

**DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA KARVAKROL UYGULAMASININ
PERİODONTAL DOKULAR ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL, HİSTOLOJİK
ve RADYOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

**Dt. Eda KERMEN
Periodontoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Recep ORBAK**

Doktora Tezi - 2014

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

**DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA KARVAKROL UYGULAMASININ
PERİODONTAL DOKULAR ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL, HİSTOLOJİK ve
RADYOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

Dt. Eda KERMEN

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Recep ORBAK**

**Periodontoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**ERZURUM
2014**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
KARVAKROL UYGULAMASININ PERİODONTAL DOKULAR
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL, HİSTOLOJİK ve
RADYOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

Dt. Eda KERMEN

Tez Savunma Tarihi : 03.12.2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Recep ORBAK (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Turgut DEMİR (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Ahmet KIZILTUNÇ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç.Dr. Alparslan DİLSİZ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. M. Cankat KARA (Ordu Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2014

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Periodontal Hastalık.....	5
2.1.1. Kronik Periodontitis.....	7
2.2. Kronik Periodontitisin Etiyolojisi.....	8
2.3. Periodontal Hastalıklarda Doku Yıkımı	8
2.4. Kronik Periodontitisin Patogenezi	9
2.5. Mikroorganizma-Konak Etkileşiminde Yer Alan İmmünolojik Faktörler ve Mediyatörler.....	10
2.6. Periodontal Hastalıklarda Sitokinlerin Rolü	15
2.6.1. İnterlökin-1	16
2.6.2. İnterlökin-6	17
2.6.3. Tümör Nekroz Faktör Alfa	18
2.7. Nükleer Faktör Kappa B ve Aktivasyon Mekanizması	19
2.8. RANK/RANKL/OPG’ nin Alveoler Kemik Yıkımındaki Rolü.....	19
2.8.1. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B.....	19
2.8.2. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand.....	20
2.8.3. Osteoprotegerin.....	21

2.9. Kemik Dokusu ve Metabolizması.....	22
2.9.1. Normal Kemik Dokusu.....	22
2.9.2. Kemik Remodelasyonu.....	23
2.9.3. Kemik Turnover Markırları	26
2.9.3.1. Kemik Yapım Markırları	26
2.9.3.2. Kemik Rezorpsiyonunu Gösteren Markırlar.....	26
2.10. Periodontal Tedavide Konak Modülasyonu	30
2.11. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler	34
2.12. Uçucu Yağlar	35
2.13. Karvakrol	36
3.MATERYAL ve METOT	38
3.1. Deney Hayvanları	38
3.2. Deneysel Periodontitis Modeli.....	39
3.3. KAR Hazırlanışı ve Uygulaması	39
3.4. Doku ve Kan Örneklerinin Alımı	42
3.5. Biyokimyasal Metotlar	42
3.5.1. Serum Sitokin Seviyelerinin Ölçümü	42
3.5.2. Serum CTx ölçümü.....	43
3.5.3. Serum KALP Seviyelerinin Ölçümü	43
3.6. Histolojik Analizler.....	43
3.6.1. Histopatolojik Analiz.....	43
3.6.2. İmmüno-histokimyasal Analiz.....	44
3.7. Radyolojik Analizler.....	44
3.8. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46

4.1. Biyokimyasal Bulgular	46
4.1.1. Serum Sitokin Seviyesi Bulguları.....	46
4.2. Serum CTx ve KALP Seviyesi Bulguları	47
4.3. Histolojik Sonuçlar	47
4.3.1. Histopatolojik Analiz.....	47
4.4. İmmuno-histokimyasal Bulgular	50
4.5. Radyografi Sonuçları	54
5.TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR	74
EKLER	108
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	108
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	109

TEŞEKKÜR

Mesleğine olan tutkusuna hayranlık duyduğum, doktora hayatım boyunca bana her konuda anlayış gösteren, tüm çalışmalarımda yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Recep ORBAK'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında değerli görüşlerine başvurduğum, doktora eğitimim boyunca klinik ve akademik tecrübelerini büyük bir sabır ve titizlikle paylaşan Sayın Doç. Dr. Taner ARABACI'ya, doktoram süresince bana her konuda emeği geçen hocalarım Sayın Prof. Dr. Turgut DEMİR, Doç. Dr. C. Fatih ÇANAKÇI ve Doç.Dr. Alparslan DİLSİZ'e, tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, deney hayvanlarıyla çalışmamı kolaylaştıran ve histolojik çalışmalarımda benden hiçbir yardımı esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Adem KARA'ya, tez çalışmamın ön hazırlık aşamasında bana yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e, tezimin laboratuvar aşamasında desteğini daima hissettiğim Prof.Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinde tüm labratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Sayın Doç.Dr. M.Sinan AKTAŞ'a ve Yrd.Doç.Dr. Orhan AKMAN'a, tez çalışmalarım sırasında bana yardım eden arkadaşlarım Dr.Alper KIZILDAĞ ve Dr.Dt. Didem Özkal EMİNOĞLU'na, tezimin radyolojik çalışmalarında benden yardımını esirgemeyen Dr. Dt. Şuayip Burak DUMAN'a, doktora hayatımı güzelleştiren, birlikte çalışmaktan ve aynı eğitim ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, bu çalışmayı 2012/384 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, hayatım boyunca benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen, bana her konuda destek olan canım annem ve kardeşim Dt. Seda KERMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dt. Eda KERMEN

ÖZET

Deneysel Periodontitis Oluşturulmuş Ratlarda Karvakrol Uygulamasının Periodontal Dokular Üzerine Olan Etkilerinin Biyokimyasal, Histolojik ve Radyolojik Olarak İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde karvakrolün sistemik uygulamasının immünomodulator etkilerini biyokimyasal, histolojik ve radyolojik olarak incelemektir.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada; 24 haftalık 200-220 gr ağırlığında Sprague-Dawley ırkı 24 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar her grupta 8 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı; 1.Kontrol 2.PED 3.KAR-PED grubu. Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla ratların sağ alt birinci molar dişine 3-0 ipek sütür ligature edilerek 30 gün beklendi. Ligatürlerin alınmasını takiben, KAR-PED grubuna 50 mg/kg dozda KAR 15 gün boyunca oral gavaj yöntemi ile verildi. Sakrifiye edilen ratlardan alınan serum örneklerinde IL-1 β , IL-6, TNF- α , CTx ve KALP seviyeleri ölçüldü. Histolojik kesitlerde histopatolojik değişiklikler, RANKL ve OPG pozitif hücre yoğunluğu değerlendirildi. Mandibula örneklerinde radyografik olarak alveoler kemik seviyeleri karşılaştırıldı.

