



**T. C.**  
**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARVAKROLÜN İNSAN DİŞETİ FİBROBLAST HÜCRELERİ  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ÇAĞLA YANKI**  
**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Meltem HENDEK**

**ORTAK DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Burcu ÖZDEMİR**

**KIRIKKALE-2022**





**T. C.**  
**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARVAKROLÜN İNSAN DİŞETİ FİBROBLAST HÜCRELERİ  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ÇAĞLA YANKI**  
**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Meltem HENDEK**

**ORTAK DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Burcu ÖZDEMİR**

**KIRIKKALE-2022**

## ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

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

.....

Çağla YANKI

...../...../2022

## ÖZET

### KARVAKROLÜN İNSAN DİŞETİ FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Periodontoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Meltem HENDEK

Ortak Danışman: Prof. Dr. Burcu ÖZDEMİR

Kasım 2022, 95 sayfa

Periodontal hastalık, mevcut oral floranın disbiyozu nedeniyle periodonsiyumun yıkımına yol açan ilerleyici, enfeksiyöz bir enflamatuvar hastalıktır. Çeşitli bitki türleri ve içerdikleri etken maddeler, patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. Bitkiler ve içerdikleri etken maddeler, periodontal sağlığın korunmasında eşsiz rol oynayan oldukça önemli özelliklere sahiptir. Karvakrol, kekik, biber ve yabani bergamot gibi aromatik bitkilerin uçucu yağlarında bulunan çeşitli hastalıklarda tedavi edici etkiye sahip antioksidan bir fenolik monoterpen bileşiğidir. Antibakteriyel, antifungal, antiviral, immün-modülatör ve antioksidan özellikleri birçok çalışmada araştırılmış ve farklı hastalıklar üzerinde terapötik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı dişeti fibroblastları üzerinde karvakrolün sitotoksik olmayan dozlarını belirleyerek, hücre canlılığı, apoptoz/nekroz oranı, reaktif oksijen türleri (ROT) aktivitesi, yara iyileşmesi ve Nrf2/Keap1 sinyal yolu üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Dişeti fibroblast hücrelerinde oksidatif hasar oluşturmak için ajan olarak hidrojen peroksit(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kullanıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve karvakrolün farklı konsantrasyonlarda sitotoksik olmayan dozu belirlenerek hücre canlılığına etkisi tespit edildi. Bu uygulamalar için MTT test yöntemi kullanıldı. Daha sonra hematoksilen-eozin boyama ile hücre morfolojileri, double staining ile apoptoz/nekroz oranları, ROT aktivitesi ile oksidatif hasar şiddeti, immunositokimya (ICC) ile Nrf2 ve Keap1'in gen ekspresyonları incelendi. İki adet uygulama grubu oluşturuldu. Birinci uygulamada 24, 48 ve 72 saat sürelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, karvakrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+karvakrol ve kontrol şeklinde 4 farklı grup incelendi. İkinci uygulamada ise 24 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 24 saat karvakrol ve 48 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 24 saat karvakrol olmak üzere iki grup incelendi. MTT testi sonucunda, karvakrolün uygulama konsantrasyonu 20 µl olarak belirlendi. Bu konsantrasyonda karvakrolün hem toksik etki göstermediği hem de hücre artışına sebep olduğu gözlemlendi. Aynı yöntemle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 100 µM'luk konsantrasyonu kullanıma uygun olarak tespit edildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı yüzdesinin azaldığı ancak hiçbir dozda hücre canlılığının tamamen ortadan kalkmadığı gözlemlendi. 24,48 ve 72 saatlik uygulamalarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, karvakrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ karvakrol ve kontrol gruplarında yapılan incelemede, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin tek başına uygulandığı hücrelerde ROT ile boyanma tespit edilirken diğer gruplarda ROT aktivitesi izlenmedi. Uygulamalar sonrasında hücrelerin morfolojisi ışık mikroskobu

ile değerlendirdiğinde karvakrolün 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda hücrelerin morfolojik bütünlüğünü koruduğu, ayrıık sitoplazma içi granüllerin, hücre yıkımlarının olmadığı ve hücre çoğalmasında azalma olmadığı tespit edildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve karvakrolün bir arada uygulandığı gruplarda ise 24 ve 48. saatte herhangi bir yıkım gözlemlenmese de 72. saatin sonunda hafif yıkımların başladığı ve morfolojinin değişmeye başladığı gözlemlendi. Double staining metodu ile apoptoz/nekroz oranı değerlendirildiğinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan gruplarda nekroz oranı yüksekken karvakrol uygulanan gruplarda bu oranın sıfıra indiği gözlemlendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidatif stres oluşumu sonrasında karvakrol uygulanan gruplarda ise nekroz oranının düşüp apoptoz oranlarının arttığı gözlemlendi. Ayrıca *in vitro* çizik yara iyileşme modeli ile karvakrolün hücre proliferasyonunu artırdığı ancak yara iyileşmesi için yara bölgesine hücre göçünü sağlamadığı tespit edildi. ICC ile inceleme sonucunda ise oksidatif hasar oluşturulmuş hücreler üzerine karvakrol uygulanmasının Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyon düzeylerinde artışa yol açtığı ve artan oksidatif stres karşısında bu artışın daha şiddetli bir şekilde gerçekleştiği tespit edildi. Sonuç olarak, 20 µM dozunda uygulanan karvakrolün diş eti fibroblast hücrelerinde canlılık düzeyini ve apoptoz/nekroz oranını artırdığı ayrıca ROT aktivitesini azaltarak ve oksidatif hasar karşısında oluşan Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyon düzeylerini artırarak oksidatif hasarın inhibe edilmesinde etkin bir rol oynadığı tespit edildi.

**Anahtar Sözcükler:** Oksidatif stres, antioksidan, karvakrol, Nrf2/Keap1

## ABSTRACT

### IN VITRO EVALUATION OF THE EFFECTS OF CARVACROL ON HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST CELLS

Kırıkkale University

Graduate School of Health Sciences

Department of Periodontology, Ph.D. Thesis

Supervisor: Doç. Dr. Meltem HENDEK

Common Supervisor: Prof. Dr. Burcu ÖZDEMİR

October 2022, 95 pages

Periodontal disease is a progressive, infectious inflammation disease, caused by the dysbiosis of oral resident flora, leading to the destruction of periodontium. The pathogenic microorganisms is the etiological factor of periodontal disease, while the immuno-inflammatory response affects the progression of the disease. Herbs and their active ingredients have some remarkable benefits and valuable properties that play an irreplaceable role in the maintenance of periodontal health. Carvacrol is an antioxidant phenolic monoterpene compound found in essential oils of aromatic plants such as thyme, pepper and wild bergamot, which has a therapeutic effect on various diseases. Its antibacterial, antifungal, antiviral, immune modulator and antioxidant properties have been investigated in many studies, and many studies have reported that carvacrol has a therapeutic effect on different diseases. The aim of this study is investigate the effects of carvacrol on effective dose, cytotoxicity, cell viability, apoptosis, wound healing, oxidative stress and Nrf2/Keap1 signaling pathway by in vitro studies on gingival fibroblasts. As gingival fibroblast cells, cells obtained by the research team from previous studies used. Cell viability and cytotoxicity test determined by MTT method. Dose adjustment applied at different concentrations in the MTT test. After determining the effective concentration of carvacrol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reactive oxygen species (ROS) levels determined in order to determine the changes that may occur in oxidative stress by applying it to the cells where oxidative stress is created. Immunohistochemistry staining applied to the cells in order to examine the effects of carvacrol on the Nrf2 and Keap-1 pathways as a result of the application of carvacrol to the cells in which oxidative stress is created with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Double staining test performed for cell apoptosis analysis. Cell migration and wound healing assessed using a scratch wound analysis, which measures the expansion of a population of cells on surfaces.

**Keywords:** Gingival fibroblasts, thyme, carvacrol, oxidative stress, Keap1/Nrf2

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin tamamında hem bir hoca hem de bir insan olarak daima desteğini hissettiğim, meslek ahlakı, insanlara olan saygı ve sevgisi, merhamet ve adalet duygusuyla her zaman bana yol gösteren, hayatımla ilgili attığım her adımda olumlu tavrı ve tecrübesiyle yanımda hissettiğim çok değerli hocam Doç. Dr. Meltem HENDEK'e;

Doktora eğitimim boyunca akademik bilgisi ve klinik tecrübesiyle her daim yoluma ışık tutan, insani ve ahlaki değerleri ile her zaman örnek olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen, bana duyduğu güveni her daim hissettiren ve öğrencisi olmaktan büyük mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. H. Ebru OLGUN'a;

Doktora eğitimim süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Burcu ÖZDEMİR'e;

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini her daim benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Fatma Berrin ÜNSAL'a;

Doktora eğitimim süresince yardımlarını ve desteklerini her zaman hissettiren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Kubilay BARIŞ'a;

Tezimin *in vitro* aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan değerli hocam Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çalışan Öğr. Gör. Büşra MORAN BOZER'e;

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım hem iyi hem kötü zamanlarda birlik ve beraberlik duygusunu bana yaşatan, 4 yılımı sonsuz güzel anılarla dolduran ve tüm kalbimle hep hayatımda olmalarını dilediğim çok sevgili çalışma arkadaşlarım; can dostlarım Gamze SOLAKOĞLU, Elif Dilara EKİNCİ, Tolga AYDOĞAN, Sarah KHALED, Elmir ABBASOV, Necip GÜN, İrem AYKAÇ, Furkan ÖZCAN, Uğur ÇELTİKÇİ, Server İBRAHİMLİ, Alper KULOĞLU, Elif YÜCEL ve Akif NALBANT'a;

Beni bu günlere getiren, hayatım boyunca destek ve sevgileriyle yanımda yer alan, benden çok bana inanan ve evlatları olmaktan büyük gurur duyduğum sevgili babam Erdiç AKYULAF ve canım annem İlhan AKYULAF'a; her daim yanımda olan, hayatıma girdiği ilk andan beri hayatımı güzelleştiren, hayattaki en büyük şansım, kız kardeşim Bade AKYULAF'a;

Ve hayatımın her alanında olduğu gibi tezimin hazırlık sürecinde de daima sevgisi, özverisi, desteği ve sabrı ile yanımda yer alan sevgili eşim Hüseyin YANKI'ya;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çağla YANKI  
KIRIKKALE-2022



# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	VI
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	VII
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	XI
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	XII
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	XIV
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Periodonsiyum .....	3
2.2. Dişeti.....	3
2.2.1. Dişeti Epiteli .....	4
2.2.2. Dişeti Bağ Dokusu.....	5
2.2.3. Bağ Dokusu Hücreleri .....	5
2.3. Fibroblast .....	6
2.4. Periodontal Hastalık.....	6
2.5. Periodontal Hastalıkların Sınıflaması .....	7
2.5.1. Periodontal Hastalıklar ve Durumlar .....	8
2.5.1.1. Periodontal Sağlık Gingival Hastalıklar ve Durumlar.....	8
2.5.1.1.1. Sağlıklı Periodonsiyumda Klinik Gingival Sağlık.....	8
2.5.1.1.2. Azalmış Periodonsiyumda Klinik Gingival Sağlık.....	8
2.5.1.1.3. Dental Plakla İlişkili Gingivitis .....	8
2.5.1.1.4. Dental Plakla İlişkili Olmayan Gingivitis .....	9

	<u>Sayfa</u>
2.5.1.2. Periodontitis.....	9
2.5.1.2.1. Nekrotizan Periodontal Hastalıklar .....	9
2.5.1.2.2. Sistemik Hastalıklarla İlişkili Periodontitis.....	9
2.6. Periodontal Hastalık Patogenezi .....	10
2.7. Serbest Radikaller .....	13
2.8. Reaktif Oksijen Türleri .....	13
2.9. Protein Hasarı .....	14
2.10. DNA Hasarı .....	14
2.11. Lipit Peroksidasyonu .....	14
2.12. Periodontitis ile İlişkili ROT Aşırı Üretimi .....	15
2.13. Antioksidanlar .....	16
2.14. Oksidatif Stres .....	19
2.15. Periodontal Hastalık ve Oksidatif Stres.....	20
2.16. Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2 (Nrf2) .....	20
2.17. Periodontiste Nrf2'nin Rolü.....	22
2.18. Keap1 (Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1) .....	24
2.18.1. Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1/Nükleer Faktör E2 ile İlişkili Faktör 2 (Keap1/Nrf2) Sinyal Yolu .....	24
2.19. Esansiyel Yağlar .....	24
2.19.1. Periodontal Hastalık ve Esansiyel Yağlar .....	25
2.20. Karvakrol.....	25
2.21. Periodontal Yara İyileşmesi.....	27
2.22. Karvakrol ve Yara İyileşmesi .....	29
2.23. Hücre Apoptozu.....	30
2.24. ELISA Testi (Enzim Bağlı Immunosorbent Ölçüm).....	31
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>

	<u>Sayfa</u>
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	32
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler .....	33
3.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	34
3.3.1. Besiyeri Hazırlanması.....	34
3.3.2. MTT Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması .....	34
3.3.3. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Blokaj Solüsyonu .....	34
3.3.4. ROT Solüsyonunun Hazırlanması .....	35
3.3.5. Double Staining Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması.....	35
3.4. Grupların Belirlenmesi ve Planlanması .....	35
3.5. Hücre Kültürü Testleri.....	36
3.5.1. Hücre İzolasyonu.....	36
3.5.2. Hücre Sayımı .....	37
3.6. Biyokimyasal Analizler .....	38
3.6.1. Sitotoksisite Testi (MTT) .....	38
3.6.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Uygulama Sonrası Karvakrol Uygulanması.....	39
3.6.3. ROT Aktivitesinin Belirlenmesi .....	39
3.6.4. Double Staining ile Hücre Apoptoz Analizi.....	39
3.6.5. İmmünohistokimya Prosedürü ile Nrf2/Keap1 Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	40
3.6.6. <i>In vitro</i> Yara İyileşme Modeli .....	41
3.7. İstatistiksel Analiz .....	41
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>42</b>
4.1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	42
4.2. Karvakrol Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	42
4.3. Uygulama Gruplarında ROT, Nrf2 ve Keap1 Aktivitesi.....	43
4.4. Morfolojik İnceleme Sonuçları.....	58

	<u>Sayfa</u>
4.5. Double Staining Metodu ile Apoptoz ve Nekroz Sonuçları .....	59
4.6. <i>In vitro</i> Yara İyileşme Modeli Sonuçları .....	61
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>76</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>93</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bağ dokusu hücreleri .....	6
2.2. Periodontitis evre sınıflaması .....	10
2.3. Periodontitis derece sınıflaması .....	10
2.4. Endojen ve eksojen antioksidanlar .....	19
2.5. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri arasındaki farklar .....	31
4.1. Farklı karvakrol konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri.....	43
4.2. 24 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 ve Keap1'nin değerlendirme sonuçları.....	44
4.3. Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 24 saatlik Keap1 ve Nrf2 ekspresyonlarında pozitif/negatif olma dağılımlarının karşılaştırılması .....	45
4.4. 48 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 ve Keap1'nin değerlendirme sonuçları.....	47
4.5. Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 48 saatlik Keap1 ekspresyonlarında pozitif/negatif olma dağılımlarının karşılaştırılması .....	48
4.6. Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 48 saatlik Nrf2 ekspresyonlarında pozitif/negatif olma dağılımlarının karşılaştırılması .....	49
4.7. 72 saat uygulama sonrası Nrf2 ve Keap1'nin değerlendirme sonuçları.....	52
4.8. Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 72 saatlik Nrf2 ve Keap1 ekspresyonlarında pozitif/negatif olma dağılımlarının karşılaştırılması .....	54
4.9. Karvakrol uygulama öncesinde Nrf2 ve Keap1 ekspresyon sonuçları.....	56
4.10. Karvakrol uygulama sonrasında Nrf2 ve Keap1 ekspresyon sonuçları.....	56
4.11. 24 saat boyunca H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ye maruz bırakılıp 24 saat tedavi uygulandıktan sonra Keap1 ve Nrf2 ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	56
4.12. 48 saat boyunca H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ye maruz bırakılıp 24 saat tedavi uygulandıktan sonra Keap1 ve Nrf2 ekspresyonlarının pozitifliği karşılaştırılması .....	57
4.13. Grupların % Apoptoz/Nekroz oranları .....	60

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. 2017 Periodontal hastalıkların ve durumların sınıflandırılması .....	8
2.2. Periodontal hastalıkta artan ROT üretim mekanizması .....	16
2.3. Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör (Nrf2) ve Keap1'in etki alanı yapıları .....	21
2.4. Sağlıklı ve hastalıklı periodontal dokuda nötrofil yanıtı .....	23
2.5. Karvakrol ve biyoaktivitesi ; antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser özellikleri .....	26
2.6. Yara iyileşme süreci .....	27
3.1. Kullanılan Cihazlar, a) Hücrelerin fotoğraflanmasında kullanılan inverted mikroskop, b) Hücrelerin 37 °C %5 CO <sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyonu için kullanılan inkübatör (Etüv).....	33
3.2. Birinci ve ikinci uygulama grupları .....	36
3.3. Uygulama öncesi çoğaltılan diş eti fibroblast hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü .....	36
3.4. Sitotoksisite testinde kullanılan 96 Well Plate görüntüsü .....	39
4.1. Farklı H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri.....	42
4.2. Farklı karvakrol konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri.....	43
4.3. 24 saat uygulama sonrası gruplarda ROT aktivitesinin floresan mikroskopla görüntülenmesi .....	44
4.4. 24 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri.....	45
4.5. 24 saat uygulama sonrası hücrelerde Keap1 ve Nrf2 gen ekspresyonlarının ışık mikroskopunda görüntülenmesi .....	46
4.6. 48 saat uygulama sonrası gruplarda ROT aktivitesinin floresan mikroskopla görüntülenmesi .....	47
4.7. 48 saat uygulama sonrası grupların Keap1 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri.....	48
4.8. 48 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri .....	50

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
4.9. 48 saat uygulama sonrası hücrelerde Keap1 ve Nrf2 gen ekspresyonlarının ışık mikroskobunda görüntülenmesi .....	51
4.10. 72 saat uygulama sonrası gruplarda ROT aktivitesinin floresan mikroskopla görüntülenmesi .....	52
4.11. 72 saat uygulama sonrası grupların Keap1 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri.....	53
4.12. 72 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri .....	53
4.13. 72 saat uygulama sonrası Keap1 ve Nrf2 gen ekspresyonlarının ışık mikroskobunda görüntülenmesi .....	55
4.14. 24 saat boyunca H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'ye maruz bırakılıp 24 saat karvakrol uygulandıktan sonra Keap-1 ve Nrf2 ekspresyonları .....	57
4.15. 48 saat boyunca H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ye maruz bırakılıp 24 saat karvakrol uygulandıktan sonra Keap1 ve Nrf2 ekspresyonları.....	57
4.16. Gruplarda 24 saat uygulama sonrası inverted mikroskop ile çekilen HE boyama görüntüleri.....	58
4.17. Gruplarda 48 saat uygulama sonrası inverted mikroskop ile çekilen HE boyama görüntüleri.....	59
4.18. Double staining işlemi uygulanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü .....	60
4.19. Yara modeli oluşturulan diş eti fibroblast hücrelerinin ve kontrol grubunun resmi .....	61
5.1. Nrf2'nin Keap1 tarafından regülasyonu .....	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
COX	: Siklooksijenaz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
Cd	: Kadmiyum
DOS	: Dişeti Oluğu Sıvısı
Fe	: Demir
Hg	: Cıva
HO-	: Hidroksil
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
IL	: İnterlökin
IL-1 $\alpha$	: İnterlökin-1Alfa
KEAP1	: Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1
KAT	: Katalaz
LPO	: Lipit Peroksidasyonu
LPS	: Lipopolisakarit
MDA	: Malondialdehit
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF- $\kappa$ B	: Nükleer Faktör Kappa B
NO	: Nitrik Oksit
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
O <sub>2</sub>	: Süperoksit
Pb	: Kurşun
<i>P. gingivalis</i>	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	: <i>Prevotella intermedia</i>
PG	: Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandin E2
PMNL	: Polimorfonükleer löksit
RANK	: Nükleer Faktör Kappa B'nin Reseptör Aktivatörü
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa B'nin Reseptör Aktivatörünün Ligandı
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
<i>T. denticola</i>	: <i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	: <i>Tannerella forsythia</i>
PBS	: Fosfatla Tamponlanmış Salin
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktör-Alfa
TNF- $\beta$	: Tümör Nekroz Faktör-Beta
Vd	: Ve Diğerleri
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü



# 1. GİRİŞ

Periodontal hastalık, mevcut oral floranın disbiyozu nedeniyle periodonsiyumun yıkımına yol açan ilerleyici, enfeksiyöz bir enflamatuvar hastalıktır. Patojenik mikroorganizmalar, periodontal hastalığın etiyolojik faktörüdür. İmmünoenflamatuvar yanıt hastalığın ilerlemesini ve yayılmasını etkilemektedir (Kinane vd., 2017). Periodontal tedavide periodontal hastalıkla ilişkili subgingival mikroorganizmaları ortadan kaldırmak, azaltmak ve periodontal sağlığı korumak amaçlanmaktadır. Mevcut tedavi, profesyonel ve evde uygulanan mekanik temizlik yöntemleri ile plak oluşumunun azaltılması ve engellenmesi ile bakteri yükünün azaltılmasına yöneliktir. Diş yüzey temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi, periodontal hastalıklar için etkili geleneksel bir tedavi yöntemidir. Mekanik tedavi, subgingival mikroorganizmaların prevalansını ve seviyelerini önemli ölçüde azaltsa da tüm patojenleri ortadan kaldırmaz (Jamal vd., 2018). Yıllar boyunca periodontal hastalıklarla ilişkili, subgingival mikrofloranın ortadan kaldırılması için farklı cerrahi prosedürler, lokal ve sistemik antibiyotikler kullanılmıştır.

Güncel yaklaşımlar, periodontal hastalıkların tedavisi için antibiyotik dışında bitkisel ürünlerin de geliştirilmesini hedeflemektedir. Bitkiler, yüzyıllardır bulaşıcı hastalıkların tedavisinden parfüm üretimine kadar çok çeşitli amaçlarla kullanılmıştır. Yeni hastalıkların ortaya çıkması ile birlikte mikroorganizmaların halen kullanılan antimikrobiyallere karşı artan direnci, yeni ve daha etkili ilaçların geliştirilmesini gerektirmektedir. Bitkiler ve içerdikleri etken maddeler, periodontal sağlığın korunmasında eşsiz rol oynayan bazı dikkat çekici faydalara ve özelliklere sahiptir ve bileşenlerinin biyolojik ve yapısal çeşitliliği nedeniyle, yeni antibakteriyel, antifungal ve antiparaziter bileşiklerin keşfi için benzersiz bir kaynak oluşturmaktadır (Sakkas vd., 2017). Periodontal yara iyileşmesi, yaralanmadan sonra aktive olan bir dizi karmaşık mekanizmayı içeren, ardışık ve örtüşen fazlar tarafından yönetilen önemli fizyolojik bir süreçtir. Doku onarımı ve deney hayvanlarında insan koşullarını yapılandırabilen çalışmaların yeterli olmaması, yara iyileşmesi için yeterli tedavilerin eksikliğine neden olmaktadır (Richmond, 2012). Bu anlamda, yara

iyileşmesi için daha etkili ve uygun maliyetli terapötik yaklaşımların araştırılması gerekmektedir. Tıbbi bitkiler dünya çapında çeşitli hastalıklar için tamamlayıcı veya alternatif bir tedavi olarak kullanılmıştır. Bu nedenle, bitkilerden elde edilen biyoaktif ürünler, yeni ilaçların geliştirilmesi için büyük bilimsel ve ticari ilgi görmektedir (Ahn, 2017; Li ve Vederas, 2009). Bu kapsamda monoterpen ve seskiterpenler gibi düşük moleküler ağırlıklı uçucu bileşenlerden oluşan uçucu yağlar araştırılmaktadır. Karvakrol, kekik, biber ve yabani bergamot gibi aromatik bitkilerin uçucu yağlarında bulunan çeşitli hastalıklarda tedavi edici etkiye sahip antioksidan bir fenolik monoterpen bileşiğidir (Arkali vd., 2021). Karvakrolün antibakteriyel (Rattanachaikunsopon vd., 2010; Ravishankar vd., 2010; Rivas vd., 2010), antifungal (Chami vd., 2004), antiviral (Pilau vd., 2011), immünmodülatör (Hashemipour vd., 2013) ve antioksidan özellikleri (Alma vd., 2003; Radonic ve Milos, 2003) birçok çalışmada araştırılmıştır ve birçok çalışma, karvakrolün farklı hastalıklar üzerinde terapötik bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (Arunasree, 2010; Melo vd., 2011; Jayakumar vd., 2012).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Periodonsiyum

Periodonsiyum “dişleri saran ve destekleyen dokular” olarak tanımlanmakta ve alveolar kemik, sement, periodontal ligament ve dişetinden oluşmaktadır (Dorland, 1965; Ainamo vd.,1981).

Bu yapıların bir araya gelmesiyle oluşan periodonsiyumun görevleri;

- Doku yıkımı ve yaşlanma ile meydana gelen yapısal değişiklikleri remodelasyon ve rejenerasyon ile telafi etmek
- Çiğneme, konuşma ve yutkunma sırasında oluşan kuvvetleri karşılamak ve eşit olarak dağıtmak
- Dişi, çevresindeki kemiğe bağlamak
- Dış ortama ait zararlı etkilere karşı savunma yapmak
- İç ve dış ortamlar arasında bariyer oluşturarak vücut yüzeyinin devamlılığını korumaktır (Newman vd., 2002).

### 2.2. Dişeti

Morfolojik olarak dişeti, yapışık dişeti ve serbest dişeti olarak adlandırılan iki anatomik yapıdan meydana gelmiştir (Lindhe vd., 2003). Serbest dişeti, gingival sulkusun yumuşak doku duvarını oluşturur ve dişetin dişler üzerinde sonlandığı bölgede yer alarak dişlerin servikal bölümlerini sarar. Dişler üstünde dantela gibi sonlandığı yere dişeti kenarı, komşu iki dişin kontak noktaları altındaki alanı dolduran kısmı ise dişeti papili olarak adlandırılır. Serbest dişeti genişliği ortalama 0,5-2 mm arasındadır (Newman vd., 2002).

Yapışık dişeti, dişeti oluşu tabanından başlayarak mukogingival birleşime kadar devam eder. Oldukça esnek bir yapıdadır ve alttaki kemiğin periostuna sıkıca bağlanmaktadır. Mukogingival birleşimden sonra alveol mukozası ile devam eder. Non-keratinize alveol mukozası, yapışık dişetin aksine periosta oldukça gevşek

bağlanır, bu nedenle hareketli bir yapıdadır. Yapışık dişetin genişliği, mukogingival birleşim ile gingival sulkus tabanını arasındaki mesafedir (Lindhe vd., 2003).

Klinik olarak yalnızca dişeti gözle görülebilmektedir ve sağlıklı dişeti pembe renkli olarak gözlenmektedir. Keratinizasyon ve pigmentasyon derecesine bağlı olarak klinik olarak az çok belirgin olan mukogingival hatla oral mukozadan apikal olarak ayrılmaktadır. Yapışık keratinize dişeti, mukogingival hattan koronal olarak uzanmaktadır ve kolajen lifleri ile alttaki periosteuma sıkı bir şekilde bağlanmaktadır. Yapışık dişetin koronoapikal genişliği farklı bireyler ve dişler arasında önemli ölçüde değişkenlik gösterir ve yaşla birlikte daha geniş olma eğilimindedir (Ainamo vd., 1981).

### **2.2.1. Dişeti Epiteli**

Dişeti epiteli, periodonsiyumun koruyucu bütünlüğünü sağlayan en önemli yapıdır. İnsan dişeti epitelinin histolojik görünümü çok detaylı olarak incelenmiş ve çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Schroeder vd., 1966; Muller vd., 1983; Schroeder vd., 1981). Dişeti, 4 epitel tabakasından oluşmaktadır. Bu tabakalar Stratum bazale, spinosum, granülozum ve korneum olarak adlandırılmaktadır. Stratum bazale, germinatif tabakayı temsil etmektedir; hücreleri esas olarak küboidaldir ve hemidesmozomlar aracılığıyla alttaki bazal laminaya bağlanmaktadır. Bazal hücreler ayrıca hem boşluk bağlantıları hem de hemidesmozomlar yoluyla birbirine bağlanmaktadır. Stratum bazale'nin bazı hücreleri tüm epitel boyunca göç etmekte ve keratinize olmaktadır. Bu hücrelere keratinosit adı verilmektedir (Skougaard., 1965).

Bazal tabakada tipik olarak gözlenen başka bir hücre tipi çok sayıda dendritik sürece sahip, yıldız şeklinde bir hücre olan melanositlerdir (Schroeder., 1969). Melanositlerin bilinen tek görevi, elektromanyetik radyasyonun iyonlaştırıcı etkilerine karşı koruma sağlayan bir pigment olan melanin üretmek ve onu keratinositlere dağıtmaktır. Transfer işlemi, keratinositler tarafından fagositoz yoluyla gerçekleşmektedir (Jimbow vd., 1976).

Dişeti epitelinde bulunan bir diğer hücre, kemik iliğindeki bir progenitör hücreden türeyen Langerhans hücresidir. Langerhans hücrelerinin, konak savunma hücrelerine benzer yüzey antijenleri ve reseptörleri içerdiği gösterilmiştir. Bundan dolayı bu hücrelerin dişetinde mikrobiyolojik hasara karşı konak yanıtında çok büyük bir rol

üstlendiği öne sürülmüştür (Newcomb vd., 1982). Özetle, dişeti epitelinin bazal tabakasındaki hücreler, alttaki yapıları koruma ve yeni epitel hücreleri üretmenin yanısıra stratum bazaleyi alttaki bağ dokusundan ayıran bazal laminayı oluşturan makromoleküllerin sentezlenmesi ve salgılanmasından sorumludur (Karring vd., 1970). Stratum bazalenin hemen üstünde, yüksek miktarda sitoplazmik filamentler barındıran hücrelerden oluşan stratum spinosum bulunmaktadır ve ışık mikroskopunda, komşu hücreler arasında görünen “köprüler” ile karakterize edilebilmektedir. Stratum spinosum’un üzerinde, keratohyalin granülleri, yassı hücresel elementler, enzimler ve Odland cisimlerini içeren stratum granulozum bulunmaktadır. Granüler tabakanın hücreleri arasındaki desmozomal bağlantılar diğer tabakalara göre daha sık gözlenmektedir. Hücreler oral epitelin en dış tabakasına, stratum korneuma yaklaştıkça, dişeti yüzeyine düz bir şekilde sıkıştırılmış şekilde görünen ve hiç çekirdek içermeyen korneositlere dönüşmekte ve hücre içi keratinizasyon süreci tamamlanmaktadır (Schroeder vd., 1966).

### **2.2.2. Dişeti Bağ Dokusu**

Epitel tabakasının altında lamina propria olarak da adlandırılan dişeti bağ dokusu bulunmaktadır. Bağ dokusu, serbest marjinal ve interdental diş eti ve bu yapıların tüm bölgeleri dahil olmak üzere yapışık dişetin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Hassell, 1993). Sağlıklı dişetin lamina propriasında daha az yoğunlukta bulunan diğer elementler ise fibroblast hücreleri, doku makrofajları, sinirler, bazı lökositler, mast hücreleri, vasküler elementler ile glikoprotein ve proteoglikanlardan oluşan temel maddedir (Schroeder vd., 1973).

