



Borik asitin sementoblast hücrelerinde nikotin kaynaklı biyoaktivite kaybı üzerindeki etkisi

Melike Ünlütürk ¹, Abdullah Emre Hasırcı ¹, Şerife Buket Bozkurt Polat ^{2,*}

¹Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Niğde, 51240, Türkiye

²Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Niğde, 51240, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:
İlk gönderi 19 Haziran 2023
Kabul 1 Ekim 2023
Online 29 Aralık 2023

Araştırma Makalesi

DOI: 10.30728/boron.1316579

Anahtar kelimeler:

Borik asit
Nikotin
Sementoblast

ÖZET

Borik asit (BA), dental fizyolojide mineral kompozisyonu ile ilişkili alveolar kemik yoğunluğunu etkiler ve nikotin (N) maruziyeti periodontal hastalığın patofizyolojisinde önemli bir risk faktörüdür. Bu çalışmanın amacı, BA'nın sementoblast hücrelerinde N maruziyeti sonrası biyoaktivite kaybı üzerindeki etkisini araştırmaktır. Bu amaçla, sementoblast hücreleri farklı konsantrasyonlarda (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM) N ve 10 ng/mL konsantrasyonda BA ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı 24 ve 72. saatlerde MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin yara alanına göç potansiyeli, hücre göçü yara iyileşmesi deneyi ile görüntülenmiştir. Total RNA 3, 6 ve 9. günlerde hücrelerden izole edilmiş ve mineralize doku ile ilişkili belirteçlerin gen ekspresyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, N'in sementoblast hücrelerinin canlılığı, migrasyona dayalı yara iyileşmesi ve özellikle mineralize doku ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir ($p<0,01$). Ayrıca, N maruziyetinin gün bazında artmasıyla birlikte hedef gen ifade paternlerinin olumsuz etkilendiği ($p<0,01$) ve BA uygulamasının ise sementoblast hücre fonksiyonlarının korunmasında güçlü bir preventif terapötik ajan olabileceği belirlenmiştir.

Effect of boric acid and quercetin combination on oxidative stress/cognitive function in parkinson model

ARTICLE INFO

Article History:
Received June 13, 2023
Accepted October 1, 2023
Available online December 29, 2023

Research Article

DOI: 10.30728/boron.1316579

Keywords:

Boric acid
Nicotin
Cementoblast

ABSTRACT

Boric acid (BA) affects alveolar bone density related to mineral composition in dental physiology and nicotine (N) exposure is an important risk factor in the pathophysiology of periodontal disease. The aim of this study was to investigate the effect of BA on the deprive of bioactivity in cementoblast cells after N exposure. For this purpose, cementoblast cells were treated with different concentrations (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM) of N and BA at a concentration of 10 ng/mL and cell viability was evaluated at 24 and 72 h by MTT assay. The migration potential of cells into the wound area was visualized by cell migration wound healing assay. Total RNA was isolated from cells on days 3, 6 and 9 and gene expression of mineralized tissue-associated markers was analyzed using real-time polymerase chain reaction. The results showed that N had a significant effect on the viability of cementoblast cells, migration-based wound healing, especially on the expression of mineralized tissue-related genes ($p<0.01$). In addition, it was determined that target gene expression patterns were negatively affected with the increase in N exposure on a daily basis ($p<0.01$), and BA application may be a powerful preventive therapeutic agent in the protection of cementoblast cell functions.

1. Giriş (Introduction)

Bor (B), kaya, toprak ve suda bulunan ve organizmada önemli fizyolojik görevler üstlenen bir elementtir [1]. Bu element doğada daha çok sodyum ve oksijenle birleşerek borik asit, boraks gibi bor tuzları halinde bulunmaktadır [2]. Çeşitli deney modelleri kullanılarak yapılan birçok araştırma sonucu, B'un yüksek yapıları

organizmalar ve insanlar için önemli bir element olduğunu ortaya çıkarmıştır [3]. Özellikle B'un kemik oluşumu ve tamir mekanizmasında trabeküler ve alveoler kemik üzerinde etkin rol oynadığı belirlenmiştir [4]. Hakki ve ark. tarafından yapılan çalışma; B'un farklı konsantrasyonlarının (0, 0,1, 1, 10, 100, 1000, 2000, 4000, 8000, 10.000 ng/mL) osteoblast hücrelerinin canlılığı, proliferasyonu, mineralizasyonu ve mineralize

*Corresponding author: buketbozkurt@ohu.edu.tr

doku ilişkili genlerin ekspresyonunu farklı seviyelerde etkileyerek moleküler düzeyde kemik yapım sürecine dahil olduğunu ve bu sebeple terapötik odaklı rejeneratif tıp alanında uygulama alanı bulabileceğini göstermiştir [5]. Ayrıca B'un kemik metabolizması üzerindeki etkilerini destekleyen bir diğer çalışmada da düşük ve yüksek B içerikli diyetle beslenen tavşanların femur ve tibia analizlerinin farklı olduğu özellikle yüksek B içerikli beslenme ile femur dayanıklılığının arttığı bununla birlikte tibiada kalsiyum, magnezyum ve fosfor konsantrasyonunun yükselişine sebep olarak osteogenezi pozitif yönde desteklediği belirlenmiştir [3]. Aynı araştırma grubunun yüksek ve düşük B içerikli diyetle beslenen tavşanların diş analizleri üzerindeki sonuçları ise yüksek B alımının dişlerin yapısını, direncini, mineral yoğunluğunu etkilemezken dişlerin mineral kompozisyonunu değiştirdiği olarak raporlanmıştır [6]. Literatürde yer alan başka bir çalışmada, sıçanların diyetlerine günlük 0,1 mg/kg ve 3 mg/kg B eklenmesi sonrası 0,1 mg/kg B ile beslenen sıçanlarda kemik hacmi fraksiyonunun ve trabeküler kalınlığının azaldığı ve bununla birlikte trabeküler boşlukların da arttığı gösterilmiştir [7]. Aynı araştırmacı devam eden deneyleri sonucunda B'un, kemik metabolizmasını osteoblast ve osteoklast hücrelerinin magnezyum, potasyum, bakır ve çinko ilişkili mineraller üzerinden etkileyebileceğini ortaya koymaktadır [8,9].

Sigara dumanı içeriğinde bulunan yaklaşık 4000'den fazla kimyasal bileşik (benzen, nikotin, kotin, nitrik oksit, karbon monoksit, asetaldehit vb.) ile hem sistemik sağlık üzerinde zararlı etkilere sahip olup hem de kardiyovasküler hastalık, solunum sistemi hastalıkları ve periodontal hastalık gibi kronik enflamatuar süreçler için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır [10-12].

Özellikle nikotin (N) periodontal hastalık patofizyolojisinde etkili olan önemli bir bileşiktir [13-15]. Nikotin maruziyeti sonucunda konak immün cevabında T lenfosit ve B lenfosit düzeylerinde görülen azalmayla [16] birlikte oral dokunun hücrelerinde anjiyogenez, osteogenez, fibroblast proliferasyonu, adhezyon ve kollajen sentezi ile hücrel metabolizmada hasar meydana gelmektedir [17-20]. Bununla birlikte periodontal doku rejenerasyonunda önemli olan sert ve yumuşak doku iyileşmesi proseslerinde de N, negatif etki oluşturur [10,21]. İnsan gingival fibroblast hücreleri ile yapılan *in vitro* bir çalışma sonucu N'nin Rac sinyal yolağı tarafından organize edilen hücre migrasyonunu önemli seviyede hasara uğrattığını göstermiştir [22]. Ayrıca N'in insan gingival fibroblast hücrelerinin sadece migrasyonunu bozmakla kalmayıp aynı zamanda ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesini etkileyerek hücrel dejeneratif değişikliklere sebep olabileceği belirlenmiştir [23]. Hem cerrahi hem de klinik periodontal tedavi uygulamalarında N maruziyetinin oluşturabileceği olumsuz etkiler halen aşılması gereken önemli parametreler arasında yer almaktadır. Özellikle periodontal cerrahi uygulama sonrası yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu bakımından kritik bir aşamadır.

