

Effect of Indigo Naturalis on the Viability of Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells: An In Vitro Study

İndigo Naturalis'in İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi: Bir In Vitro Çalışma

Aslı Aktan¹, Sema Tuğçe Aydın², Ayşegül Tiryaki³, Dilruba Baykara⁴, Canan Ekinci Doğan⁵, Oğuzhan Gündüz⁶, Turgut Taşkın⁷, Ömer Birkan Ağralı⁸

¹ Dt. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

² Doktora, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

³ Yüksek Lisans, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

⁴ Doktora, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

⁵ Prof. Dr. Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Malzeme Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

⁶ Prof. Dr. Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Seramik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

⁷ Doç. Dr. Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmakognazi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

⁸ Doç. Dr. Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

ÖZ

Amaç: Bu in vitro çalışmada, insan periodontal ligament fibroblast (İPDLF) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda İndigo naturalis (İN) uygulanarak hücrelerin canlılık düzeylerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamız dahilinde İndigo naturalis DMSO ile çözülerek 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 15 µg/ml olacak şekilde üç farklı konsantrasyon hazırlandı. Hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla, 96 kuyucuklu plakalara her konsantrasyon için 4 defa tekrarlanacak şekilde hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Hücrelere 24 saat süreyle İndigo Naturalis uygulandı. Canlılık değerlendirmesi için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) deney protokolü izlendi. Verilerin istatistiksel analizleri SPSS paket programı kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 olarak kabul edildi.

Bulgular: İN uygulamasının kontrol grubuna kıyasla test gruplarında anlamlı değişiklik olmadığı görülürken 15 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyon arasında anlamlı fark tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmanın sınırları içerisinde sağlanan bulgular, İN'nin İPDLF hücrelerinin canlılığı üzerine farklı konsantrasyonlarda benzer etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. İN'nin daha farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak ve daha uzun süre aralıklarında takip edilerek araştırıldığı çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: İndigo naturalis, periodontal ligament fibroblastı, hücre canlılığı

ABSTRACT

Objectives: In this in vitro research, it was aimed to examine the viability levels of human periodontal ligament fibroblast (hPDLF) cells by applying different concentrations of Indigo naturalis (IN).

Materials and Methods: Within the scope of our study, IN was dissolved in DMSO and three different concentrations were prepared: 5 µg/ml, 10 µg/ml and 15 µg/ml. In order to evaluate cell viability, cells were seeded in 96-well plates, repeated 4 times for each concentration. Indigo Naturalis was applied to the cells for 24 hours. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) experimental protocol was followed for viability assessment. Statistical analyzes of the data were evaluated using the SPSS package program. Statistical significance was accepted as p<0.05.

Results: While it was observed that there was no significant change in the test groups with IN application compared to the control group, a significant difference was detected between 15 µg/ml and 5 µg/ml concentration.

Conclusions: The findings obtained within the limits of this study reveal that IN has similar effects at different concentrations on the viability of hPDLF cells. There is a need for studies in which IN is investigated by preparing it in different concentrations and monitoring it for longer periods of time.

Keywords: Indigo naturalis cell viability, periodontal ligament fibroblast.

Corresponding Author
Ömer Birkan Ağralı (✉)
omer.agrali@marmara.edu.tr

Article History

Submitted 23.05.2024

Revised 20.06.2024

Accepted 26.06.2024

Published 29.08.2024

How to cite this article: Aktan, A., Aydın, S. T., Tiryaki, A., Baykara, D., Ekinci, Doğan, C., Gündüz, O., Taşkın, T., Ağralı, Ö. B. İndigo Naturalis'in İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi: Bir In Vitro Çalışma. European Journal of Research in Dentistry, 2024;8(2): 48-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.29228/erd.70>



GİRİŞ

Periodonsiyum, dişlerin etrafında bulunan ve dişlere destek olan bir yapıdır. Bu yapı; dişeti, sement, periodontal ligament ve alveol kemiğinden oluşur. Periodonsiyum esas olarak dişlerin fonksiyonu esnasında görev alarak dişleri ağızda tutmaya yardımcı olur (Newman ve ark., 2011). Periodontal hastalıklar, periodonsiyumun tahrip olmasına neden olan iltihabi ve ilerleyici hastalıklardır (Tonetti ve ark., 2018). Periodontal hastalıkların tedavisinde ise hedef, hastalığın ilerlemesini durdurmak ve kaybedilmiş dokuları yerine koymaktır (Graziani ve ark., 2017). İdeal periodontal tedavi tahrip olmuş periodonsiyumun rejenerasyonunu kapsamalıdır.

