

# Farklı Resveratrol Konsantrasyonlarının Gingival Fibroblastlardaki Hücre Canlılığına Etkisi

## Effect of Different Resveratrol Concentrations on Cell Viability on Gingival Fibroblasts

Yasemin Sezgin<sup>1</sup>, Mehtap Bilgin Çetin<sup>1</sup>, Özlem Darcansoy İşeri<sup>2</sup>, Yunus Kasım Terzi<sup>3</sup>, Nilgün Özlem Alptekin<sup>1</sup>, Şule Bulut<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji A.D

<sup>2</sup> Başkent Üniversitesi, Transplantasyon ve Gen Bilimleri Enstitüsü; Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

<sup>3</sup> Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara

**Atıf/Citation:** Sezgin, Y., Bilgin, Çetin, M., Darcansoy, İşeri, Ö., Terzi, Y. K., Alptekin, N. Ö. & Bulut, Ş. (2019). Farklı Resveratrol Konsantrasyonlarının Gingival Fibroblastlardaki Hücre Canlılığına Etkisi. Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 40(3), 147-152.

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, farklı resveratrol konsantrasyonlarının gingival fibroblast canlılığı üzerindeki etkisini MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemiyle belirlemektir.

**Yöntem:** Çalışmamızda, fibroblast kültürlerinin kurulmasında sıçanların mandibular 1.molar dişlerinin bukkalinden alınan dişeti dokuları kullanıldı. Dokular mekanik olarak parçalanarak kültür kaplarına aktarıldı. Hücreler, DMEM besi ortamı içerisinde kültüre edildi. Resveratrolün hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 4. pasaj kültürler kullanıldı. Hücre proliferasyonu, 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemiyle ½ dilüsyonile 0,78-400µM konsantrasyon aralığında ve 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sürelerinin ardından incelendi. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde tek yönlü ANOVA testinin Tukey ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları (IC50) logaritmik canlılık eğrilerinden hesaplandı.

**Bulgular:** 0,78-25µM konsantrasyon ve 72 ile 96 saat inkübasyon süresi aralığında fibroblast canlılığının %85'in üzerinde; 48 saat sonra ise %90'ın üzerinde olduğu saptandı. Uygulanan çözücünün hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi. IC50 değerleri 48, 72 ve 96 saatler için sırasıyla 120,1±5,7 µM; 85,2±6,4 µM; 105,9±7,1 µM olarak belirlendi.

**Sonuç:** Bu doz belirleme çalışmasının sınırları dahilinde, 0,78-25µM resveratrol konsantrasyonunun fibroblast canlılığı üzerinde olumsuz etkisi olmadığı söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** MTT yöntemi; sıçan gingival fibroblast; resveratrol.

### ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of resveratrol on gingival fibroblast viability with (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay).

**Methods:** In our study rat buccal gingival tissues from the area surrounding the mandibular first molar were used for establishment of fibroblast cultures. Rat gingival tissues were mechanically disrupted, and cultured in DMEM supplemented with 15% fetal bovine serum, 2 mM L- glutamine, and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL). The 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and forth passage cultures were used for evaluating the effects of resveratrol on fibroblast viability in a concentration range of 0,78-400µM after 48, 72 and 96 hours of incubation. Inhibitory concentration 50 (IC50) values were calculated from the logarithmic trend lines of the proliferation versus concentration graphs.

**Results:** MTT assay showed that viability of gingival fibroblast cells were over 85% and 90% after 72-96 hours and 48 hours respectively in a 0.78-25µM concentration range of resveratrol. IC50 were 120,1±5,7 µM; 85,2±6,4 µM; 105,9±7,1 µM for 48, 72, 96 hours, respectively.

**Conclusion:** Within the limitations, it can be concluded that 0.78-25µM concentration range of resveratrol doesn't have negative effect on fibroblast viability.