### **2.2.3. Bağ Dokusu Hücreleri**

Periodonsiyum, bileşen dokuları üzerine getirilen stres ve saldırılara sürekli olarak yanıt vermesi gereken dinamik bir yapıdır. Normal olarak yumuşak bağ dokularında bulunan hücreler bu dinamizmi yansıtır (Çizelge 2.1). Hücreler, bağ dokusunun hacimce yaklaşık %8'ini oluşturur (Schroeder vd., 1973).

**Çizelge 2.1.** Bağ dokusu hücreleri (Hassell 1993)

<b>Sabit Hücreler</b>	<b>Hareketli Hücreler</b>
Fibroblastlar	Lenfositler
Mezenşimal Kök Hücreleri	Plazma Hücreleri
Adipositler	Makrofajlar
Mast Hücreleri	Lökositler (Nötrofil, Eozinofil, Bazofil)
Retiküler Hücreler	Pigment Hücreleri

### **2.3. Fibroblast**

Periodontal bağ dokusunda yaygın olarak bulunan ve işlevsel olarak en önemli hücrelerden birisi olarak bilinmektedir. Dişeti bağ dokusundaki hücrelerin %65'i fibroblastlardan oluşmaktadır (Schroeder vd., 1973). Bu hücrelerin görevi, yapısal bağ dokusu proteinlerini, kolajen ve elastini, ayrıca temel maddeyi oluşturan glikoproteinleri ve glikozaminoglikanları üretmektir. Periodontal fibroblastlar aktif bir kolajenazın yanı sıra matris metalloproteinazlar (MMP) olarak bilinen hücre dışı matrisi parçalama kapasitesine sahip olan enzimleri salgılamaktadırlar (Birkedal ve Hansen, 1988). MMP'lerin hepsi, fibroblastlar tarafından inaktif ve öncü formda salgılanmaktadır (Goldberg vd., 1989).

Fizyolojik koşullar altında periodontal fibroblastlar hücre dışı matrisi üretmekte ve homeostazı sürdürmektedir. Yabancı cisimleri fagosite etme ve çapraz bağlı kolajeni sindirme yetenekleri sayesinde fibroblast hücreleri dişetin yapısını ve doku bütünlüğünü korumak için çok önemlidir (Garant, 1976).

Fibroblastların büyük, soluk lekeli çekirdekleri, ana lif gruplarının histolojik bölümlerinde kolaylıkla görülebilmektedir. Hücre gövdeleri, genellikle ayırt edilmesi zor olan bir bazofilik sitoplazma ile lif demetinin uzun eksenine paralel şekilde görünmektedir. Elektron mikroskobu ile bakıldığında, klinik enflamasyon belirtileri gösteren hastaların dişetlerindeki bazı fibroblastların oldukça büyümüş ve sitopatik olarak değişmiş görüldükleri izlenmiştir (Simpson vd., 1974).

### **2.4. Periodontal Hastalık**

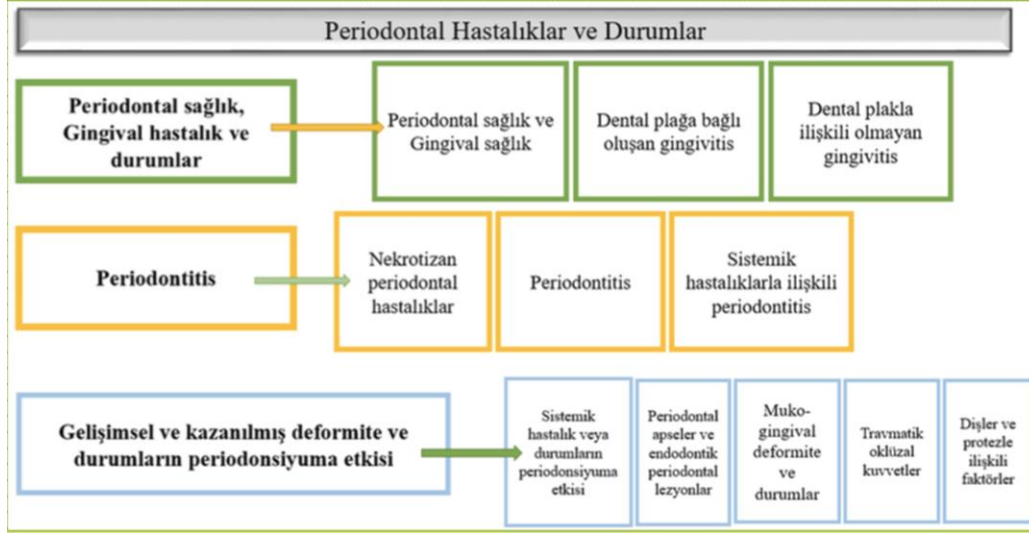
Periodontal hastalıklar, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* ve *Treponema denticola* gibi

subgingival biyofilmdeki patojenik mikrobiyotanın neden olduğu, doğal ve adaptif immün yanıtları tetikleyen gingivitis ve periodontitis olarak bilinen yaygın enflamatuvar hastalıklardır (Periodontol 1996). Patojenik mikrobiyotadaki değişimler, dişeti epiteli tarafından sitokin ve kemokinlerin üretimini indükler, bu da adezyon moleküllerin ekspresyonuna, dişeti kılcal damarlarının geçirgenliğinin artmasına ve polimorfonükleer nötrofillerin birleşim epiteli yoluyla dişeti cebine kemotaksisine neden olmaktadır (Ford vd., 2010). Bu süreç devam ederse, enflamasyon dokuların derinlerine kadar uzanır ve periodontal cep oluşumu ve ataçman kaybına neden olur (Hernández vd., 2011).

Ağız boşluğu, vücudun diğer sistemleriyle bağlantılı bir bölgedir ve izole bir alan olarak görülmemelidir. Literatürde, periodontal hastalık ile kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, artrit, alzheimer, gebelik komplikasyonları gibi birçok sistemik durumlar arasındaki ilişkiye dair kanıtlar toplanmıştır ve bu durum bireylerin yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Arigbede vd., 2012).

## **2.5. Periodontal Hastalıkların Sınıflaması**

Periodontal hastalıkların 1999 sınıflaması periodontolojide hem klinik hem de bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan uygulanabilir bir kaynak sağlamış olsa da; agresif ve kronik periodontitis teşhisindeki belirsizlik,hastalıklar arasında patobiyolojik temelli ayırımın yapılmaması,öngörülen sınıflar arasındaki temel ayırımın net olmaması ve doğru teşhis konulmasında yaşanan sıkıntılardan dolayı yeni bir sınıflama ihtiyacı doğmuştur.Bu nedenlere dayanarak çevresel ve sistemik risk faktörlerini değerlendiren yeni bilgiler toplanarak, 2017 yılında periodontal hastalık sınıflaması revize edilmiştir (Armitage, 1999; Papapanou vd., 2017 ) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. 2017 Periodontal hastalıkların ve durumların sınıflandırılması (Caton vd., 2018)

## 2.5.1. Periodontal Hastalıklar ve Durumlar

1. Periodontal sağlık, gingival hastalıklar ve durumlar
2. Periodontitis
3. Gelişimsel ve kazanılmış durumların periodonsiyuma etkisi

### 2.5.1.1. Periodontal Sağlık Gingival Hastalıklar ve Durumlar

#### 2.5.1.1.1. Sağlıklı Periodonsiyumda Klinik Gingival Sağlık

Sağlıklı periodonsiyumda kemik kaybı ve ataçman kaybı yoktur. Klinik gingival sağlık, klinik olarak enflamasyonun olmaması durumudur.

#### 2.5.1.1.2. Azalmış Periodonsiyumda Klinik Gingival Sağlık

Azalmış periodonsiyum periodontitis hastası olmayan bireyde, gingival çekilme ya da kron boyu uzatma cerrahisi gibi işlemlerden sonra veya daha önceden periodontitis geçmişi olan; ancak şu an periodontal olarak stabil olan hastalarda enflamasyon yoksa, klinik gingival sağlık olarak tanımlanır.

#### 2.5.1.1.3. Dental Plakla İlişkili Gingivitis

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



#### **2.5.1.1.4. Dental Plakla İlişkili Olmayan Gingivitis**

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

#### **2.5.1.2. Periodontitis**

##### **2.5.1.2.1. Nekrotizan Periodontal Hastalıklar**

- Nekrotizan gingivitis
- Nekrotizan periodontitis
- Nekrotizan stomatitis

##### **2.5.1.2.2. Sistemik Hastalıklarla İlişkili Periodontitis**

###### **✓ Periodontitis**

2017 sınıflamasında periodontitis, şu şekilde tanımlanmıştır:

- $\geq 2$  komşu olmayan dişte interdental klinik ataçman kaybı (CAL) varlığı veya bukkal veya oral CAL  $\geq 3$  mm ve cep derinliği (PD)  $> 3$  mm periodontal yıkım varlığı ile karakterize bir durumdur (Tonetti vd., 2017).
- Staging (Evreleme) ve Grading (Derecelendirme) baz alınarak karakterize edilmiştir (Tonetti vd.,2017) (Çizelge 2.2 ve 2.3).

###### **✓ Peri-İmplant Hastalıklar ve Durumlar**

- Peri-implant sağlık
- Peri-implant mukozitis
- Peri-implantitis
- Peri-implant yumuşak ve sert doku eksiklikleri

**Çizelge 2.2.** Periodontitis evre sınıflaması (Tonetti vd., 2018)

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

**Çizelge 2.3.** Periodontitis derece sınıflaması (Tonetti vd., 2018)

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

## 2.6. Periodontal Hastalık Patogenezi

Periodontal dokularda mikroorganizma türleri tarafından yaralanma veya istilaya uğrama durumunda fizyolojik bir cevap olarak enflamasyon meydana gelmektedir. Bu süreçte, kayıp veya hasarlı dokular iyileştirilmeye, onarılmaya ve yenilenmeye çalışılmaktadır. Zararlı uyarıların varlığına ilk tepki akut enflamasyondur ve “doğal bağışıklık” tepkisinin aktivasyonu baskındır. Doğal bağışıklık, patojenlere karşı ilk

savunma hattıdır ve konağı korumayı amaçlayan fizyolojik aktiviteleri içermektedir. Bu yanıt genellikle transüda sıvısının birikmesini ve ardından hücreden zengin enflamatuvar infiltrat akışını içermektedir (Ebersole vd., 2013). Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi kısa sürelidir ve mikrobiyal hasarın veya diğer enflamasyona neden olan uyarıların çözülememesi durumunda adaptif bağışıklık sisteminin baskın olduğu kronik enflamatuvar durumların gelişmesine yol açabilmektedir (Çekici vd., 2014). *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* ve *Treponema denticola* gibi spesifik bakterilerin varlığı, periodontitis için birincil mikrobiyal etiyolojik faktör olarak bilinmektedir. Ancak bu bakterilerin tek başına varlığı her zaman ciddi periodontal ataçman kaybının gelişmesiyle sonuçlanmamaktadır (Socransky vd., 1998). Hastalık indüklenmesi ve yayılmasındaki en büyük etken, bir süre sonra bu mikroorganizmaların, biyofilm adı verilen organize bir bakteri topluluğu halinde olgunlaşabilmesidir (Marsh, 1994). Biyofilmdeki bakteri türleri rastgele dağılmamıştır, çevresel faktörleri daha iyi tolere edebilecek ve hızla büyüyecek şekilde organize edilmiştir (Marsh, 2000). Gram-pozitif bakteri toplulukları, kolonize olma ve konakçı içinde simbiyotik olarak var olma kapasitesine sahiptir. Bu sayede Gram negatif anaerob patojenik bakterilerin büyümesini rekabetçi bir şekilde inhibe ederek koruma sağlamaktadır (Roberts vd., 2015). Artan mikrobiyal yüke karşı bir enflamatuvar yanıtın gelişmesi ve biyofilmin büyümesiyle artan virülans, daha disbiyotik bir biyofilme geçişi destekleyebilmekte ve gelişen enflamasyon, gram-negatif anaerobik bakterilerin çoğalmasını teşvik etmektedir. Bu bakterilerin virülans faktörleri, dişeti oluşunu istila etmelerine ve bazı konak savunmalarından korunmalarına izin vermektedir. Bu durum konakçının immünoenflamatuvar yanıtını başlatmakta ve tedavi edilmezse periodontal hastalığa sebep olmaktadır (Hajishengallis vd., 2011). Subgingival periodontal patojenlerin varlığında, konakçı bağışıklık sistemi, periodonsiyumu korumak ve homeostazı yeniden sağlamak için koordineli bir şekilde yanıt vermektedir (Çekici vd., 2014). Periodontal enflamasyon gelişiminin ilk aşamasında, bakteriyel ürünler proenflamatuvar mediyatörlerin salınımını indüklemektedir. Proenflamatuvar sitokinlerin artan salınımının nükleer faktör kapp-B transkripsiyonuna (NF- $\kappa$ B) bağlı olduğuna inanılmaktadır (Baldwin, 1996). Bu süreç, gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunan ve zararlı bir endotoksin olan lipopolisakkaritin (LPS) varlığı ile aktive olmaktadır (Hanada vd., 2002). Salgılanan proenflamatuvar mediyatörler, sitokinler ve interlökinleri içerir (Bloemen vd., 2011). İnterlökinler (IL) ve tümör nekroz faktörleri (TNF) gibi

spesifik sitokinlerin incelenmesi, periodonsiyumun tahrip olmasına neden olan periodontal patojenlerin varlığına ve altta yatan konak yanıtının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Periodontitise neden olan patofizyolojik reaksiyonları anlayabilmek için hayvan modelleri geliştirilmiştir (Weinberg, 1999). Bu model sistemlerinin kullanılmasıyla periodontal enflamasyon varlığının TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8 gibi proenflamatuvar sitokinlerin dolaşımında artışına yol açtığını göstermek mümkün olmuştur (Garlet, 2010). Bu mediyatörlerdeki artış, polimorfonükleer nötrofillerin damar sisteminden enflamasyon bölgesine göçünü kolaylaştıran vazodilatasyona neden olur. Ayrıca sitokinlerin bağ dokusu metabolizması ve kemik metabolizması üzerinde etkisi vardır. IL-1 $\beta$  salınımının, nükleer faktör  $\kappa$ B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörünün ekspresyonunu artırabileceği gösterilmiştir (Liu vd., 2010). Osteoblastlar, fibroblastlar ve aktive edilmiş T hücreleri tarafından eksprese edilen RANKL, pre-osteoklastların yüzeyinde doğrudan nükleer faktör  $\kappa$ B'nin reseptör aktivatörüne bağlanır ve kemik rezorpsiyonundan sorumlu olan ve periodontitis patogeneğinde önemli bir rolü olan osteoklastların farklılaşması ile sonuçlanır (Crotti vd., 2003). Ayrıca IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$ , MMP'lerin polimorfonükleer lökosit aracılı salınımını artırır. MMP'ler, hücre dışı matrisin bozulmasından sorumlu olan bir enzim grubudur (Visse vd., 2003). Bu nedenle, artan MMP salınımının periodonsiyum için olumsuz sonuçları vardır ve enflamatuvar mediyatörlerin aktivasyonu yoluyla dolaylı olarak enflamasyonu düzenlemektedir (Romanelli vd.,1999). Sonuç olarak periodontal ligament ve alveolar kemik dahil olmak üzere diş destek dokularının daha fazla kaybına yol açmaktadır (Birkedal ve Hansen, 1999). Bakterilere ve ayrıca periodontal dokuları kolonize eden virüslere karşı enflamatuvar ve bağışıklık tepkileri, sistemik dolaşımı ve nihayetinde vücudun periferik sistemlerini içerir. Bu sistem hücresel ve hümoral faktörleri, sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerini içeren karmaşık çift yönlü bir konak-mikroorganizma etkileşimler dizisi yaratır. Primer etiyolojik ajan, subgingival biyofilm içindeki ağırlıklı olarak gram negatif anaerobik veya fakültatif bakteriler olmasına rağmen, periodontal doku yıkımının çoğuna bu mikroorganizmalara ve ürünlerine karşı uygun olmayan bir konak tepkisinin neden olduğu düşünülmektedir (Lamster vd., 1992). Daha spesifik olarak, proteolitik enzimler ve ROT ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki homeostatik dengenin korunmasından sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Chapple vd., 2007).

## 2.7. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektronları olması bakımından çoğu biyolojik molekülden farklı olan küçük yayılabilir moleküllerdir. Serbest radikaller oldukça reaktif olma eğilimindedir ve bir veya birden fazla moleküle zarar vermek için tek bir serbest radikal yeterlidir. Serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklı üretilmektedir. Endojen kaynaklı üretim bağışıklık hücresi aktivasyonu, enflamasyon, iskemi, kanser, aşırı egzersiz, stres ve yaşlanma ile olurken; çevre kirliliği, ağır metaller (Cd, Hg, Pb, Fe ve As), bazı ilaçlar (siklosporin, takrolimus, gentamisin ve bleomisin), kimyasal çözücüler, pişirme (füme et, kullanılmış yağlar ve katı yağlar), sigara dumanı, alkol ve radyasyonlar eksojen kaynaklı üretime neden olabilmektedir. Bu eksojen bileşikler vücuda girdiğinde metabolize olurlar ve yan ürünler olarak serbest radikaller üretilir (Valko vd., 2006). Vücutta oluşan ROT ile antioksidan yanıt arasındaki denge korunduğu sürece vücut serbest radikallerden etkilenmemektedir. ROT üretiminin aşırı artması ya da antioksidan savunmanın azalması sonucu bu dengenin bozulmasıyla birlikte oksidatif stres oluşur ve protein hasarına, hücre membranı hasarına, mitokondri hasarına, apoptozisin indüklenmesine ve hücre ölümlerine neden olabilmektedir (Sies, 2000).

## 2.8. Reaktif Oksijen Türleri

ROT, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve nitrik oksit radikali gibi serbest radikal türleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile hipokloröz asit gibi oksijenin radikal olmayan türevlerini içeren toplu bir terimdir. Serbest radikallerin dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronun varlığı, bu türleri, özellikle serbest radikal türlerini doğada aşırı derecede reaktif hale getirir (Halliwell vd., 1992). Son yıllarda, ROT, birçok enflamatuvar hastalığın ilerlemesindeki merkezi rolleri nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmeye başlamıştır (Mittal vd., 2014). ROT'lar normal hücrel metabolizmada yer alırlar ve çoğu dokudaki hücreler tarafından sürekli olarak üretilirler. Fizyolojik koşullar altında ROT, ROT aracılı doku hasarını önleyen antioksidanlar tarafından etkili bir şekilde nötralize edilir (Sies,1997). Enflamasyon meydana geldiğinde, esas olarak doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri nedeniyle ROT üretimi artar (Mittal vd., 2014). Daha sonra, ROT'un yüksek seviyeleri veya aktiviteleri antioksidan savunma sistemi tarafından dengelenemez, bu

da oksidatif strese ve doku hasarına yol açar (Sies, 1997). Sonuç olarak; ROT, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein hasarı ve önemli enzimlerin oksidasyonunu içeren doğrudan doku hasarına neden olabilir ve sinyal molekülleri veya enflamasyon araçları olarak da işlev görebilirler (Chapple ve Matthews, 2007).

## **2.9. Protein Hasarı**

Oksidatif stres durumunda protein peroksidasyonu peptid zincirinin parçalanması, çapraz bağlanma, elektrik yükünün değiştirilmesi, proteinler ve spesifik aminoasitlerin oksidasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bazı eser metal iyonlarının ( $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  gibi) etkisi ile proteinler oksidatif olarak hasar görmektedir (Reddy, 2006; Bahramikia vd., 2009).

Oksidatif hasara en duyarlı olan aminoasitlerin prolin, lizin, histidin ve argininin olduğu tespit edilmiştir. Proteinlerin ROT ile reaksiyonu sonucu peroksitler ve karboniller gibi çok çeşitli kalıntı modifikasyonları meydana gelmekte ve oluşan kalıntı modifikasyonları oksidatif hasarın belirlenmesinde oldukça etkin rol oynamaktadır (Nimse ve Pal, 2015).

## **2.10. DNA Hasarı**

Nükleotidlerin oksidasyonu sonucunda oksidatif stres DNA hasarı meydana getirebilmektedir (Dizdaroglu ve Jaruga, 2012). Serbest radikallerden olan hidroksil radikali DNA bazlarına zarar vermekte ve DNA'da tek ve çift dal kırıklarına, kontrolsüz baz dizilimine ve baz modifikasyonlarına neden olmaktadır (Box vd., 1995).

ROT aracılı DNA hasarına birçok hastalıkta rastlanmaktadır. ROT aracılı DNA hasarı görülen bazı hastalıklar ve durumlar; kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma olarak bilinmektedir (Milisav vd., 2018; Smallwood vd., 2018; Ochoa vd., 2018).

## **2.11. Lipit Peroksidasyonu**

Başta hücre zarlarının çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere tüm ana biyomolekül sınıfları serbest radikaller tarafından saldırıya uğramaktadır. Oluşan lipit

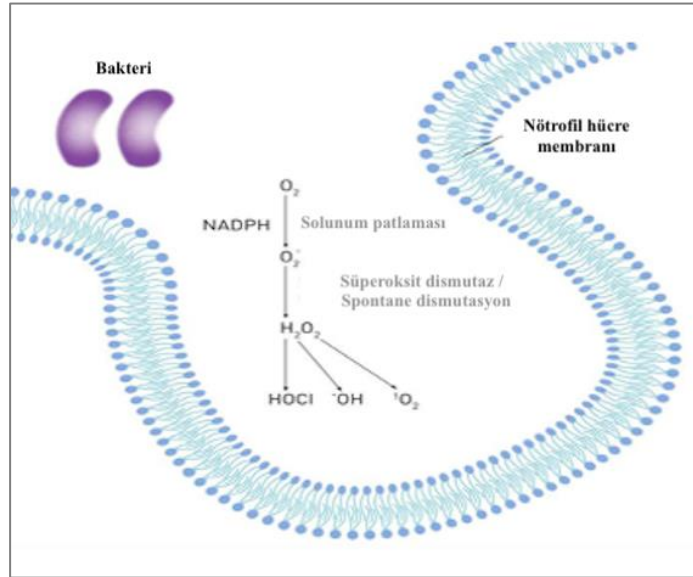
peroksidasyonu kendi kendine devam eden bir zincir reaksiyonu olarak ilerlediği için oldukça yıkıcıdır (Jenkinson vd., 1999; Park vd., 2009). Lipit peroksidasyonunun başlıca ürünü lipit hidroperoksittir. Lipit peroksidasyonu lipit hidroperoksitin aldehitlere ve diğer karbonil bileşenlere dönüşmesi ile sonlanır. Malondialdehit, bu bileşenlerden biridir ve oksidatif stresi en iyi değerlendiren ve aynı zamanda periodontitiste en çok araştırılan lipid peroksidasyon ürünüdür. Lipit peroksidasyon seviyelerini belirlemek için çalışmalarda sıklıkla kullanılır. Malondialdehit, enzimatik veya enzimatik olmayan işlemler yoluyla araşidonik asit ve diğer çoklu doymamış yağ asitlerinin parçalanmasıyla üretilen bir son üründür (Esterbauer ve Cheeseman, 1990). Lipid peroksidasyonu, doku yıkımı ile yaygın olarak ilişkilendirilmektedir ve bu durumun periodontitis gibi doku yıkımının yüksek olduğu hastalıklarla kuvvetli bir ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Esterbauer vd., 1991). Lipid peroksidasyon ürünleri, iltihabi diş eti dokularından difuze olduğu için, tükürükte ve serumda ölçülebilmekte ve sağlıklı dokularda çok düşük düzeyde iken hastalıklı durumlardaki artışı, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının bir göstergesi olarak kullanılabilir (Panjamurthy vd., 2005; Khalili ve Biloklytska, 2008).

## **2.12. Periodontitis ile İlişkili ROT Aşırı Üretimi**

Periodontitiste baskın ROT kaynağının nötrofiller olduğu düşünülmektedir. Kanda en fazla bulunan hücreler, bakteriyel enfeksiyona karşı ilk savunma hattında bulunmaktadır. Patojenik biyofilm tarafından konak yanıtının başlatılmasından sonra nötrofiller, periodontal dokuda ve dişeti sulkusunda toplanan en yaygın enflamatuvar hücreler haline gelir (Miyasaki, 1991). Patojenler tarafından uyarılmanın ardından nötrofiller, fagositoz sırasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz tarafından katalize edilen “solunum patlaması” adı verilen metabolik yol aracılığıyla  $O_2^-$  üretir (Chapple ve Matthews, 2007) (Şekil 2.2).  $O_2^-$  fagozomal ve hücre dışı ortama salınabilir ve daha sonra  $H_2O_2$ , hipokloröz asit, hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) ve tek oksijen ( $1O_2$ ) gibi farklı radikal ve radikal olmayan türevlere dönüştürülebilir. Protein fosforilasyonu, çeşitli transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu, apoptoz, bağışıklık ve farklılaşma gibi süreçlerin tümü, uygun bir ROT üretimine ve hücreler içinde düşük seviyede tutulmasına bağlıdır (Rajendran vd.,

2014). ROT üretimi arttığında proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi önemli hücresel yapılar üzerinde zararlı etkiler görülmektedir (Wu vd., 2013).

Bu moleküller esas olarak mitokondri, peroksisom ve endoplazmik retikulumda meydana gelen çeşitli metabolik reaksiyonlarda tüketilen oksijenden üretilir. Mitokondri tarafından tüketilen oksijenin yaklaşık %2'sinin indirgenerek süperoksit oluşturduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle mitokondri ROT'un ana kaynağı olarak kabul edilmektedir (Finkel, 2012, Handy vd., 2012). Peroksisomlar ise hem ROT'un temizlenmesinde hem de ROT üretiminde yer almaktadır (Schrader vd., 2006). Endoplazmik retikulum, disülfid bağı oluşumunu ve protein katlanmasını destekleyen ve protein oksidasyonu yoluyla ROT seviyelerini artıran oksitleyici bir ortam oluşturmaktadır (Malhotra vd., 2007).



Şekil 2.2. Periodontal hastalıkta artan ROT üretim mekanizması (Wang vd., 2017)

### 2.13. Antioksidanlar

Biyolojik antioksidan kavramı, oksitlenebilir bir substratınkine kıyasla daha düşük bir konsantrasyonda mevcut olduğunda, substratın oksidasyonunu geciktirebilen veya önleyebilen bir bileşik olarak tanımlanmaktadır (Halliwell vd., 1999; Godic vd., 2014).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, antioksidanların ROT aktivitesini azaltarak kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların insidansını azaltma etkisini kanıtlamıştır (Godic vd., 2014). Oksidatif hasara karşı geliştirilen ilk tanımlanan antioksidan savunma sistemleri, ROT oluşumunu engelleyenler ve oluşan radikalleri bloke



edenler olarak bilinmektedir (Cheeseman vd.,1993). Vücutta redoks homeostazını sürdürmek için detoksifiye edici enzimler ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidan moleküller ağı mevcuttur. Antioksidanlar, endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki grup altında toplanabilir (Çizelge 2.4). Endojen ve eksojen antioksidanlar, serbest radikalleri etkisizleştirmek için kullanılırlar ve oksidan/antioksidan dengesini sağlamak için serbest radikallerden vücudu korurlar. Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimatik savunma hattını oluşturan enzimatik antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanlar, doğrudan ROT nötralizasyonundan sorumludur ve bu mekanizmalar, ROT seviyelerini normal bir aralıkta sürdürülmesi için gereklidir (Chapple vd., 2000; Kaklamanos vd., 2002; Battino vd., 1999). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutatyon, koenzim Q 10, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, transferrin ve seruloplazmin olarak bilinmektedir (Aydemir vd., 2009; Sen, 2011). ROT'u nötralize etmek için ikincil mekanizmalar eksojen antioksidanlardır (Chapple vd., 2000). Çeşitli meyve ve sebzeleri içeren dengeli bir diyet yoluyla eksojen olarak elde edilir (Platel vd., 2015). Eksojen kaynaklı antioksidanları, vitamin ve ilaç olarak kullanılan antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırabiliriz.  $\alpha$ -Tokoferol,  $\beta$ -karoten, askorbik asit ve folik asit dışarıdan alınan vitamin kaynaklı antioksidanlardır (Aydemir vd., 2009; Sen, 2011). Ksantin oksidaz ve NADPH inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, trolox-c, sitokinler, barbitüratlar ve demir şelatörleri ise ilaç kaynaklı antioksidanlardır (Aydemir vd., 2009; Sen, 2011; Platel vd., 2015). Vitamin kaynaklı antioksidanlardan C vitamini, doku büyümesi ve onarımı, adrenal bez fonksiyonu ve sağlıklı diş etleri için gerekli bir antioksidandır. C vitamini, sığırlarda olmasına rağmen insanlarda endojen olarak sentezlenmez (Halliwell ve Gutteridge, 1995). E vitamini ise yağda çözünen bir antioksidandır. Düşük yoğunluklu lipoprotein partikülü başına 6 molekül  $\alpha$ -tokoferol vardır, bu oran diğer tüm antioksidanlardan daha yüksektir (Esterbauer vd., 1992). Plazma antioksidan durumunun yarısı urat ve albüminden gelirken, antioksidan aktivitenin diğer yarısı E vitamini, enzimler ve flavonoidler gibi küçük moleküllerden türetilir (Rice ve Evans, 1997). Meyve ve sebzelerde mevcut olduğu bilinen antioksidan vitamin ve minerallere ek olarak karotenoidler, flavonoidler ve diğer fenolikler gibi fitokimyasallar, yüksek radikal süpürücü aktiviteleri ve kompleks demir oluşturma kapasiteleri nedeniyle çok güçlü

antioksidanlardır (Wada ve Ou, 2002; Areias vd., 2001). Bu fitokimyasalların ayrıca antibakteriyel, antiviral, antitrombotik, antiinflamatuvar ve antikanser aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Hou, 2003; Astley ve Lindsay, 2002). Meyve ve sebzelerin antioksidan kapasitesinin çoğunluğunun C vitamininden ziyade fenolikler ve flavonoidlerden geldiği öne sürülmüştür (Liu vd., 2002). Redoks döngüsü enzimleri veya faz 2 enzimleri, diyetle antioksidanlar gibi çeşitli kimyasal ajanların düşük konsantrasyonları tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir (Ramirez vd., 2001). Talalay (2000) tarafından yapılan deneyler, faz iki enzimlerin glutatyon gibi endojen ligandlar ile sentetik oksidatif stres ürünleri arasında konjugasyonu desteklediğini ve bunun da suda daha fazla çözünür ve dolayısıyla daha kolay atılabilir ürünlere yol açtığını göstermiştir. Redoks döngüsü enzimleri arasında glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz, kinon redüktaz ve süperoksit dismutaz bulunur. Süperoksit dismutaz, oksijen ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturmak üzere iki süperoksit radikalinin dismutasyonunu katalize ederek hücreden serbest radikalleri uzaklaştırır. Süperoksit dismutaz (SOD), insan vücudunda en çok bulunan antioksidan enzimlerden biridir (Akalin vd., 2005). Etki mekanizmalarından biri, süperoksit anyonlarının, bir antioksidan görevi gören H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dönüştürülmesidir (Kim vd., 2010; Scandalios 2005). Çeşitli enzimler, serbest radikallerin neden olduğu hasarı onarmak için hareket edebilir. Metionin sülfoksit redüktaz böyle bir enzimdir ve işlevi, aminoasit metioninin serbest radikal oksidasyonu ile oluşan metionin sülfoksiti onarmaktır. Bu değiştirilmiş aminoasidi içeren proteinler, düşük metionin sülfoksit redüktaz seviyelerinin varlığı ile birlikte katarakt oluşumunda rol oynar. Bununla birlikte metionin sülfoksit redüktazın radikalın neden olduğu hasarı telafi etmedeki önemi henüz açıklığa kavuşturulmamıştır (Halliwell ve Gutteridge, 1995). Oksidatif olarak hasar görmüş DNA, spesifik onarım enzimleri tarafından onarılır (Mcan ve Berti, 2003).