Hücreler, periodonsiyumun rejenerasyonunda sinyal molekülleri ve taşıyıcı iskelet yapılarla birlikte görev alan esas bileşenlerdir (Taba ve ark., 2015). Periodontal ligamentin periodontal dokuların rejenerasyonunda önemli rol oynayan öncül hücreleri içerdiği bilinmektedir (Melcher, 1976). Periodontal ligamentin temel hücresi olan fibroblastların ise esas görevi kolajen yapım ve yıkım metabolizmasıdır (Benatti ve ark., 2007). Hasar meydana geldiğinde aktifleşerek çoğalır ve yara bölgesine göç ederler, ekstraselüler matris sentezi yapımına katılarak tamir aşamasında etkin rol oynarlar (Narayanan ve Page, 1983, Melcher, 1976).

Her canlı organizmanın hücresel faaliyetlerinin düzenlenmesinde görevli olan çeşitli sinyal yolları bulunmaktadır. Bunlardan biri olan Wnt sinyal yolu (WSY), embriyo gelişimi sırasında ve erişkin dokuların devamlılığının sağlanmasında çok önemli role sahiptir. Wnt sinyal iletimi, erişkin dönemde rejenerasyon kapasitesi olan hücrelerin adezyonunu ve gen transkripsiyonunu sağlar (Tanır ve Demirezen, 2009). Doku hasarına verilen erken cevap olarak WSY aktive edilir ve bu aktivasyon tüm dokularda hücresel tamirin gerçekleşmesi için gereklidir (Neves ve ark., 2017).

Wnt sinyal iletimi birkaç farklı yol ile meydana gelmektedir. Wnt sinyalleri arasında en önemli olanı kanonik olarak da geçen β -katenin bağlantılı olan yoldur (Kikuchi ve ark., 2011). Bu yolda Wnt ligandının hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanması ile hücre içi sinyalizasyon başlatılır. Bu bağlanmanın gerçekleşmediği, sinyalin inaktif olduğu durumda glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3) enzimi hücre içindeki β -katenin molekülünün fosforillenecek parçalanmasına yol açar. Wnt ligandlarının varlığında ise GSK-3 aktivitesi inhibe edilerek β -katenin'in çekirdeğe girmesine izin verilir ve hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek üzere transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girer (Minear ve ark., 2010; Whyte ve ark., 2012).

Wnt/ β -katenin sinyal yolunun diş gelişiminde en önemli sistemlerden biri olduğu bilinmektedir (Liu ve Millar, 2010). Wnt aktivasyonunun kemik dokunun osteoblastlar tarafından yapımını sağladığı ve Wnt inhibisyonunun kemik yoğunluğundaki azalma ile ilişkili olduğu çalışmalar tarafından gözlenmiştir (Bonewald ve Johnson, 2008; Hsu ve Kiel, 2012). Yapılan bir *in vivo* çalışma, yeni sement oluşumunun Wnt/ β -katenin sinyal yolunun düzenlenmesi ile sağlanabileceğini göstermiştir (Han ve ark., 2015).

Wnt/ β -katenin, sinyal yolunun kemik morfojenetik protein 2 ile ilişkili olarak osteoblastik aktivasyonu düzenlediği bulunmuştur (Zhang ve ark., 2013). Wnt/ β -katenin sinyali, fibroblastlarda proliferasyonu kontrol ederek transkripsiyon faktörleri ve sinyal proteinlerini kodlayan genleri etkilemektedir (Cheon ve ark., 2002; Cheon ve ark., 2004; Klapholz-Brown ve ark., 2007). İnsan periodontal ligament hücreleri Wnt aktivasyonu sağlayacak ortamda bulduklarında kemik ve sement yapımı ile ilgili gen ve protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Han ve ark., 2015).