Bulgular: KAR-PED grubunda serum IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinin PED grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi. CTx seviyesinin KAR-PED grubunda PED grubuna göre anlamlı derecede düşük, KALP seviyesinin ise anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu. PED grubunda kontrol grubuna göre; RANKL-pozitif hücre yoğunluğunun anlamlı derecede yüksek, OPG-pozitif hücre yoğunluğunun anlamlı derecede düşük olduğu gösterildi. KAR-PED grubunda ise PED grubuna göre RANKL-pozitif hücre yoğunluğunun anlamlı derecede düşük, OPG-pozitif hücre yoğunluğunun anlamlı derecede yüksek olduğu gösterildi. KAR-PED grubunda periodontal dokuda meydana gelen doku yıkımı ve PMNL hücre yoğunluğunun PED grubuna göre daha az olduğu görüldü. MKS ve DKS değerlerinin KAR-PED grubunda PED grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi.

Sonuç: Deneysel periodontitis rat modelinde KAR uygulamasının periodontal dokuda gözlenen enflamasyona bağlı alveoler kemik rezorpsiyonu üzerine iyileştirici etkilerinin bulunduğu ve KAR'ın periodontitis tedavisinde kullanılabilecek immünomodulator bir ajan olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Deneysel periodontitis; karvakrol; kemik alkali fosfat; osteoprotegerin; reseptör aktivatör nükleer kappa b ligand; sitokin; tip I kollajenin c-terminal telopeptidi.

ABSTRACT

Biochemical, Histological and Radiographic Evaluation of Carvacrol Application's Effects on Periodontal Tissues in Experimental Periodontitis in Rats

Aim: The aim of this study is to evaluate systemic carvacrol application's immunomodulator effects in experimental periodontitis in rats biochemically, histologically and radiographically.

Material and Method: In this study, 24 weeks old 24 male Sprague-Dawley rats weighing 200-220 gr were used. Rats were divided into 3 groups, each consisted of 8 animals. 1. Control 2. PED 3. CAR-PED group. For periodontitis induction rats' first mandibular molars were ligatured submarginally for 30 days. After ligature removal, rats in CAR-PED were treated with a dose of 50 mg/kg carvacrol by oral gavage for 15 consecutive days. IL-1 β , IL-6, TNF- α , b-ALP, CTx levels were analyzed in rats' serum samples after sacrifice. Histopathological changes, RANKL and OPG positive cell densities were evaluated in histological samples. Alveolar bone levels were compared radiographically on mandibular samples.

Results: Serum IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels were significantly lower in CAR-PED compared to PED group. CTx levels were lower and b-ALP levels were significantly higher in CAR-PED compared to PED group. RANKL-positive cell density was significantly higher and OPG-positive cell density was significantly lower in PED compared to control group. RANKL-positive cell density was significantly lower and OPG-positive cell density significantly higher in CAR-PED compared to PED group. Periodontal tissue destruction and PMNL cell infiltration were significantly lower in CAR-PED compared to PED group. MBL and DBL were significantly higher in CAR-PED compared to PED group.

Conclusion: CAR administration showed beneficial effects against inflammatory alveolar bone resorption in experimental periodontitis rat model and it's been inferred that CAR can be used as an immunomodulator agent for periodontitis treatment.

Key Words: Bone alkaline phosphatase; carvacrol; cytokine; C-terminal telopeptide of type I collagen; experimental periodontitis; osteoprotegerin; receptor activator of nuclear kappa B ligand.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen Fosfataz
CTx	: C Terminal Telopektid
DKS	: Distal Kemik Seviyesi
DOS	: Dişeti Oluğu Sıvısı
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
IL-1	: İnterlökin 1
IL-1α	: İnterlökin 1 Alfa
IL-1β	: İnterlökin 1 Beta
IL-6	: İnterlökin 6
IL-1 Ra	: İnterlökin-1 Reseptör Antagonisti
IκB	: İnhibitör Kappa B
KALP	: Kemik Alkalen Fosfataz
KAR	: Karvakrol
KAR-PED	: Karvakrol-Periodontitis Grubu
KFA	: Komple Freund Adjuvanı
LPS	: Lipopolisakkarit
MDP	: Mikrobiyal Dental Plak
MKS	: Mezial Kemik Seviyesi
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
mRANKL	: Membran Bağlı RANKL
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa-B
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz

OPG	: Osteoprotegerin
PED	: Periodontitis grubu
PGE2	: Prostaglandin E2
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
RANK	: Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B
RANKL	: Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandı
SDD	: Subantimikrobiyal doz doksisisiklin
sRANKL	: Çözünebilir Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandı
TALP	: Total Alkalen Fosfataz
Th	: Yardımcı T Hücre
TLR	: Toll like reseptör
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNSB	: Trinitrobenzen Sülfonik Asit
TTA	: Tiyoasetamid

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Periodontal hastalık patogenezinde yer alan immünolojik faktörler.....	15
Şekil 2.2. Öncül osteoklastın olgun osteoklasta farklılaşmasında OPG, RANK ve RANKL'in rolü ve kemik yıkımı.....	25
Şekil 2.3. Kollajen fibrillerin komşu fibrillerin helikal bölgelerine pyridinium çapraz bağlantılarla bağlanan helikal olmayan karboksiterminal ve aminoterminal uçları	29
Şekil 2.4. Karvakrolün açık kimyasal formülü.....	37
Şekil 3.1. Deneysel periodontitis çalışma grupları ve uygulamaları	39
Şekil 3.2. Ligatürün Bağlanması (1.gün).....	40
Şekil 3.3. Ligatürün alınmadan önceki ağız içi görüntüsü (30.gün).....	40
Şekil 3.4. Ligatür alındıktan sonra periodontal yıkımı gösteren ağız içi görüntüsü (30.gün).....	41
Şekil 3.5. Oral KAR/Plasebo Uygulaması Başlangıcı (30.gün)	41
Şekil 3.6. Hayvanların sakrifiye edilmesi (45.gün)	42
Şekil 3.7. Mezial ve distal kemik yüzdelerinin gösterimi: $AB/BC \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı.	45
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait histopatolojik görünüm.....	48
Şekil 4.2. PED grubuna ait histopatolojik görünüm.....	49
Şekil 4.3. KAR-PED grubuna ait histopatolojik görünüm	49
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerin anti-RANKL ile immuno- histokimyasal boyaması	51
Şekil 4.5. PED grubuna ait histolojik kesitlerin anti-RANKL ile immuno-histokimyasal boyaması	51