**Çizelge 2.4.** Endojen ve eksojen antioksidanlar (Aydemir vd., 2009; Sen, 2011)

ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	$\alpha$ -lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR		
VİTAMİN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	
$\alpha$ -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
$\beta$ -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar)	
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin)	
	Nötrofil adezyon inhibitörleri	
	Sitokinler (TNF ve IL-1)	
	Barbitüratlar	
	Demir şelatörleri	

## 2.14. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, ROT üretimi ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki homeostatik denge kaybından kaynaklanmaktadır ve periodontal hastalık gibi birçok enflamatuar hastalıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Nakanishi vd., 2004). Genel olarak reaktif özelliklere sahip oksijen içeren süperoksit ( $O_2$ ) ve hidroksil ( $HO^\cdot$ ) serbest radikalleri ile  $H_2O_2$  gibi radikal olmayan moleküller, ROT olarak bilinmektedir. Protein fosforilasyonu, çeşitli transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu, apoptoz, bağışıklık ve farklılaşma gibi süreçlerin tümü, uygun bir ROT üretimine ve hücreler içinde düşük seviyede tutulmasına bağlıdır (Rajendran vd., 2014). Orta derecede stres apoptozu tetikleyebilirken, daha yoğun stresler nekroza neden olabilmektedir. Antioksidan savunma mekanizmaları yetersizse, çeşitli dokularda

hasar oluşabilmektedir (Pizzino vd., 2017). Aşırı ROT üretimi, hücrel lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verebileceğinden hücre işlevselliğini bozabilir (Rajendran vd., 2014). Hücreler, kendilerini ROT'un neden olduğu hücrel hasardan korumak için esas olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GP) gibi enzimatik bileşenlere dayanan bir antioksidan savunma sistemi kullanırlar (Deponte vd., 2013).

Oksidatif stres, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabetes mellitus, enflamatuvar hastalıkların yanı sıra psikolojik hastalıklar ve yaşlanma süreçleri dahil olmak üzere birçok hastalığın patogenetik mekanizmalarıyla ilişkili bir durumdur (Durackova vd., 2010).

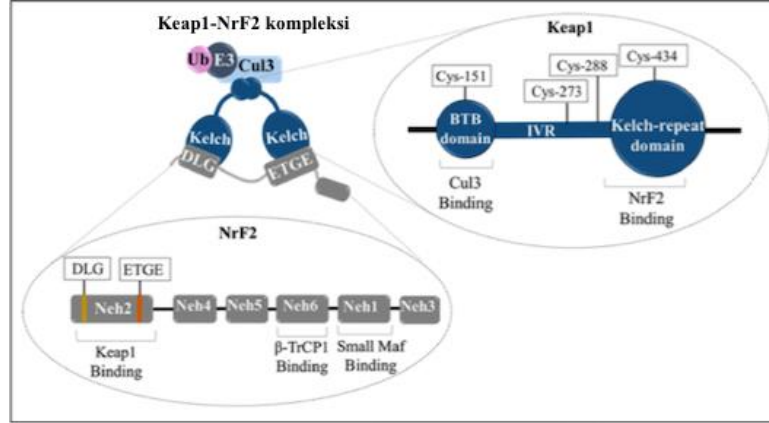
## **2.15. Periodontal Hastalık ve Oksidatif Stres**

Periodontitis patogeneğinde enflamatuvar hücrelerde en baskın bağışıklık sistemi hücresi olan nötrofiller fazla miktarda üretildiği zaman normalden daha çok ROT oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum oksidan ve antioksidan sistem arasındaki dengeyi bozarak oksidatif strese neden olmaktadır (Chapple ve Matthews, 2007; Nauseef ve Borregaard, 2014). Nötrofiller, NADPH oksidaz aktivasyonu, süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) ve ikincil ROT oluşumuyla proenflamatuvar yolları aktive eden sinyal stimülasyonuna aracılık ederek, enflamasyon sırasında artan oksidatif strese neden olmaktadır. Nötrofil türevli ROT'un hepsi birçok akut ve kronik enflamatuvar durumda görülen doku hasarı ile ilişkilendirilmektedir (Kehrer, 1993). ROT'ların enflamasyon alanında doku hasarına neden olmasının yanında proenflamatuvar sitokinler için ikincil haberci gibi davrandığı gösterilmiştir (Harjith vd., 2014). Ayrıca ROT, osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından RANKL reseptör aktivatörünü artırarak kemik yıkımına da katkıda bulunmaktadır (Wauquier vd., 2009).

## **2.16. Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2 (Nrf2)**

Nrf2, antioksidanların ve faz II detoksifiye edici enzimlerin gen transkripsiyonunu düzenleyen anahtar bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2, Nrf2 sinyallemesine aracılık eden moleküler etkileşimler için gerekli olan altı yüksek oranda korunmuş alanı (Neh1–6) içerir (Şekil 2.3). Oksidatif ve elektrofilik hasarlarda merkezi bir rol oynar ve esansiyel antioksidan ve detoksifiye edici enzim genlerinin promotöründe,

antioksidan yanıt elemanlarına (ARE'ler) afinitesi nedeniyle enflamatuvar hasarın kontrolüne katkıda bulunabilir (Sima vd., 2016). Bazal koşullar altında, Nrf2, bir hücre iskeleti olan Keap1'e bağlanır.



**Şekil 2.3.** Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör (Nrf2) ve Keap1'in etki alanı yapıları

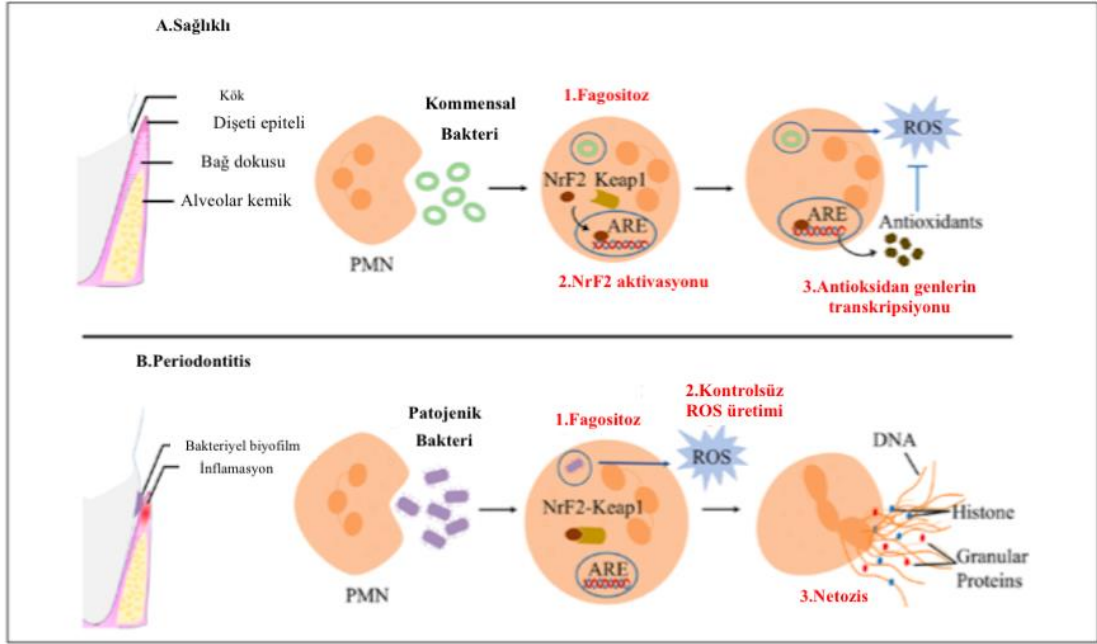
Nrf2, 6 yüksek oranda korunmuş alan içerir, Neh1–6. Neh1, küçük Maf proteinleri ile dimerizasyona aracılık eden ve DNA bağlanması için gerekli olan bir bZip motifi içerir. Neh2, Keap1 ile etkileşimi kontrol eden DLG ve ETGE motiflerini içerir. Neh6 alanı,  $\beta$ -TrCP1 adaptör proteini tarafından tanınan ve çekirdekte Nrf2'nin bozulmasına aracılık eden fosfodegronu içerir. Neh3–5, işlem alanları olarak işlev görür. Keap1'de araya giren bölge (IVR), BTB alanını Kelch alanından ayırır. BTB alanı, Keap1'in homodimerizasyonuna ve Cullin3 (Cul3) ile bağlanmasına aracılık eder. Kelch alanı, Neh2 ile etkileşime aracılık eder. Keap1'deki birkaç sistein kalıntısının, elektrofiller ve oksidanlar için sensörler olarak önemi gösterilmiştir. Nrf2'nin aktivasyonu için Cys151, Nrf2'nin baskılanması için ise Cys273 ve Cys288 gereklidir (Kansanen vd., 2013).

Nrf2, transkripsiyonel hedefleri ile birçok hücresel cevabı doğrudan düzenler. Oksidasyon koşullarında çoklu antioksidan proteinlerin regülasyonunu yöneterek, mitokondri türevli ROT'a karşı koyan sistemlerden biridir. Nrf2, mitokondriyal solunumda, ATP üretiminde ve mitokondriyal membran potansiyelinin korunmasında da görev almaktadır. Hücrelerde azalmış Nrf2 aktivitesi, düşük seviyelerde mitokondriyal membran potansiyeli, oksijen tüketim hızı ve ATP üretimi ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, Nrf2'nin yokluğunda, NADPH seviyelerinde de azalma gözlenmektedir (Dodson vd., 2019).

## 2.17. Periodontiste Nrf2'nin Rolü

Periodontal hastalığın ilerlemesi sırasında, kalıcı proenflamatuvar yanıtlar, nötrofillerin ilgili bölgeye gelmesini teşvik etmektedir. Bu bölgelerde, hücre dışı ortama sürekli bir nötrofil göçü ve ROT salınımı vardır (Dahiya vd., 2013) (Şekil 2.4). Patojenik biyofilmlerin büyümesini kontrol etme girişimi olan bu tepkiler, diş destek dokularının yıkımını teşvik etmektedir. Dolayısıyla oksidatif stres, periodontiste periodontal yıkıma katkıda bulunmaktadır (Chapple ve Matthews, 2007). Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, geleneksel periodontal tedavi gören kronik periodontitis hastaların oral nötrofilleri belirgin şekilde daha yüksek ROT üretmekte ve daha fazla periodontal ataçman kaybına sebep olmaktadır. Aşırı ROT üretimi ve antioksidan eksikliği, periodonsiyumdaki proteinlerde oksidatif hasara, plazmada ise lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır ve bu değişiklikler hastalık şiddeti ile ilişkili bulunmuştur (Kurita ve Ochiai vd., 2015).

Nrf2'nin periodontal hastalık toleransının kritik unsurları olan bakteri, nötrofil ve makrofaj etkileşimleri karşısında periodontal dokuların korunmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Hasturk vd., 2012). İleri periodontitisli hastalardan alınan nötrofillerde regüle edilen konakçı ile ilişkili immünopatolojik mekanizmalar, periodontitisin ilerlemesine büyük katkıda bulunduğu için disbiyotik biyofilmlere karşı immün toleransın klinik önemi oldukça büyüktür. Patojenlere nötrofil aracılı normal yanıt, ROT üretimini içerir. ROT'un birincil rolü bakteri inhibisyonu iken, bu moleküller fazla miktarda doku hasarına neden olur ve belirgin bir enflamatuvar yanıt başlatabilir. Hücreler, ROT'tan kaynaklanan hücre ve doku hasarının etkilerini en aza indirmek için özel sistemler geliştirmektedir. ROT ile ilişkili hasarın önlenmesine yönelik sistemlerden biri esas olarak Nrf2 transkripsiyon faktörünün down regülasyonundan sorumlu antioksidanların ekspresyonunu içermektedir (Kansanen vd., 2013).



**Şekil 2.4.** Sağlıklı ve hastalıklı periodontal dokuda nötrofil yanıtı

**(A)** Sağlıkta, sıkıca yerleşmiş dişeti dokuları epitelyal ataçmanın korunmasına yardımcı olur. Ağız boşluğu, nötrofilleri dişeti cebi ve epitelyuma girmeye teşvik eden çok sayıda patojenik olmayan bakteri barındırır. İlk savunma hattı olarak hareket eden nötrofiller, ROS üretmek bakteriyel biyofilme yanıt verir. Periodontal sağlıkta, üretilen ROS miktarları ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge korunur, bu sayede nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör (Nrf2) yolu aktive edilir ve ROS'u nötralize etmek için antioksidanlar salınır. Periodontal sağlıkla ilişkili bakteriyel biyofilmler, aşırı enflamasyon oluşturmadan periodontal koruma sağlayan hastalığa toleranslı, paraenflamatuvar polimorfonükleer lökosit fenotipini destekler.

**(B)** Periodontitiste bakteriler diş yüzeyinde birikir ve komşu epiteli ve bağ dokusunu enfekte ederek periodontal cepte artan nötrofil göçüne neden olur. Nötrofil infiltratındaki artış, Nrf2 yolağının down regülasyonu ve ardından antioksidan üretiminin inhibisyonu ile ilişkilidir, bu da aşırı ROS üretimine yol açar. Sonuç olarak, yüksek ROS seviyeleri, nötrofilin patojenle savaşmak için kullandığı savunma sistemlerinden biri olan netosis oluşumunda bir artışa yol açarak bakterilere bağlanan ve bakterileri öldüren granüler proteinleri serbest bırakır. Bu, antioksidan yolu yeterince düzenleyemeyen bir proenflamatuvar polimorfonükleer lökosit fenotipine karşılık gelebilir (Dahiya vd., 2013).

## **2.18. Keap1 (Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1)**

Keap1, Nrf2'ye bağlanan birincil Nrf2 düzenleyici mekanizma olarak işlev gören bir adaptör proteindir (Harder ve diğerleri 2015). İki Keap1 molekülü, N-terminalinde bulunan Nrf2'nin Neh2 alanındaki Nrf2 ile 2 anahtar motifin tanınmasından sorumludur. Nrf2'nin küçük bir kısmı, inhibe edici kompleksten kaçır ve bazal antioksidan tepki elementlerine (ARE) bağlı gen ekspresyonuna aracılık etmek için çekirdekte birikir, böylece hücrel redoks homeostazını sürdürür. Bazal koşullar altında, Nrf2, bozunma için Keap1'e bağlanır. Keap1, Nrf2'nin ubiquitin aracılı proteazom sistemine (UPS) sürekli geçişine aracılık eden, böylece Nrf2 protein düzeylerini düşük tutan ve gereksiz antioksidan genlerin transkripsiyonunu önleyen bir hücre iskeleti bağlayıcı proteindir (Kansanen vd., 2013)

### **2.18.1. Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1/Nükleer Faktör E2 ile İlişkili Faktör 2 (Keap1/Nrf2) Sinyal Yolu**

Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1/nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (Keap1/Nrf2) sinyal yolu, vücudun oksidatif hasardan korunmasında merkezi bir rol oynamaktadır. Nrf2 transkripsiyon faktörü, sitoplazmada baskılayıcı protein Keap1 tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Oksidatif stres altında Nrf2, Nrf2/Keap1 kompleksinden salınır ve çekirdeğe yer değiştirir. Daha sonra, ARE'lere bağlanır ve SOD, KAT ve hem oksijenaz-1 gibi down regülasyon genlerinin ekspresyonunu up regüle ederek, hücrel antioksidan savunma sistemini aktive eder (He vd., 2020). Nrf2'nin aktivasyonu, hücrel redoks homeostazını sürdürmek için gen ekspresyonunun düzenlenmesi için gereklidir (Harder vd., 2015).

## **2.19. Esansiyel Yağlar**

"Esansiyel yağ" terimi ilk kez 16. yüzyılda her ilacın etkili bileşenini "quinta essentia" olarak adlandıran Paracelsus tarafından kullanılmıştır (Malamas vd., 1992). Yaklaşık 500 bileşik olan esansiyel yağların bileşenleri arasında terpenler (monoterpenler ve seskiterpenler), terpenoidler (izoprenoidler), aldehitler ve fenoller gibi alifatik ve aromatik bileşikler bulunur. Baskın bileşenlerin, yağın toplam konsantrasyonunun %85'ini oluşturması mümkündür. 300'ü yaygın olarak ticareti yapılan yaklaşık 3.000 iyi bilinen esansiyel yağ olduğu tahmin edilmektedir.



Esansiyel yağların bileşimi, çevre koşulları, toprak bileşimi ve yetiştirme yöntemi, bitkinin toplandığı mevsim ve günün saati, depolama ve işleme koşulları, yağ çıkarma yöntemi ve bitki analizi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Esansiyel yağlar damıtma, fermantasyon, ezme, ekstraksiyon, hidroliz ve havalandırma yoluyla bitkilerden üretilir, ancak en sık kullanılan yöntem buharla damıtmadır. Bitkiler yüzyıllardır bulaşıcı hastalıkların tedavisinden parfüm üretimine kadar çok çeşitli amaçlarla kullanılmıştır. Yeni hastalıkların ortaya çıkması ile birlikte mikroorganizmaların halen kullanılan antimikrobiyallere karşı artan direnci, yeni ve daha etkili ilaçların geliştirilmesini gerektirmektedir. Bitkiler, bileşenlerinin biyolojik ve yapısal çeşitliliği nedeniyle, yeni antibakteriyel, antifungal ve antiparaziter bileşiklerin keşfi için benzersiz bir kaynak oluşturmaktadır (Sakkas vd., 2017).

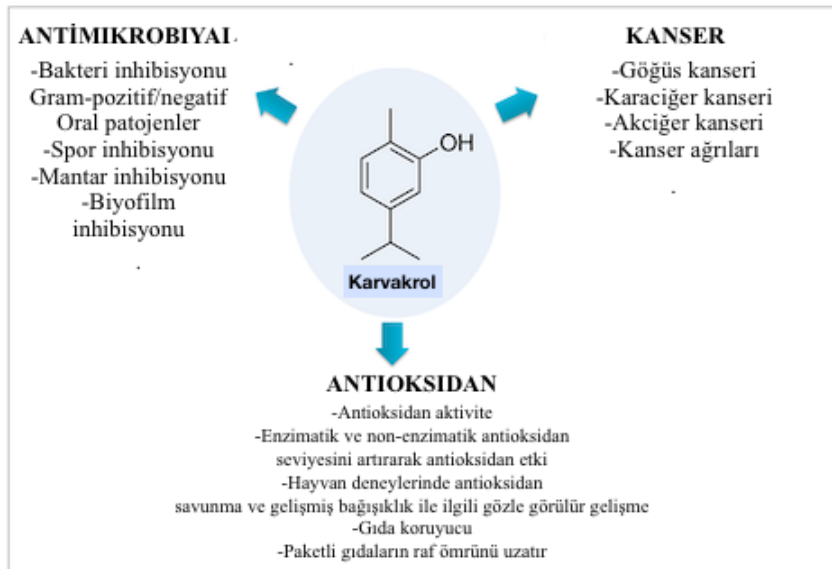
### **2.19.1. Periodontal Hastalık ve Esansiyel Yağlar**

Esansiyel yağlar, çeşitli ağız hastalıklarına ve özellikle diş hastalıklarına karşı koruyucu ve tedavi edici bir ajan olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Esansiyel yağların antimikrobiyal ve antiinflamatuvar ajan olarak, çeşitli diş hastalıklarının yönetimi ve tedavisi için önemli bir potansiyele sahiptir. Periodontitis, diş erozyonu, diş çürükleri, diş ağrısı, diş eti iltihabı ve plak tutumu gibi diş ve dişeti hastalıklarında, farklı esansiyel yağların terapötik etkinlikleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Son yıllarda, çeşitli araştırmacılar tarafından esansiyel yağ bazlı formülasyonlar ve bunların diş bakımındaki uygulamaları ile ilgili birçok ürün patentlenmiştir. Ancak, esansiyel yağ bazlı formülasyonların mevzuata uygunluğu ve ticari kullanımı için, esansiyel yağların güvenliğini ve etkinliğini destekleyen daha fazla klinik öncesi ve klinik çalışmalar yapılması gerekmektedir (Sakkas vd., 2017).

### **2.20. Karvakrol**

Karvakrol [2-metil-5-(1-metiletil)-fenol] kekik, biber ve yabani bergamot gibi aromatik bitkilerin uçucu yağlarında bulunan çeşitli hastalıklarda tedavi edici etkiye sahip antioksidan bir fenolik monotermen bileşimidir (Arkali vd., 2021). Karvakrol genellikle tüketim için güvenlidir. Gıdadaki kullanımları için FDA tarafından onaylanmıştır (Ultee vd., 1999). Karvakrolün antibakteriyel (Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn, 2010; Ravishankar vd., 2010; Rivas vd., 2010), antifungal (Chami vd., 2004), antiviral (Pilau vd., 2011), immün-modülatör (Hashemipour vd., 2013) ve

antioksidan özellikleri (Alma vd., 2003; Radonic ve Milos, 2003) birçok çalışmada araştırılmıştır ve karvakrolün farklı hastalıklar üzerinde terapötik bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Arunasree, 2010; Jayakumar vd., 2012; Melo vd., 2011) (Şekil 2.5).Ratlarda oral gavaj yoluyla uygulandığında ortalama öldürücü dozunun 810 mg/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmiştir (Hagan vd., 1967). Farelere intravenöz veya intraperitoneal olarak uygulanan karvakrol öldürücü dozunun sırasıyla 80.00 ve 73.30 mg/kg vücut ağırlığı olarak bulunmuştur. 33.3 mg/kg intraperitoneal karvakrol uygulanan farelerin hiçbir yan etki göstermediği ve 50 mg/kg dozunda spesifik olmayan etkiler ve hafif ataksi olduğu bildirilmiştir. Ancak, daha yüksek dozlarda karvakrol (110- 233.3 mg/kg) uygulanan farelerin, ölümden önce ataksi yaşadığı ve spontan motor aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (Andersen, 2006).



Şekil 2.5. Karvakrol ve biyoaktivitesi; antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser özellikleri (Sharifi vd., 2018)

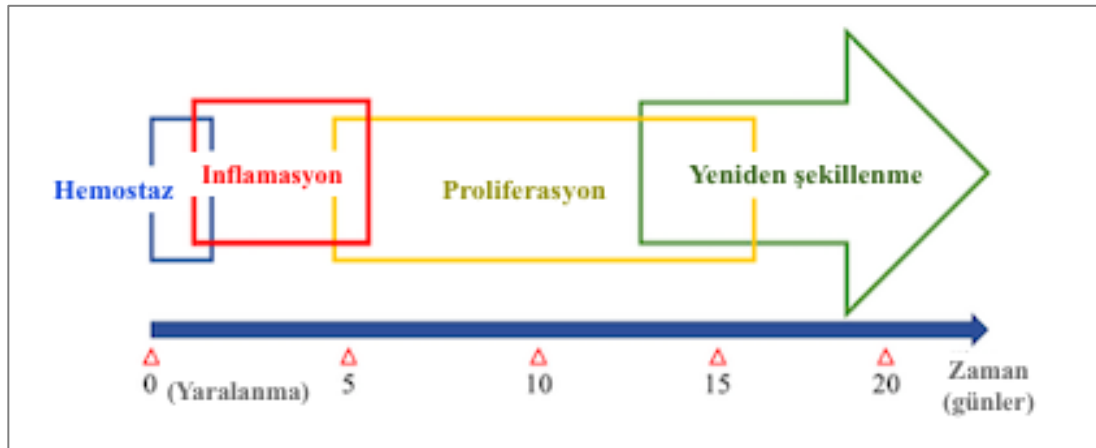
Karvakrolün antimikrobiyal potansiyeli, esansiyel yağlarda bulunan diğer uçucu bileşiklerinkinden daha yüksektir. Serbest bir hidroksil grubu, hidrofobiklik ve fenol parçasını içermesi açısından önemlidir. Karvakrol *E. coli*, *Salmonella* ve *B. cereus* dahil olmak üzere gıda kaynaklı patojenlere karşı etkilidir, büyümelerini ve toksin üretimini engeller. Ayrıca mantarlara karşı da aktiftir ve biyofilm oluşumunu engeller. Bu antimikrobiyal aktivite hem sıvı hem de buhar fazlarında gösterilmiştir. Karvakrolün antioksidan özellikleri ile ilgili olarak, sadece *in vitro* değil, aynı zamanda hayvan pankreatit, hepatotoksisite ve karaciğer kanseri modellerinde de gösterilmiştir. Çok sayıda *in vitro* rapor, karvakrolün güçlü bir antikanser aktivitesi sergileyebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, hayvan modelleri ile ilgili az

sayıda rapor olduğundan, biyoyararlanımını değerlendirmek ve hedef dokularını anlamak için insan çalışmalarına ihtiyaç vardır (Sharifi vd., 2018) (Şekil 2.5).

## 2.21. Periodontal Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, tedavi sonrası oldukça zorlu olan dinamik bir süreçtir. İyileştirme teknikleri ve yeni tedavi yaklaşımları geliştirmek için yara yönetimine çok fazla çaba harcanmaktadır. Temel olarak, yara iyileşme süreci aşağıdaki dört farklı aşamadan oluşmaktadır (Cho vd., 2021).

1. Hemostaz ve pıhtılaşma
2. Enflamasyon
3. Hücre proliferasyonu
4. Yaranın yeniden şekillenmesi ve olgunlaşması (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Yara iyileşme süreci

Yaralanmadan sonra yara iyileşmesi şu süreçle başlar: 1. Hemostaz ve pıhtılaşma, 2. Enflamasyon, 3. Hücre proliferasyonu ve 4. Yaranın yeniden şekillenmesi ve olgunlaşması (Cho vd., 2021).

Bu genel yara iyileşmesi ilkesi, periodontal yara iyileşmesi için de geçerlidir (Polimeni vd., 2006). Yara iyileştirme prosedürü, çeşitli hücre tiplerini, hücre dışı matrisi, sitokinleri ve büyüme faktörlerini içerir. Hücrelerin, moleküllerin, fizyolojinin ve biyokimyanın çeşitli yönleriyle ilgili olarak yara iyileşmesini anlamak, orijinal dokudan fonksiyonel ve yapısal olarak ayırt edilemeyen ve fibrotik skarlarla onarılmamış dokuları yeniden oluşturmak için önemlidir. Damar hasarı olan bir yaralanma varsa, yara yerinde başlayan ilk süreç kanamadır. Normal koşullar

altında, kan pıhtısı oluşumu için moleküler mekanizma derhal çalıştırılır, yaralanma bölgesini korur ve hücre göçü için geçici matrise hizmet eder. Kan pıhtısı oluşumu, polimorfonükleer nötrofiller ve monositler dahil olmak üzere enflamatuvar hücrelerin aktive olduğu ilk enflamatuvar aşamaya kadar devam eder. Bu hücreler nekrotik doku ve bakteri yaralarını temizler ve yara debridmanı için çeşitli enzimler salgılar. Bu enflamatuvar yanıt, makrofajların yara bölgesine hareket ettiği ve yara iyileşme sürecinde yer alan hücreler için sitokinler veya büyüme faktörleri salgıladığı geç faza geçer. Enflamatuvar evreyi takiben kolajen birikimi ile granülasyon dokusu oluşumu başlar. Makrofajların oluşturduğu sitokinler ve büyüme faktörleri, fibroblastların ve endotel hücrelerinin yara bölgesine göçünü ve çoğalmasını indükler. Hücre açısından zengin granülasyon dokusu, matris oluşumu ve olgunlaşma aşamasını aktive eder. Fibroblastlar, kolajen açısından zengin matris üreterek geçici hücre dışı matrisin yerini alır ve endotel hücreleri, vaskülarizasyon için anjiyogenezde yer alır. Daha sonra, yara epitelizasyonu bazal tabakadaki epitel hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Granülasyon dokusu olgunlaşması, mevcut hücreler ve hücre toplama sinyalleri ile doku rejenerasyonuna veya onarımına yol açar. Deri ve diş eti, yaralanmaya tepki olarak benzer iyileşme paternleri gösteren yapısal ve fonksiyonel olarak homojen dokular olarak kabul edilir. Her ikisi de mikroorganizmalara ve diğer patojenlere karşı bir bariyer görevi gören, alttaki bağ dokusu ile keratinize epitelin varlığı ile karakterize edilir (Nikoloudaki vd., 2020).

Oral kavitede yara iyileşmesi, iyileşme sürecine zararlı olarak algılanabilecek milyonlarca oral mikroorganizma içeren ağız sıvılarında meydana gelir (Politis, 2016). Bununla birlikte, oral kavitedeki yaralar, cilt yaralarına kıyasla çok daha hızlı iyileşir, re-epitelizasyon ve yeniden şekillenme minimal skar oluşumu ile sonuçlanır (Iglesias ve Bartolome, 2018). Bu avantaj, tükürükte büyüme faktörlerinin veya sitokinlerin varlığı ve fibroblastların önemli rolü ile açıklanabilir. Tükürük, antimikrobiyal ve antienflamatuvar özelliklere sahip epidermal büyüme faktörleri, lizozomlar ve laktoferrin gibi bir dizi önemli molekül içerir (Katsani vd., 2019). Fibroblastlar dişeti dokusunun ana hücreleridir ve yara iyileşmesinde, özellikle hücre dışı matris bileşenlerinin (kolajen, fibronektin, hyaluronan ve elastin gibi) sentezi ve doku inhibitörü MMP salgılanmasıyla hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesinde önemli bir rol oynarlar (Ahangar vd., 2020). İyileşme potansiyelindeki tek istisna, sert damaktaki eksizyonel yaralardır. Damakta bağ dokusu çok incedir; bu nedenle

yaranın derinliği kemik yüzeyine kadar ulaşabilir ve iyileşme yavaştır (Chen vd., 2010). Son araştırmalar, oral ve cilt yara iyileşmesi arasındaki moleküler farklılıkları ortaya çıkarmıştır. Çoğu çalışma, ağız yarasının cilt yarasına kıyasla yara iyileşmesi için “hazır” durumda olduğunu öne sürmüştür (Cho vd., 2021). Periodontal cerrahide, yara iyileşme paterni büyük ölçüde iki tipe ayrılır: primer ve sekonder iyileşme (Pippi vd., 2017). Primer iyileşme, dişeti dokusunun ameliyat öncesi ve sonrası aynı pozisyonda biraraya getirildiği bir prosedürdür. İyileşme modeli, çok az yara izi veya hiç iz bırakmadan ve düşük enfeksiyon riskiyle hızlı iyileşme süresini gösterir. Sekonder iyileşme ise, kazalar, dikişlerin yırtılması, yer değiştirilen flep uygulanması ve diş çekim soketi gibi durumlarda yara bölgesi epitel dokusu ile kaplanmadığında meydana gelir.