İndigo naturalis (İN), *Baphicacavthus cusia*, *Polygonum tinctorium*, *Isatis indigotica* ve *Indigofera tinctoria* gibi indigo taşıyan bitkilerin yapraklarından elde edilen bir Çin bitkisel ilacıdır. Geleneksel Çin doktorları İN'yi ateş düşürücü olarak, kanı detoksifiye etmek amaçlı ve ekimozları çözmek için kullanmışlardır (Sun ve ark., 2020). Ayrıca İN'nin farmakolojik etkileri de incelenmiştir. Modern araştırmalar, İN'nin antienflamatuvar, antioksidan, antibakteriyel, bağışıklık düzenleyici ve başka aktiviteleri olduğunu bulmuştur (Gaitanis ve ark., 2018; Naganuma, 2019; Yu ve ark., 2021). Bu özellikleri sayesinde İN; sedef hastalığı, lösemi, ülseratif kolit gibi hastalıkları tedavi etmek amacıyla klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (Qi-Yue ve ark., 2020). İN'nin içerdiği indirubin türevlerinin GSK-3 sentezini inhibe ederek WSY'yi aktive ettiği görülmüştür (Leclerc ve ark., 2001).

Bu bilgiler doğrultusunda içeriğinde GSK-3 sentezini inhibe ederek WSY aktivasyonu sağlayan moleküller içeren İN'nin periodontal rejenerasyon açısından olumlu etkileri olabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Bu nedenle bu *in vitro* çalışmanın amacı, farklı konsantrasyonlarda İndigo naturalis'e maruz bırakılan insan periodontal ligament fibroblastlarının (İPDLF) canlılık düzeylerini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

İndigo Naturalis Ekstresinin Hazırlanması

Hücre kültürü deneylerinde İN gibi suda çözünmeyen doğal bileşikler çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) sıklıkla tercih edilir. DMSO, birçok organik bileşiği iyi derecede çözebilen ve hücrelere minimal toksisite gösteren bir çözücüdür. Bu nedenle, İN'yi çözmek için DMSO kullanıldı ve hücre ortamında % 0,1 maksimum toksik sınır konsantrasyonu geçmeyecek şekilde hücrelere uygulandı. İN tozu, standardize edilmiş bir tedarikçiden temin edildi. 100 mg/mL konsantrasyonunda çözelti elde etmek amacıyla dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Elde edilen çözelti sterilizasyon amacıyla 0.22 μ m sırtınga filtresi kullanılarak filtreden geçirildikten sonra -20°C'de saklandı.

Hücre Kültürü

Deneyler, ticari olarak satın alınan İPDLF (CC-7049, LONZA, Basel, İsviçre) hücre hatları kullanılarak yapıldı. İPDLF hücreleri, 37 °C sıcaklıkta; % 1 penisilin/streptomisin, %

1 L-glutamin (CAS No: 56-85-9), % 0,1 amfoterisin B (CAS No: 1397-89-3) ve % 10 fetal sığır serumu (CAS No: 9014-81-7, GibcoTM, Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (Biochrom AG, Berlin, Almanya) içerisinde kültür edilerek üretici firmanın talimatları izlenerek çoğaltıldı. İPDLF hücrelerini içeren flasklar % 70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra hücreler, her kuyuda 2 mL besiyeri içeren, kuyu başına hücre yoğunluğu $1,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve kuyulara tutunabilmeleri için 24 saat süreyle 37°C ısıda inkübasyonda bekletildi. İnkübasyon sonrası ortamdaki besiyeri elimine edildi. Hücreleri içeren kuyulara 5, 10 ve 15 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda İndigo naturalis veya 2 mL besiyeri (kontrol grubu) ilave edilerek 24 saat süreyle bekletildi. Daha sonra hücre canlılığını ölçmek amacıyla MTT testi uygulama aşamasına geçildi.

MTT Testi

İPDLF hücrelerinde hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Glentham Life Sciences, İngiltere) testi uygulanarak araştırıldı. Kuyucuklar fosfat tampon çözeltisi (Wisent, Kanada) kullanılarak yıkandı, her kuyucuğa 132 μL MTT boyama solüsyonu eklenerek 37°C sıcaklıkta inkübasyon 3 saat için bekletildi. Her bir kuyucukta bulunan hücre ortamı uzaklaştırılarak 200 μL DMSO (CAS No: 67-68-5) eklendi ve böylece MTT formazonu açığa çıkarıldı. 10 dk bekledikten sonra, kuyucuklardan alınan 200 μL ortam, 96 kuyucuklu plakalara transfer edildi ve optik dansite (OD) bir plaka okuyucu (Perkin Elmer Enspire multimode, Boston, ABD) yardımıyla 570 nm'de okundu. Okuyucuda izlenen absorbans değerleri kullanılarak aşağıda verilen formül yardımıyla canlılık (%) değerleri hesaplandı.