Periodontal doku hasarı sonrası yara iyileşmesi sementoblast, osteoblast, periodontal ligament fibroblast hücrelerinin dâhil olduğu bir süreçtir [24]. Özellikle yürütülen periodontal tedavi prosesinde kök sement dokusunun yeniden modellenmesi, yara iyileşmesi ve rejeneratif tedavinin niteliğini belirlemesi açısından kritiktir [25]. Dişin kök kısmının formasyonu sırasında sementoblast hücreleri tarafından sentezlenen sement dokusu, mineralize avasküler bir dokudur [26,27]. Sementum dokusu, fiziksel ve biyokimyasal özellikleri bakımından kemik doku ile benzerlik göstermektedir [26]. Dental folikül içerisinde ektomezemim orijinli olan sementoblast hücreleri, kollajen sentezi, osteokalsin ve bonesialoprotein ekspresyonu ile periodontal dokuların idamesi/rejenerasyonu ve periodonsiyumun homeostazı bakımından önemlidir [28,29]. Daha önceki araştırmamızda farklı konsantrasyonlarda (0, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 1, 2.5, 5, 10 mM) N maruziyetinin sementoblast (OCCM-30) hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve mineralize doku ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisini değerlendirilmiştir. Araştırma sonucu, N uygulamasının sementoblast hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve mineralize doku belirteçleri gen ekspresyon düzeylerini negatif etkilediğini ve bu fonksiyon kaybının yeni sement dokusu oluşumu için olumsuz olabileceğini göstermiştir [30].

Bu çalışmada, sementoblast hücrelerinin, farklı konsantrasyonlarda (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ mM) N maruziyeti ile sürekli sigara kullanan bir bireyin tükürük ve kan seviyelerindeki N miktarı üzerinden *in vitro* koşullarda deney modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan bu deney modeli üzerine 10 ng/mL BA uygulanarak sementoblast hücrelerinin canlılığı, hücrelerinin yara alanına migrasyon potansiyelleri ile mineralize doku ilişkili gen [Bonesialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCN), Alkaline phosphatase (ALP), Osteoprotegerin (OPG), Runt Related Transcription Factor 2 (Runx2), tip I kollajen (COL-I)] mRNA ekspresyonları üzerine etkisi belirlenmiştir.

2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)

2.1. Sementoblast Hücreleri (Cementoblast Cells)

Deneylerde kullanılan 18. pasaj fare sementoblast (OCCM-30) hücreleri 100 mm²'lik 2 adet hücre kültürü kabı içerisinde %10 fetal sıgır serumu (FBS) içeren hücre kültürü vasatı (Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium (DMEM)) ile çözülerek %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi. Ertesi gün inverted hücre kültürü mikroskobu altında incelenen hücrelerin kabın tabanına yapıştıkları ve mitoz bölünmeyle sayılarını artırmaya başladıkları gözlemlendi. Gün aşırı hücrelerin ortamları %10 FBS içeren DMEM ile değiştirilerek yeterli sayıya ulaşmaları beklendi. Yeterli sayıya ulaşan ve morfolojik olarak sağlıklı görünen OCCM-30'lar tripsin enzimiyle kabın tabanından ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanarak 4 adet 100 mm²'lik hücre kültürü kabına pasajlandı. Sementoblastlar, proliferere olup

kabın tabanını tamamen kaplamasıyla deneylerde kullanıma hazır hale geldiler [31].

2.2. Borik Asit Deney Konsantrasyonlarının Hazırlanması (Preparation of Boric Acid Experiment Concentrations)

Borik asit (H_3BO_3 , Merck, Darmstadt, Germany) stok solüsyonu ($10.000 \mu\text{g/mL}$) distile su ile hazırlandıktan sonra biyogüvenlik kabini içerisinde $0,20 \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Sonrasında bu stok solüsyondan seri dilüsyonlarla $1000 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$ ve ideal stok konsantrasyon olan $1 \mu\text{g/mL}$ 'ye ulaşıldı. Daha önceki deneylerimizde osteoblast (MC3T3-E1) hücrelerinin mineralize-doku ilişkili gen ekspresyon düzeylerini artıran 10 ng/mL etkin dozu [5] her deney uygulaması öncesinde olmak şartıyla $1 \mu\text{g/mL}$ borik asit konsantrasyonundan %5 FBS içeren DMEM içerisinde çalışma konsantrasyonu olarak hazırlandı.

2.3. Nikotin Deney Konsantrasyonlarının Hazırlanması (Preparation of Nicotine Experiment Concentrations)

Literatürde yer alan araştırma sonuçları, sigara içen bireylerin tükürükteki nikotin konsantrasyonunu $1-9 \text{ mM}$ [32] ve kan değerlerini ise $0,06-1,2 \text{ mM}$ [33] konsantrasyon olarak belirtmiştir. Daha önceki çalışmamızda sementoblast hücrelerine 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 1 , $2,5$, 5 ve 10 mM nikotin uygulaması sonrasında 1 mM üzerindeki konsantrasyonlarda (1 , $2,5$, 5 , 10 mM) hücre proliferasyonu, mineralizasyonu ve mineralize doku belirteçleri gen ekspresyonlarında önemli seviyelerde azalmaya sebep olduğu tespit edildi [30]. Bu çalışmada sementoblast hücrelerine 1 mM 'dan daha düşük olan 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} mM nikotin konsantrasyonları kullanıldı. Bu amaçla ticari olarak satın alınan nikotin (Merck, Darmstadt, Germany) solüsyonundan %5 FBS içeren DMEM kullanılarak her bir deney uygulaması öncesinde hazırlanmak kaydıyla 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} mM N konsantrasyonları elde edildi.

2.4. Hücre Canlılık Deneyi (Cell Viability Assay)

Borik asit ve farklı konsantrasyonlarda N uygulamasının, sementoblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi hücrelerin tetrazolium tuzunu, formazan boyasına dönüştürebilmesine dayalı olarak yapılan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) analizi ile 24 ve 72 . saatlerde değerlendirildi. Hücreler 96 kuyulu hücre kültürü kapları içerisinde 2×10^4 hücre/cm² olacak şekilde inkübe edildikten 24 saat sonra her bir kuyu üzerine 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM konsantrasyonda N ve 10 ng/mL konsantrasyonda BA %5 FBS içeren DMEM içerisinde aynı anda uygulandı ($n=8$). Bu işlemi takip eden 24 . saatte sementoblast hücrelerinin canlılığının tespit edilebilir için hücre kültürü kabının kuyularındaki 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM konsantrasyonda N ve 10 ng/mL konsantrasyonda BA içeren %5 FBS içeren

DMEM aspire edilip hücrelerin fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanması sonrasında her bir kuyuya hazırlanan MTT solüsyonundan $200 \mu\text{L}$ ($0,55 \text{ mg/mL}$ MTT) eklendi. Devamında hücre kültürü kabı alüminyum folyoya sarılarak sonraki 2 saat için tekrar inkübatöre yerleştirildi. 96 kuyulu hücre kültürü kabının 2 saatlik MTT inkübasyonundan sonra, MTT içeren kültür ortamı çıkarılarak her bir kuyu $200 \mu\text{L}$ PBS ile yıkanıp bu işlem iki kez tekrar edildi. Devamında kuyulardan PBS'in uzaklaştırılmasının ardından petri kabı kurularak, her bir kuyuya $200 \mu\text{L}$ dimetil sülfoksit eklenip çözünen formazon'un analizi için kültür kabı 30 dakika oda sıcaklığında çalkalanıp ve absorbansı 450 nm 'de spektrofotometrede okundu. Hazırlanmış olan ikinci 96 kuyulu deney kabı inkübatörde bekletilerek deneyin 2 . zaman periyodu olan 72 . saatin sonunda da aynı işlemler uygulanarak tekrarlandı.

2.5. Hücre Migrasyonu: Yara İyileşmesi Modeli (Cell Migration: A Wound Healing Model)

Hücre migrasyonu: yara iyileşmesi deneyi, 60 mm 'lik hücre kültürü kaplarında yapıldı. Her bir petri kabı içerisine 5×10^4 sementoblast hücresi 4 mL %10 FBS içeren DMEM içerisinde eklenip 24 saat inkübe edildi. Hücre yoğunluğu %90 üzerine ulaştıktan sonra $1000 \mu\text{L}$ steril pipet ucu kullanılarak vertikal yara alanı oluşturuldu. Her bir petri kabında başlangıçta oluşturulan yara alanı tersmikroskop altında fotoğraflanıp deneyin başlangıç saati (0 . saat) olarak kabul edildi. Daha sonra sementoblast hücrelerine sadece 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM N konsantrasyonları, sadece BA konsantrasyonu (10 ng/mL), N ve BA konsantrasyonlarını birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$) içeren %5 FBS içeren DMEM uygulamaları yapıp ters mikroskop altında 0 , 2 , 4 , 6 ve 24 . saatlerde fotoğrafları çekildi.