## **2.22. Karvakrol ve Yara İyileşmesi**

Yara iyileşmesi, yaralanmadan sonra aktive olan bir dizi karmaşık mekanizmayı içeren, ardışık ve örtüşen fazlar tarafından yönetilen önemli, fizyolojik bir süreçtir. Doku onarımı ve deney hayvanlarında insan koşullarını yapılandırabilen çalışmaların yeterli olmaması, yara iyileşmesi için yeterli terapi ve tedavilerin eksikliğine neden olmaktadır (Richmond, 2012). Bu anlamda, yara iyileşmesi için daha etkili ve uygun maliyetli terapötik yaklaşımların araştırılması gerekmektedir. Tıbbi bitkiler dünya çapında çeşitli hastalıklar için tamamlayıcı veya alternatif bir tedavi olarak kullanılmıştır. Bu nedenle, bitkilerden elde edilen biyoaktif ürünler, yeni ilaçların geliştirilmesi için büyük bilimsel ve ticari ilgi görmektedir (Ahn, 2017; Li ve Vederas, 2009). Bu kapsamda monoterpen ve seskiterpenler gibi düşük moleküler ağırlıklı uçucu bileşenlerden oluşan uçucu yağlar araştırılmaktadır. Monoterpenler, uçucu yağların yaklaşık %90’ını oluşturur ve çok çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahiptir. Karvakrol ve timol, *Origanum* cinsinin uçucu yağlarında yaygın olarak bulunan monoterpenlerdir. Bu konum izomerleri birkaç antibakteriyel ve antifungal aktiviteye ve ayrıca anti-enflamatuvar ve analjezik etkilere sahiptir. Bu özellikler, bu bileşikleri doku onarımı için ürünlerin geliştirilmesi için güçlü adaylar haline getirir (Las vd., 2003; Bakkali vd., 2008, Lozano vd.,2018; Langeveld vd., 2014, Riella vd., 2012; Guimaraes vd., 2013).

On yıldan fazla bir süredir araştırmacılar, *in vivo* ve *in vitro* testler yoluyla monoterpenler karvakrol ve timolün yara iyileşmesi potansiyelini araştırmaktadırlar.

Bu bileşikler, yara onarımı için yeni terapötik alternatiflerin geliştirilmesi için yüksek potansiyele sahiptir ve halihazırda insanlarda test edilmeye başlanmıştır. Bununla birlikte, bu bileşiklerin veya bunları içeren uçucu yağların yaraların tedavisinde kullanımının, dozlarının ve formülasyon fikirlerinin belirlenmesi, etkinliği ve güvenliği ile bu etkilerin gözlemlenebileceği mekanizmalar gelecekteki çalışmalarda en önemli konular olarak öne çıkmaktadır (Costa vd., 2019).

### **2.23. Hücre Apoptozu**

Programlanmış hücre ölümünün prototipik formu olan apoptoz, morfolojik olarak hücre büzülmesi ve kromatin yoğunlaşması ve ardından tüm hücrenin daha küçük, kapalı apoptotik gövdelere parçalanması olarak tanımlanır. Bu apoptotik cisimler, komşu fagositler tarafından, önemli ölçüde, proenflamatuvar bir yanıt başlatmadan veya doku homeostazını bozmadan derhal temizlenir (Westman vd., 2019). Hücrede ölüm, fizyolojik veya patolojik süreçler sonucunda gerçekleşmektedir. Apoptoz ve nekroz olmak üzere iki farklı hücre ölümü tanımlanmıştır (Hockenbery, 1995; Jacobson vd., 1997). Bu iki ölüm şekli biyolojik olarak farklı önem arz eder ve dokularda farklı cevaplar oluşturur (Çizelge 2.5). Nekroz, hücre şişmesi veya parçalanmasıyla karakterize, ani iskemi, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik ve pasif bir süreçtir (Kane, 1995; Majno ve Joris, 1995; Cimpan vd., 2000). Bu tür hücre ölümünde hücre içi denetim mekanizmalarının bir etkisi yoktur. Apoptoz ise fizyolojik bir süreç olup; yaşlı, hasarlı ya da anormal hücreleri ortadan kaldırarak hücreler arası dengeyi sağlar ve doku homeostazının önemli bir parçasıdır. Hücrelerin kontrollü olarak kendi kendini yokettiği programlı bir formu olarak açıklanmıştır (Gough ve Downes, 2001).

**Çizelge 2.5.** Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri arasındaki farklar (Kam ve Fetch, 2000)

<b>Apoptoz</b>	<b>Nekroz</b>
Membran bütünlüğü geç bozulur	Membran bütünlüğü erken bozulur
Hücre su kaybederek büzülür	Hücre ve çekirdek yaygın olarak şişer
Çekirdek içeriği yoğunlaşarak kondanse olur	Çekirdek kromatini parçalanır
Enflamatuar reaksiyon oluşmaz	Enflamatuar reaksiyon oluşur
Fizyolojik veya patolojik olabilir	Her zaman bir patoloji sonucunda oluşur

Apoptozun saptanmasında morfolojik görüntüleme yöntemleri, histokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immünolojik yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır. Apoptozun pek çok gen tarafından düzenlendiği, nekrozun ise toksik ya da fiziksel etkenlerle başlayan bir olay olduğu bilinmektedir. Histokimyasal yöntemler, hücrel farklılıkların boyama yolu ile gösterilmesi temeline dayanmaktadır.

İmmünolojik yöntemde ise hedeflenen proteinin antikoru kullanılarak boyama yapılır. Hedeflenen protein enzim veya apoptotik hücrelerde meydana gelen DNA içindeki kırıklarda ortaya çıkan proteinler olabilir. Bu yöntemler arasında ELISA ve Florometrik yöntem sayılabilir (Ulukaya, 2003).

## **2.24. ELISA Testi (Enzim Bağlı Immunosorbent Ölçüm)**

Son yıllarda en çok kullanılan serolojik testlerden biri haline gelmiştir. Antijen antikor bağlanmasını göstermek için kullanılmaktadır. Bu test yönteminde antijen veya antikor bir enzim ile işaretlenir ve sonuç immünolojik reaksiyon sonucu renk değişimi esasına dayanılarak değerlendirilir (Fung, 2006). Kullanılan birçok ELISA kiti yüksek standartlara sahiptir ve otomatik olarak çalışma olanağı sağlar. Bu nedenle analizler sırasındaki hız ve verim artmakta, insan hataları büyük ölçüde önlenmektedir (Fung, 2002).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı;

Dişeti fibroblastlarında karvakrolün sitotoksik olmayan etkin dozunu belirleyerek hücre canlılığı, hücre ölümü, yara iyileşmesi, ROT aktivitesi ve Nrf2/Keap1 sinyal yolu üzerindeki olası etkilerini araştırmaktır.

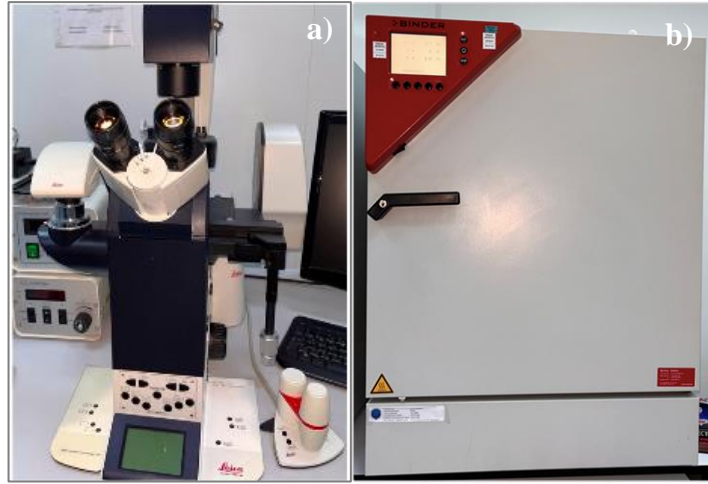
### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma analizleri, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM) ve Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HÜBTUAM) yapılmıştır.

#### **3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar**

1. Etüv (Şekil 3.1)
2. -20'lik derin dondurucu ve buzdolabı
3. pH-metre
4. Vortex (Heidolph)
5. Işık mikroskobu
6. Fotoğraf makinesi
7. Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İldam, Türkiye)
8. Santrifüj (Nüve, SF-400)
9. İverted mikroskop (Leica DM6000B, İsveç) (Şekil 3.1)
10. Elisa plate okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2)
11. Karbondioksitli etüv (Binder CB150, hemositometri (İnvitrogen, Countess),
12. Hassas terazi (Mettler toledo MS204)
13. Isıtıcıli manyetik tabla (IKA C-MAG HS 7)
14. Floresan mikroskop (Leica DM6000B, İsveç)





**Şekil 3.1.** Kullanılan Cihazlar a) Hücrelerin fotoğraflanmasında kullanılan inverted mikroskop, b) Hücrelerin 37 °C %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyonu için kullanılan inkübatör (Etüv) (Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM))

### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

1. Hydrogen Peroxide 30% Stabilized, Suitable for Use as Excipient Improve Exp Ph Eur, Bp, Usp 2.5 Lt
2. Dmem High Glucose (4.5g/L), With L-Glutamine 500 mL
3. L-Glutamine (200 Mm) 100 mL
4. Penicillin/Streptomycin (100x) 100 mL
5. Fetal Bovine Serum Advanced, Collected in South America 500 mL
6. Trypsin (0.25%) In Dpbs(1x) 100 mL
7. 25 Cm2 Cell Culture Flask, Vent Cap, Tc, Sterile,10/Pk
8. 50 Ml Centrifuge Tube, Bulk, Premium, Sterile,25/Pk
9. 15 Ml Centrifuge Tube, Bulk, Premium, Sterile,50/Pk
10. 5 Ml Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile,200/Pk
11. 100 µl Filter Universal Pipette Tips, Clear, Racked, Sterile 96/Pk
12. 96 Well Cell Culture Plate, Flat, Tc, Strele,1/Pk
13. 6 Well Cell Culture Plate, Flat, Tc, Sterile,1/Pk
14. 200 µl Universal Pipette Tips, Yellow, Bulk, Dnase-Rnase Free, Non-Sterile,1000/Pk
15. 10 µl Filter Universal Pipette Tips, Clear, Racked, Sterile 96/Pk
16. Dimethyl Sulfoxide (DmsO), Reagent Grade 250 mL
17. Phosphat Buffered Saline 1 X Pbs, Sterile, Ph 7.4 W/O Calcium&Magnesium 500 mL

18. 2-Propanol For Analysis Emsure, Acs, Iso, Reag. Ph Eur 2,5 Lt
19. Carvacrol Natural,99%, Fg 100gr
20. Nrf2 Polyclonal Antibody 100 µl Applications Wb, Elisa, Fcm, Ihc-P, Ihc-F, If (Ihc-P), If (Ihc-F), If (Icc)Reactivity Human, Mouse, Rat, Pig, Chicken, Rabbit, Others Predicted Reactivity Dog, Cow, Horse Conjugation Unconjugated Host Rabbit
21. Keap1 Polyclonal Antibody,100 µl Applications Wb, Elisa, Fcm, Ihc-P, Ihc-F, If (Ihc-P), If (Ihc-F), If (Icc)Reactivity Human, Mouse, Rat, Pig, Chicken, Rabbit, Others Predicted Reactivity Dog, Cow, Horse Conjugation Unconjugated Host Rabbit
22. Hematoxylin Harris Non Pap (11)
23. Reactive Oxygen Species (ROT) Detection Assay Kit 100assays
24. Ultravision Plus Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, Hrp

### **3.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **3.3.1. Besiyeri Hazırlanması**

%19 Fetal bovin serum

%1 Penisilin-Streptomisin

%89 Dulbecco's Modified Eagles Medium/F12 (DMEM/F12)

Primer kültür için hazırlanan örneklerde ise %1 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin kullanıldı.

#### **3.3.2. MTT Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması**

1ml fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde 5 mg MTT çözdürülerek 0.2µ'luk filtreden geçirilerek oluşturulan solüsyon karanlıkta, +4 derecede ve etrafi alüminyum folyo ile sarılarak kullanılabilecek kadar saklandı.

#### **3.3.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Blokaj Solüsyonu**

30 ml %30 konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine 470 mL metanol ilave edilerek hazırlandı.

### **3.3.4. ROT Solüsyonunun Hazırlanması**

ROT solüsyonu ticari olarak satın alındı ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı bunun için 1 µl ROT çalışma solüsyonu 1000 µl HEPES solüsyonu ile karıştırıldı ve ışık görmeyecek şekilde muhafaza edildi.

### **3.3.5. Double Staining Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması**

Ribonükleaz A'dan 1mL PBS'de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlandı. Hoechst ise 1 mL PBS'de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlandı. Propidium Iodide 1mL PBS'de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlandı. Solüsyonlar kullanılana kadar – 20 °C'de saklandı.

10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 µl, Hoechst stoktan 500 µl Propidium Iodide stoktan 100 µl ilave edilerek hazırlandı.

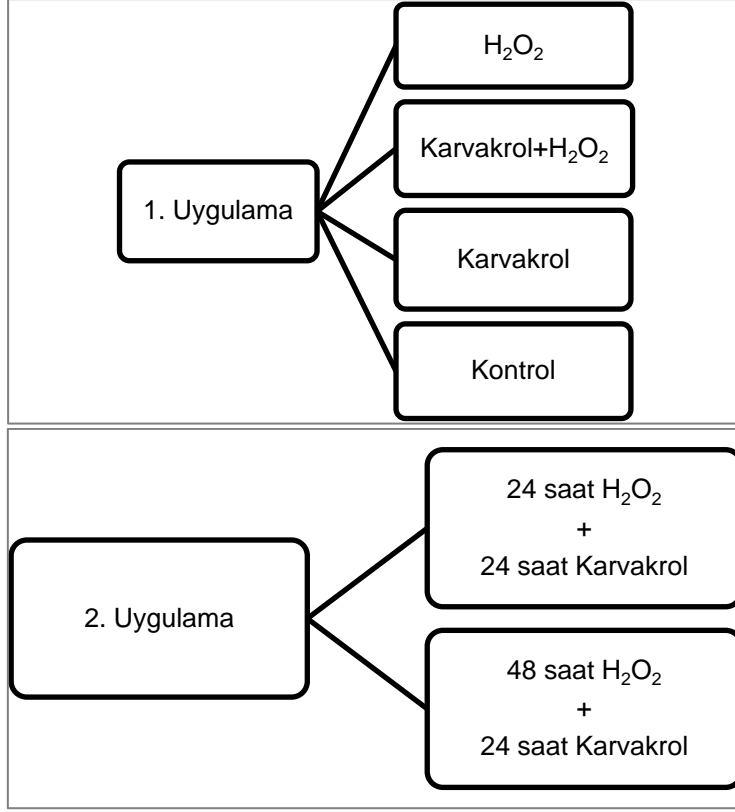
## **3.4. Grupların Belirlenmesi ve Planlanması**

Deney planlamasında ilk olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin uygulama konsantrasyonu belirlendi. Konsantrasyonun belirlenmesini takiben 2 farklı uygulama yapıldı. İlk uygulamada 4 farklı grup 3 farklı zaman diliminde (24,48 ve 72 saat) değerlendirildi. Belirlenen uygulama saatlerini takiben hematoksilin-eozin boyaması ile hücre morfolojileri, double staining ile apoptoz/nekroz oranları, ROT aktivitesi ile oksidatif hasar şiddeti, ICC (immunositokimya) ile Nrf2 ve Keap1'in protein ekspresyonları incelendi (Şekil 3.2).

Gruplar şu şekilde oluşturuldu:

1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu
2. Karvakrol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu
3. Yalnızca karvakrol grubu
4. Kontrol grubu

İkinci uygulamada ise 24 saat ve 48 saat boyunca hücreleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakarak oksidatif hasar oluşturulan iki farklı grupta, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının ardından 24 saat karvakrol uygulanarak oksidatif hasar, Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyonları incelendi.



Şekil 3.2. Birinci ve ikinci uygulama grupları

### 3.5. Hücre Kültürü Testleri

#### 3.5.1. Hücre İzolasyonu

Çalışmada kullanılan diş eti fibroblast hücreleri, KÜBTUAM'da daha önce elde edilmiş hazır olan hücreler çoğaltılarak kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Uygulama öncesi çoğaltılan diş eti fibroblast hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü. (Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM))

Donmuş haldeki hücreler 37°C 'de çözündürüldü ve steril laminar flow kabin içerisinde 15mL'lik falkon tüpe aktarıldı. 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Flask 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnsan fibroblast hücreleri için kültür ortamı olarak 3mL %89 Dulbecco's modified Eagle medium-high glucose (DMEM) besiyeri içine %10 fötal bovin serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin eklenerek besiyeri ortamı oluşturuldu ve homojen hale getirildikten sonra besiyerini içeren 25cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına ekimi yapılan hücreler 37°C %95 hava ve %5 CO<sub>2</sub> içeren koşullarda inkübe edildi. Hücre yoğunluğunun %80 lere ulaşmasının ardından hücreler pasajlanma işlemiyle çoğaltıldı. Pasajlanma işleminde flasklarda bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak PBS çözeltisi ile yıkandı. Tripsin/EDTA solüsyonu eklenen flasklar 2 dk boyunca inkübatörde bekletildi. Flask tabanından tamamen ayrılan hücrelere yeni besiyeri eklenerek 2500 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant uzaklaştırılarak taze besiyeriyle yeniden süspanse edildi. Besiyeri ortamı iki günde bir olacak şekilde yenilendi.

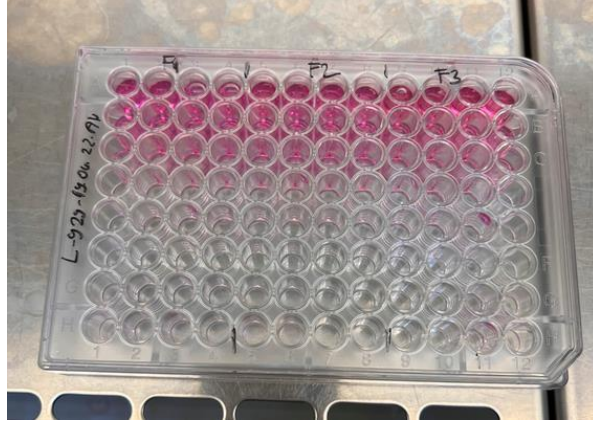
### **3.5.2. Hücre Sayımı**

Hücre sayımı hemositometri cihazı ile yapıldı. İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alındı ve steril ortamda laminar kabin içerisinde, flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı ve 1 mL PBS ile yıkandı. Daha sonra 1 mL tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsinli inkübasyon sonrasında mikroskobik olarak hücrelerin yapışık oldukları flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskobik olarak gözlendikten sonra, flask içerisine medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılarak 2500 rpm hızında 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı, tüpün dibinde kalan hücre pelletinin üzerine 1 mL (%10 FBS ve %1 antibiyotik içeren) DMEM/F-12 medyum ilave edildi. Pipet yardımıyla pellet ve DMEM/F-12 süspanse edildi ve süspanse karışımdan 10 µl alınıp mikrosantrifüj tüpüne koyuldu, üzerine 10 µl tripan blue boyası eklenip homojenize edildi. Elde edilen karışımdan 10 µl alınıp hemositometri lamına koyuldu. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapıldı. ICC değerlendirmesi için 1000±5 hücre sayıldı.

## 3.6. Biyokimyasal Analizler

### 3.6.1. Sitotoksosite Testi (MTT)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve karvakrolün uygulama konsantrasyonlarını belirlemek ve hücre canlılığını ölçmek amacıyla MTT testi kullanıldı. Bu test yöntemi TS EN ISO 10993-5 de geçen adımlara göre gerçekleştirildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doğrudan kullanıldığında sitotoksik özellik göstermektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin 50 µM ile 800 µM arasında farklı konsantrasyonları test edilerek sitotoksik olmayan dozu belirlendi. Uygulanan konsantrasyonlar arasında değerlendirme yapılarak kullanılması gereken miktar belirlendi. Sitotoksosite testi için 96 well plate kullanıldı (Şekil 3.4). Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her kuyucukta 10x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde hesaplama yapıldı. 96 well plate'de her kuyucuğa 100µl hücre koyuldu ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda hücrelerin well plate yüzeyine tutunup tutunmadığı kontrol edilerek kuyucuklardaki medyum boşaltıldı. Karvakrol farklı dilüsyon oranlarında well plate kuyucuklarına en az 3 tekrarlı olarak hücrelerin üzerine eklendi. Negatif kontrol grubuna sadece medyum uygulanırken pozitif kontrol grubuna latex/kauçuk uygulandı. 24 saat inkübasyon sonunda well platelerdeki medyum boşaltıldı ve MTT (1 mg/mL) solüsyonu 50 µl kuyucuklara eklenmiştir. 37 °C'de 2-2,5 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki MTT solüsyonu boşaltılıp üzerine 100 µl MTT çözücüsü (izopropanol) eklendi. Hücre canlılığının tespiti için 96 well plate'in absorbans yoğunluk değerleri ELISA plate okuyucuda 570 nm'de okundu. Kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edildi ve diğer absorbans değerleri ile canlılık hesaplandı. Karvakrol konsantrasyonunu belirlemek için ise MTT testinin sonlandırılmasını takiben 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Herhangi bir uygulama yapılmayan hücre grubu kontrol grubu olarak belirlendi ve bu grubun canlılığı %100 olarak kabul edildi. Diğer absorbans değerlerdi bu değerle karşılaştırılarak canlılık değerleri hesaplandı. Konsantrasyonlar 100 µl besiyeri ortamını tamamlayacak şekilde karvakrolü 20 µl-1.25 µl aralığında uygulayarak en uygun karvakrol dozu belirlendi. Ayrıca nitel olarak uygulama sonrası hücrelerin morfolojik durumları da incelendi.



**Şekil 3.4.** Sitotoksosite testinde kullanılan 96 Well Plate görüntüsü (Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM))

### **3.6.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Uygulama Sonrası Karvakrol Uygulanması**

24 saat 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamanın ardından 24 well plate de her kuyucukta 50  $\mu$ l olacak şekilde karvakrol uygulandı ve ortama 200  $\mu$ l besiyeri eklenerek 24 saat 37°C CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun tamamlanması ile ortamdaki vasat uzaklaştırıldı ve plakalar PBS ile yıkanarak immünohistokimya, double staining, reaktif oksijen türleri ve hematoksilin-eozin boyamaları için kullanıldı. Uygulama, her parametre için en az 3 kuyucuk olacak şekilde yapıldı.

### **3.6.3. ROT Aktivitesinin Belirlenmesi**

24 saat boyunca 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan dış eti fibroblast hücreleri üzerindeki vasat ortamdaki uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı. Kit protokolüne göre hazırlanan ROT, 24 well plate de uygulama yapılan her kuyucukta 100  $\mu$ l olacak şekilde 15 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Uygulama sonrasında vakit kaybı olmadan floresan mikroskop ile değerlendirilmesi yapıldı.

### **3.6.4. Double Staining ile Hücre Apoptoz Analizi**

Double staining uygulaması için 48 well plate kullanıldı. Pasajlanarak çoğaltılan dış eti fibroblast hücrelerini flasktan kaldırmak için içerisindeki vasatı uzaklaştırıldı ve 1 mL PBS ile yıkandıktan sonra 1 mL Tripsin-EDTA eklenip 4 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon işleminden sonra mikroskop yardımıyla gözlenen yüzeyden ayrılan hücrelere taze besileri eklenerek 15 mL falkon tüplere aktarıldı ve 2000 rpmde 2 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin ardından süpernatant kısım atılarak falkon tüpün en alt kısmında kalan pellet 1mL taze besiyeri ile süspanse edildi. Bu karışımdan 10  $\mu$ l alınıp ependorf tüpe koyuldu ve üzerine 10  $\mu$ l tripan mavisi

eklenerek homojenize edildi.Bu karışımdan 10 µl alınarak hemositometri lamına koyuldu ve sayım yapıldı.Sayılan hücreler her bir kuyucuk başına 20.000 hücre düşecek şekilde 48 well plate ekildi. Üzerine %10 FBS,%1 penisilin / streptomisin içeren DMEM eklendi ve hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübateörde 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra her kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda karvakrol eklendi ve kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için lateks,negatif kontrol için ise sadece hücre koyuldu.Üzerlerine hazırlanmış olan double staining solüsyonu 70 µl damlatılarak ışık görmemesi için üzeri alüminyum folyo ile örtüldü ve 15 dk inkübe edildi.Floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücreler, FITC filtresi kullanılarak ise nekroza uğramış hücreler değerlendirildi.

### **3.6.5. İmmunositokimya Prosedürü ile Nrf2/Keap1 Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi**

İnkübasyonu sonlandırılan hücre plaklarından hücreler uzaklaştırılarak lam üzerine alındı, kurumaya bırakıldı ve kurumasını takiben alkol serilerinden geçirildi.Daha sonra sırasıyla ; %90'lık alkolde 1dakika,%70'lik alkolde 1dakika,%50'lik alkolde 1dakika ve distile suda 1-2 dakika bekletildi.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blokajı ile endojen peroksidaz aktivasyonunun inhibisyonu için solusyonda 10 dakika bekletildi.Distile suda yıkandı.Non spesifik boyanma inhibisyonu için "Protein Block Solution" 10 dakika uygulandı.Primer antikor uygulandı (60 dakika) (Nrf2 (1:500 dilüsyonda, Keap1 1:500 dilüsyonda). PBS ile 3 defa yıkama yapıldı ve her yıkama 5 dakika bekletildi. Sekonder antikor uygulandı (15 dakika).PBS ile yıkandı (3x5 dakika).Streptavidin-peroksidaz kompleksi uygulandı.PBS ile yıkandı (3x5 dakika).10 dakika DAB uygulandı.1 dakika distile suda bekletildi.5 dakika Hematoksilen-eozinde 1 dakika,distile suda 1dakika,%50'lik alkolde 1 dakika,%70'lik alkolde 1 dakika,%90'lık alkolde 1 dakika,absolü alkol-ksilolde 1dakika,ksilolde 10 dakika bekletilerek poly-L-lysin kaplı lamlara alınan hücreler immunohistokimya (IHC) yöntemi ile Nrf2 için 1:500 dilüsyonlarında yukarıdaki basamaklarda ayrıntılı olarak açıklanan prosedüre göre boyandı. ICC uygulanan preparatlar ışık mikroskobunda boyanma şiddetine bakılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi. Değerlendirme boyanma şiddeti için, boyanma olmaması durumu (0), hafif boyanma (+1), orta şiddette boyanma (+2), şiddetli boyanma (+3) şeklinde yapıldı.



### **3.6.6. *In vitro* Yara İyileşme Modeli**

Hücreler  $2,5 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde 24 oyuklu hücre kültürü kaplarına ekildi ve 24 saat  $37^\circ\text{C}$  de inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin konfluent olmasının ve plağı kaplamasının ardından steril 100  $\mu\text{l}$  plastik pipet ucu ile tek seferde tabaka üzerinde doğrusal bir yara örneği oluşturuldu. Kalkan hücreler ve vasat kalıntısının giderilmesi amacıyla plaklar PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkandı. Hücreler  $5 \times 10^5$  hücre/kuyu konsantrasyonuna gelinceye kadar %5  $\text{CO}_2$  içeren  $37^\circ\text{C}$ 'lik inkübatöre kaldırıldı. Hücreler gereken yoğunluğa gelince, 20 $\mu\text{l}$ 'lik steril pipet ucu ile kuyucuğun üst ucundan alt ucuna doğru hat şeklinde bir yara alanı oluşturuldu. Yüzeyden ayrılan ölü hücreleri içeren besiyeri solüsyonu uzaklaştırıldı ve kuyucuklara taze besiyeri solüsyonu eklendi. Yara alanı oluşturulan kuyucukların jel uygulamasından önceki fotoğrafları mikroskop kullanılarak alındı. Ardından kuyucuklara jellerin LD50 değerini veren dozları uygulandı ve mikroplakalar inkübatöre kaldırılarak 24 saat inkübe edildi. Ardından ilk uygulama anı (0. saat), 8. saat ve 24. saatte fotoğraflandı ve çizik alanı saatlere göre İmage J programı ile ölçülerek kapanma yüzdesi hesaplandı. Yara alanında kapanma ve hücre göçü incelemeleri yapıldı.

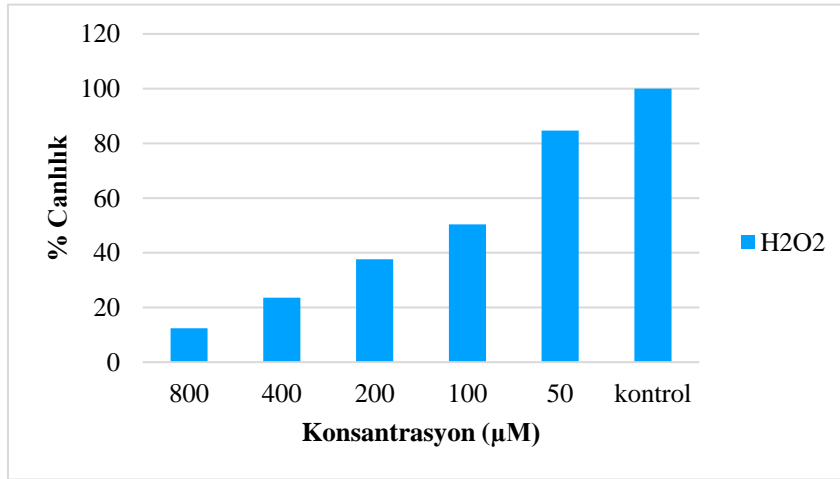
### **3.7. İstatistiksel Analiz**

Protein ekspresyonları pozitifliklerinin grup karşılaştırmalarında Ki-Kare ve Fisher's Exact testleri kullanıldı ve veriler sayı ve yüzde değerleri ile tanımlandı. Değerlendirmelerde IBM SPSS version 20 (Chicago, IL, USA) programı kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık sınırı olarak  $p < 0,05$  kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konsantrasyonunun Belirlenmesi

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin sitotoksik olmayan uygun konsantrasyonunu belirlemek için yapılan MTT testi ile hücre canlılığının tamamen sürmesi, oksidatif hasarın oluşmamış olduğunu ya da hafif derecede oluşmuş olduğunu gösterdi (Şekil 4.1). IC<sub>50</sub> değeri belirlenerek 100 µM konsantrasyon kullanıma uygun olarak tespit edildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı yüzdesi azaldı. Ancak hücre canlılığının hiçbir dozda tamamen ortadan kalkmadığı gözlemlendi.



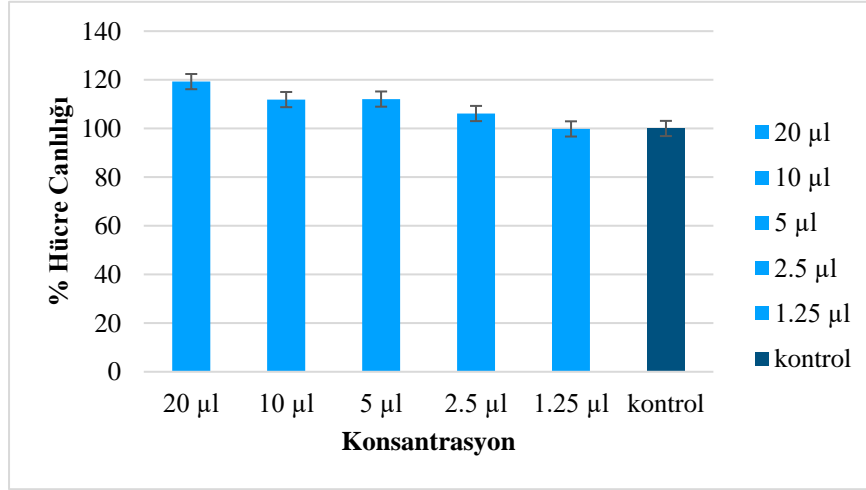
Şekil 4.1. Farklı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri

### 4.2. Karvakrol Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Uygulanan farklı konsantrasyonlarda karvakrol hücreler üzerinde toksik bir etki göstermedi ve oksidatif hasarın onarılması için uygulama konsantrasyonu 20 µl olarak belirlendi. Bu konsantrasyonda karvakrolün hem toksik etki göstermediği hem de hücre artışına sebep olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.1) (Şekil 4.2).