$$\left[\frac{(\text{OD örnek} - \text{OD hücresiz})}{(\text{OD kontrol} - \text{OD hücresiz})} \right] \times 100$$

İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS paket programı kullanılmıştır (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD). Değişkenlerin dağılımının normal olup olmadığı kontrol edilirken *Kolmogorov Smirnov* testi kullanıldı. Bu değerlendirmenin neticesinde çalışmadan edinilen sayısal değişkenlerin normal dağılım göstermediği tespit edildi. Gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapılırken *Kruskal-Wallis* testi, anlamlı farklılık tespit edilmesi durumunda iki grubu kıyaslamak amacıyla *Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U* testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık koşulu için p değeri $<0,05$ olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Farklı konsantrasyonlarda İN içeren çözeltilerin 24 saat süreyle uygulanması durumunda İPDLF hücrelerinin canlılık sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 2'de ise gruplar arası karşılaştırmada elde edilen p değerleri verilmiştir. İN uygulamasının kontrol grubuna kıyasla hiçbir konsantrasyonda hücre canlılığına etki etmediği görülürken 15 $\mu\text{g/ml}$ ve 5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. 5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda

İN uygulamasının, 15 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda İN uygulamasına göre canlılık açısından daha olumlu etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Tablo 1. İPDLF hücre canlılık sonuçları

	Ort \pm SS	Medyan	(Min - Max)
Kontrol ^a	100,00 \pm 0,00	100,00	(100,00 - 100,00)
5 $\mu\text{g/ml}$ ^b	122,98 \pm 8,82	124,67	(110,76 - 131,81)
10 $\mu\text{g/ml}$ ^c	92,34 \pm 22,22	93,47	(64,90 - 117,53)
15 $\mu\text{g/ml}$ ^d	35,58 \pm 7,69	35,20	(26,56 - 45,36)
p^*	0,006		

*Kruskal Wallis testi, SS: Standart Sapma, $p < 0,05$

Tablo 2. Karşılaştırmalı p değerleri

p_{a-b}	p_{a-c}	p_{a-d}	p_{b-c}	p_{b-d}	p_{c-d}
0,512	1,000	0,435	0,599	0,003	0,369

#Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney-U testi

TARTIŞMA

WSY'nin canlılardaki hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu ve hücre göçünde etkinliğiyle birlikte doku yapım ve onarım metabolizmasında çok önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Neves ve ark., 2017; Tanır ve Demirezen, 2009; Whyte ve ark., 2012). Bu nedenle güncel çalışmalar WSY aktivasyonu yoluyla rejenerasyonu hedeflemektedir. WSY aktivasyonu sağlayan yollardan biri GSK-3 inhibisyonudur (Neves ve ark., 2017). İN'nin içerdiği maddelerden biri olan İndirubin GSK-3 inhibisyonu yaptığı bilinmektedir (Leclerc ve ark., 2001). Bu çalışma İN'nin periodontal rejenerasyondaki olası etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan ve İPDLF hücrelerinin canlılığını değerlendiren ilk çalışmadır. Çalışmamız İN'nin İPDLF hücrelerinin canlılığı üzerine olumlu etkisi olacağı hipotezi düşünülerek planlanmıştır.

İN'nin İPDLF hücrelerinin canlılık ve proliferasyon sonuçlarını araştırmak amacıyla MTT testi kullanılmıştır. Bu test, proliferasyona uğrayan hücrelerin enzimlerinin MTT tuzunu mor renkli kristallere dönüştürmesi sayesinde canlılığın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. MTT yöntemi; hızlı ve çok tekrar edilebilir olmakla birlikte güvenilir bir test yöntemidir. Hücre canlılık testleri arasında 'altın standart' olarak kabul edilmektedir (Kumar ve ark., 2018; Mosmann, 1983).

Hücre kültürü çalışmalarında canlılık sonuçlarının araştırılması hedeflenen deney uygulama süreleri çalışma planına göre farklılık arz etmektedir. İPDLF hücrelerinin aktivitesi ve canlılığı ile ilgili çalışmalarda bu süre kısa veya uzun dönem olmak üzere 1 saatten 8 güne kadar değişmektedir (Choe ve ark., 2012; Correia Vde ve ark., 2006). Çalışmamızda hücreler, Heo ve arkadaşları ile Kook ve arkadaşlarının çalışmalarında izlediği gibi 24 saat süreyle muamele edilerek canlılık değerlendirilmesi yapılmıştır (Heo ve ark., 2010; Kook ve ark., 2016).