2.6. mRNA Ekspresyon Deneyleri (mRNA Expression Assays)

2.6.1. Sementoblast hücrelerinden RNA izolasyonu (RNA isolation from cementoblast cells)

Sementoblast hücrelerinin, sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM), sadece BA (10 ng/mL) ile BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4} \text{ N}$) uygulaması sonrasında mineralize doku belirteçleri (BSP, OPN, OCN, ALP, OPG, Runx2, COLI) mRNA ekspresyon düzeylerini belirlemek için deneyin 3 , 6 ve 9 . günlerinde total RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla tasarlanan deney modeli kullanılarak sementoblast hücreleri $25.000/\text{cm}^2$ olacak şekilde 60 mm 'lik hücre kültür kaplarına dağıtılıp %10 FBS içeren DMEM ile 24 saat inkübe edildi. Devamında hücreler sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM), sadece BA (10 ng/mL), BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4} \text{ N}$) içeren %5 FBS içeren DMEM ile muamele edilip deneyin 3 , 6 ve 9 . günlerinde total RNA izolasyonu yapıldı. Bu deney kapsamında RNA izolasyonları için hücreler üzerindeki

Tablo 1. mRNA ekspresyonları incelenen primerler (Primers analysed for mRNA expression).

Primerler	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
BSP	GAGACGGCGATAGTTCC	AGTGCCGCTAACTCAA
OPN	TTTACAGCCTGCACCC	CTAGCAGTGACGGTCT
OCN	TGAACAGACTCCGGCG	GATACCGTAGATGCGTTTG
ALP	ATTGCCCTGAAACTCCAAAACC	CCTCTGGTGGCATCTCGTTATC
OPG	CCGTTTTATCCTCTCTACT	TCAGAAAGGAAATGCAACACA
RunX2	CTTCATTCGCCTCACAAC	GTCAGTGGCTGAAGA
COLI	GCAACATTGGATTCCCTGGACC	GTTCCACCCTTTTCTCCCTTGCC
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GATGCAGGGATGATGTTCTG

sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM), sadece BA (10 ng/mL), BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) içeren %5 FBS içeren DMEM aspire edilip hücreler PBS ile yıkanması sonrasında kullanılan RNA izolasyon kitinin (In vitrogen, Camarillo, CA) bileşenlerinden EZ-RNA A solüsyonu 500 µL olarak ilave edilip hücre zarlarının parçalanıp nükleik asitlerin açığa çıkması sağlandı. Bu işlem sonrasında hücre lizatları toplanarak üzerine izolasyon kitinin diğer bileşeni olan EZ-RNA B solüsyonundan 500 µL ilave edilip hücre-lizat karışımı 4°C 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Böylece tüpler içerisindeki karışımın protein-DNA-RNA fazlarına ayrılması sağlanıp RNA fazı başka bir tüpe aktarılıp üzerine 500 µL izopropanol ilavesi yapıldı. Devamında örneklerin yeniden 4°C 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesiyle RNA pelletleri elde edilip RT-PCR deneyleri yapılmaya kadar -80°C 'de saklandı.

2.6.2. RNA örneklerinin absorbanlarının ölçülmesi (Measuring the absorbance of RNA samples)

Elde edilen total RNA örnekleri muhafaza edildikleri -80°C 'den çıkarıldıktan sonra 4°C 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip dipteki RNA pelletleri hareket ettirilmeden etanol (EtOH)-dietil pirokarbonat (DEPC)-distile su(dH_2O) karışımı pipetör ile toplandı. Örneklerin ağzı açık bırakılarak içlerindeki alkol karışımının tamamen uçması sağlandı. Sonrasında RNA pelletlerinin bulunduğu tüpler kapakları açık olarak 65°C 'de 5 dakika ısıtma işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından RNA pelletleri 25 µL DEPC dH_2O karışımında çözülerek ısıtıcı blok cihazında 5 dakika ısıyla muamele edildi ve DEPC- dH_2O 'da homojenize edilen RNA örneklerinin 1 µL'si spektrofotometrede 260 nm'de okunarak her bir gruptan elde edilen total RNA miktarları ve saflık oranları belirlendi.

2.6.3. Tamamlayıcı DNA sentezi (Complementary DNA (cDNA) synthesis)

Tamamlayıcı DNA sentezi, cDNA sentez kitinin (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, USA) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. RNA örneklerinin her birinden, içerisinde 1 µg RNA bulunacak miktar, 1 µl 20XRT Enzym Mix, 10 µl 2XRT Buffer Solution ve dH_2O eklenerek reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı.

Örnekler, Polymerase chain reaction (PCR) cihazında 37°C 'de 60 dakika, 95°C 'de 50 dakika ve 4°C 'de inkübe edilip, işlem sonunda elde edilen cDNA'lar RT-PCR deneylerinde kullanılacakları zamana kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

2.6.4. RT-PCR deneyleri (RT-PCR experiments)

Sementoblast hücrelerinin sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM), sadece BA (10 ng/mL) ile BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) uygulaması sonrasında mineralize doku belirteçleri (BSP, OPN, OCN, ALP, OPG, Runx2, COLI) genlerinin ifade düzeyleri RT-PCR ile belirlendi (Tablo 1). Normalizasyon amacı ile GAPDH kontrol geni kullanıldı. mRNA ekspresyonları Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), Thermo Scientific) ile çalışıldı. Mineralize doku belirteçleri olan BSP, OCN, ALP, COL-I, RunX2 ve GAPDH için BIORAD-CFX Connect cihazı ile 94/180; 94/45, 55/45, 95/54, 55/30 ve 95/30 $^{\circ}\text{C}$ /sn, amplifikasyon protokolü kullanılarak 35-40 siklus aralığında döngü gerçekleştirildi. Bununla birlikte OPG ve GAPDH içinse 94/180; 94/45, 57/45; 95/60, 55/30 ve 95/30 $^{\circ}\text{C}$ /sn amplifikasyon protokolü BIORAD-CFX Connect cihazı ile 35-40 döngü olarak yapıldı.

2.7. İstatistiksel analiz (Statistical analysis)

Hücre canlılığının tespit edilmesi için yapılan MTT deney sonuçlarının analizinde günler/saatler arasında farklılık olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Aritmetik ortalama ve standart sapmalar alınmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda aynı gün/saat içerisinde gruplar arasındaki değişiklik Tukey HSD Testi ile analiz edildi. Real-time PCR ile elde edilen sonuçların değerlendirmesinde karşılaştırmalı Ct yöntemi kullanıldı [34-36]. Normalize edilmiş ekspresyon değerleri tek yönlü varyans analizi yapılarak karşılaştırılacak ve gruplardaki gen ekspresyonunun GAPDH'e göre artış ya da azalışları $\alpha=0,05$ önem seviyesine göre gösterildi.