**Keywords:** MTT assay; rat gingival fibroblast; resveratrol.

Sorumlu yazar/Corresponding author\*: yasemin\_tocak@hotmail.com

Başvuru Tarihi/Received Date: 13.12.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date: 26.07.2019

## GİRİŞ

Periodontitis, dişetinde kanama, periodontal cep oluşumu, dişleri destekleyen dokuların yıkımı ile karakterize ve toplumda yaygın olarak gözlenen enflamatuvar bir hastalıktır. Dental biyofilm içerisinde bulunan patojenler konak immün sistemi uyararak diş destekleyen dokuların yıkımı ve sonuçta diş kaybına sebep olabilir.<sup>1</sup>

Oksidatif stres, vücutta antioksidan savunma sisteminin elimine edemeyeceği düzeyde açığa çıkan reaktif oksijen ürünleri “reactive oxygen species” (ROS) nedeniyle gelişen ve hücre ölüm, disfonksiyon ve yaralanmaya yol açabilen yaygın görülen bir mekanizmadır.<sup>2</sup> Oksidatif stres, kanser, artritis, yaşlanma, otoimmün bozukluklar, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik ve dejeneratif pek çok hastalığın gelişiminde rol oynar. Antioksidanlar, serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonu önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelerdir.<sup>3</sup> Periodontitisin başlaması ve ilerlemesinden sorumlu olan bakteriler polimorfonükleer hücrelerin (PMNler) sayı ve aktivitesinin artmasına sebep olan interlökin-1, tümör nekroz faktör- $\alpha$  gibi sitokin salınımı tetikler. PMNler periodontal patojenlere cevap olarak yıkıcı ROS,<sup>4,5</sup> proteinaz ve diğer faktörleri salgırlar.<sup>6,7</sup> Periodontal hastalıklar ROS üretimi kemik ve bağ dokusu yıkımı ve matriks metalloproteinaz (MMP) aktivitesi artışı ile konak dengesinin bozulmasına neden olur. Oksidatif stresin periodontitis gibi kronik enflamatuvar hastalıkların gelişiminde anahtar rol oynadığı kanıtlandığından, son yıllarda periodontal hastalıkların tedavisinde antioksidanların kullanımı ile ilgili çalışmalara olan ilgi artmıştır.<sup>2,8-11</sup>

Yüksek antioksidan özelliklere sahip olan Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-stilben), ilk olarak 1930lu yıllarda keşfedilen polifenolik bir bileşiktir. İsminin ilk bölümü olan “res” bu bileşiğin resorsinol türevidir (benzen-1,3-diol) olduğunu gösterirken; “veratrol” bölümünü ise resveratrolün ilk kez köklerinde bulunduğu bir bitki olan *Veratrum grandiflorum* bitkisinden almaktadır.<sup>12,13</sup> Resveratrol elma, yaban mersini, dut, yer fıstığı, antep fıstığı, erik, ahududu gibi birçok bitkide bulunmaktadır. Ayrıca, Japonya, Çin ve Kore gibi Doğu Asya ülkelerinin doğal bitkisel örtüsünde yaygın olarak bulunan *Polygonum cuspinatum* isimli bitkinin kök ve rizomlarında da yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Avrupa’da ise en önemli resveratrol kaynağı beyaz üzüm çeşitleri ve beyaz şaraba kıyasla yaklaşık 3-10 kat resveratrol içeren siyah üzüm çeşitleri ve kırmızı şaraptır.<sup>13</sup>

Resveratrol antioksidan, osteojenik, antienflamatuvar, analjezik, antitümör gibi geniş bir aktiviteye sahiptir. Sahip olduğu bu özelliklerle son yıllarda yapılan çalışmalarda resveratrolün kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar, diyabet, hipertansiyon, romatoid artritis, alzheimer hastalığı, kanser, obezite gibi çeşitli patolojileri önleyebileceği bildirilmiştir. Resveratrolün ayrıca kemik homeostazı ve iskeletsel kas atrofisi üzerinde de olumlu etkileri vardır.<sup>14-22</sup> Sıçanlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde resveratrolün oluşan kemik yıkımını azalttığı, sitokinlerin lokal seviyesini düzenlediği bildirilmiştir.<sup>23</sup> Aynı zamanda resveratrolün sıçan kalvariyasında oluşturulan kemik defektlerinin iyileşmesini ve sıçan tibiasına yerleştirilen implantların biyomekanik retansiyonunu arttırdığı bildirilmiştir.<sup>24</sup> Sıçanlarda deneysel periodontitis modeli oluşturulmuş diğer çalışmalarda resveratrolün sigara dumanına maruz kalan sıçanlardaki periodontitise bağlı oluşan kemik yıkımını inhibe ettiği bildirilmiştir.<sup>25,26</sup>