Lin ve arkadaşlarının yaptıkları bir in vitro çalışmadaki İN konsantrasyon değerleri çalışmamızda seçilen doz konusunda yol gösterici olmuştur (Lin ve ark., 2012). Deney

protokolümüzde 5, 10 ve 15 µg/ml konsantrasyon değerleri kullanılmıştır. Canlılık deneyinde test gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik bulunmamıştır. Ancak 5 µg/ml konsantrasyonda İndigo naturalis uygulanan gruba kıyasla 15 µg/ml konsantrasyon İN uygulanan hücrelerde canlılık düzeyinde azalma gözlenmiştir.

Güncel araştırmalar İN'nin antienflamatuvar, antioksidan ve onarıcı etkileri olduğunu düşündürmektedir. Literatürde rastlanan bir *in vitro* çalışmada bulgular; İN'nin, insan nötrofillerinde süperoksit (O₂) oluşumunu ve elastaz salınımını inhibe ederek antienflamatuvar etki ettiğini göstermektedir (Lin ve ark., 2009). Yapılan bir diğer çalışmada 10 µg/ml İN'nin, insan keratinositlerinde ekzojen reaktif oksijen türevleri (ROS) tarafından indüklenen hücre içi ROS oluşumu ve bir lipit peroksidasyon ürünü olan HNE tarafından indüklenen protein modifikasyonu üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Lin ve ark., 2012). Yine Lin-Ku Yin ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir *in vitro* çalışmada İN'nin, claudin-1 ekspresyonunu artırdığı ve insan keratinositlerindeki tight junction fonksiyonunu onardığı sonucuna varılmıştır (Lin ve ark., 2013).

WSY aktivasyonunun fibroblastların etkinliğinin artmasını ve çoğalmasını sağlayarak çeşitli dokularda fibrozis meydana getirebildiği kanıtlanmıştır (Somanader ve ark., 2024). Bu durum miyokard, akciğer, böbrek veya deri dokusunda meydana gelebilmektedir (Griffin ve ark., 2022; Patel ve ark., 2024; Tian ve ark., 2024; Zhang ve Lu, 2024). Heo ve arkadaşları İPDLF hücrelerinde WSY aktivasyonunu araştırmış ve WNT aktivatörü olan lityum klorürün İPDLF hücrelerinde transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasıyla birlikte hücrelerin osteojenik soylara farklılaşmasını sağladığını göstermiştir (Heo ve ark., 2010). Kook ve arkadaşları WSY proteinlerinin İPDLF hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını ve mineralizasyonunu uyardığını ileri sürdükleri bir çalışmanın ardından başka bir çalışmada ise Hidrojen peroksit (H₂O₂) aracılı oksidatif stresin, İPDLF hücrelerinin hayatta kalmasını ve osteojenik farklılaşmasını azalttığını, oysa bu azalmaların Wnt yolunun aktivasyonu ile önlendiğini kanıtlamıştır (Kook ve ark., 2015; Kook ve ark., 2016). Han ve arkadaşları çalışmalarında WSY aktivasyonunun insan periodontal ligament hücrelerinin proliferasyon ve osteojenik potansiyelinin arttırdığını gözlemlemiştir (Han ve ark., 2012). Daha önce İN'nin içerdiği indirubin türevlerinin GSK-3 sentezinin inhibisyonu yoluyla Wnt aktivasyonu sağladığı kanıtlanmıştır (Leclerc ve ark., 2001). Araştırmamız İPDLF hücrelerinde İN uygulamasını değerlendiren ilk çalışma olmakla beraber araştırmamızın sonucunda yukarıda bahsedilen çalışmalarla ilişkili olmayarak test grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış gözlenmemiştir. Ancak bununla birlikte bulgularımız, İN'nin doza bağımlı etkiler sergilediğini düşündürmektedir. Özellikle, daha düşük bir doz olan 5 µg/ml'nin daha yüksek bir doz olan 15 µg/ml'ye göre hücre canlılığı üzerinde daha olumlu etkiler göstermesi, yüksek dozların hücreler üzerinde toksik etkiler oluşturabileceği olasılığını akla getirmektedir. Bu durum, İN'in hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin optimizasyonu için düşük dozların daha avantajlı olabileceğini işaret etmektedir. 15 µg/

ml konsantrasyonunda gözlenen olumsuz etkiler, İN'nin yüksek dozlarının hücre canlılığını azaltıcı toksik etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Bu bulgu, literatürde İN'nin etkilerini araştıran çalışmalarla tutarlıdır. Bir çok çalışma, İN'nin düşük dozlarda faydalı olabileceğini, ancak yüksek dozlarda toksik olabileceğini bildirmektedir (Xu ve ark., 2024, Sun ve ark., 2021). Çalışmamızın sonuçlarının taramalı elektron mikroskobu ile desteklenmesinin ve hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasına yönelik biyolojik belirteçlerin değerlendirilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir.