3. Sonuçlar ve Tartışma (Results and Discussion)

3.1. Sonuçlar (Results)

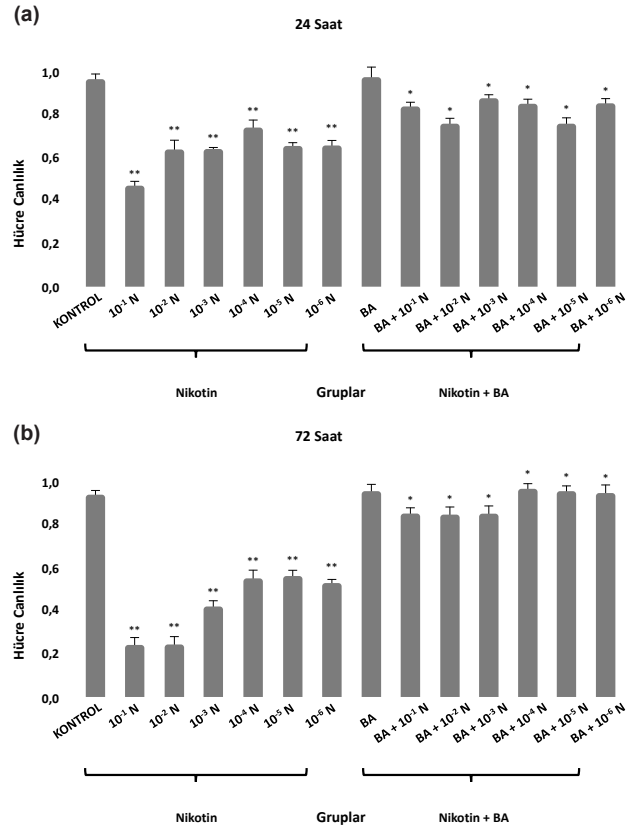
3.1.1. Hücre canlılık deney sonucu (Cell viability experiment result)

Sementoblastların farklı konsantrasyonlarda N (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM) ve BA (10 ng/mL) uygulanması sonrası hücre canlılık oranları 24. ve 72. saatlerde MTT deneyi ile belirlenerek aritmetik ortalama ve standart sapmaları alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; sadece N (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM) uygulanan hücre gruplarında kontrol grubuna kıyasla 24 ve 72. saatlerde doza bağımlı olarak hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0,01$) (Şekil 1). Bununla birlikte sadece BA (10 ng/mL) uygulanan grubun hem 24 hem de 72. saatte elde edilen hücre canlılık değerlerinin kontrol grubu ile aynı olduğu belirlendi ($p > 0,05$). Farklı N (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM) konsantrasyonlarının BA (10 ng/mL) ile birlikte uygulandığı deney gruplarında ise hücre canlılığı kontrol grubuna göre 24 ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde az olmakla birlikte bu değerler sadece N uygulanan gruplara göre hücre canlılığı bakımından istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).

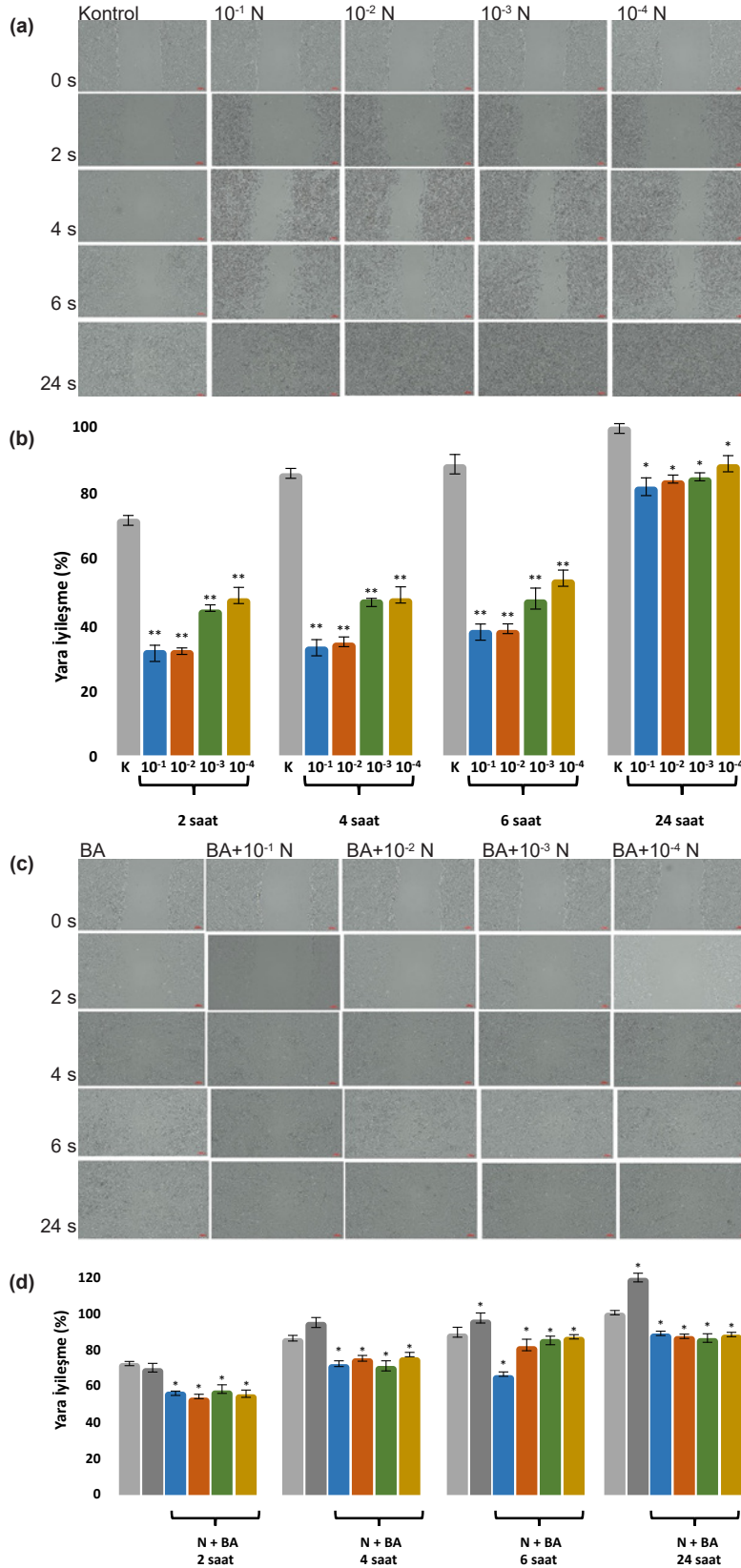
3.1.2. Hücre migrasyonu: yara iyileşmesi modeli (Cell migration: a wound healing model)

Hücre migrasyonu: yara iyileşmesi deneyi, 60 mm'lik hücre kültürü kaplarında yapıldı. Her bir petri kabı içerisine 5×10^4 sementoblast hücresi 4 mL %10 FBS içeren DMEM içerisinde eklenip 24 saat inkübe edildi. Hücre yoğunluğu %90 üzerine ulaştıktan sonra 1000 μ L steril pipet ucu kullanılarak vertikal yara alanı oluşturuldu. Her bir petri kabında başlangıçta oluşturulan yara alanı ters mikroskop altında fotoğraflanıp deneyin başlangıç saati (0. saat) olarak kabul edildi. Daha sonra sementoblast hücrelerini sadece 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM N konsantrasyonları, sadece BA konsantrasyonu (10 ng/mL), N ve BA konsantrasyonlarını birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$) içeren %5 FBS içeren DMEM uygulamaları yapıp ters mikroskop altında 0, 2, 4, 6 ve 24. saatlerde fotoğrafları çekildi (Şekil 2 a,c). Hücrelerin yara alanına migrasyon potansiyelleri ImageJ programı kullanılarak değerlendirilerek aritmetik ortalama ve standart sapmaları alınmıştır (Şekil 2 b,d). Yara iyileşmesi deneyi sonuçlarına göre tüm N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) kontrol grubuna göre tüm zaman dilimlerinde (2, 4, 6 ve 24 saat) istatistiksel olarak anlamlı seviyede hücrelerin migrasyon potansiyellerini azalttı ($p < 0,05$) (Şekil 2 a,b). Bununla birlikte bu azalmanın 10^{-3} ve 10^{-4} mM N konsantrasyonlarında 10^{-1} ve 10^{-2} mM N konsantrasyonlarına göre kontrol grubuna kıyasla 2, 4 ve 6. saatlerde istatistiksel olarak daha az olduğu belirlendi ($p < 0,05$). Devamında N grupları arasındaki bu farklılık 24. saatte eşitlendi ($p < 0,05$) (Şekil 2 a,b). Sadece BA (10 ng/mL) uygulanan grup ise sementoblastların migrasyon kapasitesini deneyin 4, 6 ve 24. saatinde

kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artırdı ($p < 0,05$) (Şekil 2 c,d). Ayrıca N konsantrasyonları ile birlikte BA uygulanan gruplar ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) hücrelerin migrasyon süreçlerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede 2, 4, 6 ve 24. saatlerde azaltmış olmalarına rağmen bu etki sadece N uygulanan gruplara göre daha az olarak tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 2 c,d). Bu sonuçlar BA'in, sementoblastların N maruziyeti sonrasında azalan migrasyonuna zaman bağımlı olarak pozitif yönde desteklediğini ortaya koydu.