Resveratrolün insan meme adenokarsinoma (MDA-MB 231), insan servikal kanser (HeLa), Çin hamster akciğer fibroblast (V79), 3T3-L1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda resveratrolün konsantrasyona bağımlı olarak sitotoksik etkiye neden olduğu bildirilmiştir.<sup>27,28</sup> Antioksidan, osteojenik, antienflamatuvar, analjezik, antiümör etkileri olduğu bilinen resveratrolün bazı konsantrasyonlarının gingival fibroblastların canlılığı üzerine olumsuz etkisi olabileceği hipotezinden yola çıkılarak bu çalışmada resveratrolün gingival fibroblastlar için zararlı olmayan uygun konsantrasyon aralığının MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hücre Kültürü

Bu çalışmada, fibroblast kültürlerinin kurulması amacıyla Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezince çeşitli nedenlerle sakrifiye edilen ve kullanılmayacak olan 250 -350 gr ağırlığındaki sıçanlardan alınan diş eti dokuları üzerinde yapılmıştır. Deneysel çalışma protokolü Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (DDA14/01).

Mandibular 1. molar dişlerin bukkal kısmından alınan diş eti dokuları izotonik fosfat tamponu (PBS, pH 7,4) içerisinde mekanik olarak parçalanarak hücreler kültür kaplarına aktarıldı.<sup>29</sup> Gingival fibroblast hücreler,

%15 fetal dana serumu, 2 mM L-glutamin ve penisilin (100 IU/mL)/streptomisin (100 µg/mL) içeren DMEM içerisinde, 37°C, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde kültüre edildi. Kültüre edilen hücreler morfolojik olarak değerlendirildi.<sup>29</sup>

### Hücre Proliferasyon Çalışmaları

Resveratrolün (R5010-500MG, Sigma- Aldrich, Sao Paulo, Brazil) hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi 4. pasajdaki kültürler kullanılarak MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemiyle yapıldı. 10 mg resveratrol, 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde direkt olarak çözüldü ve elde edilen 50 mM stok solüsyon karanlıkta 4°C'da saklandı. Her inkübasyon saati tekrarı bir 96 kuyucuklu kültür kabında (Greiner, Avusturya) yapıldı. 96 kuyucuklu kültür kapları 8 kuyucuktan oluşan 12 sütundan 1 sütun boş besi ortamı ve 1 sütun resveratrol eklenmeyen kontrol hücre grubu olacak biçimde düzenlendi. Geri kalan 8 kuyucuktan oluşan 10 sütun, 400 µM resveratrol dan başlayarak yatay olarak 1/2 oranında seri olarak seyreltildi. Böylelikle, 10. dilüsyonda 0,78 µM resveratrol elde edildi. Her kuyucuk toplam 150 µL besi ortamı içermektedir. Bu nedenle, besi ortamı kontrol grubuna ait kuyucuklara 150 µL besi ortamı ve kontrol hücre grubuna ait kuyucuklara 100 µL besi ortamı eklendi. 400 µM resveratrol konsantrasyonunun elde edilmesi için her sütuna 200 µL 600 µM resveratrol (50 mM stok solüsyondan hazırlanan) içeren besi ortamı eklendi. Diğer kuyucukların tümüne 100 µL besi ortamı eklendi. 600 µM resveratrol içeren 100 µL besi ortamı bir sonraki sütunun kuyucuklarına aktarılarak yatay olarak 1/2 oranında seri olarak seyreltildi. Hücreler 10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olarak, 50 µL besi ortamı içerisinde kontrol kuyucukları hariç tüm kuyucuklara eklendi. Bu, toplam kuyucuk hacminin 150 µL olmasına, tüm konsantrasyonların 2/3 oranında seyreltilmesine ve resveratrol konsantrasyonlarının 0,78 - 400 µM aralığında çalışılmasına neden oldu. 96 kuyucuklu kültür kapları, 48, 72 ve 96 saat 37°C'da, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Inkübasyon sürelerinin sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT (5mg/mL) solüsyonu eklendi. Hücreler 4 saat boyunca MTT ile etüvde inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µL, %10 (w/v) SDS solüsyonu eklendi. Formazan kristallerinin çözünür hale gelebilmesi için 16 saat etüvde inkübasyon gerçekleştirildi. Inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrik mikro kültür kabı okuyucu (Euroimmun, Amerika) ile 540nm dalga boyundaki absorban değeri ölçüldü.

Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla

96 kuyucuklu kültür kapları 8 kuyucuktan oluşan bir sütun boş besi ortamı, bir sütun DMSO eklenmeyen kontrol hücre grubu ve 1/2 oranında seyreltilmiş DMSO içeren her biri 8 kuyucuktan oluşan sütunlar olarak düzenlendi. 400 µM resveratrol içeren kuyucuklardaki DMSO hacmi 1,2 µL olup %0,8 (v/v) DMSO miktarına karşılık gelmekteydi. Bu nedenle, DMSO etkisi %2 ile %0,005 (v/v) aralığında ve 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sürelerinde test edildi.

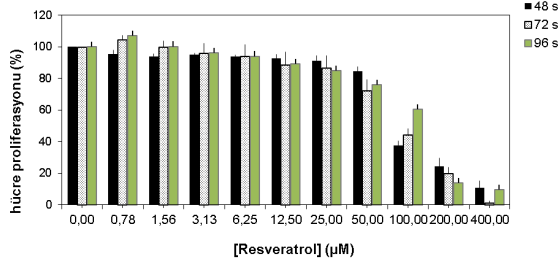
Boş besi ortamının optik yoğunluk değerleri tüm hücre ekili kuyucukların optik yoğunluk okumalarından çıkartıldı. Resveratrol uygulanan hücrelerin proliferasyonu kontrol grubu hücrelere göre yüzde proliferasyon olarak ifade edildi. Logaritmik canlılık eğrilerinden hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) hesaplandı. MTT analizleri iki farklı günde beş tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Sonuçlar, ortalama±standart hata (SH) olarak ifade edilmektedir. MTT analizine ait deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi tek yönlü ANOVA testinin Tukey ikili karşılaştırma yöntemi ile gerçekleştirildi. Anlamlılık değeri 0,05'ten (p<0,05) küçük olan sonuçlar arasındaki fark anlamlı olarak kabul edildi. Tüm istatistik analizlerinde SPSS 20 (IBM, Amerika) yazılımı kullanıldı.

### BULGULAR

MTT analizi sonucunda, uygulanan dilüsyon aralığında ve 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sürelerinde çözücü miktarının sıçan gingival fibroblast canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi. Grafik 1'e göre; 0,78-25 µM resveratrol konsantrasyonu ve 72 ile 96 saat inkübasyon süresi aralığında fibroblast canlılığının %85'in üzerinde olduğu saptandı. Aynı resveratrol konsantrasyonu aralığında 48 saat sonra fibroblast canlılığı %90'ın üzerindeydi. 50 µM resveratrol ile 48 saat sonra fibroblast canlılığı %85'e inerken, 72 ve 96 saat sonra hücre canlılığının sırasıyla, %72 ve %76 olduğu saptandı.

200 µM resveratrol 48 saat sonra hücre canlılığının %24'e düşmesine neden olurken, 72 ve 96 saatlerde hücre canlılığı sırasıyla, %20 ve %14'dü. 400 µM resveratrol konsantrasyonunda 48-96 saat aralığında hücre canlılığının %10'dan düşük olduğu belirlendi. IC<sub>50</sub> değerinin 48 saatte 120,1±5,7 µM olduğu hesaplandı. 72. ve 96. saatlerdeki IC<sub>50</sub> değerlerinin ise sırasıyla; 85,2±6,4 µM ve 105,9±7,1 µM olduğu belirlendi. 48 saatteki IC<sub>50</sub> değeri, 72 ve 96 saatlerdeki IC<sub>50</sub> değerlerinden anlamlı olarak yüksektir (p<0,05). Bu sonuç, 72 ve 96 saat sonra

resveratrolün fibroblastlar üzerindeki sitotoksik etkisinin arttığını göstermektedir. 72 ve 96 saatlerdeki  $IC_{50}$  değerleri arasında ise anlamlı bir fark yoktur.



