental epithelial cells and osteoblastic cells. *Archives of Oral Biology*, 107. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2019.07.004>.
190. He, J., Jiang, J., Safavi, K. E., Spångberg, L. S. W., and Zhu, Q. (2004a). Emdogain promotes osteoblast proliferation and differentiation and stimulates osteoprotegerin expression. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 97(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2003.10.005>.
191. Arnett, T. (2003). Regulation of bone cell function by acid-base balance. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 511–520. <https://doi.org/10.1079/PNS2003268>.
192. Arnett, T. R. (1990). Update on bone cell biology. *European Journal of Orthodontics*, 12(1), 81–90. <https://doi.org/10.1093/EJO/12.1.81>.
193. Bushinsky, D. A. (2001). Acid-base imbalance and the skeleton. *European Journal of Nutrition*, 40(5), 238–244. <https://doi.org/10.1007/s394-001-8351-5>.
194. Franceschi, R. T., Iyer, B. S., and Cui, Y. (1994). Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 9(6), 843–854. <https://doi.org/10.1002/JBMR.5650090610>.
195. Hata, R. -I, and Senoo, H. (1989). L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 138(1), 8–16. <https://doi.org/10.1002/JCP.1041380103>.

196. Czekanska, E. M., Stoddart, M. J., Richards, R. G., and Hayes, J. S. (2012). In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells and Materials*, 24, 1–17. <https://doi.org/10.22203/ECM.V024A01>.
197. Jeong, Y., Yang, W., Ko, H., and Kim, M. (2014). The effects of bone morphogenetic protein-2 and enamel matrix derivative on the bioactivity of mineral trioxide aggregate in MC3T3-E1cells. *Restorative Dentistry and Endodontics*, 39(3), 187. <https://doi.org/10.5395/RDE.2014.39.3.187>.
198. Wollman, A. J. M., Nudd, R., Hedlund, E. G., and Leake, M. C. (2015). From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. *Open Biology*, 5(4). <https://doi.org/10.1098/RSOB.150019>.







EK-1. Doğa ilaç firmasından elde edilen yenilebilir sığır jelatininin sertifikası

YENİLEBİLİR JELATİN ANALİZ SERTİFİKASI EDIBLE GELATIN CERTIFICATE OF ANALYSIS (1)				
Döküman No: SAT.PR.01.FR.01	Revizyon: 05/06.11.2017			
Parti Numarası / Batch Number: PE17-00976-1	Müşteri / Customer: DOĞA İLAÇ			
Analiz Tarihi / Analysis Date: 28.11.2017	Tip / Type: YENİLEBİLİR HELAL SIĞIR JELATİNİ 150 BLOOM, 20 MESH TİP B / EDIBLE HALAL BOVINE GELATINE 150 BLOOM, 20 MESH TYPE B			
Üretim Tarihi / Production Date: 28.11.2017	Orijin / Country of Origin: Türkiye/ Turkey			
Son Kullanma Tarihi / Expiry Date: 28.11.2022	Menşei / Source: Sığır Derisi/ Bovine Hides			
Parti Ağırlığı / Shipment Weight: 100 KG				
PARAMETRELER PARAMETERS	METOD METHODS	BİRİM UNITS	SPESİFİKASYONLAR SPECIFICATIONS	SONUÇLAR RESULTS
Görünüş / Aspect			Grains yellow to amber	Grains yellow to amber
Partikül büyüklüğü / Particle size		ASTM Sieve	20	20
Jel dayanıklılığı/ Gel strength (6.67%)	GME	Bloomgram	140 - 160	152
Viskozite/ Viscosity (6.67%)	GME	mPa.s	1.80-3.60	2.19
pH (1%)	GME	U pH	5.0-6.5	5.88
Nem/Moisture	GME	%	Max. 12	10.57
Kül/Ashes	GME	%	Max. 1%	0.10
Kükürt dioksit/Sulphur dioxide (SO ₂)	GME	ppm	Max. 10 ppm	5.00
Arsenik / Arsenic (As) *	EN 15763	ppm	<=1	<=1
Kadmiyum / Cadmium (Cd) *	EN 15763	ppm	<=0.5	<=0.5
Krom / Chromium (Cr) *	ISO 11885	ppm	<=10	<=10
Bakır / Copper (Cu) *	EN 15763	ppm	<=30	<=30
Kurşun / Lead (Pb) *	EN 15763	ppm	<=5	<=5
Civa / Mercury (Hg) *	EN 15763	ppm	<=0.15	<=0.15
Çinko / Zinc (Zn) *	EN 15763	ppm	<=50	<=50
Aerobik Koloni Sayısı/Total aerobic count **	GME	CFU/g	<=1000	0
Küf ve Maya Sayısı/Yeast and moulds *	ISO 21527	CFU/g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Koliform Bakteri Sayısı/Coliforms **	ISO 4831	CFU/10g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Escherichia coli **	GME	CFU/10g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Enterobacteriaceae *	ISO 21528-2	CFU/g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Salmonella species *	DMS 102747	BAC/25g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Sulphite-reducing anaerobes *	GME	CFU/25g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Clostridium perfringens *	ISO 7937	CFU/g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Staphylococcus aureus *	ISO 6888-1	CFU/g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
* İşaretili analizler ayda bir kez dış laboratuvar tarafından analiz edilmektedir. / * Marked analysis are done by external laboratory, once a month. ** İşaretili analizler ayda bir kez hem dış laboratuvar hem de her parti üretimde kendi laboratuvarımızda analiz edilmektedir. / ** Marked analysis are done by our laboratory for every batch and sent to external laboratory once a month. İşaretili olmayan analizler her parti üretimde kendi laboratuvarımızda analiz edilmektedir. / Unmarked analysis are done by our own laboratory for every batches.				
Laboratuvar Onayı / Laboratory Validation		Kalite Onayı / Quality Validation		
Laboratuvar Sorumlusu/ Laboratory Responsible Derya Durmaz		Kalite Müdürü/ Quality Manager İlke Çakmak Saraçbaşı		
  				