Şekil 4.6. KAR-PED grubuna ait histolojik kesitlerin anti-RANKL ile immuno-	
histokimyasal boyaması	52
Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerin anti-OPG ile immuno-histokimyasal	
boyaması	53
Şekil 4.8. PED grubuna ait histolojik kesitlerin anti-OPG ile immuno-histokimyasal	
boyaması	53
Şekil 4.9. KAR-PED grubuna ait histolojik kesitlerin anti-OPG ile immuno-	
histokimyasal boyaması	54
Şekil 4.10. Gruplara ait mandibula örneklerinden sakrifikasyon işleminden sonra	
alınmış radyografi görüntüleri	55

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. Tüm gruplara ait serum sitokin seviyeleri ve gruplar arası karşılaştırmaları.....	46
Tablo 4.2. Tüm gruplara ait serum CTx ve BALP seviyeleri ve gruplar arası karşılaştırmaları.....	47
Tablo 4.3. Tüm gruplara ait doku kesitlerinin histopatolojik analizi skorları.....	48
Tablo 4.4. Tüm gruplara ait anti-OPG ve anti-RANKL pozitif hücrelerin Stereolojik analizi.....	50
Tablo 4.5. Tüm gruplara ait mezial-distal kemik yüzdelerinin radyografik ölçümü değerleri	54

1. GİRİŞ

Periodontal hastalıklar, diş ve diş çevresinde kolonize olan mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmalara karşı gelişen konak immün cevabı arasındaki kompleks etkileşim sonucu oluşan hastalıklardır.¹ Dünyada ve ülkemizde oldukça yüksek prevalansa sahip periodontitis; periodontal cep formasyonu, klinik ataşman kaybı ve alveoler kemik rezorpsiyonu gibi bulgularla karakterize multifaktöriyel bir hastalıktır.² Tedavi edilmediği takdirde de destek dokularda meydana gelen yıkım sonucu diş kayıplarına neden olabilir.³

Mikrobiyal dental plak (MDP), periodontal doku yıkımında primer etiyolojik ajan olarak kabul edilmesine rağmen, tek başına hastalık oluşumunda %20 gibi düşük oranda bir etkiye sahiptir.⁴ Bu yüzden yeni patogeneze modellerinde, MDP hastalığın başlangıcı ve ilerlemesini açıklamak için yetersiz kalmakta, yumuşak ve sert doku hasarının temel sebebi olarak bakteriyel hasara karşı konağın verdiği immün enflamatuvar cevap gösterilmektedir. Bu cevap kazanılmış ve genetik faktörlere (sigara, diyabet, stres, genetik rahatsızlıklar) bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte, endotelial hücre ve hücreler arası adezyon moleküllerin ekspresyonu, sitokin gibi konak kaynaklı enflamatuvar mediyatörlerin, lipidlerin ve matriks metalloproteinazların (MMP) üretimiyle karakterizedir.¹

Sitokinler hücresel büyüme, enflamasyon, immünite, doku onarımı ve hematopoez gibi önemli biyolojik olaylarda rol oynayan glikoproteinlerdir.^{5, 6} Doğal immünitinin sitokinleri olan tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlekin 1 beta (IL-1 β) ve interlekin 6 (IL-6) periodontal patogeneze ilk olarak salgılanan sitokinlerdir.⁷ IL-1 β ve IL-6 enflamatuvar hücre migrasyonu ve osteoklastogeneze^{8, 9} neden olurken; TNF- α , MMP ve RANKL sekresyonunu artırarak ekstraselüler matriks yıkımı ve kemik rezorpsiyonuna neden olur.^{10, 11}

Son yıllarda osteoklast fonksiyonu ile ilişkili periodontitisin de dahil olduğu çeşitli kemik hastalıklarının kontrolünde tümör nekroz faktör (TNF) ailesine ait üç önemli molekülün keşfi, immün sistem ile kemik metabolizması arasındaki ilişkinin incelenmesine olanak sağlamaktadır.¹² Bu moleküller; nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'nin reseptör aktivatörü (RANK), onun ligandı (RANKL) ve RANKL'ı inhibe eden osteoprotegerin (OPG) dir.¹³ RANK, RANKL'ın bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. RANK ile RANKL arasındaki bağlantı osteoklast formasyonu ve aktivasyonunu indüklemektedir.¹⁴ OPG ise RANKL'a bağlanarak tuzak reseptörü görevi görür. Böylece RANKL'ın RANK a bağlanmasını inhibe eder, sonuç olarak osteoklast diferansiyasyonu ve kemik rezorpsiyonu engellenmiş olur.¹⁵ Periodontal hastalığın kontrol altına alınmasında destekleyici konak modülasyonu tedavilerinin, RANKL/OPG oranını düşürmede yararlı olacağı düşünülmektedir.¹

Bakteriyel ürünler ve enflamatuvar sitokinler tarafından oluşturulan osteoblast ve osteoklast aktivitesi arasındaki dengenin bozulması, enflamasyon kaynaklı alveolar kemik yıkımının temel sebebidir.¹⁶ Fizyolojik ya da patolojik durumlarda kemikte meydana gelen remodelasyon sürecine ışık tutan yapım ve yıkım markırları ise kemik hastalıklarının teşhis ve tedavisinde yönlendirici rollere sahiptir. Kemik döğüsünün yapım safhasında yüksek miktarda üretilen yapım markırlarından biri olan kemik alkalin fosfataz (KALP), kemik yapım aktivitesini gösteren mükemmel bir indikatör olarak kabul edilmektedir.^{17, 18} Kemik yıkımı sürecinde tip I kollajenin parçalanması sonucu dolaşıma salınan C- terminal telopeptidler (CTX) ise tip I kollajen fragmanlarıdır.¹⁹ Kemik rezorpsiyonunu değerlendirmede kullanılan bu markırın diğer yıkım markırlarından daha iyi olduğu son dönem yapılan çalışmalar tarafından desteklenmektedir.²⁰

Konak kaynaklı faktörlerin doku hasarındaki rolünün anlaşılması ile birlikte, konak cevabını değiştirmek üzere periodontal doku yıkımından sorumlu pek çok mekanizmanın engellenmesini sağlamak üzere çok sayıda konak modulator ajanı geliştirilmiş ve önerilmiştir.²¹ Günümüzde tedavi amacıyla, dünya nüfusunun %80'i direk ya da indirek olarak bitkilerden üretilen ilaçları kullanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde reçete edilen ilaçların yaklaşık % 25'inin bitkisel ilaçlar olduğu göz ardı edilemez bir gerçektir.²² Aromatik bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen uçucu yağlar ise sahip olduğu pek çok biyolojik özellik^{23, 24} sayesinde bilim dünyasının oldukça ilgisini çeken yağlardır. Bu yağların yararlı olmalarını sağlayan kimyasal ve yapısal farklılıkları nedeniyle gelecekte geliştirilecek yeni ilaç bileşiklerinde özel bir grubu temsil edeceği düşünülmektedir.²⁵