**Grafik 1.** Resveratrolün rat gingival fibroblast canlılığı üzerindeki etkisi.

## TARTIŞMA

Bu çalışma resveratrolün gingival fibroblastların canlılığı üzerindeki etkisinin en az olduğu dozun belirlenmesinin amaçlandığı *in vitro* bir araştırmadır. Bu amaçla resveratrolün 0,78-25 µM, 50 µM, 200 µM ve 400 µM konsantrasyonlarının sıçan gingival fibroblast canlılığı üzerindeki etkisi MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 0,78-25 µM resveratrol konsantrasyonunda fibroblast canlılığı 72 ile 96 saat inkübasyon süresinde ve 48 saat sonrasında sırasıyla %85'in üzerinde ve %90'ın üzerinde bulunmuştur. Resveratrol konsantrasyonu 50 µM, 200 µM ve 400 µM'e ulaştığında ise hücre canlılık değerlerinin daha düşük oranlarda olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde resveratrolün farklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda farklı resveratrol konsantrasyon aralıkları kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalarda kullanılan resveratrol konsantrasyonu 0,03 µM - 400 µM aralığındadır.<sup>27,28,30</sup> Mevcut çalışmada da literatürle uyumlu olarak resveratrol konsantrasyon aralığı 0,78 - 400 µM olarak belirlenmiştir.

Resveratrolün gingival hücreler üzerindeki etkileri ile ilgili sınırlı sayıda *in vitro* çalışma bulunmaktadır. İnsan gingival epitel hücreler ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, 48 saat süreyle 75-150 µM resveratrola maruz bırakılan S-G fazında hücrelerde DNA sentezinin engellendiği ve hücre siklusunun tutuklandığı belirlenmiştir.<sup>31</sup> Bu çalışmada test edilen hücre tipi epitel kökenli olmakla birlikte elde edilen bulgular çalışmamız ile tutarlıdır. Yakın zamanda yapılan bir diğer çalışmada, insan gingival

fibroblast hücrelere 25, 50, 100 ve 200 µg/ml (110, 219, 438, 876 µM) konsantrasyonlarında 24 saat uygulanan resveratrolün hücre canlılığına herhangi bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmadaki resveratrol konsantrasyonları bizim konsantrasyon aralığımızda ve üstünde olmakla birlikte 24 saatlik uygulama süresinin fibroblast hücre canlılığının etkilenmesi açısından yeterli olmadığı kanısındayız.<sup>32</sup>

Resveratrolün farklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirildiği literatürdeki çalışmalar resveratrolün doz ve hücre bağımlı sitotoksik etkisi olabileceğini göstermiştir. Örneğin, bir çalışmada resveratrolün insan meme adenokarsinoma (MDA-MB 231), insan servikal kanser (HeLa) ve Çin hamster akciğer fibroblast (V79) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri 24 saat inkübasyon sonrasında Nötral Kırmızı Alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Resveratrolün MDA-MB 231 hücreleri üzerinde 2, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarda sitotoksik etkisinin olmadığı; 50 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda ise hücre canlılığının azaldığı bildirilirken test edilen en yüksek konsantrasyon olan 400 µM' de hücre canlılığı % 55 olarak saptanmıştır. HeLa hücrelerinde ise resveratrol 2,5 ve 10 µM konsantrasyonlarında sitotoksik etki göstermezken; 25 µM'den daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı bildirilmiştir. 400 µM konsantrasyonda ise hücre canlılığının %57'ye azaldığı tespit edilmiştir.<sup>27</sup> Bu araştırmada elde edilen 25 µM'den yüksek resveratrol konsantrasyonlarının hücre canlılığını azalttığı bulgusu mevcut çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Chang ve arkadaşlarının çalışmasında 0,03 µM ile 100 µM arasında değişen konsantrasyonlardaki resveratrolün 3T3-L1 hücreler üzerindeki sitotoksikite, proliferasyon, adipojenik farklılaşma ve lipoliz üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Yüksek dozda (10-100 µM) resveratrolün hem preadiposit hem de matür adipositler üzerinde sitotoksik etkisi olduğu; düşük konsantrasyonda ise (1-10 µM) 3T3-L1 hücrelerinin matür adipositlere farklılaşma kapasitesini engellediği bildirilmiştir.<sup>28</sup>