Şekil 1. BA'in N ile indüklenen sementoblast hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Sementoblast hücrelerinin canlılığı sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM), sadece BA (10 ng/mL) ile BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$ N, $BA+10^{-2}$ N, $BA+10^{-3}$ N, $BA+10^{-4}$ N, $BA+10^{-5}$ N, $BA+10^{-6}$ N) uygulanması sonucunda 24 saat sonuçları a). Sementoblast hücrelerinin canlılığı sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM), sadece BA (10 ng/mL) ile BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$ N, $BA+10^{-2}$ N, $BA+10^{-3}$ N, $BA+10^{-4}$ N, $BA+10^{-5}$ N, $BA+10^{-6}$ N) uygulanması sonucunda 72 saat sonuçları b). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. (Effect of BA on N-induced cementoblast cell viability. The viability of cementoblast cells only at N concentrations (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM), only BA (10 ng/mL) with BA and N concentrations together ($BA+10^{-1}$ N, $BA+10^{-2}$ N, $BA+10^{-3}$ N, $BA+10^{-4}$ N, $BA+10^{-5}$ N, $BA+10^{-6}$ N) results after 24 hours of application a). the viability of cementoblast cells only at N concentrations (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM), only BA (10 ng/mL) and N concentrations together ($BA+10^{-1}$ N, $BA+10^{-2}$ N, $BA+10^{-3}$ N, $BA+10^{-4}$ N, $BA+10^{-5}$ N, $BA+10^{-6}$ N) results after 72 hours of application b). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).



Şekil 2. Sementoblast hücrelerine N uygulaması sonrası migrasyon potansiyelinin BA ile module edilmesi. Sementoblast hücreleri kontrol (sadece DMEM), sadece N konsantrasyonları (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ mM), sadece BA (10 ng/mL) ile BA ve N konsantrasyonlarının birlikte (BA+10⁻¹ N, BA+10⁻² N, BA+10⁻³ N, BA+10⁻⁴ N) uygulanması sonucunda migrasyon potansiyelleri belirlendi (0, 2, 4, 6, 24 saat) a,c). Yara kapanma oranının belirlenmesi b,d). *p<0,05; **p<0,01. (Modulation of migration potential by BA after N treatment of cementoblast cells. Migration potentials were determined (0, 2, 4, 6, 24 h) after treatment of cementoblast cells with control (DMEM only), N concentrations only (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ mM), BA only (10 ng/mL) and BA and N concentrations together (BA+10⁻¹ N, BA+10⁻² N, BA+10⁻³ N, BA+10⁻⁴ N) a,c). Determination of wound closure rate b,d). *p<0.05, **p<0.01).

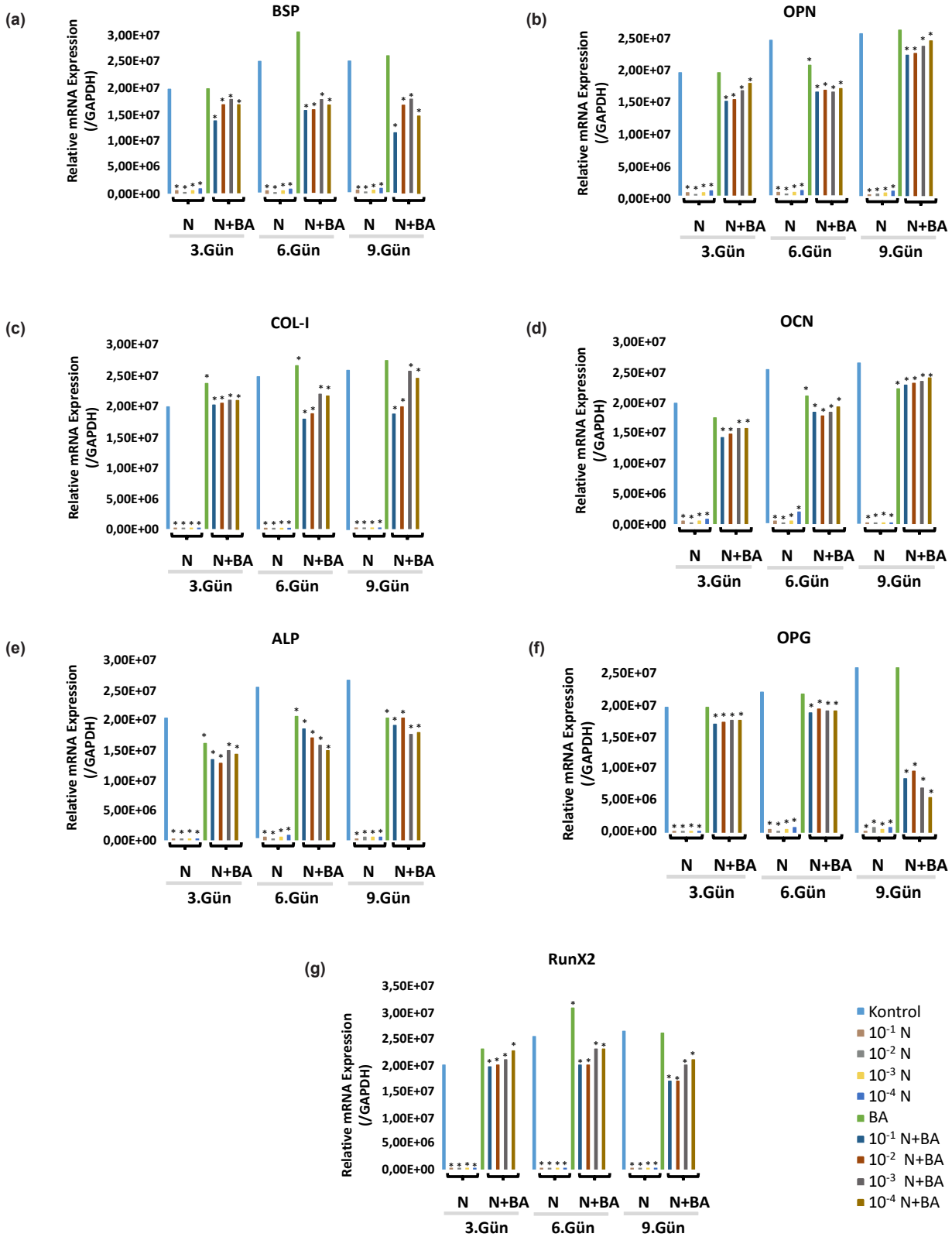
3.1.3. Borik asit nikotin ile indüklenen sementoblastlarda mineralize dokuya ilişkili belirteçleri düzenler (*Boric acid regulates markers associated with mineralized tissue in nicotine-induced cementoblasts*)

Real-time PCR deney sonuçlarının aritmetik ortalama ve standart sapmaları alınmış ve buna göre BSP ifadesi sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) uygulanan sementoblast hücrelerinde doza ve zamana bağlı şekilde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı ($p<0,01$). Bununla birlikte sadece BA (10 ng/mL) uygulaması sonrası ise en fazla deneyin 6. gününde olmak üzere BSP mRNA ifadesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttı ($p<0,01$). Ayrıca BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) uygulandığı gruplarda ise BSP ifadesi kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte sadece N konsantrasyonlarına göre bu düşüklüğün istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha az olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 3a). OPN ifadesi de benzer bir grafik sergilemekle birlikte sadece BA (10 ng/mL) uygulamasının zaman bağlı olarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı belirlendi ($p<0,01$). Aynı zamanda, BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) uygulanmasının da hücrelerin OPN ifadelerinin tek başına aynı N konsantrasyonlarına (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) göre kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha az baskılandığını gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 3b). COL-I mRNA ifadesi sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) uygulaması sonrasında deneyin 3, 6 ve 9. günlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldı ($p<0,01$). Sadece BA (10 ng/mL) uygulaması ise sementoblastların COL-I ifadesini kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede zamana bağlı olarak artırdı ($p<0,01$). Özellikle BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) uygulandığı gruplarda, BA'in sadece N maruziyeti sonrası oluşan COL-I ifade eksikliğini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede artırdığı bu durumun deneyin 6. gününden itibaren olmak üzere 9. günde daha belirgin olduğu tespit edildi ($p<0,01$) (Şekil 3c). OCN mRNA ifadesi de sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) uygulamasından zamana ve doza bağlı olarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma yönünde etkilendi ($p<0,01$). Sadece BA (10 ng/mL) uygulaması hücrelerde OCN mRNA ifadesini kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artırmakla birlikte deneyin 9. gününde BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) uygulamasının da sementoblastlarda OCN ifadesini sadece BA ile aynı seviyede istatistiksel olarak anlamlı seviyede artırdığını gösterdi ($p<0,01$) (Şekil 3d). ALP mRNA ifadesi sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) uyarısı sonrasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldı ($p<0,01$). Sadece BA (10 ng/mL) uygulamasının kontrol grubuna göre ALP ifadesini istatistiksel olarak anlamlı seviyede