Labiata=Lamiaceae ailesine ait bitki türlerinin (Origanum, Satujera, Tyhmbra, Thymus ve Corydothymus) uçucu yağlarında bulunan fenolik ve bir oksijenli monoterpen olan karvakrol (KAR),^{26, 27} doğada özellikle kekik adıyla bilinen çeşitli bitki türlerinde bulunan uçucu bir yağdır.²⁸ Oldukça lipofilik ve küçük olan bu bileşik kolaylıkla hücre membranından geçebilme özelliğine sahiptir.²⁹ Yapılan çalışmalar KAR'ın antibakteriyel, antienflamatuvar, antifungal, analjezik, antikanserojen, antiplatelet,³⁰ antioksidan,³¹ anti-apoptotik,³² antidepresan,³³ anti-ülser³⁴ ve rejenerasyon gibi pek çok etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Periodontal hastalıkta KAR'ın terapötik etkilerini değerlendiren çok az sayıda in vivo çalışma bulunmaktadır.³⁵⁻³⁷ Literatürde ise KAR'ın sistemik uygulamasının kronik periodontitis üzerine olan etkilerini değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Sunulan bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı; deneysel periodontitis oluşturulan ratlarda sistemik KAR uygulamasının periodontal dokular üzerine olan terapötik etkilerini biyokimyasal, histolojik ve radyolojik metodlarla incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalık

Periodontal hastalıklar; bağ dokusu kaybı, alveoler kemik rezorpsiyonu ve periodontal cep formasyonu ile karakterize kronik enflamatuvar hastalıklardır.³⁸ Dünya popülasyonunun %10-15 ini etkileyen bu hastalıklar³⁹ yetişkinlerde görülen diş kaybının en önemli sebeplerinden biridir.⁴⁰

Dental plakta yer alan bakteriler, toksinler, enzimler ve metabolitler periodontal hastalığın gelişmesinde ve enflamatuvar cevabın başlamasında rol oynayan primer faktörlerdir.⁴¹ Enflamasyon doku hasarından sorumlu uyarıların ortamdaki uzaklaştırılmasını ve dokunun tamirini sağlar ancak bakteriyel uyarının sürekli olması enflamasyonun kronik bir hal almasına sebep olur.⁴² Ayrıca enflamasyon esnasında oluşan yetersiz ve aşırı konak cevabı doku hasarıyla sonuçlanır.⁴³

MDP periodontal hastalıkların başlamasında ana faktör olmakla birlikte; hastalığın başlaması ve ilerlemesinde çeşitli sistemik hastalıklar, genetik faktörler, stres, sigara kullanımı ve beslenme gibi faktörler de etkili olmaktadır.⁴⁴

Periodontal hastalıklar; klinik bulguları, immünolojik özellikleri, doku değişikliği veya doku kaybının derecesi, etkilediği periodontal bölgeler, hastalığın seyri, mikrobiyal flora gibi kriterler göz önüne alınarak bilimsel tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmeler eşliğinde çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır.

“American Academy of Periodontology” tarafından önerilen en son sınıflandırmaya göre periodontal hastalıklar aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır:⁴⁵

1-Gingival Hastalıklar

Plağa bağlı gingival hastalıklar

Plağa bağlı olmayan gingival lezyonlar

2-Kronik Periodontitis

Lokelize

Generalize

3-Agresif Periodontitis

Lokelize

Generalize

4-Sistemik Hastalıkların bir bulgusu olarak Periodontitisler

5-Nekrotizan Periodontal Hastalıklar

Nekrotizan ülseratif gingivitis

Nekrotizan ülseratif periodontitis

6-Periodonsiyumun Apseleri

Gingival apseler

Periodontal apseler

Perikoronar apseler

7-Endodontik Lezyonlarla İlişkili Periodontitisler

Endodontik-periodontal lezyon

Periodontal-endodontik lezyon

Kombine lezyon

8-Gelişimsel veya Edinsel Deformiteler ve Durumlar

Plağa bağlı gingival hastalıkları veya periodontitisi predispoze eden, diş ile ilişkili lokalize faktörler

Dişler etrafındaki mukogingival deformiteler ve durumlar

Dişsiz kretlerdeki mukogingival deformiteler ve durumlar

Okluzal travma

2.1.1. Kronik Periodontitis

Kronik periodontitis, periodontitisin en yaygın görülen formudur. Genellikle yavaş ilerleyen bir hastalık olarak tanımlanmasına rağmen sistemik ve çevresel faktörler konak cevabını etkileyebilir ve hastalık daha agresif seyredebilir. Daha çok yetişkinlerde görülmesine rağmen çocuklarda, adolesanlarda kısacası her yaşta görülebilir.

Tedavi edilmemiş kronik periodontitisin klinik bulguları; supragingival ve subgingival diştaşı ve plak birikimi, gingival enflamasyon, dişetinde renk değişikliği, stiplinglerin kaybolması, keskin olmayan yuvarlak hatlı dişeti kenarı, sondalamada kanama, periodontal dokuların sondalamaya karşı dirençlerinde azalma, klinik ataşman kaybı, alveoler kemik kaybı ve supurasyon olarak sayılabilir. Ayrıca bazı vakalarda dişeti büyümesi veya dişeti çekilmesi, kök ve furkasyon bölgelerinin açığa çıkması, artmış diş mobilitesi de görülebilmektedir. Hastalık genellikle ağrısız seyreder ancak bazen açığa çıkmış kök yüzeylerinin sıcağa veya soğuğa karşı hassas olması ya da çürük varlığında ağrı şikayetleri görülebilir. Lokalize künt ve bazen de çeneye yayılan bir ağrı olabilir. Akut ağrı periodontal apsenin görülmesi ile ortaya çıkar. Dişetinde ödem ve kaşıntı hissi vardır. Radyografik incelemede kemik kaybı vertikal ya da horizontal olarak görülebilir.⁴⁶