FACTORY ADDRESS: SEL SANAYİ ÜRÜNLERİ TİCARET VE PAZARLAMA A.Ş. KURTULUŞ MH. YILMAZ ÇOLPAN CD. NO:10 10900 GÖNEN / BALIKESİR / TÜRKİYE TEL:0266 762 65 44-45 FAX: 0266 762 83 09-10

HEADQUARTERS ADDRESS: TEZMAN HOLDING A.Ş. PİYALEPAŞA BULVARI KASTEL İŞ MERKEZİ D BLOK KAT:7 NO: 124 - 34440 KASIMPAŞA/ İSTANBUL/ TÜRKİYE TEL: 0212 253 62 40 FAX: 0212 255 34 55

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BAL, Cenkhan

Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji ABD	Devam ediyor
Doktora	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği ABD	1998-2004
Lisans	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	1993-1998
İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2020-devam ediyor	SBÜ Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği ABD	Dr. Öğr. Üyesi / AD Başkanı V
2016-2020	Etimesgut Ağız Diş Sağlığı Merkezi	Diş Tabibi
2000-2016	Hava Kuvvetleri Komutanlığı	Diş Tabibi
1999-2000	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği ABD	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

- 1) **Bal C**, Unsal GS, Turkyilmaz I. Comparative analysis of bone density measurements by using multislice spiral and cone-beam computed tomography. J Dent Sci. 2020 Sep;15(3):388-389. doi: 10.1016/j.jds.2019.09.008. Epub 2019 Dec 31. PMID: 32952898; PMCID: PMC7486493.