artırdığı bununla birlikte BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) hücrelere uygulanmasının da aynı N konsantrasyonları maruziyetine göre ALP ifadesini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha az azalttığı belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 3e). OPG ifadesi ise sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) sonrasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalırken ($p<0,01$), sadece BA (10 ng/mL) uygulaması ise kontrol grubuna göre zamana bağımlı şekilde OPG ifadesini istatistiksel olarak anlamlı seviyede artırdı ($p<0,01$) (Şekil 3f). Bununla birlikte BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) hücrelere uygulanması sonrasında OPG ifade düzeyleri deneyin 3 ve 6. günlerinde sadece BA (10 ng/mL) uygulanan grupla yakın seviyelere ulaşmakla birlikte deneyin 9. gününde BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) uygulanmasının OPG düzeyini daha az ifade ettiğini gösterdi ($p<0,01$) (Şekil 3f). RunX2 düzeyi de sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) sonrasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalırken ($p<0,01$), bu durum hem sadece BA (10 ng/mL) hem de BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$, $BA+10^{-2}$, $BA+10^{-3}$, $BA+10^{-4}$ N) uygulanması sonrasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış olarak tespit edilmiştir ($p<0,01$) (Şekil 3g).

3.2. Tartışma (Discussion)

Periodonsiyumun nikotin ile olan direkt teması sonucunda hücre proliferasyonu, konak cevabı ve immün sistem etkilenecek periodontal hastalık patogeneziye yatkın hale gelmektedir [37-39]. Dişin sement dokusunun ana hücreleri olan sementoblastlar, kök yapısının yeniden şekillenmesi, periodontal rejenerasyon ve sağlıklı periodonsiyum için kritik öneme sahip olup fizyolojik olarak eksprese ettikleri ALP, BSP, OCN, COL-I, OPN gibi mineralize doku belirteçlerinin N maruziyeti sonrasında önemli derecede azaldığı bilinmektedir [30,40,41]. Bununla birlikte BA'in ise osteoblast hücrelerinin kemik morfogenetik protein (BMP)-4, BMP-6, BMP-7 düzeyleri ile BSP, OPN, OCN, COL-I mRNA ekspresyon seviyelerini önemli düzeyde artırdığı böylece kemik yapısının direnci ve mineral kompozisyonu ile dişin mineral içeriği yanında alveoler kemik yoğunluğunun farklılaşmasına da olumlu katkı sağladığı belirlendi [3,5,6]. Bu çalışmada BA'in, sementoblast hücrelerinde N maruziyeti sonrası biyoaktivite kaybı üzerindeki etkisini sementoblast hücrelerinin canlılığı, migrasyon: yara iyileşmesi, mineralize doku belirteçlerinin mRNA ifade düzeyleri üzerinden değerlendirildi. MTT analiz sonuçları deneyin her iki zaman periyodunda da sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM) uygulanan gruplarda hücre canlılığının kontrol grubuna (sadece DMEM) göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığını ($p<0,01$) bununla birlikte sadece BA (10 ng/mL) uygulamasının ise kontrol grubu ile benzer hücre canlılık düzeyi sergilediğini gösterdi. Ayrıca BA ve N konsantrasyonlarının ($BA+10^{-1}$ N, $BA+10^{-2}$ N, $BA+10^{-3}$ N, $BA+10^{-4}$ N, $BA+10^{-5}$ N, $BA+10^{-6}$



Şekil 3. BA'in N ile indüklenen sementoblastlarda mineralize dokuyla ilişkili gen ekspresyon sonuçları. Sementoblast hücreleri sadece N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM), sadece BA (10 ng/mL) ile BA ve N konsantrasyonlarının birlikte ($BA+10^{-1}$ N, $BA+10^{-2}$ N, $BA+10^{-3}$ N, $BA+10^{-4}$ N) uygulanması sonucunda 3, 6 ve 9. gün; BSP mRNA ifadesi a). OPN mRNA ifadesi b). COL-I mRNA ifadesi c). OCN mRNA ifadesi d). ALP mRNA ifadesi e). OPG mRNA ifadesi f). RunX2 mRNA ifadesi g). * $p<0,05$, ** $p<0,001$. (Mineralised tissue-related gene expression results of BA in N-induced cementoblasts. Cementoblast cells were treated with N concentrations only (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM), BA only (10 ng/mL) and BA and N concentrations together ($BA+10^{-1}$ N, $BA+10^{-2}$ N, $BA+10^{-3}$ N, $BA+10^{-4}$ N) on day 3, 6 and 9; BSP mRNA expression a). OPN mRNA expression b). COL-I mRNA expression c), OCN mRNA expression d). ALP mRNA expression e). OPG mRNA expression f). RunX2 mRNA expression g). * $p<0.05$, ** $p<0.001$).

N) birlikte uygulanmasının ise kontrol grubuna (sadece DMEM) göre hücre canlılık seviyesini sadece N konsantrasyonlarına göre istatistiksel olarak daha az azalttığı belirlendi ($p < 0,05$). Daha önceki araştırma sonucumuz ile 1, 2,5, 5 ve 10 mM N konsantrasyonları dramatik düzeyde hücre proliferasyonunu azalttığını 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mM N konsantrasyonlarının ise sementoblast proliferasyonunda anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını belirlemiştik [30]. Şimdiki çalışmamızda hücre canlılığını MTT yöntemiyle daha önceki çalışmamızda [30] ise hücre proliferasyonunu gerçek zamanlı hücre analizörü (xCELLigence) ile test etmiştik. Proliferasyonda eş zamanlı olarak sonuçlara yansıyan stabil durum hücre canlılığının azalması kaynaklı olabilir. Bununla birlikte literatürde yer alan N'nin sementoblast hücrelerine uygulamasının 1,5 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarının toksik olduğu [28], insan periodontal ligament hücrelerine 100 ng/mL üzerinde N ilavesi sonrası hücre proliferasyonunun inhibe edildiği [42,43], 1 ve 100 mM N'nin ise insan gingival fibroblastlarının proliferasyonunu suprese ettiği [32] yönünde çalışma sonuçları yer almaktadır. Orafasiyal alandan izole edilen farklı doku orijinli hücrelerin *in vitro* sonuçlarında N konsantrasyonuna bağlı farklılıklar olmakla birlikte literatürde yer alan çalışma sonuçlarının ortak noktası N periodontal hücre canlılığı ve proliferasyonunu negatif olarak etkilediği yönündedir. Yara iyileşmesi deneyi sonuçlarına göre tüm N konsantrasyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} mM) kontrol grubuna göre tüm zaman dilimlerinde (2, 4, 6 ve 24 saat) istatistiksel olarak anlamlı seviyede hücrelerin migrasyon potansiyellerini azalttı. Sadece BA (10 ng/mL) uygulanan grup ise sementoblastların migrasyon kapasitesini deneyin 4, 6 ve 24. saatinde kontrol grubuna göre anlamlı seviyede artırdı. Ayrıca N konsantrasyonları ile birlikte BA uygulanan gruplar ($BA+10^{-1}$ N, $BA+10^{-2}$ N, $BA+10^{-3}$ N, $BA+10^{-4}$ N) hücrelerin migrasyon süreçlerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede 2, 4, 6 ve 24. saatlerde azaltmış olmalarına rağmen bu etki sadece N uygulanan gruplara göre daha az olarak tespit edildi. Böylece elde edilen sonuçlar BA'in, sementoblastların N maruziyeti sonrasında azalan migrasyonuna zaman bağımlı olarak pozitif yönde katkı sağladığını gösterdi. Kaymaz ve ark.'ları iyileşmesi uzun süre alan tendon yaralanmalarında, oral olarak BA uygulamasının ekstraselüler matriks bileşenlerinin sentezi ile anjiyogenez indüklenmesi üzerinden tendon hasarını iyileştirmede güvenli ve etkili bir tedavi bileşeni olabileceğini *in vivo* rat deney modelinde gösterdiler [44]. Biyolojik veya kimyasal birçok ajan indüklemesi sonucunda gelişen periodontal hastalık etiolojisinde sık karşılaşılan diş kayıplarının önlenmesi için yeni kemik, yeni periodontal ligament ve yeni sement dokusu oluşumunu hedefleyen tedavi yöntemleri amaçlanmaktadır. Rejeneratif odaklı tedavi yaklaşımlarının ana hedef hücreleri periodontal ligament hücreleri olup bu hücrelerin uygun uyaranlarla osteoblast veya sementoblast hücrelerine farklılaşması yeni kemik ve yeni sement doku oluşumu için elzemdir. Özellikle periodonsiyumda doku yıkımına sebep olan ajanın uzun dönem ve kısa dönemde