Kronik periodontitis, ağız içerisinde etkilediği her bölgede eşit oranda yıkım göstermez. Bazı bölgeler yıllar boyunca aynı kalırken ⁴⁷ bazı bölgelerde çok şiddetli yıkımlar görülebilir ve bu yıkımlar genellikle interproksimal alanlarda ve plak kontrolünün yeterince sağlanamadığı bölgelerde izlenir.^{48, 49}

Kronik periodontitis, etkilenen diş sayısına bağlı olarak lokalize ve generalize olmak üzere iki grupta tanımlanır. Etkilenmiş dişlerin sayısı tüm dişlere oranla <30% ise lokalize, >30% ise generalizedir. Hastalık genellikle generalize formda izlenir.⁵⁰

Lokelize ve generalize form da klinik ataçman kaybının miktarına bağlı olarak 3 alt gruba ayrılmaktadır; klinik ataçman kaybı 1-3 mm arasında ise hafif şiddetli, 3-5 mm arasında ise orta şiddetli, 5 mm veya daha fazla ise şiddetli olarak sınıflandırılır.⁴⁶

2.2. Kronik Periodontitisin Etiyolojisi

Kronik periodontitisin esas sebebi MDP'dir. MDP'nin içeriği ise mikroorganizmalardır. Mikroskopik incelemelerde plak içerisinde 500 den fazla bakteri türü olduğu tespit edilmiştir. 1 gr plakta yaklaşık 10^{11} adet bakteri bulunduğu rapor edilmiştir.⁵¹ Periodontitis oluşumunda ve ilerlemesinde belirgin rolleri olan bakteriler 'periodontopatojen' olarak adlandırılmaktadır. Bu bakterilerden; porphyromonas gingivalis, tannerella forsythia, campylobacter rectus, fusobacterium nucleatum, prevotella intermedia, aggregatibacter actinomycetemcomitans, peptostreptococcus, treponema denticola ve spiroketler en önemlileridir.^{52, 53} Mikrobiyal dental plaktaki periodontopatojenlerin miktarı, patojenitesi ve bu patojenlere karşı konağın cevabı (immün durum, genetik ve risk faktörlerinin varlığı) periodontal yıkımın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde etkilidir.⁵⁴

Restorasyonlar, dişin anatomik yapısı, çürük ve kök rezorpsiyonları gibi plak birikimini kolaylaştıran veya etkisini arttıran değişik lokal faktörler de periodontal hastalık etiyolojisinde önemli rol oynar. Ayrıca cinsiyet,⁵⁵ yaş,⁴⁶ sigara içme,⁵⁶ diyabet,⁵⁷ stres,⁵⁸ sistemik hastalıklar,⁵⁹ hamilelik gibi hormonal değişimler,⁶⁰ beslenme,³⁹ AIDS,⁶¹ osteoporoz^{62, 63} ve Down's Sendromu^{64, 65} gibi hastalıklar da periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde etkili olan risk faktörleridir.

2.3. Periodontal Hastalıklarda Doku Yıkımı

Periodontal hastalıklarda doku yıkımı birbirleriyle ilişkili çeşitli mekanizmaların ortak faaliyeti sonucu direk ya da indirek olarak gerçekleşir.⁶⁶ Direk yıkım mekanizmasında bakteriler ürettikleri toksik ürünlerin ve enzimlerin vasıtasıyla doku

yıkımına sebep olurken, indirek yıkım mekanizmasında ise konak savunma sistemlerini harekete geçirerek doku yıkımına sebep olurlar.⁶⁷

2.4. Kronik Periodontitisin Patogenezi

Patogenez terimi genel olarak hastalığın ilerleyişini belirtir. Periodontal hastalığın patogenezi, doğal ve kazanılmış immün cevabı içeren oldukça karmaşık enflamatuvar bir süreçtir⁶⁸ ve pek çok faktörün etkisi altındadır.⁴¹

Periodontitisin oluşması ve ilerlemesi için hastalığa yol açan patojen mikroorganizmaların ortamda bulunması gerekir. Periodontal mikroorganizmaların patojenitesi periodontal dokularda kolonize olabilmeleri, konağın antibakteriyel savunma mekanizmalarını aşabilmeleri, direk doku yıkımını başlatabilecek maddeleri salgılayabilmeleri ile karakterizedir. Gingival sulkus bakterilerin büyümesi için elverişli bir ortam olmasına karşın, subgingival alanda bir bakteri türünün kolonize olabilmesi çok sayıda konak kaynaklı engeli aşmasını gerektirir. Subgingival plakta bulunan periodontal patojenlerin hastalık başlatmak ve ilerletmek için gerekli olan sayısal seviyeye ulaşmasıyla koruyucu bariyerler geçilmiş olur.⁶⁹

Dento-gingival marjinde kolonize olan bakteriyel meydan okumaya karşı konak, periodontal cebin altındaki dokuda enflamatuvar hücre infiltrasyonu ile cevap verir.⁷⁰

1976 yılında Page & Schroeder periodontal hastalıkları klinik ve histopatolojik evrelerine göre sınıflandırmış ve periodontal enflamasyonu 4 histopatolojik evreye ayırmıştır; 1)Başlangıç lezyonu 2)Erken lezyon 3)Yerleşmiş Lezyon 4) İlerlemiş lezyon.⁷⁰

Periodontal dokularda gelişen başlangıç lezyonu mikrobiyal uyarıya karşı gelişen fizyolojik bir cevaptır. Hastalığın bu evresinde klinik olarak diştaşı ve gingival enflamasyonun eşlik ettiği subgingival ve supragingival plak formasyonu mevcuttur, klinik enflamasyon belirtileri yoktur ve dokudaki değişiklikler ancak histolojik olarak

gözlemlenebilir. Eğer plak ve eklentiler uzaklaştırılırsa enflamasyon çözülerek dokuda homeostazi sağlanır ancak enflamasyon devam ederse olay patolojik hale gelerek devamında erken lezyon gelişir. Erken lezyonda bakterilerin metabolik ürünleri birleşim epiteli hücrelerini sitokin salınımı, nötronlarını da nöropeptit üretimi için uyarır. Bunun sonucunda lokal kan damarlarında vazodilatasyon oluşur. Nötrofiller kemokinlerin uyarısıyla damarı terk ederek enflamasyon alanına doğru göç eder. Erken lezyonun ilerleyen safhalarında bağ dokusunda nötrofil artışı ve ortamda makrofaj, lenfosit, plazma hücreleri ve mast hücrelerinin varlığı gözlenir. Kompleman proteinleri aktive olur. Epitel rete pegler oluşturmak üzere proliferer olur ve klinik olarak enflamasyonun belirtisi olan kanama görülebilir. Dişeti oluşu sıvısında artış gözlenir. Erken lezyonunun ilerlemesi sonucu yerleşmiş lezyon gelişir ve immün cevabın yerini kazanılmış immün cevap alır. Bu evrede makrofajlar, plazma hücreleri, T ve B lenfositler baskındır. Bu evrede kan akımı bozulmuş kollajenolitik aktiviteyle birlikte, fibroblastların ürettiği kollajen yapımı artmıştır. Klinik olarak hafiften şiddetliye değişen gingivitis tablosu gözlenir. Histolojik olarak epitelde rete peg artışı gözlemlenir. Son evrede ise yerleşmiş lezyon, ilerlemiş lezyona yani periodontitise dönüşür. Klinik olarak ataçman kaybı ve kemik kaybı gözlenir.⁷¹