**Çizelge 4.1.** Farklı karvakrol konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri

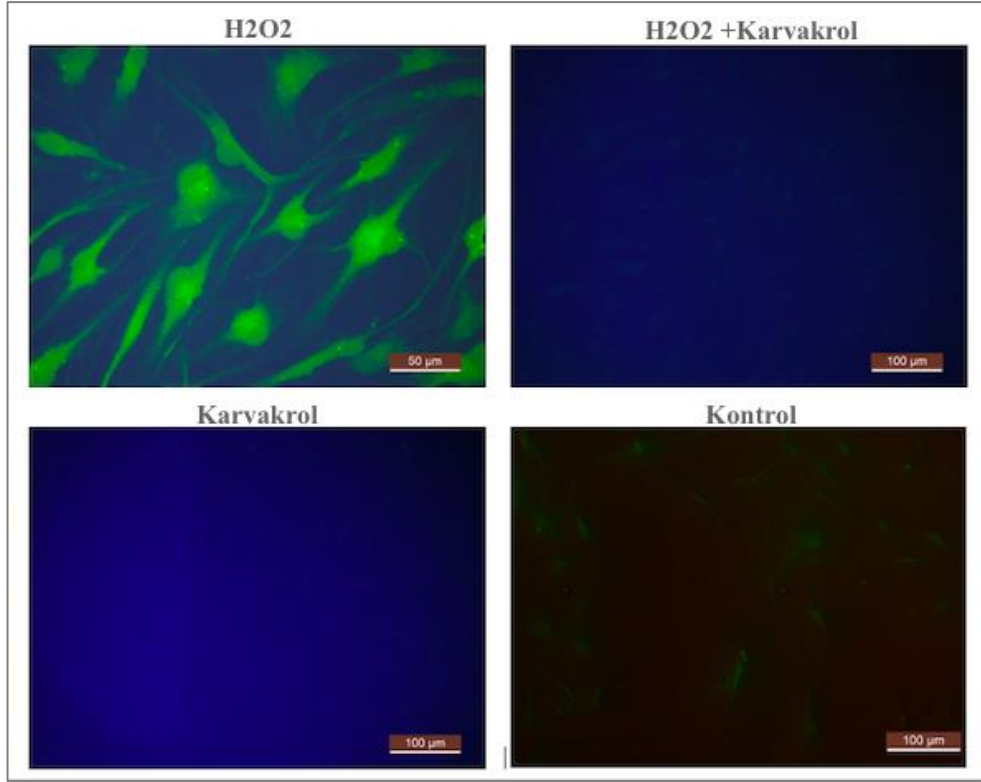
Konsantrasyon	% Canlılık±stdspm
20 µl	119,26±6,1
10 µl	111,87±4,7
5 µl	112,08±3,5
2.5 µl	106,15±5,6
1.25 µl	99,81±2,64
Kontrol	100



**Şekil 4.2.** Farklı karvakrol konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri

### 4.3. Uygulama Gruplarında ROT, Nrf2 ve Keap1 Aktivitesi

İlk 24 saatlik uygulamada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, karvakrol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+karvakrol ve kontrol gruplarında yapılan incelemede, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin tek başına uygulandığı hücrelerde ROT ile boyanma tespit edilirken diğer gruplarda ROT aktivitesi izlenmedi (Şekil 4.3).

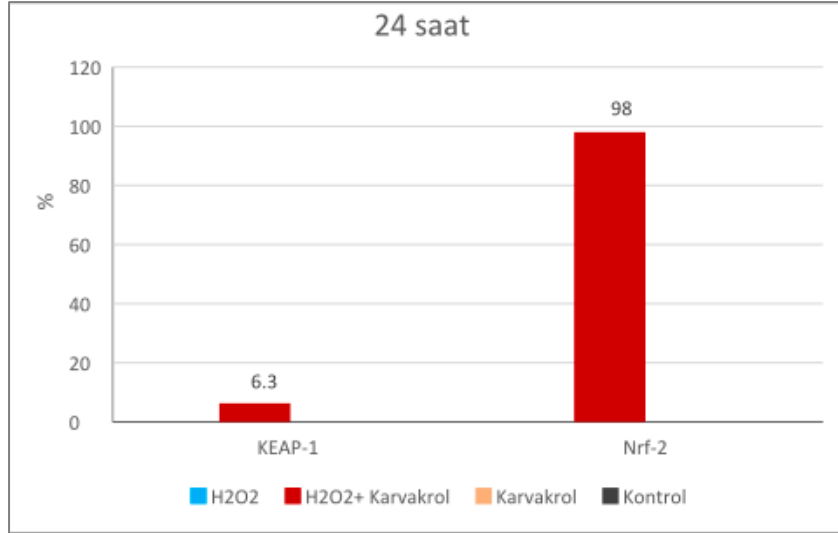


**Şekil 4.3.** 24 saat uygulama sonrası gruplarda ROS aktivitesinin floresan mikroskopta görüntülenmesi. İmmunohistokimya boyama ile Nrf2 ve Keap1'nin protein ekspresyonları incelendi. 1000 hücre sayıldı ve boyanma şiddetleri derecelendirildi (Çizelge 4.2) (Şekil 4.5).

**Çizelge 4.2.** 24 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 ve Keap1'nin değerlendirme sonuçları

	24 h	NEGATİF	1+	2+	3+	Toplam hücre
Keap1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1014	0	0	0	1014
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	957	64	0	0	1021
	Karvakrol	1004	0	0	0	1004
	Kontrol	1007	0	0	0	1007
Nrf2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1006	0	0	0	1006
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	21	138	865	0	1024
	Karvakrol	1012	0	0	0	1012
	Kontrol	1007	0	0	0	1007

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol uygulanan grupta 24 saatte hücrelerin %6,3'ünde Keap1 gen ekspresyonunda 1+lik saptandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Karvakrol ve Kontrol gruplarında ise 24 saatte herhangi bir pozitiflik görülmedi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol uygulanan grupta 24 saatte hücrelerin %13,5'inde Nrf2 ekspresyonunda 1+, %84,5'inde 2+'lık saptandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Karvakrol ve Kontrol gruplarında ise 24 saatte herhangi bir pozitiflik görülmedi (Şekil 4.4).



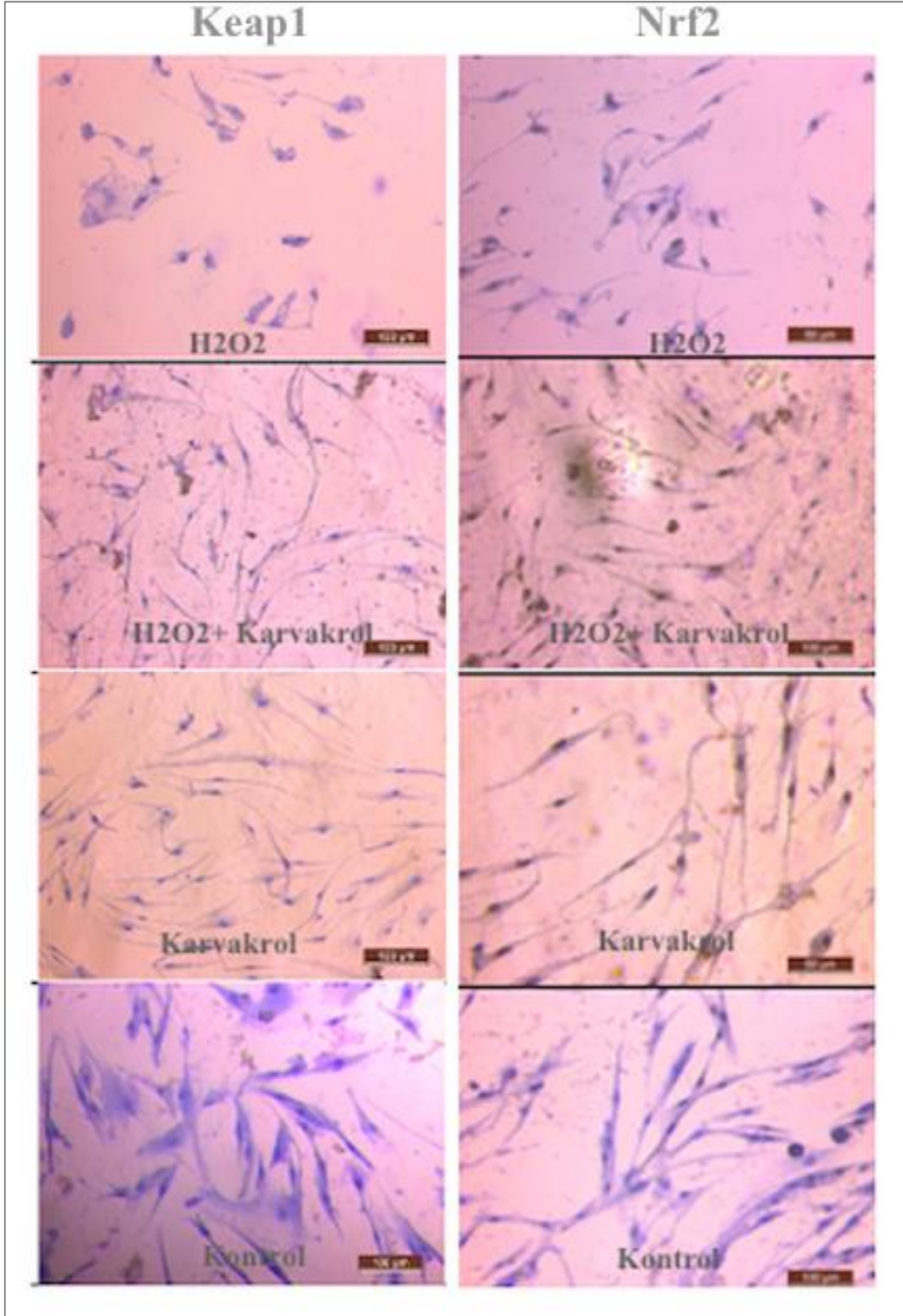
**Şekil 4.4.** 24 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol, Karvakrol ve kontrol gruplarında 24 saatlik Keap1 pozitifliği oranları arasında fark saptandı (p<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol grubunda pozitiflik oranları diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol, Karvakrol ve kontrol gruplarında 24 saatlik Nrf2 pozitifliği oranları arasında fark saptandı (p<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol grubunda pozitiflik oranları diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Çizelge 4.3) (Şekil 4.4).

**Çizelge 4.3.** Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 24 saatlik Keap1 ve Nrf2 ekspresyonlarında pozitif/negatif olma dağılımlarının karşılaştırılması

24 saat	Negatif	Pozitif	Test İstatistiği	p
Keap1 n (%)				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1014 (100)	0 (0)	$\chi^2 = 166.884$	<0.001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Karvakrol	957 (93.7)	64 (6.3)		
Karvakrol	1004 (100)	0 (0)		
Kontrol	1007 (100)	0 (0)		
Nrf2				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1006 (100)	0 (0)	$\chi^2 = 4305.09$	<0.001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Karvakrol	21 (2)	1003 (98)		
Karvakrol	1012 (100)	0 (0)		
Kontrol	1007 (100)	0 (0)		

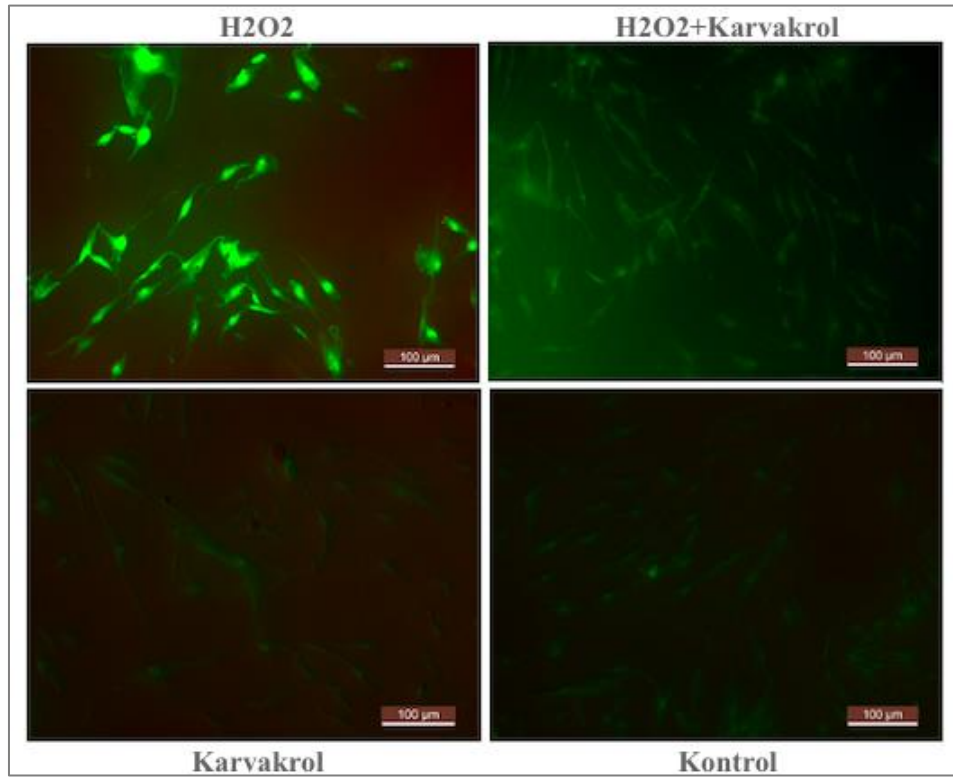
Ki-kare test



Şekil 4.5. 24 saat uygulama sonrası hücrelerde Keap1 ve Nrf2 gen ekspresyonlarının ışık mikroskopunda görüntülenmesi

48 saatlik uygulamada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, karvakrol, karvakrol ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve kontrol grubu ROT aktivitesi sonuçları incelendiğinde ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin tek başına uygulandığı hücrelerde

ROT ile boyanma tespit edilirken diğer gruplarda ROT aktivitesi tespit edilemedi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** 48 saat uygulama sonrası gruplarda ROT aktivitesinin floresan mikroskopla görüntülenmesi

İmmunohistokimya boyama ile Nrf2 ve Keap1'nin protein ekspresyonları incelendiğinde ise 1000 hücre sayıldı ve boyanma şiddetleri derecelendirildi (Çizelge 4.4). Oksidatif hasarın uzun sürmesi ile hücrelerde yapım/onarım çalışmalarının başladığı ve Nrf2 ve Keap1 proteinlerinin eksprese olmaya başladığı izlendi (Şekil 4.9). Karvakrolün uzun süre uygulanmasının, Keap1 ve Nrf2'nin aktifleşmesine yol açtığı tespit edildi.

**Çizelge 4.4.** 48 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 ve Keap1'nin değerlendirme sonuçları

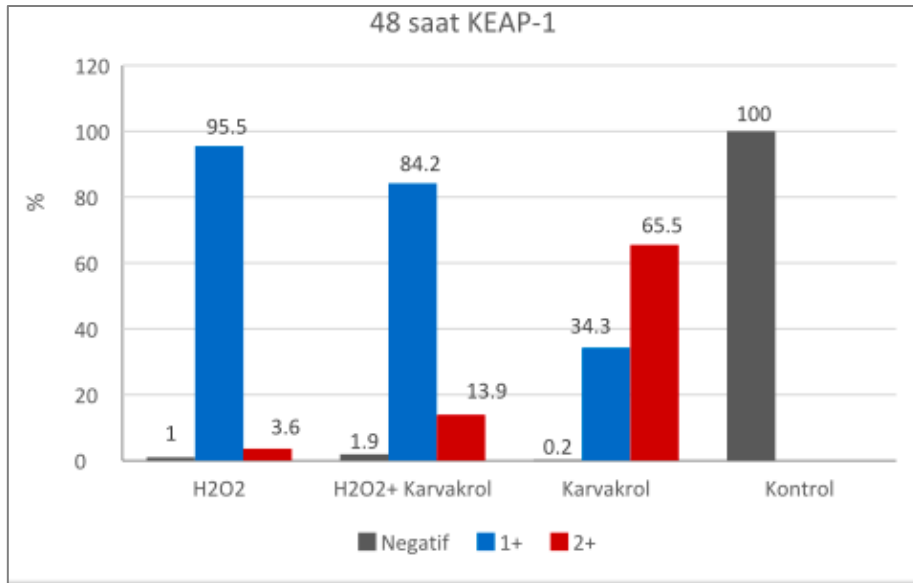
48 h		NEGATİF	1+	2+	3+	Toplam hücre
Keap1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	965	36	0	1011
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	19	845	139	0	1003
	Karvakrol	2	345	658	0	1005
	Kontrol	1004	0	0	0	1004
Nrf2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9	793	207	0	1009
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	0	8	792	214	1014
	Karvakrol	0	75	917	14	1006
	Kontrol	1002	0	0	0	1002

48 saatte dört farklı uygulama grubunda da 3+ saptanmadı. Bu nedenle karşılaştırmaya dahil edilmedi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol, Karvakrol ve kontrol gruplarında 48 saatlik Keap1 negatif/1+/2+ olma oranları arasında fark saptandı (p<0.001). Farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığı incelendiğinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol grubu ile karvakrol ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0.001). Karvakrol ve kontrol grubu arasında da anlamlı bir farklılık tespit edildi (p<0.001) (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 48 saatlik Keap1 ekspresyonlarında pozitif/negatif olma dağılımlarının karşılaştırılması

48 saat	Toplam Hücre	Negatif	1+	2+	Test İstatistiği	p
Keap1 n (%)						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1011	10 (1)	965 (95.5)	36 (3.6)	$\chi^2 = 5330.71$	<0.001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Karvakrol	1003	19 (1.9)	845 (84.2)	139 (13.9)		
Karvakrol	1005	2 (0.2)	345 (34.3)	658 (65.5)		
Kontrol	1004	1004 (100)	0 (0)	0 (0)		

Ki-kare testi



**Şekil 4.7.** 48 saat uygulama sonrası grupların Keap1 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda 2+ olma oranı hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol hem de Karvakrol grubuna göre daha düşük, Kontrol grubuna göre ise daha yüksek; 1+ olma oranı ise hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol hem Karvakrol hem de Kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol grubunda 1+ oranı karvakrol ve kontrol grubuna göre daha yüksek, 2+ olma oranı ise Karvakrol grubuna göre daha düşük kontrol grubuna göre



daha yüksek idi. Karvakrol grubunda 1+ ve 2+ olma oranları kontrol grubuna göre daha yüksek idi (Şekil 4.7) (Çizelge 4.5).

Özetle, kontrol grubunda pozitiflik saptanmadı ve tüm gruplarda pozitiflik oranları kontrol grubuna göre daha yüksek, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol grubunda 1+ oranları Karvakrol grubuna göre daha yüksek, Karvakrol grubunda ise 2+ oranı daha yüksek bulundu.

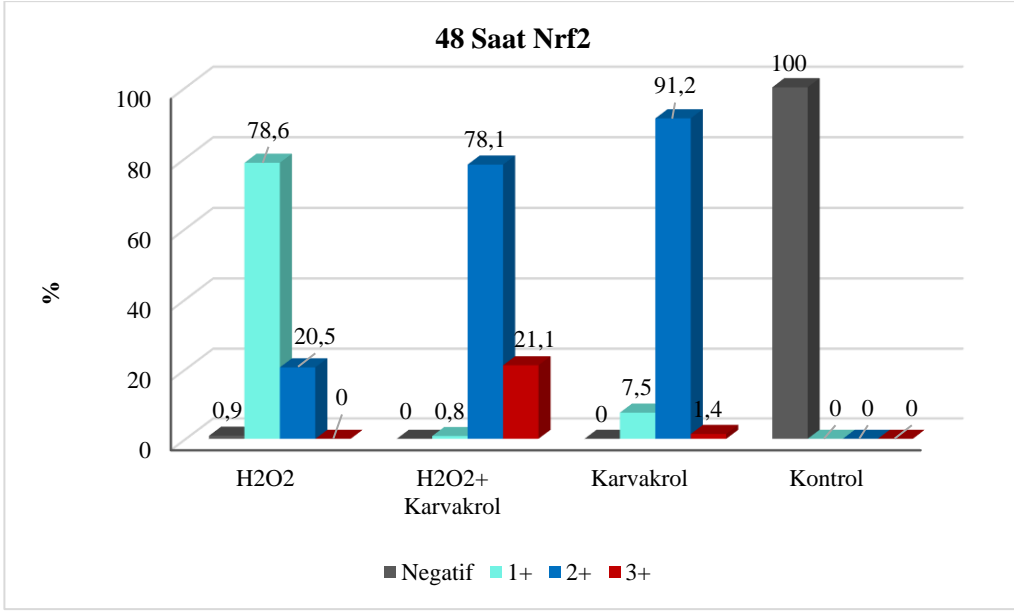
**Çizelge 4.6.** Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 48 saatlik Nrf2 ekspresyonlarında pozitif/negatif olma dağılımlarının karşılaştırılması

48 saat	Toplam Hücre	Negatif	1+	2+	3+	Test İstatistiği	P
<b>Nrf2</b>							
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1009	9 (0.9)	793 (78.6)	207 (20.5)	0 (0)	$\chi^2 = 6809.65$	<0.001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Karvakrol	1014	0 (0)	8 (0.8)	792 (78.1)	214 (21.1)		
Karvakrol	1006	0 (0)	75 (7.5)	917 (91.2)	14 (1.4)		
Kontrol	1002	1002 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		

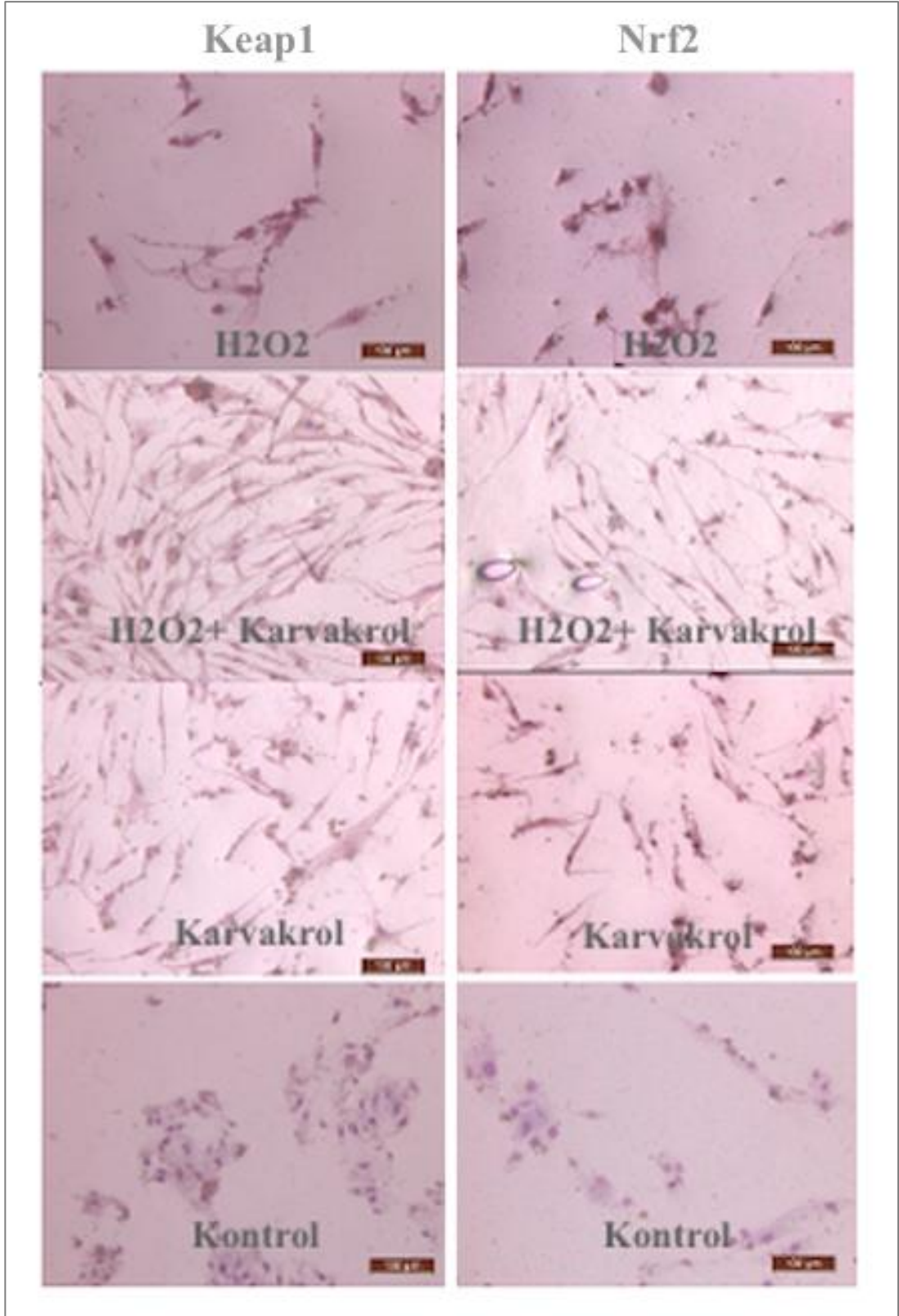
Ki-kare test

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol, Karvakrol ve kontrol gruplarında 48 saatlik Nrf2 negatif/1+/2+ olma oranları arasında fark saptandı (p<0.001). Farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığı incelendiğinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol grubu ile karvakrol ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0.001). Karvakrol ve kontrol grubu arasında da anlamlı bir farklılık tespit edildi (p<0.001) (Çizelge 4.6).

Kontrol grubunda pozitiflik saptanmadı diğer gruplarda pozitiflik oranları kontrol grubuna göre daha yüksek, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda 1+ oranları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol ve Karvakrol grubuna göre daha yüksek, Kavrokrol grubunda ise 2+ oranı daha diğer gruplara göre daha yüksek, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol grubunda ise 3+ oranı diğer gruplara göre daha yüksek bulundu (Şekil 4.8).



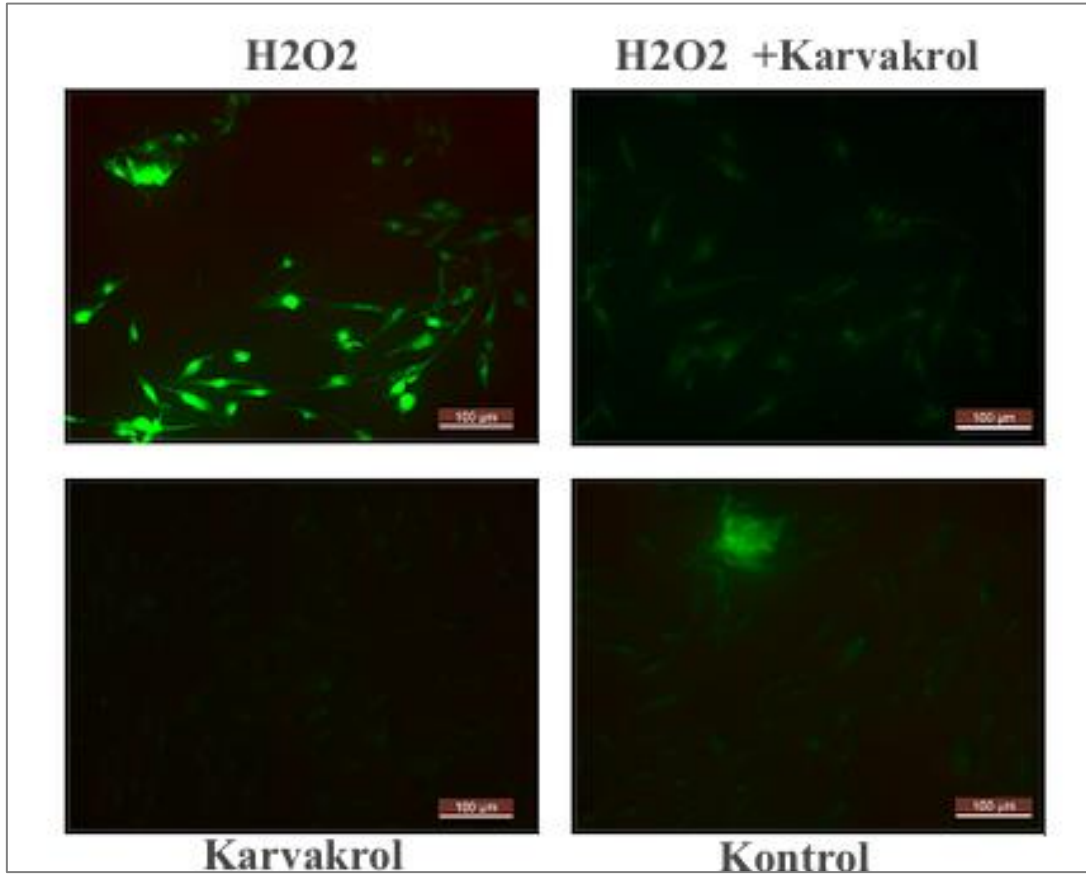
**Şekil 4.8.** 48 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri



**Şekil 4.9.** 48 saat uygulama sonrası hücrelerde Keap1 ve Nrf2 gen ekspresyonlarının ışık mikroskopunda görüntülenmesi

Üçüncü grup 72 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, karvakrol, karvakrol ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamaları ve kontrol grubu olarak yer almıştır. Bu grupta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tek başına uygulandığı hücrelerde ROT ile

boyanma tespit edilirken diğer gruplarda ROT aktivitesinden söz edilmemektedir (Şekil 4.10).



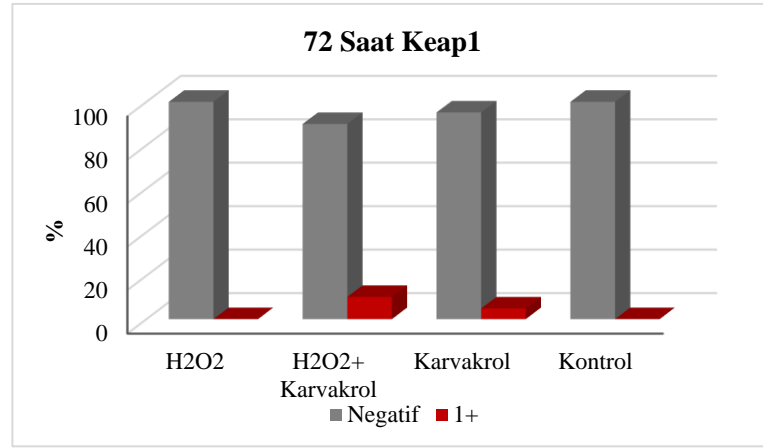
**Şekil 4.10.** 72 saat uygulama sonrası gruplarda ROT aktivitesinin floresan mikroskopla görüntülenmesi

Grupların 72 saat uygulama sonrası Nrf2 ve Keap1'in gen ekspresyonları incelendi. Bu incelemelerde 1000 hücre sayıldı ve boyanma şiddetleri derecelendirildi (Çizelge 4.7.) (Şekil 4.13).