SONUÇ

Bu *in vitro* çalışmanın sonucunda 5, 10 ve 15 µg/ml konsantrasyonlarda İN'nin İPDLF hücrelerinin canlılığına olumsuz etki göstermediği öte yandan canlılığı arttırıcı yönde etki ortaya koymadığı sonucuna varılabilir. Çalışmamız İN'nin periodontal ligament üzerine etkinliğini değerlendiren ilk çalışma olduğu için bu alanda ufuk açsa da, farklı periodontal hücreler, geniş doz aralıkları ve çeşitli protein ekspresyonlarının araştırılmasını içeren daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışmaları Beyanı

Bu çalışma hazırlanırken; veri toplanması, sonuçların yorumlanması ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması alanı bulunmamaktadır.

REFERANSLAR

1. Benatti BB, Silvério KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr FH. (2007). Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. *JOB*, 2007;103(1): 1-6.
2. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008;42(4): 606-615.
3. Cheon SS, Cheah AY, Turley S, Nadesan P, Poon R, Clevers H, Alman BA. Beta-catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(10): 6973-6978.
4. Cheon SS, Nadesan P, Poon R, & Alman BA. Growth factors regulate beta-catenin-mediated TCF-dependent transcriptional activation in fibroblasts during the proliferative phase of wound healing. *Exp Cell Res*. 2004;293(2): 267-274.
5. Choe Y, Yu JY, Son YO, Park SM, Kim JG, Shi X, Lee JC. Continuously generated H₂O₂ stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2012;113(4): 1426-1436.
6. Correia VdeF, Caldeira CL, Marques MM. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dent Traumatol*. 2006;22(6): 312-317.