oluşturduğu hasarı ortadan kaldıracak ve yeni doku oluşumunu indükleyecek biyo-uyumlu moleküllerin, etkinliklerinin ortaya konması ve mevcut tedavi planlarına katılması önemlidir. Dolayısıyla periodonsiyum N ile olan direkt teması sonucunda hücre proliferasyonu, konak cevabı ve immün sistem etkilenerek periodontal hastalık patogeneziye yatkın hale gelmektedir [30]. Sementoblastlar, dişin sement dokusunun ana hücreleri olup kök yapısının yeniden şekillenmesi, periodontal rejenerasyon ve sağlıklı periodonsiyum için kritik öneme sahiptir [27,45]. Literatürde yer alan daha önceki araştırma sonuçları, sementoblast hücrelerinin mineralize doku belirteçleri arasında yer alan ALP, BSP ve OCN eksprese ettiğini [40,41] bununla birlikte N maruziyeti sonrasında COL, OCN, OPN düzeylerinin periodonsiyumun farklı hücrelerinde azaldığı ve araştırma grubumuzun da bir önceki çalışmasında sementoblast hücrelerinde de N bağımlı mineralize doku belirteçlerinin mRNA seviyelerinin önemli derecede azaldığı belirlendi [30]. Bununla birlikte daha önceki araştırma sonuçlarımız, 0,1, 1, 10, 100 ng/mL bor konsantrasyonlarının osteoblast (MC3T3-E1) hücrelerinin bone morphogenetic protein (BMP)-4, BMP-6, BMP-7 düzeyleri ile BSP, OPN, OCN, COL-I mRNA ekspresyon seviyelerini önemli derecede artırdığını gösterdi [5]. Araştırma grubumuzun yapmış olduğu başka bir çalışmada, BMP-7 uygulaması sonrasında sementoblast hücrelerinin COL-I, BSP, OCN seviyelerinin dramatik düzeyde arttığı belirlendi [46]. Her iki araştırma sonucumuza bakarak borik asit-BMP-7 indüklemesi sonucunda sementoblast fonksiyonuna bağlı periodontal hastalık sonucu gelişen doku kaybının önüne geçilebileceği öngörülmüştür. Araştırma ekibimiz bir diğer *in vivo* çalışmasında BA içeren diyetle beslenen tavşanların kemik yapısının direnci ve mineral kompozisyonunun değiştiği belirlenirken [3] diş yapısında ise mineral kompozisyonu ile alveoler kemik yoğunluğunun farklılaştığı görüldü [6]. Borik asitin, osteoblast hücreleri üzerindeki etkinliğini araştırdığımız başka bir çalışma sonucumuzda da farklılaşma faktörü olan Tuftelin düzeyinin BA uygulaması ile önemli düzeyde artış sergilediği belirlendi [47].

4. Sonuçlar (Conclusions)

Elde edilen sonuçlar BA'in, N maruziyetine uğramış sementoblast hücrelerinin biyoaktivite kaybı üzerinde pozitif regülatör rol oynayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte N uygulamasının sementoblast hücrelerinin canlılığı, migrasyon temelli yara iyileşmesi özellikle de mineralize doku ilişkili genlerin ekspresyonunda önemli bir etkisi olduğu, N maruziyetinin gün bazında artmasıyla birlikte hedef gen ifade paternlerinin olumsuz etkilendiği, BA uygulamasının ise sementoblast hücre fonksiyonlarının korunmasında aktif bir rol alabileceği sonucuna varılmıştır. Proje kapsamında *in vivo* deney modeli uygulamasının olmaması çalışmanın limitasyonu olup bundan sonraki aşamalarda BA'in, N maruziyetinin olası sonuçları üzerindeki etkisinin *in vivo* deney modeli üzerinde değerlendirmeye yönelik ilave analizler ve çalışmalar yapılması gerekmektedir. Sementoblastların N maruziyeti sebebiyle

karşılaştıkları biyoaktivite kaybınının BA uygulaması ile hücre canlılığı, yara iyileşmesi ve mineralize doku belirteçleri açısından konsantrasyon ve zaman bazlı kıyaslanması sonucu elde edilen bulguların hayvan modelleri/klinik uygulamalara geçişte kritik bilgiler sağlayıp preventif terapötik ajan olarak kullanıma yönelik aday olabileceğini düşünmekteyiz.

Yazar Katkısı Beyanı (Author Contribution Statement)

Şerife Buket Bozkurt Polat (ŞBBP) makalenin kavramsallaştırmasında; ŞBBP, Melike Ünlütürk (MÜ) ve Abdullah Emre Hasırcı (AEH) veri analizinde; ŞBBP proje yönetiminde; ŞBBP, MÜ, AEH görselleştirme, orijinal taslak yazma aşamalarında katkı sağlamıştır.

Teşekkürler (Acknowledgements)

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (TÜBİTAK-2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destek Programı-No:1919B012104849)

Kaynaklar (References)

- [1] Bolt, H. M., Duydu, Y., Başaran, N., & Golka, K. (2017). Boron and its compounds: Current biological research activities. *Archives of Toxicology*, *91*(8), 2719-2722. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2010-1>
- [2] Uluisik, I., Karakaya, H.C., & Koc, A. (2018) The importance of boron in biological systems. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *45*, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.10.008>
- [3] Hakki, S. S., Dundar, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., Kerimoglu, U., ... & Nielsen, F. H. (2013) Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *27*(2), 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.07.001>
- [4] Sağlam, M., Arslan, U., Bozkurt, Ş. B., & Hakki, S. S. (2013). Boric acid irrigation as an adjunct to mechanical periodontal therapy in patients with chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Journal of Periodontology*, *84*(9), 1297-1308. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120467>
- [5] Hakki, S. S., Bozkurt, B. S., & Hakki, E. E. (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *24*(4), 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.03.003>
- [6] Hakki, S. S., Malkoc, S., Dundar, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., ... & Götz, W. (2015) Dietary boron does not affect tooth strength, micro-hardness, and density, but affects tooth mineral composition and alveolar bone mineral density in rabbits fed a high-energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *29*, 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.10.007>
- [7] Nielsen, F. H. (1994) Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environmental Health Perspectives*, *102*, 59-63. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s759>
- [8] Nielsen, F. H. (2004) The alteration of magnesium, calcium and phosphorus metabolism by dietary magnesium deprivation in postmenopausal women is not affected by dietary boron deprivation. *Magnesium Research*, *17*, 197-210. PMID: 15724868.
- [9] Nielsen, F. H., Stoecker, B. J., & Penland, J. G. (2007) Boron as a dietary factor for bone microarchitecture and central nervous system function. In: F. Xu, H. E. Goldbach, P. H. Brown, R. W. Bell, T. Fujiwara, Hunt C. D., S. Goldberg, & L. Shi (Eds.), *Advances in plant and animal boron nutrition* (pp. 227-290). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5382-5_27.
- [10] Malhotra, R., Kapoor, A., Grover, V., & Kaushal, S. (2010) Nicotine and periodontal tissues. *Journal of Indian Society of Periodontology*, *14*, 72-79. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.65442>.
- [11] Meenawat, A., Govila, V., Goel, S., Verma, S., Punn, K., Srivastava, V., & Dolas, R. S. (2015). Evaluation of the effect of nicotine and metabolites on the periodontal status and the mRNA expression of interleukin-1 in smokers with chronic periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, *19*, 381-387. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.157879>.
- [12] Lahdentausta, L., Paju, S., Mäntylä, P., Buhlin, K., Pietiäinen, M., Tervahartiala, T., ... & Pussinen, P. J. (2019) Smoking confounds the periodontal diagnostics using saliva biomarkers. *Journal of Periodontology*, *90*, 475-483. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0545>.
- [13] Nogueira-Filho G., R., Rosa, B. T., Cesar-Neto, J. B., Tunes, R. S., & Tunes U., R. (2007) Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontology*, *78*, 730-735. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060323>.
- [14] Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., van Benthem, J., Wester, P., & Opperhuizen, A. (2011) Hazardous compounds in tobacco smoke. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *8*, 613-628. <https://doi.org/10.3390/ijerph8020613>.
- [15] Wu, L. Z., Duan, D. M., Liu, Y. F., Ge, X., Zhou, Z. F., & Wang, X. J. (2013) Nicotine favors osteoclastogenesis in human periodontal ligament cells co-cultured with CD4(+) T cells by upregulating IL-1. *International Journal of Molecular Medicine*, *31*, 938-942. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1259>.
- [16] Barbour, S. E., Nakashima, K., Zhang, J. B., Tangada, S., Hahn, C. L., Schenkein, H. A., & Tew, J. G. (1997) Tobacco and smoking: Environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *8*, 437-460. <https://doi.org/10.1177/10454411970080040501>.
- [17] Theiss, S. M., Boden, S. D., Hair, G., Titus, L., Morone, M. A., & Ugbo, J. (2000) The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine*, *25*(20), 2588-2594. <https://doi.org/10.1097/00007632-200010150-00008>.
- [18] Pinto, J. R., Bosco, A. F., Okamoto, T., Guerra, J. B., & Piza, I. G. (2002) Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Brazilian Dental Journal*, *13*(1), 3-9. PMID: 11870959.