**Çizelge 4.7.** 72 saat uygulama sonrası Nrf2 ve Keap1'nin değerlendirme sonuçları

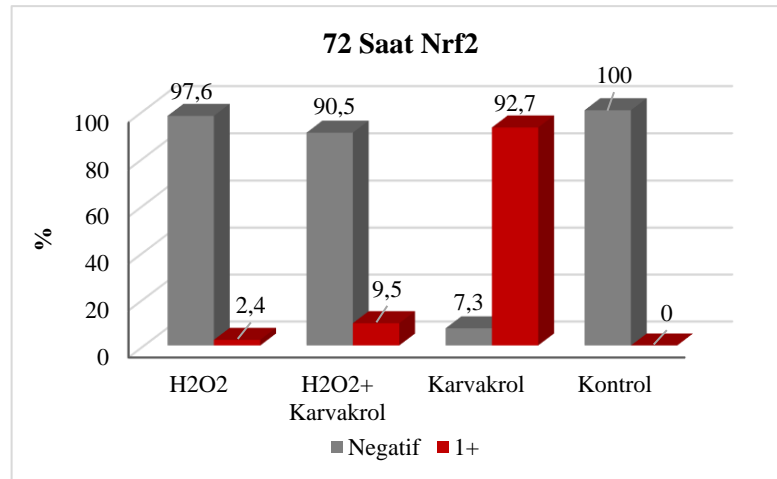
	72 h	NEGATİF	1+	2+	3+	Toplam hücre
Keap1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1004	0	0	0	1004
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	897	102	0	0	999
	Karvakrol	953	49	0	0	1002
	Kontrol	1005	0	0	0	1005
Nrf2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	981	24	0	0	1005
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	917	96	0	0	1013
	Karvakrol	74	935	0	0	1009
	Kontrol	1001	0	0	0	1001

Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 72 saatlik protein ekspresyon dağılımlarında 2+ ve 3+ lik saptanmadı bu nedenle değerlendirmeye alınmadı (tablo) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol, Karvakrol ve kontrol gruplarında 72 saatlik Keap1 negatif/1+ olma oranları arasında fark saptandı (p<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve kontrol grubunda 72. saatte keap1 ekspresyonu saptanmadığı için bu gruplar ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol ve Karvakrol grupları arasındaki farklılık da anlamlıydı (p<0.001) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. 72 saat uygulama sonrası grupların Keap1 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri

Tüm gruplar arasında 72 saatlik Nrf2 oranlarında anlamlı farklılık bulundu. Karvakrol grubunda 72 saatlik Nrf2 pozitifliği diğer gruplardan daha fazla, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol pozitifliği oranları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve kontrol grubundan fazla karvakrol grubundan düşük, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda ise kontrol grubundan yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol ve Karvakrol grubundan düşük bulundu (Şekil 4.12).



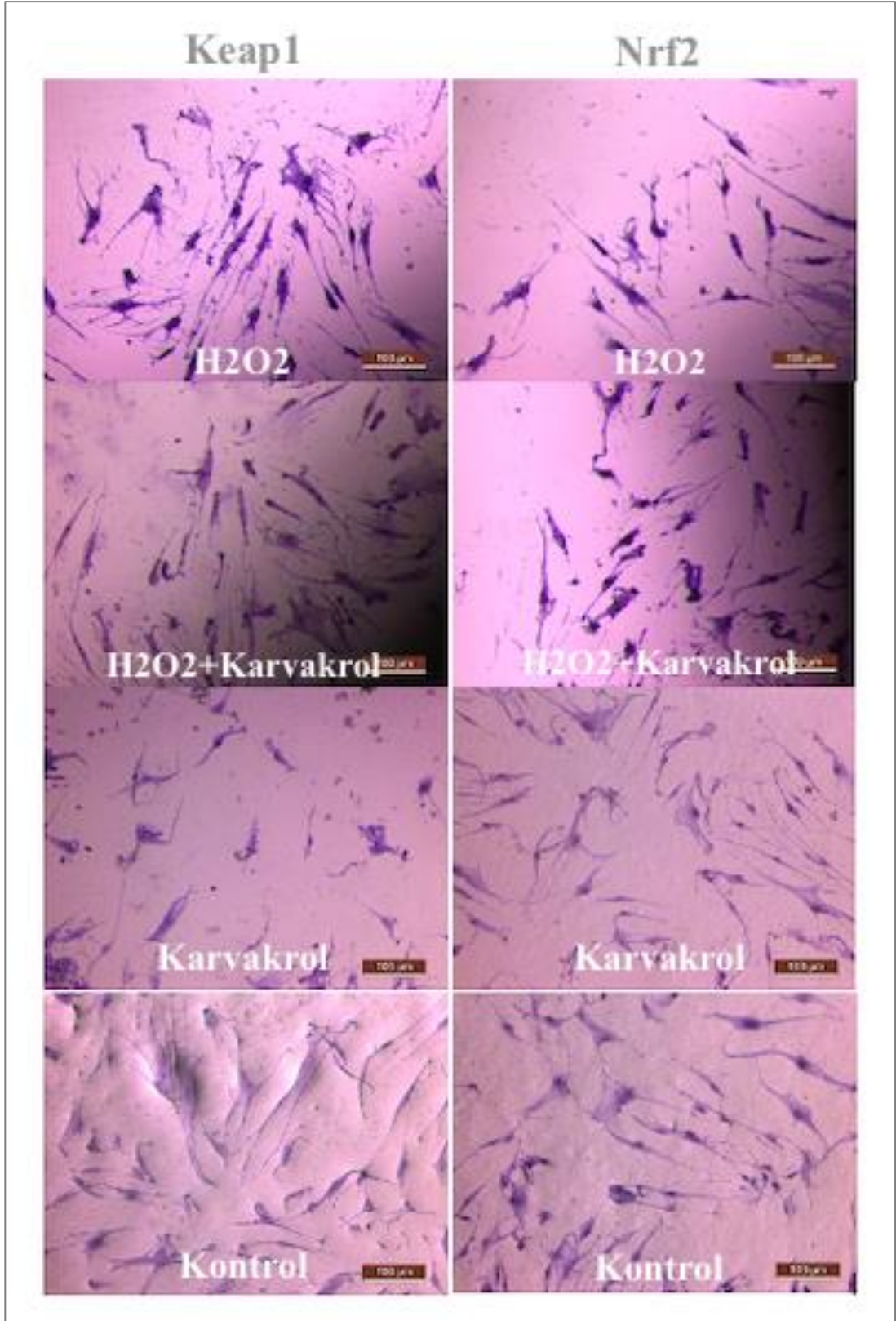
Şekil 4.12. 72 saat uygulama sonrası grupların Nrf2 gen ekspresyonlarında pozitiflik yüzdeleri

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ Karvakrol, Karvakrol ve kontrol gruplarında 72 saatlik Nrf2 negatif/1+ olma oranları arasında fark saptandı (p<0.001). Farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığı incelendiğinde ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0.001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Karvakrol grubu ile karvakrol ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık tespit edildi (p<0.001). Karvakrol ve kontrol grubu arasında da anlamlı bir farklılık tespit edildi (p<0.001) (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8.** Dört farklı uygulama grubundaki hücrelerin 72 saatlik Nrf2 ve Keap1 ekspresyonlarında pozitif/negatif olma dağılımlarının karşılaştırılması

72 saat	Toplam Hücre	Negatif	1+	Test İstatistiği	P
<b>Keap1 n (%)</b>					
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1004	1004 (100)	0 (0)	$\chi^2 = 1966.60$	<0.001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	999	897 (89.8)	102 (10.2)		
Karvakrol	1002	958 (95.1)	49 (4.9)		
Kontrol	1005	1005 (100)	0 (0)		
<b>Nrf2 n (%)</b>					
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1005	981 (97.6)	24 (2.4)	$\chi^2 = 3102.56$	<0.001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	1013	917 (90.5)	96 (9.5)		
Karvakrol	1009	74 (7.3)	935 (92.7)		
Kontrol	1001	1001 (100)	0 (0)		

Ki-kare test



**Şekil 4.13.** 72 saat uygulama sonrası Keap1 ve Nrf2 gen ekspresyonlarının ışık mikroskopunda görüntülenmesi

Bu uygulamaların dışında ikinci bir uygulama olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile stres oluşturulmasının ardından hücreler karvakrol ile tedavi edildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 24 ve 48 saat muamele edilen

hücrelere uygulama sürelerini takiben 24 saat boyunca karvakrol uygulandı ve sonuçlar değerlendirildi. 24 saat ve 48 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile stresin oluşması ROT ile gösterilmiştir. Uygulamaların ardından 24 saat karvakrol uygulandı ve yine ROT ile işaretleme yapıldı ancak ROT'un inaktive olduğu tespit edildi. Bu da karvakrolün ROT'u inhibe edebildiğini göstermektedir. Ayrıca karvakrol uygulama öncesi ve sonrası Nrf2 ve Keap1'nin protein ekspresyonları ölçülmüştür (Çizelge 4.9 ve 4.10).

**Çizelge 4.9.** Karvakrol uygulama öncesinde Nrf2 ve Keap1 ekspresyon sonuçları

Karvakrol Uygulama Öncesi		NEGATİF	1+	2+	3+	Toplam Hücre
24 h H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Keap1	1014	0	0	0	1014
	Nrf2	1006	0	0	0	1006
48 h H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Keap1	10	965	36	0	1011
	Nrf2	9	793	207	0	1009

**Çizelge 4.10.** Karvakrol uygulama sonrasında Nrf2 ve Keap1 ekspresyon sonuçları

Karvakrol Uygulama Sonrası		NEGATİF	1+	2+	3+	Toplam Hücre
24 h H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Keap1	0	7	189	812	1008
	Nrf2	0	1	35	974	1010
48 h H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Keap1	0	2	21	978	1001
	Nrf2	0	1	12	992	1005

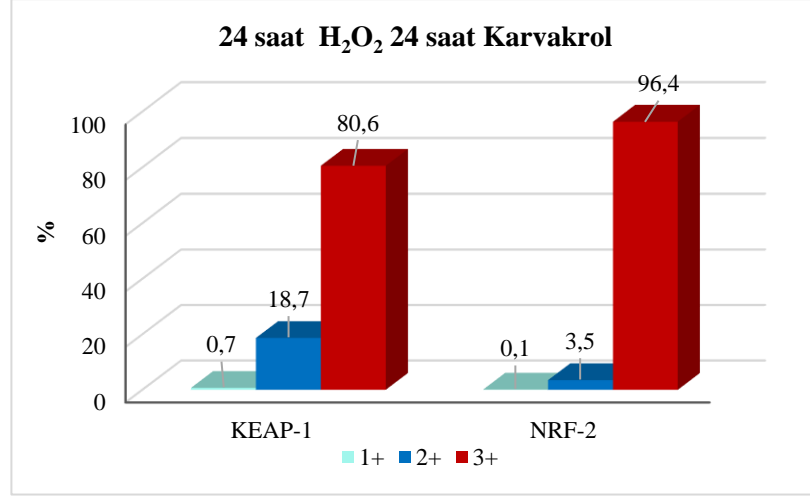
24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakılıp 24 saat tedavi uygulandıktan sonra Keap-1 ve Nrf2 ekspresyonlarının 1+/2+/3+ pozitiflik oranları arasında fark saptandı (p<0.001) (Çizelge 4.11). KEAP-1 ekspresyonunun 2+ pozitifliği Nrf2'ye göre daha yüksek, 3+ pozitifliği ise daha düşük bulundu. Sonuçta Nrf2de 3+ olma oranı daha fazla idi (Şekil 4.14).

**Çizelge 4.11.** 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakılıp 24 saat tedavi uygulandıktan sonra Keap1 ve Nrf2 ekspresyonlarının karşılaştırılması

24 saat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 24 saat Karvakrol	Toplam Hücre	1+	2+	3+	Test İstatistiği	P
Keap1	1008	7 (0.7)	189 (18.7)	812 (80.6)	$\chi^2 = 125.06$	<0.001
Nrf2	1010	1 (0.1)	35 (3.5)	974 (96.4)		

Ki-kare test





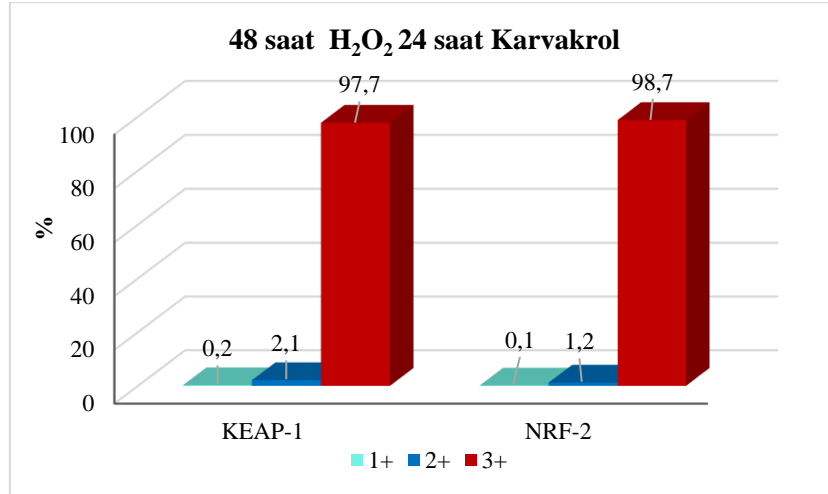
**Şekil 4.14.** 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakılıp 24 saat karvakrol uygulandıktan sonra Keap-1 ve Nrf2 ekspresyonları

48 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ye maruz bırakılıp 24 saat karvakrol uygulandıktan sonra ise Keap1 ve Nrf2 ekspresyonlarının 1+/2+/3+ pozitiflik oranları arasında fark bulunmadı (p>0.05) (Çizelge 4.12) (Şekil 4.15).

**Çizelge 4.12.** 48 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'ye maruz bırakılıp 24 saat tedavi uygulandıktan sonra Keap1 ve Nrf2 ekspresyonlarının pozitifliği karşılaştırılması

48 saat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 24 saat Karvakrol	Toplam Hücre	1+	2+	3+	Test İstatistiği	p
Keap-1	1001	2 (0.2)	21 (2.1)	978(97.7)	$\chi^2 = 2928$	0.209
Nrf2	1005	1 (0.1)	12 (1.2)	992 (98.7)		

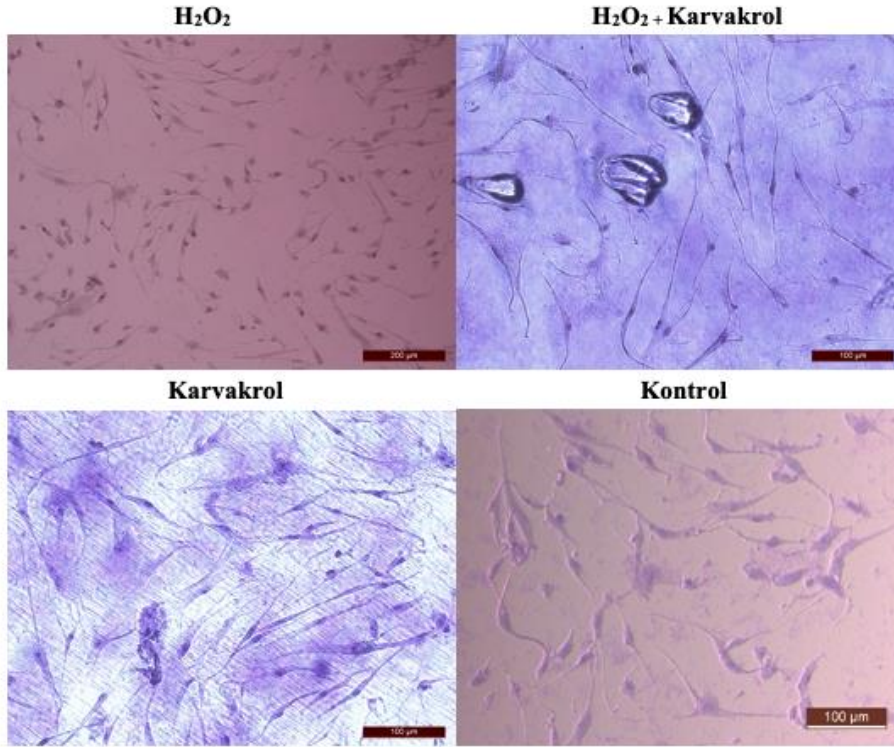
Fisher's Exact test



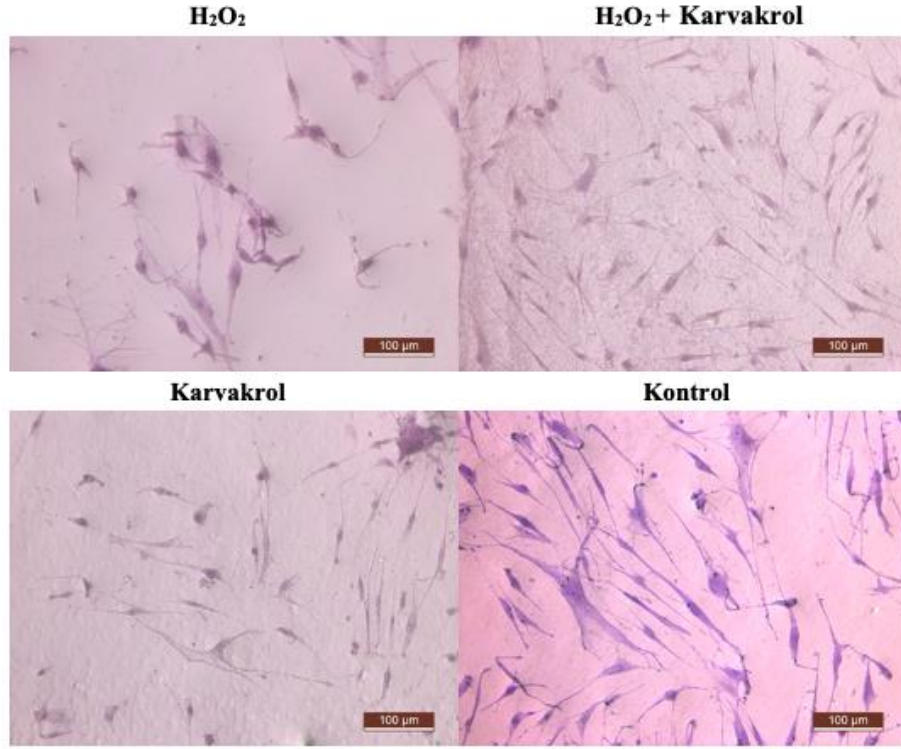
**Şekil 4.15.** 48 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'ye maruz bırakılıp 24 saat karvakrol uygulandıktan sonra Keap1 ve Nrf2 ekspresyonları

#### 4.4. Morfolojik İnceleme Sonuçları

Uygulama gruplarında uygulamalar sonrasında hücrelerin morfolojisi ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrasında 24 ve 48 saat  $H_2O_2$  uygulaması yapılan gruplarda hücrelerin membran bütünlüğünü çoğu alanda koruduğu, zayıf tutunmuş sitoplazma içi granül içermeyen morfolojide değişiklikler göstermektedir (Şekil 4.16 ve 4.17). Bütünlük değerlendirildiğinde nadiren yıkıma uğramış hücreler ve hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenmektedir. 72 saatlik uygulama sonrasında ise hücrelerin katmanlarının tamamına yakını yıkıma uğramıştır. Karvakrolün 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda hücrelerin morfolojik bütünlüğünü koruduğu, ayırık sitoplazma içi granüllerin, hücre yıkımlarının olmadığı ve hücre çoğalmasında azalma olmadığı tespit edilmiştir.  $H_2O_2$  ve karvakrolün bir arada uygulandığı gruplarda ise 24 ve 48. Saatte herhangi bir yıkım gözlemlenmese de 72. Saatin sonunda hafif yıkımların başladığı ve morfolojinin değişmeye başladığı gözlemlenmiştir.



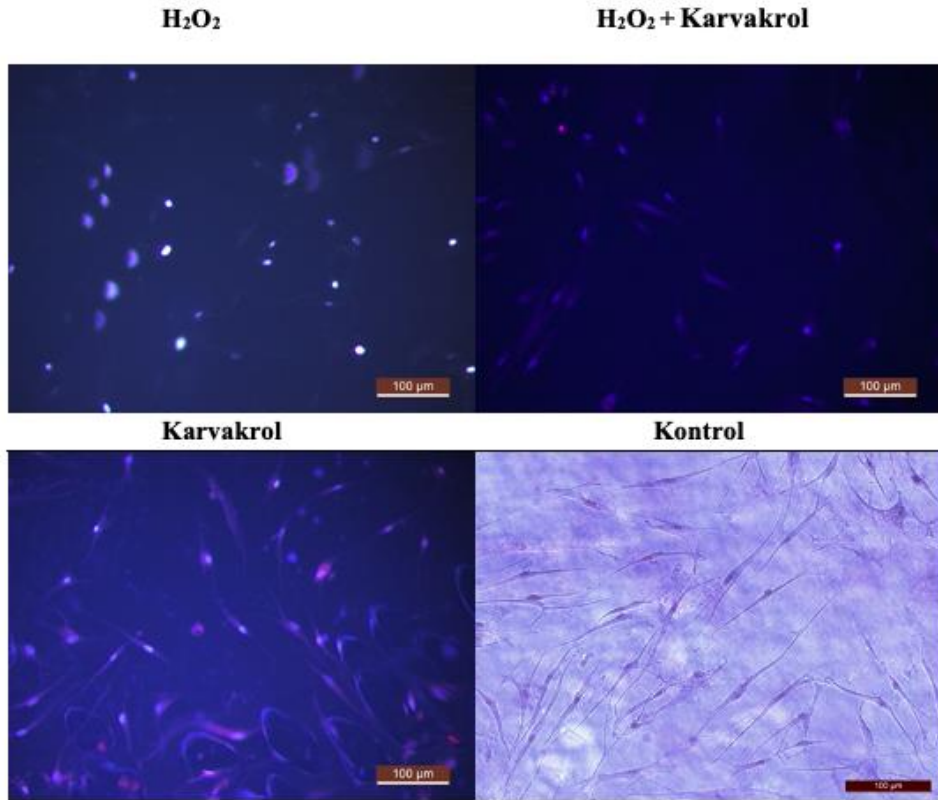
Şekil 4.16. Gruplarda 24 saat uygulama sonrası inverted mikroskop ile çekilen HE boyama görüntüleri



**Şekil 4.17.** Gruplarda 48 saat uygulama sonrası inverted mikroskop ile çekilen HE boyama görüntüleri

#### **4.5. Double Staining Metodu ile Apoptoz ve Nekroz Sonuçları**

Materyal metotta bahsedildiği şekilde yapılan double staining işleminin sonlandırılması ile hücreler floresan mikroskop ile değerlendirildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Double staining işlemi uygulanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

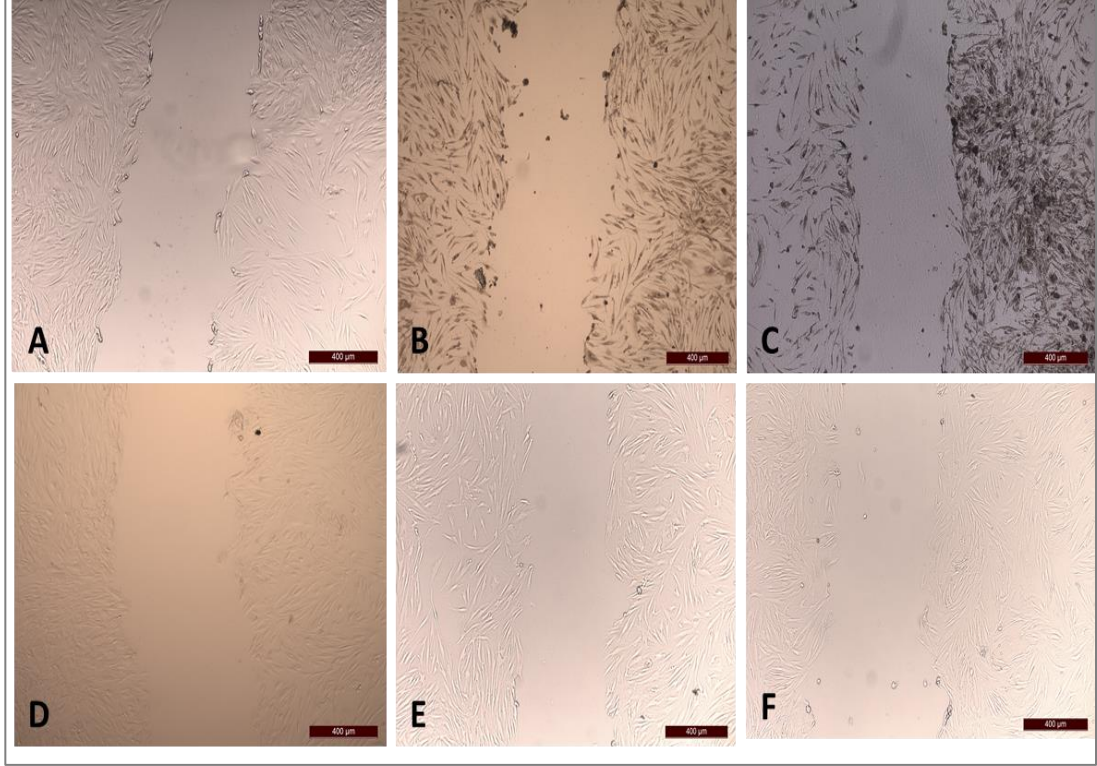
Değerlendirmede her gruptan en az 100 hücre sayılarak apoptoz ve nekroz oranları yüzde cinsinden verilmiştir (Çizelge 4.13). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan gruplarda nekroz oranı yüksekken karvakrol uygulanan gruplarda bu oranın sıfıra indiği gözlemlenmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile stres oluşumu sonrasında karvakrol uygulanan gruplarda nekroz oranının düşüp apoptoz oranlarının arttığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.13. Grupların % Apoptoz/Nekroz oranları

Gruplar	% Apoptoz	% Nekroz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,4±0,2	24,4±2,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Karvakrol	15,3±2,3	3,2±1,2
Karvakrol	0	0
Kontrol	0	0
24 saat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 24 saat Karvakrol	8,3±2,1	0,2±0,01
48 saat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 24 saat Karvakrol	9,3±2,3	2,3±0,2

#### 4.6. *In vitro* Yara İyileşme Modeli Sonuçları

Uygulamanın başlangıcından sonlandırılma sürecine kadar herhangi bir hücre göçü ya da yara kapanması tespit edilemedi ancak karvakrolün uygulandığı yara bölgesi dışındaki hücrelerde artış gözlemlendi. Başlangıç, 8. saat ve 24. Saatte karvakrol ve kontrol grubu sonuç görüntüleri şekilde detaylıca gösterildi (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Yara modeli oluşturulan diş eti fibroblast hücrelerinin ve kontrol grubunun resmi (A: 0. saat karvakrol uygulaması yapılan hücreler, B: 8. saat karvakrol uygulaması yapılan hücreler, C: 24. saat karvakrol uygulaması yapılan hücreler, D:0. saat kontrol grubu, E: 8. Saat kontrol grubu, F: 24. Saat kontrol grubu)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Periodontal hastalıklar dünya popülasyonunun %10-15'ini etkilemekte ve Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı rapora göre ağız sağlığı düzeyindeki tüm gelişmelere rağmen dünya genelinde görülen oral hastalıkların büyük bir kısmını oluşturmaktadır(Petersen, 2005). Periodontal hastalıkta primer etiyolojik ajanın mikrobiyal dental plak olduğu bilinmekle beraber periodontal doku yıkımının temel sebebi mikrobiyal uyarıya karşı konağın verdiği immün-enflamatuvar yanıtıdır (Dawson vd., 2014). Periodontitise neden olan yıkıcı mekanizmaların engellenmesine yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için konak cevabının değiştirilmesi, konak kaynaklı faktörlerin doku yıkımındaki rolünün anlaşılmasıyla birlikte araştırmacıların ilgisini çeken bir konu haline gelmiştir(Kornman, 1999). Bu bağlamda, çeşitli konak modulator ajanları geliştirilmiş ve konak modulator ajanlarının konvansiyonel mekanik tedavi ile birlikte kullanılmasının daha iyi klinik sonuçlar getireceği vurgulanmıştır (Oringer, 2002; Kornman, 1999; Gokhale vd., 2013; Preshaw vd., 2004).

Tıbbi bitkiler dünya çapında çeşitli hastalıklar için tamamlayıcı veya alternatif bir tedavi olarak kullanılmıştır. Bu nedenle, bitkilerden elde edilen biyoaktif ürünler, yeni ilaçların geliştirilmesi için büyük bilimsel ve ticari ilgi görmektedir (Yap vd., 2014). Antioksidanların insan sağlığının korunması üzerindeki faydalı etkileri, son yıllarda dünya çapında birçok bilim insanının ilgisini çeken önemli bir konu haline gelmiştir. Bitkilerden elde edilen antioksidanların serbest radikal reaksiyonlarının yayılmasını engellediği ve insan vücudunu çeşitli hastalıklardan koruduğu bildirilmiştir (Milella vd., 2014). Aromatik bitkiler tarafından üretilen uçucu yağlar; antioksidan, antiinflamatuvar, sedatif, antimikrobiyal, antiviral, sindirimi düzenleyen, antikarsinojenik, sitotoksik, antimikotik ve anti paraziter etkiler göstermektedir (Burt vd., 2004; Jo vd., 2012). Karvakrol, kekik ve çok sayıda aromatik bitki tarafından üretilen monoterpenik bir fenoldür. Günümüzde karvakrol, gıda sektöründe gıda koruyucu, tatlandırıcı ve aroma verici olarak düşük konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Karvakrolün tüketimi genel olarak güvenilir

kabul edilmektedir ve Avrupa Konseyi tarafından 2 ppm seviyesinde içkilerde ve 25 ppm de şekerlerde kullanılmak üzere kimyasal tatlandırıcılar listesine alınmıştır (De Vincenzi vd., 2004). Son yıllarda, klinik uygulamalarda potansiyel kullanımı için karvakrolün biyolojik etkilerini belirlemek amacıyla önemli araştırmalar yapılmıştır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlar, karvakrolün antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antikanser, anti-enflamatuvar, hepatoprotektif, spazmolitik ve vazorelaksan dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Suntres vd., 2015).

Yeni teröpatik yaklaşımlar geliştirilebilmesi için yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara öncü olacak *in vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda karvakrolün insan dişeti fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik olmayan etkin dozu belirlenerek, hücre canlılığı, ROT aktivitesi, apoptoz, yara iyileşmesi ve Nrf2/Keap1 sinyal yolu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. *In vitro* hücre kültürü testleri, canlı dokuların fizyolojik durumunu taklit etmektedir ve materyallerin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. *In vitro* testler; bireysel faktörlerden etkilenmez, hızlı uygulanabilir, tekrarlanabilir sonuçlar elde edilir, standardize etmek kolaydır, ucuz ve materyaller arasında kıyaslama yapılmasına izin verir. Ayrıca, hücre düzeyindeki olayları, karmaşık hücreler arası ilişkilerden izole olmuş bir şekilde incelemeye olanak tanır (Tuncer, 2011; Schmalz, 1994; Hanks vd., 1996).