2.5. Mikroorganizma-Konak Etkileşiminde Yer Alan İmmünolojik Faktörler ve Mediyatörler

Periodontal patojenlerin direkt olarak doku hasarına yol açabilen virulans faktörleri olsa da periodontal hastalıkta doku yıkımı, periodontal enfeksiyonun tetiklediği konağa ait yıkıcı ve koruyucu mekanizmalar arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır.⁷² Mikrobiyal antijenler ve virulans faktörleri konakta hızlı bir iltihabi ve immün cevabın oluşmasına neden olur. Konak, mikrobiyal ürünlere karşı sitokinler, kininler, MMP'ler üreterek ve kompleman sistemi aktive

ederek cevap verir. Bu iltihabi mediyatörler ise, periodontal dokuların yıkımında rol oynamaktadır.⁷³

Enfeksiyöz veya enflamatuar uyarana karşı, doğal immün ve kazanılmış immün cevap olmak üzere iki cevap oluşur. Doğal immünite, ağız epitelinin fiziksel ve biyokimyasal koruyucu özelliklerini, enflamatuar cevabın damarsal ve hücrel olaylarını kapsamaktadır. Enfeksiyon ve enflamasyona karşı ani koruma sağlayan koruyucu bu cevap,⁷⁴ mikroorganizmaların ve yabancı yapıların makrofajlar ve nötrofiller tarafından fagositozu ve sindirimi ile karakterize, nonspesifiktir. Doğal immünite doğuştan itibaren mevcuttur, daha önce karşılaşılan patojenler sonucunda gelişmez ve enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını oluşturur.⁷⁵ Hızlı olma avantajına karşın, özgünlükten yoksundur ve konağın zararına işleyebilir.⁶⁹ Doğal bağışıklık sistemi, bağışıklık sistemi hücrelerinin toplanmasında, kompleman sisteminin aktivasyonunda, yabancı maddelerin tanınmasında ve ortadan kaldırılmasında ve kazanılmış bağışıklık sisteminin aktivasyonunda rol oynar.⁷⁴

İltihabın başlaması ile birlikte damarsal değişiklikler ve kompleman sistem aktivasyonu gerçekleşir. Kompleman sistem de C3a, C4a, C5a gibi anaflatoksinleri üreterek lökositlerin ve mast hücrelerinin degranüle olmasını sağlar Böylece vasküler değişiklikleri dolaylı yoldan tetikleyerek, bağışıklık sistemine ait koruyucu hücrelerin ve mediyatörlerin kandan dokulara geçişini sağlar. Ayrıca bu proteinler direk olarak bakterileri öldürebilme özelliğine de sahiptir.^{71, 76}

Makrofaj ve nötrofil gibi fagositler bakteri yüzey moleküllerini tanıyan ve bu yüzeylere bağlanan reseptörlere sahiptir.⁷⁷ Toll-like reseptörleri (TLR) içeren bu tanıyıcı reseptörler konak ve bakteriyi birbirinden ayırt edebilme özelliğine sahiptir.⁷⁸ TLR aktivasyonu ile birlikte hücre içi sinyalizasyon stimüle olur. Bu durum transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, ardından inflamatuvar sitokin salınımı, lökosit

migrasyonu ve osteoklastogenezis ile sonuçlanır.⁷¹ Enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını yöneten TLR sistemi adaptif immün yanıt için de ikincil uyarı sağlar.⁷⁹

Kompleman sistem, periodontopatojenleri kontrol etmede başarılı olamazsa doğal bağışıklık sisteminin hücreleri olan nötrofiller, periodontal iltihabın akut döneminde endotellerden göç ederek periodontopatojen bakterilere karşı verilen konak savunmasının ilk hattını oluştururlar. Diş eti oluğunda biriken bu hücreler subgingival plak ve gingival doku arasında bir bariyer meydana getirirler. Fagositik hücreler olan monositler ise, konak savunmasının 2. hattını oluştururlar ve sadece enfeksiyonun devam ettiği, nötrofillerin etkisiz kalmaya başladığı durumlarda aktive olurlar.⁸⁰

Aktive olan monositler endoteli geçtikten sonra bağ dokusuna yerleşerek makrofajlara olgunlaşırlar. Makrofajlar, konak cevabını, akut inflamatuvar durumdan bağışıklık sistemine ait aracı moleküllerin konak cevabını şekillendirdiği kronik bir patolojiye dönüştürerek, periodontal hastalığın ilerlemesinde anahtar rol oynarlar. Doku içerisinde lipopolisakkarit (LPS) ile aktif hale geçen makrofajlardan bir grup sitokin ve yüzey reseptörü salgılanır. Bu ürünler patojeni direkt olarak hedef alan, antijene özgü immün cevabı başlatır ve enflamatuvar yanıtı şiddetlendirir.

Başlangıç immün yanıtı ilave olarak harekete geçen kazanılmış immün sistem ise vücut hücrelerini istenmeyen istilacılardan ayırdedebilme özelliğine sahiptir. Etken patojenlere karşı konakta gelişen spesifik bir cevap olduğu için, daha etkilidir. Kazanılmış immün sistemin en önemli görevleri; antijen sunumunda antijenleri tanımak, spesifik patojenlerin ortamdaki uzaklaştırılmasına yönelik bir cevap geliştirmek ve bir sonraki enfeksiyonlarda patojenlerin antijen işaretlerini hatırlamaktır. T ve B lenfositler bu sistemin en önemli hücreleridir. Bir hasar oluştuğunda T ve B lenfosit proliferasyonunda artış olur. Antijen ve yoğun sitokin varlığında bu hücreler genişleyip çoğalarak CD4+ ve CD8+ T hücrelerini oluştururlar.⁸¹ Antijenik stimulasyondan sonra

aktive olan CD4+T hücreleri yardımcı T hücre 1 (Th1) ve 2 (Th2) olmak üzere farklı etkilere sahip iki hücre grubuna ayrılır. Yardımcı T1 hücreler, ağırlıklı olarak hücrel immün yanıtı kontrol ederken; ikincil olarak da B lenfositlerin ve plazma hücrelerinin baskılanmasında görev alır. T1 tip fenotip, karakteristik olarak hücrel immünite ile ilişkili ve proinflatuar özelliklere sahip iken Th2, humoral immünite ile ilişkilidir ve antiinflatuar özellik gösterir. Th2, B hücreleri indükler ve ikincil fonksiyon olarak da T hücre ilişkili cevapları baskılar, ayrıca mikroorganizmaların eliminasyonunda görev alırlar. T ve B hücreler, makrofajları destekleyerek ve öldürücü hücre oluşumuna yardım ederek immün cevabı artırır.^{74, 82}