- [19] Zhou, J., Olson, B. L., & Windsor, L. J. (2007) Nicotine increases the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, 42, 228-235. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00937.x>.
- [20] Zheng, L. W., Ma, L., & Cheung, L. K. (2008) Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. *Bone*, 43, 355-361. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.04.002>.
- [21] Riebel, G. D., Boden, S. D., Whitesides, T. E., & Hutton, W. C. (1995) The effect of nicotine on in-corporation of cancellous bone graft in an animal model. *Spine*, 20, 2198-2202. <https://doi.org/10.1097/00007632-199510001-00004>.
- [22] Fang, Y., & Svoboda, K. K. (2005) Nicotine inhibits human gingival fibroblast migration via modulation of Rac signalling pathways. *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 1200-1207. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00845.x>.
- [23] Takeuchi-Igarashi, H., Kubota, S., Tachibana, T., Murakashi, E., Takigawa, M., Okabe, M., & Numabe, Y. (2016) Matrix remodeling response of human periodontal tissue cells toward fibrosis upon nicotine exposure. *Odontology*, 104, 35-43. <https://doi.org/10.1007/s10266-014-0177-y>.
- [24] Sculean, A., Gruber, R., & Bosshardt, D. D. (2014) Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *Journal of Clinical Periodontology*, 41, 6-22. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12206>.
- [25] Bosshardt, D. D., Stadlinger, B., & Terheyden, H. (2015) Cell-to-cell communication-periodontal regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 26, 229-239. <https://doi.org/10.1111/clr.12543>.
- [26] Moon, J. S., Kim, S. D., Ko, H. M., Kim, Y. J., Kim, S. H., & Kim, M. S. (2018) Twist1 suppresses cementoblast differentiation. *Dentistry Journal*, 6, E57. <https://doi.org/10.3390/dj6040057>.
- [27] Bozkurt, S. B., Hakki, E. E., Kayis, S. A., Dundar, N., & Hakki, S. S. (2017) Biostimulation with diode laser positively regulates cementoblast functions, in vitro. *Lasers in Medical Science*, 32, 911-919. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2192-z>.
- [28] Chen, C. S., Lee, S. S., Yu, H. C., Huang, F. M., & Chang, Y. C. (2015) Effects of nicotine on species by cementoblasts. *Journal of Dental Sciences*, 10, 154-160. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2014.04.002>.
- [29] Hakki, S. S., Bozkurt, S. B., Türkay, E., Dard, M., Purali, N., & Götz, W. (2018) Recombinant amelogenin regulates the bioactivity of mouse cementoblasts in vitro. *International Journal of Oral Science*, 10, 15. <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0010-5>.
- [30] Bozkurt, S. B., & Hakki, S. S. (2020) Nicotine suppresses proliferation and mineralized tissue-associated gene expressions of cementoblasts. *Journal of Periodontology*, 91, 800-808. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0256>.
- [31] D'Errico, J. A., Ouyang, H., Berry, J. E., MacNeil, R. L., Strayhorn, C., Imperiale, M. J., ... & H., Somerman, M. J. (1999) Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. *Bone*, 25, 39-47. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(99\)00096-4](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(99)00096-4).
- [32] Torshabi, M., Rezaei Esfahrood, Z., Jamshidi, M., Mansuri Torshizi, A., & Sotoudeh, S. (2017) Efficacy of vitamins E and C for reversing the cytotoxic effects of nicotine and cotinine. *European Journal of Oral Sciences*, 125, 426-437. <https://doi.org/10.1111/eos.12375>.
- [33] Kim, B. S., Kim, S. J., Kim, H. J., Lee, S., Park, Y. J., Lee, J., & You, H. K. (2012) Effects of nicotine on proliferation and osteoblast differentiation in human alveolar bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Life Science Journal*, 90, 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.10.019>.
- [34] Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 386-401. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>.
- [35] Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Ct method. *Methods*, 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [36] Pfaffl, M. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 900. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- [37] de Almeida, J. M., Bosco, A. F., Bonfante, S., Theodoro, L. H., Nagata, M. J., & Garcia, V. G. (2011) Nicotine-induced damage affects gingival fibroblasts in the gingival tissue of rats. *Journal of Periodontology*, 82, 1206-1211. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100549>.
- [38] Chang, Y. C., Lii, C. K., Tai, K. W., & Chou, M. Y. (2001) Adverse effects of arecoline and nicotine on human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Journal of Periodontology*, 28, 277-282. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028003277.x>.
- [39] Bergström, J. (2004) Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10266-004-0043-4>.
- [40] Nakayama, Y., Mezawa, M., Araki, S., Sasaki, Y., Wang, S., Han, J., ... & Ogata, Y. (2009) Nicotine suppresses bone sialoprotein gene expression. *Journal of Periodontal Research*, 44, 657-663. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01171.x>.
- [41] Rothem, D. E., Rothem, L., Soudry, M., Dahan, A., & Eliakim, R. (2009) Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 27(5), 555-561. <https://doi.org/10.1007/s00774-009-0075-5>.
- [42] Giannopoulou, C., Geinoz, A., & Cimasoni, G. (1999) Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(1), 49-55. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2002.01612.x>.
- [43] Chang, Y. C., Huang, F. M., Tai, K. W., Yang, L. C., & Chou, M. Y. (2002) Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *Journal of Periodontal Research*, 37(4), 279-285. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2002.01612.x>.

- [44] Kaymaz, B., Gölge, U. H., Ozyalvaçlı, G., Kömürcü, E., Goksel, F., Mermerkaya, M. U., & Doral, M. N. (2016) Effects of boric acid on the healing of Achilles tendons of rats. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 24(12), 3738-3744. <https://doi.org/10.1007/s00167-015-3617-5>.
- [45] Bosshardt, D. D. (2005) Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype?. *Journal of Dental Research*, 84, 390-406. <https://doi.org/10.1177/154405910508400501>.
- [46] Hakki, S. S., Foster, B. L., Nagatomo, K. J., Bozkurt, S. B., Hakki, E. E., Somerman, M. J., & Nohutcu, R. M. (2010) Bone morphogenetic protein-7 enhances cementoblast function in vitro. *Journal of Periodontology*, 81(11), 1663-1674. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100074>.
- [47] Hakki, S. S., Bozkurt, S. B., Hakki, E. E., & Nielsen, F. H. (2021) Boron as boric acid induces mRNA expression of the differentiation factor tuftelin in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biological Trace Element Research*, 199(4),1534-1543. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02257-x>.