Materyallerin biyoyumluluk değerlendirilmesinde kullanılacak *in vitro* sitotoksosite testleri uluslararası standartlar tarafından (ISO 10993-5) belirlenmiştir. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrasodium bromide) canlı hücreler tarafından koyu mavi-mor renkli formazanlara dönüştürülen sarı renkli bir substrat olup bu reaksiyon canlı hücrelerde bulunan aktif mitokondriler tarafından gerçekleştirilir ve hücre canlılığını ölçmek amacı ile kullanılır. Çalışmamızda, sitotoksosite testlerinde direkt hücre kültürü metodu kullanılmıştır. *In vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılırken testte kullanılacak hücre tipinin seçimi çok önemlidir. Materyalin klinik kullanımda etkileşimde bulunacağı doku ağız mukozası veya periodontal dokular olduğu durumlarda fibroblast hücrelerinin kullanımının daha uygun olacağı bildirilmiştir (Browne, 1988). Yapılan *in vitro* sitotoksosite testlerinin sonuçlarını değerlendirmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Materyallerin sitotoksitesilerinin değerlendirmesinde hücre metabolizması değerlendirme testleri

kompleks yapıda ve hassas olması, sadece kısa dönem sonuçları değil, uzun dönem sonuçların elde edilmesini sağlaması gibi avantajları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Sakaguchi, 2012; Bouillaguet vd., 2002). Çalışmamızda, hücre metabolizması değerlendirme testlerinden MTT testi tercih edildi. MTT testi, günümüzde en sık kullanılan sitotoksosite değerlendirme testlerinin başında gelmektedir ve dış hekimliği alanındaki sitotoksosite çalışmaları incelendiğinde MTT testinin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Bu test; ucuz, güvenilir, uygulanması basit bir testtir, tekrarlanabilir sonuçlar verir ve hassas bir test olması nedeniyle düşük dozlarda oluşan toksik etkinin ölçülebilmesini sağlar (Moharamzadeh, 2009). Çalışmamızda hücrede oksidatif hasar oluşturmak amacıyla uygulama yönteminin kolay olması sebebiyle oksidatif hasar ajanı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seçilmiştir. Etkin konsantrasyonunu belirlemek için MTT yöntemi kullanıldı. Daha önceki çalışmalarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 50-800 µM'luk konsantrasyonda yapılan uygulamaları tespit edildi (Baser, 2008). Çalışmamızda IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesinin ardından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 100 µM'luk konsantrasyonu kullanıma uygun olarak tespit edildi. Karvakrol 100 µl besiyeri ortamına tamamlanacak şekilde 20 µl-1.25 µl aralığında uygulandı ve uygulanan konsantrasyonlarda karvakrol hücreler üzerinde toksik bir etki göstermedi. Oksidatif hasarın onarılması için karvakrolün uygulama konsantrasyonu da 20 µl olarak belirlendi. Bu konsantrasyonda karvakrol hem toksik etki göstermedi hem de hücre proliferasyonuna ve hücre canlılık yüzdesinde artışa sebep oldu.

Karvakrolün fibroblastlar üzerindeki sitotoksitesini bildiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. NIH3T3 fibroblast hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada 0.01-100 µl dozlarda karvakrol uygulandığında, MTT testi ve hücre sayımı ile karvakrolün fibroblastlar üzerinde 0.01 µl'den başlayan ve 10 µl 'de maksimuma ulaşan antioksidan ve proliferatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca karvakrolün akciğer ve serviks kanserine karşı etkili olduğu ,75-200 µl doz seviyelerinde kanser hücreleri üzerinde seçici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Baser, 2008). Melo vd. (2014), MRC5'te (insan fibroblastı) karvakrol için 62.5 µl IC<sub>50</sub> değeri bildirmiştir. Buna karşılık, Houdkova vd. (2017), karvakrol için en düşük sitotoksitenin Melo vd. (2014) tarafından kullanılanla aynı hücre hattını kullanarak 5.09 µl IC<sub>50</sub> değeri olduğunu göstermiştir (Houdkova vd., 2017). Bayir vd'nin 2017 yılında yaptığı çalışmalarında insan fibroblast (WS-1) hücreleri üzerinde karvakrol doza bağlı bir



şekilde hücre canlılığını önemli ölçüde azaltarak sitotoksik etkiler göstermiştir ( $P \leq 0.001$ ). Karvakrol için IC50 değerleri, WS-1 hücrelerinde  $138.1 \pm 8.7 \mu\text{l}$  olarak bulunmuştur. Daha düşük konsantrasyonda ( $10 \mu\text{M}$ ) uygulandığında karvakrol, işlenmemiş kontrol hücrelerine kıyasla WS-1 hücrelerinin istatistiksel olarak anlamlı proliferasyonuna neden olmuştur ( $P \leq 0.001$ ) ve bu bizim çalışmamıza paralel bir sonuç olarak görülmektedir (Bayir vd., 2017). Öte yandan, çeşitli çalışmalarda karvakrolün sitotoksik etkileri rapor edilmiştir. Ancak sitotoksik etki rapor edilen çalışmalar HepG2 (Yin vd., 2012), SiHa, HeLa (Mehdi vd., 2011), Caco 2 hücreleri (Dusan vd., 2006; Llana vd., 2014), insan ağız kanseri hücreleri (Liang ve Lu, 2012), insan metastatik meme kanseri hücreleri (Arunasree, 2010) ve HL-60 promyelositik ve Jurkat T lenfoma hücreleri (Bhakkiyalakshmi vd., 2016) gibi farklı hücreler üzerinde yapılmıştır.

Bu çalışma, karvakrolün dişeti fibroblastları üzerindeki *in vitro* etkilerini araştıran ilk çalışmadır. Aydın vd.'nin insan lenfositleri ile yaptığı bir çalışmada karvakrol ve timolün  $0.1 \text{ mM}$  ve daha düşük konsantrasyonlarda oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu olduğu buna karşılık fenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarında ( $0.2 \text{ mM}$  ve üzeri) oksidatif hasarı tetiklediği gösterilmiştir (Aydın vd., 2005). Yapılan bir başka çalışmada (Dağlı, 2010) karvakrolün antioksidan özelliklerinin ratlarda langerhans adacık canlılığı üzerine etkilerini incelemek için  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile oksidatif hasar oluşturulmuş ve adacık hücrelerinde floresan boyama ile canlılık tayini yapılmıştır. Adacık hücrelerine üç farklı *in vitro* ortam sağlanarak  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'siz,  $150$  ve  $300 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ile hasar oluşturulmuş hücreler 9 gün boyunca  $20 \mu\text{M}$  verilen ratların adacıklarının tüm  $\text{H}_2\text{O}_2$  seviyelerinde canlılık düzeyinin kontrol ve DMSO gruplarına göre yüksek olduğu belirlenmiştir.  $40 \mu\text{M}$  dozunda da benzer şekilde  $0$  ve  $150 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunda canlılığın yüksek olduğu ancak  $300 \mu\text{M}$  seviyesinde adacık canlılığının kontrole göre farkının anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.  $80 \mu\text{M}$  dozunda ise tüm  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonlarındaki canlılık düzeylerinde belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da  $20 \mu\text{M}$  dozunda uygulanan karvakrolün hücrede canlılık düzeyini kontrol grubuna kıyasla artırdığı gösterilmiştir.

ROT üretimi ve/veya aktivitesi ile antioksidan savunma sistemi arasında bir dengesizlik olduğunda oksidatif stres meydana gelir. ROT, genel adıyla serbest radikaller, oksijen metabolizmasının ürünleridir ve hayati fizyolojik fonksiyonlar için

gereklidir (D'Autreaux vd., 2006). Kanserler de dahil olmak üzere birçok hastalığın başlangıcında ve ilerlemesinde DNA, proteinler ve lipidler gibi makromoleküller hasar görmektedir ve bu gibi durumlarda aşırı ROT üretiminin rol oynadığı anlaşılmaktadır. Daha yüksek dozlarda polifenoller (her molekülde birden fazla fenol grubunun bulunduğu bileşikler, örneğin; antioksidan bitkiler) oksidatif stresin yanı sıra pro-oksidan etki ile sonuçlanan aşırı ROT oluşumuna neden olabilir. ROT oluşumunu indükleyen bitkiler apoptozu ve hücrel yaşlanmayı aktive edebilmektedir (Mahalingam vd., 2003; Kuhnel vd., 2015). Bu nedenle apoptoza neden olan polifenol ajanların ideal antioksidan ilaçlar olması beklenir. Daha düşük dozlarda polifenoller, artan antioksidan enzimlerin üretimi nedeniyle hücreleri koruyabilir ve böylece antioksidan etkiler sergileyebilir. Fenolik bileşikler için hem antioksidan hem de prooksidan aktivitenin farklı dozlarda gözlenmesi nadir değildir (Ferguson, 2001). Çalışmamızda 24 saat ve 48 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidatif hasar oluşturulmuş hücrelere uygulama sürelerini takiben 24 saat karvakrol uygulandı ve sonuçlar değerlendirildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin tek başına uygulandığı hücrelerde ROT ile boyanma tespit edilirken diğer gruplarda ROT aktivitesi izlenmedi. 24 saat ve 48 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması ile oksidatif stresin oluşması ROT aktivitesi ile gösterildi. Oksidatif hasar oluşturulmasının ardından, 24 saat karvakrol uygulanarak ROT ile işaretleme yapıldığında, ROT'un inaktive olduğu tespit edildi. Bu durum karvakrolün ROT'u inhibe edebildiğini açıkça göstermektedir. Literatürde farklı hücre grupları üzerinde yapılan çalışmalarda düşük dozlarda ROT seviyesinin anlamlı düzeyde azaldığını, yüksek doz karvakrol uygulanan çalışmalarda ise karvakrolün ROT oluşumunu artırdığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda düşük dozlarda (20 µM) karvakrol uygulaması ile ROT'un inaktive olmasını desteklemektedir (Bayır vd., 2017; Ündeğer vd., 2009). Ayşe Günes Bayır vd'nin 2017 yılında insan fibroblast (WS-1) hücreleri üzerinde yaptığı çalışmalarında karvakrolün doza bağımlı ROT oluşturucu etkisi gözlemlenmiştir ve WS-1 hücrelerindeki bağıl ROT düzeyi ile artan karvakrol dozu arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Ancak WS-1 hücreleri en düşük dozda karvakrol ile tedavi edildiğinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ROT seviyesini düşürmüştür. Ündeğer vd'nin 2009 yılında V79 çin hamster akciğer fibroblast hücreleri üzerinde yaptığı çalışmalarında ise karvakrol tedavisi, kontrole kıyasla 100 µM'de ROT aktivitesinde anlamlı derecede artışa neden olurken 5 µM ve 25 µM dozlarında karvakrol uygulandığında kontrole kıyasla ROT aktivitesinde önemli düşüşler rapor edilmiştir.

Bilindiği üzere apoptoz ve nekroz olmak üzere iki farklı tip hücre ölümü tanımlanmıştır. Bu iki ölüm tipinin farklı biyolojik cevaplar oluşturması nedeniyle bir materyalin sitopatojenik etkileri değerlendirilirken apoptoz ve nekroz oranlarının tespit edilmesi çok önemlidir. Apoptoz, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilen hasar görmüş hücrenin programlanmış ve gen tarafından düzenlenen bir hücre ölümüdür (Brown vd., 2005). Apoptoza uğrayan hücreler apoptotik cisimcik adı verilen daha küçük parçalara ayrılırlar ve parçalanan hücreye ait tüm yapılar, plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi uyarır ve enflamasyonu başlatırlar. Apoptotik cisimcikler yandaki hücreler tarafından fagosite edildiği için apoptotik hücre ölümünde enflamasyona ait klinik semptomlar ve otoimmün herhangi bir cevap görülmemektedir. Moleküler düzeyde apoptozisin gerçekleşmesi iki ana yolla olmaktadır. Bu yollar intrinsik ve ekstrinsik sinyal yollarıdır. Ekstrinsik sinyal yolu fas ligandı veya TNF- $\alpha$  gibi ölüm ligandları, plazma membranındaki aynı kökenli reseptörlerine bağlandığında aktive olmaktadır. İntrinsik sinyal yolu ise DNA hasarı, hücresel stresler veya sitokin yoksunluğu gibi durumlara cevap olarak meydana gelmektedir. Apoptozun intrinsik veya mitokondriyal yolu, hücre içi sinyalleşme ile başlatılır ve mitokondriyal membran geçirgenliğini ve dolayısıyla pro-apoptotik proteinlerin salınmasını içerir (Martinou ve Youle, 2011). Bcl-2 ailesinin üç protein alt grubu, mitokondriyal membrandaki intrinsik sinyal yolunu kontrol etmektedir (Death vd., 1998). Antiapoptik Bcl-2 ve proapoptik Bax proteinleri, hücre ölümünü belirleyen iki kritik proteindir. Bcl-2 ekspresyonu arttığında apoptoz baskılanmaktadır, Bax ekspresyonu arttığında ise apoptoz indüklenmektedir. Bax'ın Bcl-2'ye oranı (Bax/Bcl-2) ise, hücrelerin apoptotik sürece girip girmeyeceğini belirleyen önemli bir orandır (Sadeghzadeh vd., 2018). Sadeghzadeh vd'nin 2018 yılında ratlarda hipertrofik kalp modellemesi oluşturdukları bir çalışmada; karvakrolün, apoptik süreçte yer alan proteinlerin üzerinde olumlu etkisinin olduğunu, kalbi hipertrofiye karşı korumak için antiapoptotik ekspresyonun artması ve proapoptotik ekspresyonun zayıflamasının yeni bir mekanizma olarak ele alınabileceğini bildirmişlerdir. Shoorei vd'nin 2019 yılında diyabetli ratlarda testis dokusundan immunofloresans yöntemiyle Bax ve Bcl-2 yoğunluklarını ve RT-PCR ile mRNA seviyelerini araştırdıkları çalışmalarında, diyabetli ratlara karvakrol verilmesiyle Bax seviyesinin azaldığını, Bcl-2 seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada diyabetli ratlarla kıyaslandığında dördüncü ve sekizinci haftalarda, diyabetli ratlara karvakrol verilmesi ile Bax protein

ekspresyon düzeylerinin azaldığı, Bcl-2 protein ekspresyon düzeylerinin arttığı ve Bax'ın Bcl-2'ye oranının azaldığı belirlenmiştir (Sadeghzadeh vd., 2018) (Shoorei vd., 2019). Nekrotik ölüm ise çoğunlukla hücre hasarı ile ortaya çıkmaktadır. Nekrotik ölüme uğrayan hücrelerde şişme ve parçalanma görülmektedir. Bunun sonucunda ortaya çıkan prostaglandin, histamin gibi ürünler, en yakın damar endotelini uyarır ve lökositlerin hasarlı bölgeye doğru göç etmesini sağlar. Nekrotik ölüm gerçekleştiğinde ödem ve ağrı ile karakterize olan enflamasyon bulguları, klinik olarak gözlenmeye başlar (Kam vd., 2000). Dolayısıyla eğer dokularla temasta olan bir biyomateryal daha yüksek oranda apoptozu indüklüyorsa, dokularda enflamasyon oluşturmaz ve dokularda oluşabilecek reaksiyonlara daha hızlı adapte olur; ancak daha yüksek oranda nekrozu indüklüyorsa, enflamatuvar reaksiyon sonucu ciddi doku hasarları meydana getirebileceği sonucuna varılabilir (Cimpan vd., 2000). Çalışmamızda double staining metodu ile apoptoz nekroz oranlarına bakıldığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan gruplarda nekroz oranı yüksekken, karvakrol uygulanan gruplarda bu oranın sifıra indiği gözlemlendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile stres oluşturulan ve sonrasında karvakrol uygulanan gruplarda ise nekroz oranının düşüp apoptoz oranlarının arttığı gözlemlendi. Bu bağlamda, fibroblast hücrelerinde test edilen karvakrolün daha fazla oranda apoptotik ölüm oluşturması ve apoptotik ölüm sonucunda *in vivo* olarak enflamasyon oluşmaması sebebi ile karvakrolün klinik olarak güvenli bir şekilde kullanılabilir olduğu düşünülebilir.

Melušová vd.'nin 2014 yılında insan hepatoma HepG2 hücreleri üzerinde yaptığı çalışmalarında, çalışmamıza benzer sonuçlar bildirilmiştir. Bu çalışmada, karvakrol ve biberiye yağının sitotoksik konsantrasyonlarının hücre döngüsü üzerindeki etkisini ve her iki doğal uçucu maddenin insan hepatoma HepG2 hücrelerinin DNA fragmantasyonunu ve apoptotik ölümünü indükleme kabiliyetini belirlemek amaçlanmıştır. Bu etkiler, HepG2 hücrelerinin karvakrol ve biberiye yağı ile 24 saat inkübasyonundan sonra akış sitometrisi, internükleozomal DNA fragmantasyonu ve mikronükleus tahlili olarak bilinen üç bağımsız yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda karvakrolün konsantrasyona bağlı bir şekilde apoptoz için tipik olan morfolojik değişiklikleri indüklediği gözlenmiş ve nekroz varlığı ihmal edilebilir düzeyde bulunmuştur. Her iki doğal bileşik de sitoplazmik membranın büzülmesine ve apoptotik cisimlerin oluşmasına neden olmuştur (Melušová vd., 2014). Uçucu yağlar ve karvakrol ile tedavi edilen hücrelerin apoptotik ölümünün

indüklenmesi farklı çalışmalar tarafından da gözlenmiştir. Arunasrre (2010), hücre döngüsü analizini ve Annexin V boyamasını kullanarak insan metastatik meme MDA-MB231 hücrelerinde apoptoz oluşumunda karvakrolün etkisini izlemiştir. Çalışmanın sonuçları, karvakrolün hücrelerde apoptozu açıkça indüklediğini göstermiştir. Bulgular ayrıca artan karvakrol konsantrasyonlarının G0/G1 fazındaki apoptotik hücrelerin sayısını arttırdığını ve S fazındaki hücrelerin görülme sıklığının azaldığını ortaya koymuştur. Böylece karvakrolün tümör hücrelerinde apoptozu indüklediği ve hücre döngüsünün S fazında DNA sentezini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Arunasrre, 2010). Çalışmamız karvakrolün dişeti fibroblast hücreleri üzerinde apoptoz ve nekroz oranlarını araştıran ilk çalışmadır ve elde ettiğimiz olumlu sonuçların yeni yapılacak çalışmalara öncü olacağını düşünmekteyiz.

Nrf2 ve endojen inhibitörü Keap1, evrimsel olarak korunmuş, oksidatif strese karşı koymak için bulunan bir hücre içi savunma mekanizması olarak işlev görür. Nrf2, sitoplazmik Keap1 tarafından sekestre edilir ve bazal koşullarda proteazomal bozunmayı hedefler, oksidatif stres durumunda Nrf2, Keap1'den ayrılır ve küçük Maf proteinlerinden biriyle çekirdeğe yer değiştirir. Heterodimerler, Nrf2 hedef genlerinin düzenleyici bölgelerinde bulunan ARE'leri tanıır. ARE'ler Nrf2 transkripsiyon için anahtar faktörlerin yanında gerekli olan güçlendirici dizilerdir. Nrf2, redoks dengeleme faktörleri, detoksifiye edici enzimler, stres tepkisi proteinleri ve metabolik enzimler olarak görev yapan proteinleri kodlayan yaklaşık 500 genin ekspresyonunu etkilemektedir. Nrf2, antioksidan etkileri ile hücre korumasına katkı sağlamaktadır ve hastalıkların önlenmesinde potansiyel bir hedef olarak görülmektedir (Bellezza vd., 2018). Transkripsiyon faktörü Nrf2, güçlü bir transkripsiyonel aktivatördür ve oksidatif ve elektrofilik streslere yanıt olarak birçok sitoprotektif genin uyarılabilir ifadesinde merkezi bir rol oynar (Itoh vd., 1997; Motohashi ve Yamamoto, 2004). Nrf2'nin hedef genleri glutatyon sentezinde, ROT'un ortadan kaldırılmasında, ksenobiyotik metabolizmasında ve ilaç taşınmasında rol oynar (Okawa vd., 2006; Yates vd., 2009). Keap1, Nrf2'nin aktivitesinin düzenlenmesi için gereklidir. Normal koşullar altında, Nrf2, Keap1'e bağlı bir şekilde ubikuitin-proteazom yolu aracılığıyla sürekli olarak bozulur (Sekhar vd., 2002; Mahon vd., 2003; Kobayashi vd., 2004). Elektrofiller veya ROT varlığında, Nrf2 bozunması durur, stabilize Nrf2 çekirdeklerde birikir, küçük Maf proteinleri ile heterodimerize olur ve antioksidan yanıt elemanı (ARE)/elektrofil

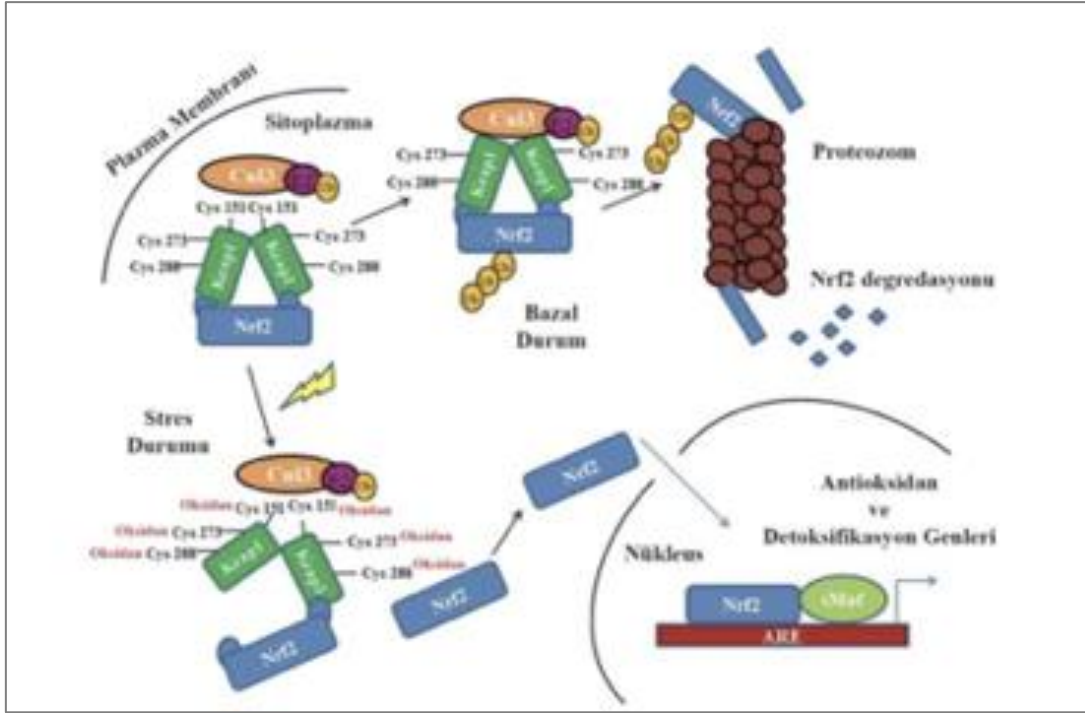
yanıt elemanı (EpRE) yoluyla sitoproteksiyon için hedef genleri aktive eder (Itoh vd., 2004). Böylece, Nrf2 proteininin seviyesi, bozunma süreçleri tarafından düzenlenir ve Nrf2'nin indüklenabilir stabilizasyonu, oksidatif ve elektrofilik streslere hücrel tepkinin özüdür. Elektrofillere ve ROT'a maruz kaldığında Nrf2 bozulmasının nasıl durdurulabileceği araştırılmaktadır. Keap1, tiyol açısından zengin bir proteindir ve komşu kalıntıları genellikle bazik amino asitler olan çoklu reaktif sisteinlere sahiptir. Reaktif tiyoller, elektrofillerin mükemmel hedefleridir ve birkaç elektrofilik reaktifin, tiyolleri doğrudan değiştirdiği gösterilmiştir (Holland vd., 2008; Satoh vd., 2008; Kobayashi vd., 2009; Sekhar vd., 2010). Keap1'in modifikasyonunun, Keap1-Cul3 E3 ligaz kompleksinin yapısal bütünlüğünü bozduğu, ubiquitination aktivitesinin azalmasına neden olduğu ve böylece Nrf2 birikimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Böylece, Keap1, elektrofilik sinyalleri transkripsiyonel aktivasyona dönüştüren bir sensör görevi görür. Elektrofiller için moleküler sensörün özelliklerini ortaya çıkarmak için Keap1-Nrf2 etkileşiminin biyokimyasal, biyofiziksel ve yapısal analizleri kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Normal koşullar altında, Nrf2 yarılanma ömrü < 20 dk olarak bilinmektedir (Kato vd., 2005). Bu hızlı devir, hücrel Nrf2'yi düşük bir seviyede tutar. Streslere maruz kaldığında, Keap1, sistein tiyol kalıntılarının doğrudan modifikasyonu ile etkisiz hale getirilir ve ardından Nrf2 stabilize olur, çekirdeğe yer değiştirir ve çeşitli detoksifikasyon ve antioksidan enzim genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Elektrofilik ve oksidatif stresler, Nrf2 mRNA'da güçlü bir artışa neden olmadığından, Nrf2 proteininin stabilizasyonu, bu streslere yanıt olarak Nrf2 aktivitesinin yükselmesine büyük katkı sağlar. Böylece, Keap1-Nrf2 yolu, Nrf2'nin Keap1 tarafından baskıdan kurtarıldığı ve strese maruz kaldığında biriktiği derepresyon tipi bir stres tepkisini benimser (Itoh vd., 2003; Mahon vd., 2003).

Çalışmamızda karvakrolün Nrf2/Keap1 sinyal yolu üzerine etkisinin araştırılması için iki farklı uygulama yapıldı ve bu uygulamalar kendi içerisinde gruplara ayrıldı. Gruplara 24 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilerek oksidatif stres oluşturuldu ve 24,48 ve 72. saatlerde 4 alt grup incelendi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol uygulanan grubun 24 saatte %6,3'ünde Keap1 ekspresyonunda 1+ saptandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Karvakrol ve Kontrol gruplarında ise 24 saatte herhangi bir pozitiflik görülmedi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol uygulanan grupta 24 saatte % 13.5'inde Nrf2 ekspresyonunda 1+, %84.5'inde 2+'lik saptandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Karvakrol ve Kontrol gruplarında ise 24 saatte herhangi bir pozitiflik

görülmedi. Bu gruplar arasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin tek başına uygulandığı hücrelerde ROT ile boyanma tespit edilirken diğer gruplarda ROT aktivitesi tespit edilemediği gösterilmiştir. Daha sonra immunohistokimya boyama ile Nrf2 ve Keap1'nin protein ekspresyonları incelenmiştir. Bu incelemelerde 1000 hücre sayılmış ve boyanma şiddetleri derecelendirilmiştir.

Çalışmamızda, oksidatif hasar oluşturulan hücreler üzerinde Nrf2 ve Keap1 aktivitelerinin ilk 24 saatte yalnızca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve karvakrol uygulanan grupta ve diğer gruplardan daha erken dönemde tespit edildi. Bu durum karvakrolün Nrf2/Keap1 yolağının daha erken dönemde aktive olmasında etkili olduğunu düşündürebilir. 48. saat sonuçları incelendiğinde ise oksidatif hasar oluşturulmuş olan tüm gruplarda Nrf2 ve Keap1 aktivitelerinin görülmeye başlandı. Oksidatif hasarın uzun sürmesi ile hücrelerde yapım/onarım çalışmaları başlamış ve Nrf2 ve Keap1 proteinleri eksprese olmaya başlamıştır. Fakat en yoğun ve kuvvetli Nrf2 ve Keap1 aktivitesinin yine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+karvakrol grubunda olduğu açıkça gözlenmektedir. Özellikle Nrf2 gen ekspresyonu 48. saatte karvakrol uygulanan gruplarda çok güçlü pozitiflik göstermiştir.

Karvakrolün uzun süre uygulanması Keap1 ve Nrf2'nin aktifleşmesine yol açmıştır. Sonuç olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol, Karvakrol ve kontrol gruplarında 24 saatlik Keap1 pozitifliği oranları arasında anlamlı bir fark saptandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol grubunda pozitiflik oranları diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol, Karvakrol ve kontrol gruplarında 24 saatlik Nrf2 pozitifliği oranları arasında fark saptandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Karvakrol grubunda pozitiflik oranları diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. 72 saat sonuçlarını incelediğimizde ise Nrf2 aktivitesinin daha zayıf şiddette de olsa devam ettiği ancak Keap1 aktivitesinin anlamlı düzeyde düştüğü gözlemlendi. Bu durum şu mekanizma ile ilişkilendirilebilir. Nrf2 stressiz koşullar altında, ubikuitin-proteazom yolu aracılığıyla Keap1'e bağlı bir şekilde sürekli olarak bozular. Oksidatif veya elektrofilik stres Cul3 ayrışması ile Keap1'i etkisiz hale getirdiğinde, Nrf2 stabilize edilir ve de novo sentezlenmiş Nrf2 çekirdeğe yer değiştirir. Nrf2, küçük Maf proteinleri ile heterodimerleşir ve antioksidan/elektrofil yanıt elemanı (ARE/EpRE) aracılığıyla sitoproteksiyon için hedef genleri aktive eder (Deshmukh vd., 2017) (Taguchi vd., 2011). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda 72 saat sonunda Keap1 aktivitesindeki düşüş bu mekanizma ile ilişkilendirilebilir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Nrf2'nin Keap1 tarafından regülasyonu (P. Deshmukh vd.,2017)

Çalışmamızda ilk uygulamadan bağımsız 24 saat ve 48 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanarak oksidatif hasar oluşturulmuş, ardından 24 saat karvakrol uygulanarak Nrf2 ve Keap1'nin protein ekspresyonları incelendi. 24 saat ve 48 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile iki farklı grupta incelememizdeki amaç, artmış oksidatif hasar karşısında karvakrolün Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyon aktivitelerindeki etkisini değerlendirmektir. Sonuç olarak, artmış oksidatif hasar karşısında uygulanan karvakrolün, Nrf2 gen ekspresyonunun daha şiddetli şekilde artışına yol açtığı, Keap'in ise 72. saatte gözlenmediği tespit edildi.

Oksidatif stres, çok çeşitli hastalıkların gelişimine önemli bir katkıda bulunduğundan, Keap1/Nrf2 yolağının mekanizmasının anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aktivitesinin küçük moleküller tarafından up regüle edilebilme kolaylığı ile birleştiğinde, insan hastalıklarının tedavisi için Nrf2'nin teröpatik amaçlı kullanılabilme potansiyeli oldukça heyecan vericidir.

Yara iyileşmesi birçok hücre tipi içeren, çeşitli sitokin ve belirteçlerin birbiriyle uyum içinde yer aldığı, bakteriyel enfeksiyonlar, doku hidrasyonu ve enflamasyon varlığı gibi farklı faktörlerden kolaylıkla etkilenebilen karmaşık bir süreçtir. Bu iyileşme süreci genel olarak dört aşamaya ayrılır: homeostoz, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme (Doğan vd., 2013; Kapan, 2006; Shedoeva vd., 2019; Agyare vd., 2016). Günümüzde, yara iyileşmesi için daha etkili ve uygun



maliyetli terapötik yaklaşımlar araştırılmaktadır ve bitkilerden elde edilen biyoaktif ürünler, yeni ilaçların geliştirilmesi için büyük bilimsel ve ticari ilgi görmektedir. On yıldan fazla bir süredir araştırmacılar, *in vivo* ve *in vitro* testler yoluyla karvakrolün yara iyileşmesi potansiyelini araştırmaktadır. Karvakrol, doku onarımı ve yeni terapötik alternatiflerin geliştirilmesi için yüksek potansiyele sahiptir ve halihazırda insanlarda test edilmeye başlanmıştır (Costa vd., 2018). Pek çok lokal ve sistemik faktör yara iyileşme sürecini etkilemektedir. Yara iyileşme mekanizmasında kolajen sentezi fibroblast hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu sebeple çalışmamızda kullanılan *in vitro* yara iyileşme modelinde, insan fibroblast hücrelerinin kullanımı uygun görülmüştür. Çalışmamızda kullanılan *in vitro* çizik yara iyileşme modeli hücre göçünü ve yara iyileşmesi tespit etmek için kullanılan yararlı bir yöntemdir. Bu yöntemde dış eti hücrelerinin hücre göçü ve yayılma yetenekleri, yüzeyler üzerindeki hücre popülasyonunun genişlemesini ölçen bir çizik yarası analizi kullanılarak değerlendirilmektedir. Klinik çalışmalardan daha kolay standardize edilmesi, uygulaması basit ve ekonomik olması, hücrede yarattığı etkinin spesifik olarak test edilmesi ve incelenecek maddenin sitotoksitesinin daha hassas bir şekilde değerlendirilebilmesi gibi birçok avantaj sağlamaktadır. Ancak *in vitro* çalışmalarda tek bir hücre üzerindeki spesifik etki test edildiğinden, kullanılan materyale karşı bütünüyle bir doku cevabı gözlenememektedir. Materyallerle ilgili daha kesin sonuçlar bildirilebilmesi için daha fazla klinik ve hayvan çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir (Browne, 1988 ; Keleş, 2006).