B hücreleri ise antikor sentezleyen plazma hücrelerine dönüşür. Diş eti oluşu veya cep duvarında biriken çok sayıda plazma hücresi bakterilere özgü spesifik antikorlar üreterek bakteri fagositozuna neden olur.⁸¹

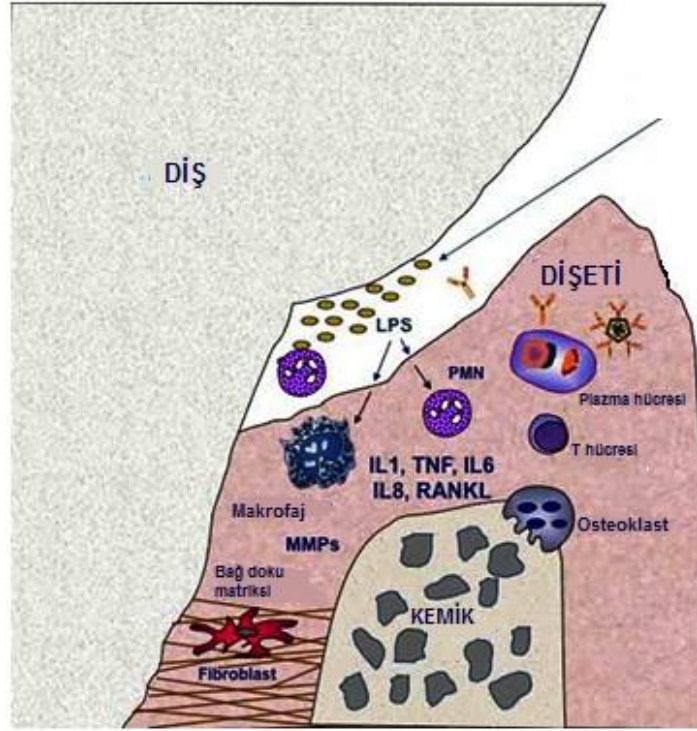
Enfeksiyona karşı immün cevap sitokin ve kemokin sinyalleriyle düzenlenir. Sitokinler enflamasyonun başlangıcında ve ilerleyen safhalarında yer alırlar. Sitokinler enflamasyonun akut ve erken kronik fazında fibroblastlar, epitelial hücreler ve fagositler tarafından, yerleşmiş ve ilerlemiş lezyonda ise lenfositler tarafından üretilir.⁵ Proenflatuar sitokinlerin salınımına önderlik eden genetik düzenleme genellikle NF- κ B transkripsiyonuna bağlıdır.⁷¹ NF- κ B ailesi pek çok immün ve enflatuar cevabı kontrol eden çok çeşitli gen ekspresyonunun koordine edilmesinde merkezi bir role sahip olup, hücrel seviyede enflamasyon için en önemli tetikleyici olarak gösterilmektedir.⁸³ Mikroorganizmaların uygun hücrelere tanıtılmasının ve sunulmasının ardından doğal immüitenin sitokinleri olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 periodontal patogeneizde görülen ilk sitokinlerdir.⁷ Bu sitokinler enflatuar hücre migrasyonu ve osteoklastogenezisten sorumludur.⁷¹

Prostaglandin E2 (PGE2) alveoler kemik rezorpsiyonuna yol açan etkili bir stimulatördür. Esas olarak makrofaj benzeri hücrelerde lokalize olan PGE2, LPS'ler tarafından uyarıldığında salınır. IL-1 β , TNF- α ve paratiroid hormon uyarısı PGE2 salınımını artırır, bu da alveoler kemik yıkımında artışa sebep olur.⁷¹

MMP'ler ise ekstraselüler matriksteki ya da hücre plazma membranındaki proteinlerin yıkımından sorumludur. Fibroblastlar, keratinositler, nötrofiller, makrofajlar ve endotelial hücreler MMP'lerin ana kaynağıdır. Çok sayıda in vitro çalışma IL-1 β , TNF- α , PGE2 ve bakteri ürünlerinin MMP'lerin üretimini düzenlediğini göstermiştir.¹

TNF ligand ve reseptör ailesinin üç anahtar molekülü olan OPG, RANK ve RANKL, hormonlar ve sitokinlerle beraber kemik rezorpsiyonundan sorumlu diğer proteinlerdir.⁸⁴

Sonuç olarak, periodontal hastalıklarda mikrobiyal etiyolojik faktörler enflamatuvar olaylara aracılık eden bir dizi konak cevabını uyarırlar. Fizyolojik enflamasyonda hücreler, mediyatörler ve dokular arasındaki bu ilişki iyi bir şekilde düzenlenmiştir. Ancak duyarlı bireylerde enflamatuvar ve immün yanıt arasındaki dengesizlik kronik enflamasyon, doku hasarı ve hastalıkla sonuçlanır. Bu yüzden enflamatuvar ve immün cevabı bir bütün olarak değerlendirmek gerekir. Bu bakımdan doku yıkımına sebep olan kompleks olayların anlaşılması geliştirilecek tedavi stratejiler açısından büyük önem taşımaktadır.⁷¹