2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- 1) Alaçam A, Yıldırım S, Çınar Ç, **Bal C**, Gürbüz F. The evaluation of the approach of turkish dentists to oral health of disabled patients: a pilot study, The British Journal of Developmental Disabilities 2004; 98: 47-50.
- 2) **Bal C**, Bal BT, Tüfekçioğlu D. Treatment considerations for a patient with hypohidrotic ectodermal dysplasia: a case report, The Journal of Contemporary Dental Practice 2008; 9: 1-7.
- 3) **Bal C**, Öztaş N, Cincik M, Barış E, Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in rat molar teeth after pulp capping with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide, The New York State Dental Journal 2011; 77: 36-42.
- 4) Tulunoğlu Ö, Çınar Ç, **Bal C**, Bal BT, Two-year study of alternative conservative treatment modalities for early anterior tooth loss, The New York State Dental Journal 2010; 76: 27-30.
- 5) **Bal C**, Alaçam A, Tüzüner T, Tıralı RE, Barış E, Effects of antiseptics on pulpal healing under calcium hydroxide pulp capping: a pilot study, European Journal of Dentistry 2011; 5: 265-272.
- 6) Ağmaz O, Acar YA, Çevik E, Uyguner C, Oral BE, **Bal C**, Resropective analysis of patients admitted to emergency dental clinic of a secondary care public hospital in Turkey, International Journal of Experimental Dental Science 2017; 6: 14-16.

3. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Sözel Bildiriler:

Poster Bildirileri:

- 1) Çınar Ç, **Bal C**, Tulunoğlu Ö. Çocuklarda anterior diş kayıplarında erken dönem tedavi planlaması. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 2. Uluslararası Bilimsel Kongresi. 4-6 Haziran, Ankara, 2001.
- 2) Oral BE, Kar MS, **Bal C**, Gültekin U, Akgürbüz A. Rehabilitation of severely resorbed mandible treated with mini dental implants supported overdenture: a case report. AÇBİD 2014, 28 Mayıs-1 Haziran Antalya, 2014.
- 3) Örsçelik RB, Akgürbüz A, Oral BE, **Bal C**. Autotransplantation of unerupted maxillary canine in its appropriate position (a case report). AÇBİD 2014, 28 Mayıs-1 Haziran Antalya, 2014.
- 4) Oral BE, **Bal C**, Kar MS, Çermik H, Gültekin U. Multiple compound odontomas in mandibula: a case report. AÇBİD 2014, 28 Mayıs-1 Haziran Antalya, 2014.

- 5) Alaçam A, Tüzüner T, **Bal C**, Tirali RE, Barış E. The role of antiseptic materials on pulp healing under calcium hydroxide. 13th Biennial Congress of the European Society of Endodontology, 6-8 Ekim, İstanbul, 2007.

4. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

- 1) Öztürk Z, **Bal C**. Dental travma sonrası ortodontik rehabilitasyon: ne zaman ve hangi koşullarda? SAĞLIK ve BİLİM: Güncel Tıp 3. 2021.
- 2) Aydın E, **Bal C**, Remineralizasyon ajanları. Sağlık ve Bilim: Güncel Tıp 3. 2021.
- 3) Ünüvar M, Öztürk Z, **Bal C**, Atak D. Matür daimi dişlerde rejenaratif endodontik prosedürler. Sağlık ve Bilim: Güncel Tıp – 1. 2021.
- 4) Öztürk Z, Ünüvar M, **Bal C**. Diş hekimliği uygulamalarında kullanılan mineral trioksit agregat hakkındaki güncel gelişmeler. Sağlık ve Bilim: Güncel Tıp – 1. 2021.

5. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- 1) Bal BT, Tözüm TF, **Bal C**. Hepatit, Ankara Diş Hekimleri Odası Dergisi 2006; Haziran: 58-61.
- 2) Bal BT, **Bal C**, Asar NV, Sönmez N. Ektodermal displazi ve protetik tedavi seçenekleri, ADO Klinik Bilimler Dergisi 20074; 1: 66-72.
- 3) Kurt M, Bal BT, **Bal C**. Güncel renk ölçüm yöntemleri: sistematik derleme, Türkiye Klinikleri J Dental Sci 2016; 22 (2).
- 4) Kurtiş M.B, **Bal C**. Stres ve Periodontal sağlık. Türkiye Klinikleri Diş Hekimliği Bilimleri Dergisi Türkiye Klinikleri Özel Sayı. 2019.
- 5) Kurun HA, Güngörmüş M, Kurtiş MB, **Bal C**. Periodontal Tedavilerde amelogenin (emdogain) ve mineralizan peptid uygulamaları. ADO Klinik Bilimler Dergisi, 2022, 11(1): 91-102.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..