7. Gaitanis G, Magiatis P, Velegriaki A, Bassukas I. A traditional Chinese remedy points to a natural skin habitat: indirubin (indigo naturalis) for psoriasis and the *Malassezia* metabolome. *British Journal of Dermatology*. 2018;179(3): 800-800.
8. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000*. 2017;75(1): 152-188.
9. Griffin MF, Huber J, Evan FJ, Quarto N, Longaker MT. The role of Wnt signaling in skin fibrosis. *Med Res Rev*. 2022;42(1): 615-628.
10. Han P, Ivanovski S, Crawford R, Xiao Y. Activation of the Canonical Wnt Signaling Pathway Induces Cementum Regeneration. *J Bone Miner Res*. 2015;30(7): 1160-1174.
11. Han P, Wu C, Chang J, Xiao Y. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/ β -catenin signalling pathway by Li-ions released from bioactive scaffolds. *Biomaterials*. 2012;33(27): 6370-6379.
12. Heo JS, Lee SY, Lee JC. Wnt/ β -catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cells*. 2010;30(5): 449-454.
13. Hsu YH, Kiel DP. Clinical review: Genome-wide association studies of skeletal phenotypes: what we have learned and where we are headed. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(10): E1958-1977.
14. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;291: 21-71.
15. Klapholz-Brown Z, Walmsley GG, Nusse YM, Nusse R, Brown PO. Transcriptional program induced by Wnt protein in human fibroblasts suggests mechanisms for cell cooperativity in defining tissue microenvironments. *PLoS One*. 2007;2(9): e945.
16. Kook SH, Heo JS, Lee JC. Crucial roles of canonical Runx2-dependent pathway on Wnt1-induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem*. 2015;402(1-2): 213-223.
17. Kook SH, Lee D, Cho ES, Heo JS, Poudel SB, Ahn YH, Hwang JW, Ji H, Kim JG, Lee JC. Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling inhibits H₂O₂-induced decreases in proliferation and differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem*. 2016;411(1-2): 83-94.
18. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018(6).
19. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM. Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease: A PROPERTY COMMON TO MOST CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITORS?. *J Biol Chem*. 2001;276(1): 251-260.
20. Lin YK, Chen HW, Leu YL, Yang YL, Fang Y, Su Pang JH, Hwang TL. Indigo naturalis upregulates claudin-1 expression in human keratinocytes and psoriatic lesions. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(2): 614-620.
21. Lin YK, Chen HW, Yang SH, Leu YL, Huang YH, Yen HC. Protective effect of indigo naturalis extract against oxidative stress in cultured human keratinocytes. *J Ethnopharmacol*. 2012;139(3): 893-896.
22. Lin YK, Leu YL, Huang TH, Wu YH, Chung PJ, Su Pang JH, Hwang TL. Anti-inflammatory effects of the extract of indigo naturalis in human neutrophils. *J Ethnopharmacol*. 2009;125(1): 51-58.
23. Liu F, Millar SE. Wnt/ β -catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res*. 2010;89(4): 318-330.
24. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976;47(5): 256-260.
25. Minear S, Leucht P, Jiang J, Liu B, Zeng A, Fuerer C, Nusse R, Helms JA. Wnt proteins promote bone regeneration. *Sci Transl med*. 2010;2(29): 29ra30.
26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2): 55-63.
27. Naganuma M. Treatment with indigo naturalis for inflammatory bowel disease and other immune diseases. *Immunol Med*. 2019;42(1): 16-21.
28. Narayanan AS, Page RC. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. *Coll Relat Res*. 1983;3(1): 33-64.
29. Neves VC, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Sci Rep*. 2017;7: 39654.
30. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology. *Birleşmiş Milletler: Elsevier Health Sciences*; 2011.
31. Patel M, Post Y, Hill N, Sura A, Ye J, Fisher T, Suen N, Zhang M, Cheng L, Pribluda A, Chen H, Yeh WC, Li Y, Baribault H, Fletcher RB. A WNT mimetic with broad spectrum FZD-specificity decreases fibrosis and improves function in a pulmonary damage model. *Respir Res*. 2024;25(1): 153.
32. Qi-Yue Y, Ting, Z, Ya-Nan H, Sheng-Jie H, Xuan D, Li H, Chun-Guang X. From natural dye to herbal medicine: A systematic review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of indigo naturalis. *Chin Med*. 2020;15: 1-13.
33. Somanader DVN, Zhao P, Widdop RE, Samuel CS. The involvement of the Wnt/ β -catenin signaling cascade in fibrosis progression and its therapeutic targeting by relaxin. *Biochem Pharmacol*. 2024;223: 116130.
34. Sun X, Lv G, Zhu C. Research on Application of Qingdai (Natural Indigo) in History. *Acta Chin Med*. 2020;35: 1653-1655.
35. Sun Q, Leng J, Tang L, Wang L, Fu C. A comprehensive review of the chemistry, pharmacokinetics, pharmacology, clinical applications, adverse events, and quality control of Indigo Naturalis. *Front Pharmacol*. 2021;12: 664022.
36. Taba MJr, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(4): 292-302.
37. Tanır H, Demirezen Ş. Wnt sinyal yolunun biyolojisi ve bu yolda görev alan biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2009;29: 1292-1297.
38. Tian Y, Chen J, Huang W, Ren Q, Feng J, Liao J, Fu H, Zhou L, Liu Y. Myeloid-derived Wnts play an indispensable

- role in macrophage and fibroblast activation and kidney fibrosis. *Int J Biol Sci.* 2024;20(6): 2310-2322.
39. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* 2018;89 Suppl 1: S159-S172.
40. Whyte JL, Smith AA, Helms JA. Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 2012;4(8): a008078.
41. Xu Y, Lin C, Tan Hy, Bian Zx. The double-edged sword effect of indigo naturalis. *Food Chem Toxicol.* 2024;185: 114476.
42. Yu H, Li TN, Ran Q, Huang QW, Wang J. *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze, a multifunctional traditional Chinese medicinal plant, and its herbal medicines: A comprehensive review. *J Ethnopharmacol.* 2021;265: 113325.
43. Zhang R, Oyajobi BO, Harris SE, Chen D, Tsao C, Deng HW, Zhao M. Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone.* 2013;52(1): 145-156.
44. Zhang, Y, Lu F. Molecular mechanism of triptolide in myocardial fibrosis through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Scand Cardiovasc J.* 2024;58(1): 2295785.