Resveratrolün oksidatif hasarla ilişkili kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar, diyabet, romatoid artrit, alzheimer hastalığı, kanser, obezite gibi çok sayıda hastalık üzerine yararlı etkileri olduğu önerilirken,<sup>15,16,19</sup> öte yandan resveratrolün konsantrasyonu ve hücre tipine bağlı olarak özellikle hücre DNA'nın oksidatif hasarına neden olan geçiş metal iyonları varlığında pro-oksidan özellikler gösterebileceği de bildirilmiştir.<sup>33</sup> Bu nedenle çeşitli sistemik hastalıkların tedavisi için ümit



verici bir ajan olan resveratrolün periodontal hastalıkların önlenmesi veya tedavisi amacıyla da kullanılabilmesi için gingival fibroblastlar üzerindeki etkisinin bilinmesi gereklidir.

Bu araştırmada resveratrol konsantrasyonu 200 µM'e ulaştığında 48 saat sonra hücre canlılığının %24'e düşmesine neden olurken, 72 ve 96 saatlerde hücre canlılığı sırasıyla, %20 ve %14 olarak bulunmuştur. 400 µM resveratrol konsantrasyonunda ise 48-96 saat aralığında hücre canlılığının %10'dan düşük olduğu belirlendiğinden resveratrol antioksidan, osteojenik, antienflamatuvar, analjezik, antiümör özelliklere sahip olsa da artan konsantrasyonlarının hücre metabolizması ile etkileştiğinde hücre ölümüne neden olabileceği göz ardı edilmemelidir. Mevcut veriler 0,78- 25 µM resveratrol konsantrasyonu ile 72 ile 96 saat inkübasyon süresi aralığında fibroblast canlılığının %85'in üzerinde; 48 saat sonra ise fibroblast canlılığının %90'ın üzerinde olduğunu gösterse de bu sonuçlar araştırmamızın *in vitro* dizaynı göz önünde bulundurularak yorumlanmalıdır. *In vivo* şartlarda fibroblastlara geçen resveratrol konsantrasyonu farklı olabileceğinden kanda da bu resveratrol konsantrasyonunun optimum

düzeyde olması önemlidir. Sıçan modelleri ile yapılan çalışmalarda, daha fazla sayıda ve genç sıçandan alınan örnekler ile yapılan analizler daha güvenilir sonuçlar verebileceğinden bu durum çalışmamızın sınırlaması olarak düşünülebilir. Çalışmamız resveratrolün deneysel ve klinik uygulamalarından önce fibroblast canlılığı üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir doz belirleme çalışması niteliğinde olduğundan bu araştırmada çeşitli nedenlerle sakrifiye edilecek ve kullanılmayacak olan sıçanlardan alınan diş eti fibroblastları kullanılmıştır. Gelecekte resveratrolün diş eti dokusu üzerindeki etki mekanizmasını aydınlatacak deneysel hayvan çalışmalarına ve elde edilen sonuçlara dayanarak da randomize kontrollü klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇ

Bu doz belirleme çalışmasının sınırları dahilinde, 0,78-25µM resveratrol konsantrasyonunun fibroblast canlılığı üzerinde olumsuz etkisi olmadığı söylenebilir. Gelecekte resveratrolün deneysel ve klinik uygulamalardaki etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 2010; 53: 28-44
2. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 287-296
3. Muniz FW, Nogueira SB, Mendes FL, Rosing CK, Moreira MM, de Andrade GM, Carvalho Rde S. The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: A systematic review. *Arch Oral Biol* 2015; 60: 1203-1214
4. Miyasaki KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol* 1991; 62: 761-774
5. Gustafsson A, Asman B. Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fc delta-receptor stimulation. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 38-44
6. Enwonwu CO. Cellular and molecular effects of malnutrition and their relevance to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 643-657
7. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 2000; 6: 138-151
8. D' Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89: 1241-1246
9. Levy Y. Oxidative stress, antioxidants and periodontal disease. *Arch Oral Biol* 2015; 60: 1461-1462
10. Iwasaki M, Moynihan P, Manz MC, Taylor GW, Yoshihara A, Muramatsu K, Watanabe R, Miyazaki H. Dietary antioxidants and periodontal disease in community-based older Japanese: a 2-year follow-up study. *Public Health Nutr* 2013; 16: 330-338
11. Yagan A, Kesim S, Liman N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2014; 85: 478-489
12. Sedlak L, Wojnar W, Zych M, Wygledowska-Promienska D, Mrukwa-Kominek E, Kaczmarczyk-Sedlak I. Effect of Resveratrol, a Dietary-Derived Polyphenol, on the Oxidative Stress and Polyol Pathway in the Lens of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Nutrients* 2018; 10: 1423

13. Weiskirchen S, Weiskirchen R. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Adv Nutr* 2016; 7: 706-718
14. Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO, Copelan EA, Duke RC, Farel PB, Gershenson LE, et al. Apoptosis: a general comment. *FASEB J* 1991; 5: 2127-2128
15. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 1998; 421: 277-279
16. Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Urien S, Tillement JP, Bertelli A. Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs Exp Clin Res* 1998; 24: 51-55
17. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 619-620
18. Zhang Y, Jayaprakasam B, Seeram NP, Olson LK, DeWitt D, Nair MG. Insulin secretion and cyclooxygenase enzyme inhibition by cabernet sauvignon grape skin compounds. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 228-233
19. Lin JK, Tsai SH. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1999; 23: 99-106
20. Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Zielinski T. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. *Thromb Res* 2002; 107: 141-145
21. Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Muller-Spahn F. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology* 2003; 49: 380-383
22. Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 2005; 280: 37377-37382
23. Casati MZ, Algayer C, Cardoso da Cruz G, Ribeiro FV, Casarin RC, Pimentel SP, Cirano FR. Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. *J Periodontol* 2013; 84: 58-64
24. Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, Ghiraldini B, Duarte PM, Ribeiro FV. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014; 43: 900-906
25. Correa MG, Absy S, Tenenbaum H, Ribeiro FV, Cirano FR, Casati MZ, Pimentel SP. Resveratrol attenuates oxidative stress during experimental periodontitis in rats exposed to cigarette smoke inhalation. *J Periodontol Res* 2019; 54: 225-232
26. Ribeiro FV, Pino DS, Franck FC, Benatti BB, Tenenbaum H, Davies JE, Pimentel SP, Casarin RC, Cirano FR, Casati MZ. Resveratrol Inhibits Periodontitis-Related Bone Loss in Rats Subjected to Cigarette Smoke Inhalation. *J Periodontol* 2017; 88: 788-798
27. Göktas HG, Göktas HG, Bacanlı M, Kutluk B, Basaran AA, Baþaran N. Cytotoxic Activity of Resveratrol in Dýfferent Cell Lýnes Evaluated by MTT and NRU Assays. *Turk J Pharm Sci* 2016; 13: 109-118
28. Chang CC, Lin KY, Peng KY, Day YJ, Hung LM. Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. *Endocr J* 2016; 63: 169-178
29. Saczko J, Dominiak M, Kulbacka J, Chwilkowska A, Krawczykowska H. A simple and established method of tissue culture of human gingival fibroblasts for gingival augmentation. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46: 117-119.
30. Berardi V, Ricci F, Castelli M, Galati G, Risuleo G. Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: potential clinical use. *J Exp Clin Cancer* 2009; 28: 96
31. Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. In vitro response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicol Lett* 2000; 114: 143-153
32. Shahidi M, Vaziri F, Haerian A, Farzanegan A, Jafari S, Sharifi R, Shirazi FS. Proliferative and Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol and Silymarin on Human Gingival Fibroblasts: A View to the Future. *J Dent* 2017; 14: 203-211
33. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1156-1160