Birçok çalışmada, karvakrolün re-epitelizasyonu, anjiyogenezi, granülasyon dokusu oluşumunu ve kolajen liflerinin birikmesini uyardığı gösterilmiştir. Bu etki, granülasyon dokusunun skar oluşumuna evrimi yara iyileşmesi sırasında enflamatuvar infiltrasyonun kronikliği ile yakından ilişkili olduğundan, karvakrolün ilk enflamatuvar fazı modüle etme yeteneği ile ilişkili olabildiği düşünülmektedir (Costa vd., 2018). Amerika Deneysel Biyoloji Derneği Federasyonu dergisinde, 2015 yılında Boston'da düzenlenen toplantısında yayınlanan bir çalışmada, kitosan filmlerine eklenen karvakrolün (%0.5 veya %1), cilt yaralarının iyileşmesi üzerinde potansiyel bir kullanıma sahip olduğu, yara alanlarını ve ödemi azalttığı, daha erken granülasyon dokusu oluşumunu indüklediği, hücre proliferasyonunu ve epitelizasyonu artırdığı gösterilmiştir (Sun vd., 2014). Başka bir çalışmada Gunal vd., (2014) 12 gün boyunca ayçiçek yağında (%2) seyreltilmiş karvakrol (%12.5)

içeren bir pansumanın iyileştirici etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında karvakrolün 12. günde lezyon yüzeyini önemli ölçüde azalttığını (P = 0.014), kontrole kıyasla granülasyon dokusu kalınlığında ve lezyon derinliğinde (P = 0.002) değişiklikleri teşvik ettiğini ve granülasyona (P = 0.008) neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda karvakrolün hücre proliferasyonunu artırdığı ancak yara iyileşmesi için yara bölgesine hücre göçünü sağlamadığı gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda karvakrolün yara iyileşmesinin ilk aşamalarında önemli bir rol sunarak yara iyileşme sürecini modüle edebildiği gösterilmiştir. Karvakrol, yara iyileşmesinin enflamatuvar fazında, ROT aktivitesini azaltarak, antioksidan enzimlerin artışına yol açarak ve *S. aureus* ve *E. coli*'yi inhibe edici antimikrobiyal özellikleri ile yara iyileşmesine dolaylı olarak katkıda bulunmaktadır. Yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasında ise anjiyogenez, re-epitelizasyon ve büyüme faktörlerinin salınımını artırarak katkı sağlamaktadır. Yara kapanma yüzdesini ise ancak yeniden şekillenme ve matürasyon aşamasında artırabildiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızda karvakrolün yara iyileşmesi üzerindeki 24 saatlik sonuçlarını gözlemlediğimiz için yara kapanma yüzdesinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Ancak daha geç dönemde karvakrolün yara kapanma yüzdesine etki edeceğini düşünmekteyiz. Çalışmamız diş eti fibroblastları üzerinde karvakrolün yara iyileşmesine etkisini araştıran ilk çalışmadır. Moleküler mekanizmaları daha iyi anlamak için daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Costa vd., 2018). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda karvakrolün diş eti fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerini belirleyerek yeni deneysel ve klinik uygulamalara öncü olması öngörülmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre;

1. Karvakrol düşük dozlarda sitotoksik olmayan doğal bir ajan olması sebebiyle periodontal hastalıkların tedavisinde kullanılan diğer kimyasal ve sentetik ajanlara alternatif olarak klinikte güvenilir bir şekilde kullanılabilir.
2. Karvakrolün *in vitro* etkilerinin daha iyi anlaşılması için daha fazla *in vitro* ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
3. Karvakrol, diş macunu, gargara, jel gibi lokal uygulama ajanı olarak ve ilave olarak kullanılabilir. Bu sebeple, farklı bilimsel çalışmalarla bu konu desteklenebilir.

4. ROT aktivitesini gözle görülür şekilde azaltması ve Nrf gen ekspresyon düzeylerini artırması sebebiyle güçlü bir antioksidan adaydır.
5. Keap1/Nrf2 mekanizmanın tam olarak anlaşılması, birçok hastalık için yeni tedavilerin geliştirilmesini sağlayabilir.
6. Karvakrolün periodontal yara iyileşmesi üzerine olası etkilerinin belirlenmesi için daha uzun dönemli çalışmalar planlanabilir.

## KAYNAKLAR

- Agyare, C., Boakye, Y. D., Bekoe, E. O., Hensel, A., Dapaah, S. O., ve Appiah, T. (2016). African medicinal plants with wound healing properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 177, 85-100.
- Ahangar, P., Mills, S. J., Smith, L. E., Gronthos, S., ve Cowin, A. J. (2020). Human gingival fibroblast secretome accelerates wound healing through anti-inflammatory and pro-angiogenic mechanisms. *NPJ Regenerative Medicine*, 5(1), 1-10.
- Ahn, K. (2017). The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Reports*, 50(3), 111-116.
- Ainamo, A., Ainamo, J., ve Poikkeus, R. (1981). Continuous widening of the band of attached gingiva from 23 to 65 years of age. *Journal of Periodontal Research*, 16(6), 595-599.
- Akalin, F. A., Toklu, E., ve Renda, N. (2005). Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(3), 238-243.
- Aliğianis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., ve Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168-4170.
- Alma, M. H., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M., ve Hirata, T. (2003). Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(12), 1725– 1729.
- Andersen, A. (2006). Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *International Journal of Toxicology*, 25, 29– 127.
- Areias, F. M., Rego, A. C., Oliveira, C.R. and Seabra, R. M. (2001). Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe<sup>2+</sup> induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochemical Pharmacology* 63, 111-118.
- Arkali, G., Aksakal, M., ve Kaya, Ş. Ö. (2021). Protective effects of carvacrol against diabetes-induced reproductive damage in male rats: Modulation of Nrf2/HO-1 signalling pathway and inhibition of Nf-kB-mediated testicular apoptosis and inflammation. *Andrologia*, 53(2), e13899.
- Arunasree K.M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17, 581-588.
- Astley, S. B. and Lindsay, D. G. (Eds). (2002). *Molecular aspects of medicine*. London: Pergamon.

- Aydemir, B., ve Sarı, E. K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2), 56-60.
- Aydın, S, Başaran, A.A, Başaran, N. (2005). The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research*, 581(1-2), 43-53.
- Bahramikia, S., Ardestani, A., ve Yazdanparast, R. (2009). Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. *Food Chemistry*, 115(1), 37-42.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., ve Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Baldwin Jr, A. S. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 14(1), 649-681.
- Battino, M., Bullon, P., Wilson, M., ve Newman, H. (1999). Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 10(4), 458-476.
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., ve Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(5), 721-733.
- Bhakkialakshmi, E., Suganya, N., Sireesh, D., Krishnamurthi, K., Devi, S. S., Rajaguru, P., ve Ramkumar, K. M. (2016). Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 772, 92-98.
- Birkedal-Hansen, H. (1988). From tadpole collagenase to a family of matrix metalloproteinases. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 17(9-10), 445-451.
- Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 64, 474-484.
- Bloemen, V., Schoenmaker, T., de Vries, T. J., ve Everts, V. (2011). IL-1 $\beta$  favors osteoclastogenesis via supporting human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(7), 1890-1897.
- Bouillaguet, S., Degrange, M., Cattani, M., Godin, C. (2022). Bonding to dentin achieved by general practitioners. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 112(10): 1006-11.
- Box, H. C., Freund, H. G., Budzinski, E. E., Wallace, J. C., ve MacCubbin, A. E. (1995). Free radical-induced double base lesions. *Radiation Research*, 141(1), 91-94.
- Brown, J.M., Attardi, L.D. (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*, 5, 231-237

- Browne, R. M. (1988). The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials—does it have a role?. *International Endodontic Journal*, 21(2), 50-58.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burt, S. A., Vlieland, R., Haagsman, H. P., ve Veldhuizen, E. J. (2005). Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*, 68(5), 919-926.
- Can Baser, K. H. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3106-3119.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., ve Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57-80.
- Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., ve Remmal, A. (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(3), 217-226.
- Chao, D. T., ve Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology*, 16, 395-419.
- Chapple, I. L., ve Matthews, J. B. (2007). The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*, 43(1), 160-232.
- Cheeseman, K. H., ve Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493.
- Chen S., Wang, J., Chen, J. and Huang, R. (2002). Possible involvement of glutathione and p53 in trichloroethylene- and perchloroethylene-induced lipid peroxidation and apoptosis in human lung cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 464-472.
- Chen, L., Arbieva, Z. H., Guo, S., Marucha, P. T., Mustoe, T. A., ve DiPietro, L. A. (2010). Positional differences in the wound transcriptome of skin and oral mucosa. *BMC Genomics*, 11(1), 1-15.
- Cho, Y. D., Kim, K. H., Lee, Y. M., Ku, Y., ve Seol, Y. J. (2021). Periodontal wound healing and tissue regeneration: A narrative review. *Pharmaceuticals*, 14(5), 456.
- Cimpan, M. R., Cressey, L. I., Skaug, N., Halstensen, A., Lie, S. A., Gjertsen, B. T., ve Matre, R. (2000). Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *European Journal of Oral Sciences*, 108(1), 59-69.

- Costa, M. F., Durço, A. O., Rabelo, T. K., Barreto, R. D. S. S., ve Guimarães, A. G. (2019). Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: A systematic review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(2), 141-155.
- Crotti, T., Smith, M. D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., ve Haynes, D. (2003). Receptor activator NF  $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 38(4), 380-387.
- Dagli Gul, A. S., Fadillioglu, E., Karabulut, I., Yesilyurt, A., ve Delibasi, T. (2010). The effects of oral carvacrol treatment against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced injury on isolated pancreas islet cells of rats. *Islets*, 5(4), 149-155.
- Dahiya, P., Kamal, R., Gupta, R., Bhardwaj, R., Chaudhary, K., ve Kaur, S. (2013). Reactive oxygen species in periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(4), 411-416.
- D'Autréaux, B., ve Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813-824.
- Dawson III, D. R., Branch-Mays, G., Gonzalez, O. A., ve Ebersole, J. L. (2014). Dietary modulation of the inflammatory cascade. *Periodontology 2000*, 64(1), 161-197.
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., ve Silano, M. (2004). Constituents of aromatic plants: Carvacrol. *Fitoterapia*, 75(7-8), 801-804.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3217-3266.
- Deshmukh, P., Unni, S., Krishnappa, G., ve Padmanabhan, B. (2017). The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophysical Reviews*, 9(1), 41-56.
- Dizdaroglu, M., ve Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4), 382-419.
- Dodson, M., De La Vega, M. R., Cholanians, A. B., Schmidlin, C. J., Chapman, E., ve Zhang, D. D. (2019). Modulating NRF2 in disease: timing is everything. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 59, 555-575.
- Dorland, W. A. N. (1955). *Dorland's illustrated medical dictionary*. 24th edition. Philadelphia: Saunders, 1129.
- Dulger, B. (2005). An investigation on antimicrobial activity of endemic *Origanum solymicum* and *Origanum bilgeri* from Turkey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2(3), 259-263.

- Dušan, F., Marián, S., Katarína, D., ve Dobroslava, B. (2006). Essential oils—their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology In Vitro*, 20(8), 1435-1445.
- Ebersole, J. L., Dawson III, D. R., Morford, L. A., Peyyala, R., Miller, C. S., ve González, O. A. (2013). Periodontal disease immunology: ‘double indemnity’ in protecting the host. *Periodontology 2000*, 62(1), 163-202.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine* 13, 341-390.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., ve Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and Medicine*, 11(1), 81-128.
- Esterbauer, H., ve Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods In Enzymology*, 186, 407-421.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), 89-111.
- Finkel, T. (2012). Signal transduction by mitochondrial oxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4434-4440.
- Fung, D. (2009). Rapid methods and automation in food microbiology: 25 years of development and predictions. *Bull Tech U Ist*, 54, 45-55.
- Fung, D. Y. (2002). Rapid methods and automation in microbiology. *Compreh Rev Food Sci Food Safety*, 1, 3-21.
- Garant, P. R. (1976). Collagen resorption by fibroblasts. A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. *Journal of Periodontology*, 47(7), 380-390.
- Garlet, G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89(12), 1349-1363.
- Godic, A., Poljšak, B., Adamic, M., ve Dahmane, R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1155.
- Gokhale, S. R., ve Padhye, A. M. (2013). Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *British Dental Journal*, 214(9), 467-471.
- Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S., ve He, C. S. (1989). Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a



- tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(21), 8207-8211.
- Goldberg, M.B., Glogauer, M. (2016). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 down-regulation in oral neutrophils is associated with periodontal oxidative damage and severe chronic periodontitis. *Am J Pathol*. 186(6), 1417-1426.
- Gorrini, C., Harris, I. S., ve Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(12), 931-947.
- Gough, J., E., Downes, S. (2001) Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res*, 57(4), 497-505.
- Gounaris, Y., Skoula, M., Fournaraki, C., Drakakaki, G., ve Makris, A. (2002). Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum*× *intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(3), 249-258.
- Guimarães, A. G., Quintans, J. S., ve Quintans-Júnior, L. J. (2013). Monoterpenes with analgesic activity-a systematic review. *Phytotherapy Research*, 27(1), 1-15.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- Günel, M. Y., Okçu Heper, A., ve Zaloğlu, N. (2014). The effects of topical carvacrol application on wound healing process in male rats. *Pharmacognosy Journal*, 6, 10-14.
- Günes-Bayir, A., Kocyigit, A., Güler, E. M., Bilgin, M. G., Ergün, İ. S., ve Dadak, A. (2018). Effects of carvacrol on human fibroblast (WS-1) and gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro and on Wistar rats in vivo. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 448(1), 237-249.
- Hagan, E. C., Hansen, W. H., Fitzhugh, O. G., Jenner, P. M., Jones, W. I., Taylor, J. M., Long, E. L., Nelson, A. A., ve Brouwer, J. B. (1967). Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology*, 5, 141– 157.
- Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskin, M. A., ve Curtis, M. A. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host & Microbe*, 10(5), 497-506.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (Eds). (1995). *Free radicals in biology and medicine*. New York: University Press Inc.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119(6), 598-620.

- Halliwell, B., ve Gutteridge, J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Third edition. New York: Oxford University Press.
- Hanada, T., ve Yoshimura, A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(4-5), 413-421.
- Handy, D. E., ve Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), 1323-1367.
- Hanks, C. T., Wataha, J. C., ve Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*, 12(3), 186-193.
- Harijith, A., Ebenezer, D. L., ve Natarajan, V. (2014). Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol*, 5, 352.
- Hashemipour, H., Kermanshahi, H., Golian, A., ve Veldkamp, T. (2013). Metabolism and nutrition: Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poultry Science*, 92(8), 2059–2069.
- Hassell, T. M. (1993). Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology 2000*, 3(1), 9-38.
- He, T., Li, X., Wang, X., Xu, X., Yan, X., Li, X., ve She, G. (2020). Chemical composition and anti-oxidant potential on essential oils of *Thymus quinquecostatus* Celak. From Loess Plateau in China, regulating Nrf2/Keap1 signaling pathway in zebrafish. *Scientific Reports*, 10(1), 1-18.
- Hockenbery, D. (1995). Defining apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 16.
- Holland, R., Hawkins, A. E., Eggler, A. L., Mesecar, A. D., Fabris, D., ve Fishbein, J. C. (2008). Prospective type 1 and type 2 disulfides of Keap1 protein. *Chemical Research in Toxicology*, 21(10), 2051-2060.
- Hou, D. X. (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Current Molecular Medicine*, 3(2), 149-159.
- Houdkova, M., Rondevaldova, J., Doskocil, I., ve Kokoska, L. (2017). Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia*, 118, 56-62.
- Iglesias-Bartolome, R., Uchiyama, A., Molinolo, A. A., Abusleme, L., Brooks, S. R., Callejas-Valera, J. L., ve Morasso, M. I. (2018). Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. *Science Translational Medicine*, 10(451), eaap8798.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., ve Nabeshima, Y. I. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II

- detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 313-322.
- Itoh, K., Tong, K. I., ve Yamamoto, M. (2004). Molecular mechanism activating Nrf2–Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), 1208-1213.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., ve Yamamoto, M. (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to Cells*, 8(4), 379-391.
- Jacobsen, N., Aasenden, R., Henstein-Petersen, A. (1991) Occupational health complaints and adverse patient reactions as perceived by personnel in public dentistry. *Community Dent. Oral Epidemiol*, 19, 155-159.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ve Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11.
- Janssen-Heininger, Y. M., Mossman, B. T., Heintz, N. H., Forman, H. J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., ve van der Vliet, A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(1), 1-17.
- Jayakumar, S., Madankumar, A., Asokkumar, S., Raghunandhakumar, S., Gokuladhas, K., Kamaraj, S., Josephine Divya, M. G., ve Devaki, T. (2012). Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 360, 51-60.
- Jenkinson, A. M., Collins, A. R., Duthie, S. J., WAHLE, K. W., ve Duthie, G. G. (1999). The effect of increased intakes of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on DNA damage in human lymphocytes. *The FASEB Journal*, 13(15), 2138-2142.
- Jimbow, K., Quevedo Jr, W. C., Fitzpatrick, T. B., ve Szabo, G. (1976). Some aspects of melanin biology: 1950–1975. *Journal of Investigative Dermatology*, 67(1), 72-89.
- Jo, J. R., Park, J. S., Park, Y. K., Chae, Y. Z., Lee, G. H., Park, G. Y., ve Jang, B. C. (2012). Pinus densiflora leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40(4), 1238-1245.
- Kaklamanos, E. G., ve Tsalikis, L. (2002). A review on peri-implant crevicular fluid assays potential in monitoring and predicting peri-implant tissue responses. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 4(2), 49-59.
- Kam, P. C., ve Ferch, N., I. (2000). Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*, 55(11), 1081-93.

- Kane, A. B. (1995). Redefining cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 1-2.
- Kansanen, E, Kuosmanen, S.M., Leinonen, H., Levonen, A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.
- Karring, T., ve Löe, H. (1970). The three-dimensional concept of the epithelium-connective tissue boundary of gingiva. *Acta Odontologica Scandinavica*, 28(6), 917-933.
- Katoh, Y., Iida, K., Kang, M. I., Kobayashi, A., Mizukami, M., Tong, K. I., ve Yamamoto, M. (2005). Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(2), 342-350.
- Katsani, K. R., ve Sakellari, D. (2019). Saliva proteomics updates in biomedicine. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 26(1), 1-11.
- Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(1), 21-48.
- Khalili, J., ve Biloklytska, H. F. (2008). Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral Diseases*, 14(8), 754-760.
- Kim, S. C., Kim, O. S., Kim, O. J., Kim, Y. J., ve Chung, H. J. (2010). Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 40(4), 164-171.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., ve Papapanou, P. N. (2017). Authors' reply: Predictive diagnostic tests in periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1-1.
- Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. & Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7130-7139.
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y. & Yamamoto, M. (2009). The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* 29, 493-502.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., ve Lanaras, T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*, 44(5), 883-886.
- Korkmaz S-Can Baser, K. H. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3106-3119.

- Kornman, K. S. (1999). Host modulation as a therapeutic strategy in the treatment of periodontal disease. *Clinical Infectious Diseases*, 28(3), 520-526.
- Kuhnel, H., Adilijiang, A., Dadak, A., Wieser, M., Upur, H., Stolze, K., ve Strasser, A. (2015). Investigations into cytotoxic effects of the herbal preparation Abnormal Savda Munziq. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 53, 1-9.
- Lamster, I. B., ve Novak, M. J. (1992). Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 3(1), 31-60.
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., ve Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1), 76-94.
- Las Heras, B., Rodriguez, B., Bosca, L., ve Villar, A. M. (2003). Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(2), 171-185.
- Li, J. W. H., ve Vederas, J. C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. *Science*, 325(5937), 161-165.
- Liang, W. Z., ve Lu, C. H. (2012). Carvacrol-induced [Ca<sup>2+</sup>] i rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sciences*, 90(17-18), 703-711.
- Lindhe J, Karring T, Lang N. P. (2003). Clinical periodontology and implant dentistry. 4th edition. *Anatomy of the periodontium*. Blackwell: Munksgaard, Chapter 1.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., ve Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2926-2930.
- Liu, Y. C. G., Lerner, U. H., ve Teng, Y. T. A. (2010). Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000*, 52, 163-206.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moreno, F. J., Bermúdez, J. M., Aucejo, S., ve Cameán, A. M. (2014). Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 281-290.
- Lozano-Navarro, J. I., Díaz-Zavala, N. P., Velasco-Santos, C., Melo-Banda, J. A., Páramo-García, U., Paraguay-Delgado, F., ve Zapién-Castillo, S. (2018). Chitosan-starch films with natural extracts: Physical, chemical, morphological and thermal properties. *Materials*, 11(1), 120.
- Mahalingam, R., ve Fedoroff, N. (2003). Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, 119(1), 56-68.

- Majno, G., ve Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 3-15.
- Malamas, M., ve Marselos, M. (1992). The tradition of medicinal plants in Zagori, Epirus (northwestern Greece). *Journal of Ethnopharmacology*, 37(3), 197-203.
- Malhotra, J. D., ve Kaufman, R. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(12), 2277-2294.
- Marsh, P. D. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research*, 8(2), 263-271.
- Marsh, P. D. (2000). Role of the oral microflora in health. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(3), 130-137.
- Martinou, J. C., ve Youle, R. J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental Cell*, 21(1), 92-101.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., ve Hayes, J. D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21592-21600.
- Mehdi, S. J., Ahmad, A., Irshad, M., Manzoor, N., ve Rizvi, M. M. A. (2011). Cytotoxic effect of carvacrol on human cervical cancer cells. *Biol Med*, 3(2), 307-312.
- Melo, F. H. C., Moura, B. A., de Sousa, D. P., de Vasconcelos, S. M. M., Macedo, D. S., Fonteles, M. M. D. F., ve de Sousa, F. C. F. (2011). Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25(3), 362-367.
- Melo, J. O. D., Saltoratto, A. L. F., Rizo, W. F., Jesus, H. C. R. D., Arrigoni-Blank, M. D. F., Alves, P. B., ve Blank, A. F. (2014). Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. *Genet. Mol. Res*, 13, 2691-2697.
- Melušová, M., Jantová, S., ve Horváthová, E. (2014). Carvacrol and rosemary oil at higher concentrations induce apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(4), 189-194.
- Milella, L., Bader, A., De Tommasi, N., Russo, D., ve Braca, A. (2014). Antioxidant and free radical-scavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species. *Food Chemistry*, 160, 298-304.
- Milisav, I., Ribarič, S., ve Poljsak, B. (2018). Antioxidant vitamins and ageing. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*, 1-23.
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., ve Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126-1167.

- Miyasaki, K. T. (1991). The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *Journal of Periodontology*, 62(12), 761-774.
- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., ve Van Noort, R. (2009). Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*, 2(2), 514-548.
- Motohashi, H., ve Yamamoto, M. (2004). Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, 10(11), 549-557.
- Muller-Glauser, W., ve Schroeder, H. E. (1983). Exfoliative cytology and ultrastructure of superficial epithelial cells from the normal human oral mucosa. *Journal de Biologie Buccale*, 11(4), 317-326.
- Nakanishi, S., Suzuki, G., Kusunoki, Y., Yamane, K., Egusa, G., ve Kohno, N. (2004). Increasing of oxidative stress from mitochondria in type 2 diabetic patients. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20(5), 399-404.
- Nauseef, W. M., ve Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7), 602-611.
- Newcomb, G. M., Seymour, G. J., ve Powell, R. N. (1982). Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. *Journal of Clinical Periodontology*, 9(4), 297-304.
- Newman, M.G., Takei, H.H., Carranza, F.A. (2002). *Carranza's Clinical Periodontology*. 9th edition. Pennsylvania: W. B. Saunders, 58, 749-53.
- Nikoloudaki, G., Creber, K., ve Hamilton, D. W. (2020). Wound healing and fibrosis: a contrasting role for periostin in skin and the oral mucosa. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 318(6), C1065-C1077.
- Ochoa, C. D., Wu, R. F., ve Terada, L. S. (2018). ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 63, 18-29.
- Okawa, H., Motohashi, H., Kobayashi, A., Aburatani, H., Kensler, T. W., ve Yamamoto, M. (2006). Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(1), 79-88.
- Oringer, R. J. (2002). Modulation of the host response in periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 73(4), 460-470.
- Page, R. C., ve Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 34(3), 235-249.
- Panjamurthy, K., Manoharan, S., ve Ramachandran, C. R. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett*, 10(2), 255-264.

- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., ve Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(1), 173-182.
- Park, Y., Nam, S., Yi, H. J., Hong, H. J., ve Lee, M. (2009). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke. *Nutrition Research*, 29(11), 812-818.
- Petersen, P. E., ve Ogawa, H. (2005). Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *Journal of Periodontology*, 76(12), 2187-2193.
- Pilau, M. R., Alves, S. H., Weiblen, R., Arenhart, S., Cueto, A. P., ve Lovato, L. T. (2011). Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1616-1624.
- Pippi, R. (2017). Post-surgical clinical monitoring of soft tissue wound healing in periodontal and implant surgery. *International Journal of Medical Sciences*, 14(8), 721-728.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ve Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-13.
- Platel, K., ve Srinivasan, K. (2015). Bioavailability of micronutrients from plant foods: an update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1608-1619.
- Polimeni, G., Xiropaidis, A. V., ve Wikesjö, U. M. (2006). Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology 2000*, 41(1), 30-47.
- Politis, C., Schoenaers, J., Jacobs, R., ve Agbaje, J. O. (2016). Wound healing problems in the mouth. *Frontiers in Physiology*, 7, 507.
- Preshaw, P. M., Hefti, A. F., Jepsen, S., Etienne, D., Walker, C., ve Bradshaw, M. H. (2004). Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis: a review. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(9), 697-707.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., ve Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332-347.
- Ramirez-Toltosa, C., Andersen, O. M., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Wood, S. G., Duthie, S. J., Collins, A. R. and Duthie, G. (2001). Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 1033-1037.
- Reddy, P. H. (2006). Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: Implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 96(1), 1-13.



- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152-159.
- Richmond, N. A., Lamel, S. A., Davidson, J. M., Martins-Green, M., Sen, C. K., Tomic-Canic, M., ve Kirsner, R. S. (2013). US–National Institutes of Health-funded research for cutaneous wounds in 2012. *Wound Repair and Regeneration*, 21(6), 789-792.
- Riella, K. R., Marinho, R. R., Santos, J. S., Pereira-Filho, R. N., Cardoso, J. C., Albuquerque-Junior, R. L. C., ve Thomazzi, S. M. (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 656-663.
- Roberts, F. A., ve Darveau, R. P. (2015). Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontology 2000*, 69(1), 18-27.
- Romanelli, R., Mancini, S., Laschinger, C., Overall, C. M., Sodek, J., ve McCulloch, C. A. (1999). Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infection and Immunity*, 67(5), 2319-2326.
- Sadeghzadeh, S., Hejazian, S. H., Jamhiri, M., Hafizibarjin, Z., Sadeghzadeh, S., ve Safari, F. (2018). The effect of carvacrol on transcription levels of Bcl-2 family proteins in hypertrophied heart of rats. *Physiology and Pharmacology*, 22(1), 54-62.
- Sakaguchi, R. L. (2012). *Craig's restorative dental materials*. (13 rd ed). Portland: Elsevier Health Sciences.
- Sakkas, H., ve Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 429-438.
- Satoh, T., Kosaka, K., Itoh, K., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Shimojo, Y., ve Lipton, S. A. (2008). Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. *Journal of Neurochemistry*, 104(4), 1116-1131.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995-1014.
- Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22, 6-11.
- Schrader, M., ve Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755-1766.
- Schroeder, H. (1981). *Differentiation of human oral stratified epithelia*. Basel: Karger.

- Schroeder, H. E. (1969). Melanin containing organelles in cells of the human gingiva: II. Keratinocytes. *Journal of Periodontal Research*, 4(3), 235-247.
- Schroeder, H. E., Münzel-Pedrazzoli, S., ve Page, R. (1973). Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Archives of Oral Biology*, 18(7), 899-923.
- Schroeder, H. E., ve Amstad-Jossi, M. (1984). Type and variability of the stratum corneum in normal and diseased human oral stratified epithelia. *Journal de Biologie Buccale*, 12(2), 101-116.
- Schroeder, H. E., ve Theiiade, J. (1966). Electron microscopy of normal human gingival epithelium. *Journal of Periodontal Research*, 1(2), 95-119.
- Sekhar, K. R., Rachakonda, G., ve Freeman, M. L. (2010). Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244(1), 21-26.
- Sekhar, K. R., Yan, X. X., ve Freeman, M. L. (2002). Nrf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by KIAA0132, the human homolog to INrf2. *Oncogene*, 21(44), 6829-6834.
- Sen, S., ve Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. In *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*. Washington, DC: American Chemical Society, 1083, 1-37.
- Sena, L. A., ve Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48(2), 158-167.
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., del Mar Contreras, M., ve Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675-1687.
- Shedoeva, A., Leavesley, D., Upton, Z., ve Fan, C. (2019). Wound healing and the use of medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-31.
- Shoorei, H., Khaki, A., Khaki, A. A., Hemmati, A. A., Moghimian, M., ve Shokoohi, M. (2019). The ameliorative effect of carvacrol on oxidative stress and germ cell apoptosis in testicular tissue of adult diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 568-578.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295.
- Sies, H. (2000). *What is oxidative stress? Oxidative stress and vascular disease*. Springer, 1-8.
- Simpson, D. M., ve Avery, B. E. (1974). Histopathologic and ultrastructural features of inflamed gingiva in the baboon. *Journal of Periodontology*, 45(7), 500-510.

- Skougaard, M. (1965). Turnover of the gingival epithelium in marmosets. *Acta Odontologica Scandinavica*, 23(6), 623-643.
- Smallwood, M. J., Nissim, A., Knight, A. R., Whiteman, M., Haigh, R., ve Winyard, P. G. (2018). Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 125, 3-14.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. K. J. R., ve Kent Jr, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144.
- Sun, B. K., Siplashvili, Z., ve Khavari, P. A. (2014). Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, 346(6212), 941-945.
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., ve Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304-318.
- Taguchi, K., Motohashi, H., ve Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2), 123-140.
- Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prestera, T., ve Zhang, Y. (1995). Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicology Letters*, 82, 173-179.
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., ve Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89, 159-172.
- Tuncer, S., ve Demirci, M. (2011). Dental materyallerde biyoyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011(2), 141-149.
- Ulukaya, E. (2003). Apoptozis ders notları. Bursa: *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi*, 15-26.
- Ündeğer, Ü., Başaran, A. R. İ. F., Degen, G. H., ve Başaran, N. (2009). Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2037-2043.
- Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., ve Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- Visse, R., ve Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827-839.
- Wada, L., ve Ou, B. (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberrries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3495-3500.

- Wang, Y., Andrukhov, O., ve Rausch-Fan, X. (2017). Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8, 910.
- Wauquier, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J., ve Wittrant, Y. (2009). Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 15(10), 468-477.
- Weinberg, M. A., ve Bral, M. (1999). Laboratory animal models in periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(6), 335-340.
- Westman, J., Grinstein, S., ve Marques, P. E. (2020). Phagocytosis of necrotic debris at sites of injury and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 10, 3030.
- Wu, J. Q., Kosten, T. R., ve Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200-206.
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., ve Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8, 6-14.
- Yates, M. S., Tran, Q. T., Dolan, P. M., Osburn, W. O., Shin, S., McCulloch, C. C., ve Kensler, T. W. (2009). Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis*, 30(6), 1024-1031.
- Yin, Q. H., Yan, F. X., Zu, X. Y., Wu, Y. H., Wu, X. P., Liao, M. C., ve Zhuang, Y. Z. (2012). Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64(1), 43-51.