Şekil 2.1. Periodontal hastalık patogenezinde yer alan immünolojik faktörler.⁸⁵

2.6. Periodontal Hastalıklarda Sitokinlerin Rolü

Sitokinler hücresel büyüme, enflamasyon, immünite, doku onarımı ve hematopoez gibi önemli biyolojik olaylarda rol oynayan, düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir.⁶ Sitokinler epitelyal hücreler, fibroblastlar, fagositler (nötrofil ve makrofaj) ve lenfositler tarafından üretilir.⁵ Sitokinler, immünitinin ve enflamasyonun başlamasıyla ilişkili olup, konak cevabının şiddetini ve süresini düzenler. Sitokinler genellikle geçici olarak üretilen, oldukça potent, pikomolar konsantrasyonlarda fonksiyon gören ve spesifik hücre reseptörleri ile etkileşime giren moleküllerdir.⁸⁶ Belli bir sitokin, çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır fakat aynı biyolojik etkiyi gösterir. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Sentezlendikleri hücreler üzerine gösterdikleri etki otokrin, belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin komşu hücreye etki etmesi parakrin, kana veya çeşitli hücresel sıvılara salgılanıp, vücudun

diğer bölgelerindeki hücresele reseptörlere bağlanarak gösterdiği etki endokrin etki olarak isimlendirilir.⁸⁷

Sitokinlerin bir kısmı (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF) proenflamatuar fonksiyonlara sahipken, bir kısmı (interlökin-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra), IL-4, IL-10, IL-11 ve TGF- β) da antienflamatuar fonksiyonlara sahiptirler. Sitokinler gingivitis ile ilgili iltihabi cevapta, periodontal hastalıklarda doku yıkımında ve adaptif immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proinflamatuar sitokinlerin, periodontal hastalıkların önemli göstergelerinden biri olan alveolar kemik yıkımını arttırmaları sebebiyle, patogeneze sürecindeki rolleri özellikle dikkat çekici olmuştur.^{7, 88} Yapılan pek çok çalışmada, periodontitisli hastaların dişeti oluğu sıvısında (DOS) artmış IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyeleri gösterilmiştir.⁸⁹⁻⁹¹

2.6.1. İnterlökin-1

IL-1, doku homeostazı, doku yıkımı ve immün-enflamatuar yanıtta geniş aktivitesi ve rolü olan bir polipeptiddir.⁹² IL-1; hücre metabolizması, immün ve enflamatuar reaksiyonlar üzerinde hem lokal hem de sistemik etkilere sahiptir. IL-1 ailesi üç ligand (IL-1 α , IL-1 β ve IL-1Ra) ve iki reseptör (tip I ve tip II) içerir. IL-1 sitokin ailesi üyelerinden interlökin 1 alfa (IL-1 α) ve IL-1 β agonist aktiviteye sahiptir. IL-1Ra, diğer iki IL-1 molekülüyle fizyolojik olarak antagonist etki gösterir.⁹³ IL-1 α ve IL-1 β 'nın her ikisi de 17 kDa molekül ağırlığında glikoprotein yapısındadır. Yapısal olarak polipeptitlerle ilişkili olan bu iki form, aminoasit düzeyinde yaklaşık olarak %27 homoloji göstermektedir. IL-1'in bu iki formu ortak biyolojik özelliklere sahiptir; ancak IL-1 β , genel olarak IL-1 α 'dan 10-50 kat daha fazla üretilir ve daha güçlü proinflamatuar özelliklere sahiptir.⁹⁴

Mikroorganizmalar, endotoksin ve ekzotoksin gibi mikrobiyal ürünler yoluyla konak hücrelerinden IL-1 salınımını uyarır. IL-1, aktive edilmiş mononükleer fagositlerden, dokuda bulunan monosit, makrofaj, lenfosit, nötrofil, fibroblastlar, endotelyal hücreler, epitelyal hücreler, astrositler ve osteoblastlar tarafından sentezlenir.⁹⁵ IL-1, nötrofil akümüasyonu ve nötrofillerin damar duvarına adezyonu gibi erken lokal inflamatuvar cevapta kritik olayları yönlendirir Doğal ve kazanılmış immün cevapta rol oynayan antijen sunucu T ve B hücreleri direkt ya da dolaylı yolla IL-1 tarafından uyarılır. Aynı şekilde T hücreleri de IL-1 salınımını yönlendirerek immün yanıtı şiddetlendirir ya da baskılar.⁹⁶ IL-1'in in vitroda ve in vivo da güçlü bir kemik rezorpsiyon uyararı olduğu gösterilmiştir.⁹⁷ IL-1'in kemik rezorpsiyonunu indüklediği mekanizmalardan birinde, stromal/osteoblastik hücrelerde RANKL'ı upregüle ederek kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirdiği görülmektedir.⁹⁸

IL-1 ligandlarından biri olan IL-1 α , osteoklastlar üzerine direk etki göstererek, osteoklastların yaşam süresini uzatır. IL-1 α , büyük oranda hücre membranı ile ilişkilidir ve nekroz, apoptozis gibi hücre devamlılığının bozulduğu durumlarda salınır. IL-1 β ise inaktif öncü protein olarak sentezlenir ve kaspaz-1 enzimi vasıtasıyla aktif forma dönüşür.^{99,100} Enflamatuvar doku yıkımıyla ilişkili olan IL-1 β ise; T lenfositleri ve sitokinleri stimüle ederek, B lenfositlerin proliferasyonunu ve antikör üretimini ve fibroblast proliferasyonunu sağlar. PGE2 stimülasyonu ve MMP'lerin salınımından da sorumludur. Ayrıca osteoklast ve kemik rezorpsiyonunu, nötrofil kemotaksisini ve aktivasyonunu, endotelyal hücre fonksiyonunu sağlayan bir sitokindir.¹⁰¹

2.6.2. İnterlökin-6

IL-6 uyarılmış monositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler, T ve B lenfositler tarafından üretilen pleiotropik bir sitokindir.¹⁰² Yaralanma ve enfeksiyona karşı konak cevabında önemli bir role sahiptir. IL-1, TNF- α , bakteriyel ürünlerin varlığında ve viral

enfeksiyona karşı gelişen cevapta yüksek konsantrasyonlarda üretilir.¹⁰³ Bu sitokin; makrofaj ve T hücrelerinin farklılaşması/aktivasyonu, B hücre farklılaşması ve gelişimi, hematopoezin uyarılması ve sinir farklılaşması gibi çeşitli etkilere sahiptir. IL-6, aynı zamanda akut enflamatuvar cevabın sınırlanmasında, negatif feedback sağlamak ve TNF üretimini inhibe etmek gibi düzenleyici etkilere de sahiptir.^{104, 105} IL-6, kemik rezorpsiyonunun otokrin ve parakrin mediyatörü olup, öncü hücrelerden osteoklastların gelişimini stimüle eder. IL-6, etkili bir kemik rezorbe edici olan IL-1'in etkileri için de bir mediyatör olarak görev yapar. Ancak buna zıt olarak, IL-6, IL-1Ra ve TNF- α çözülebilir reseptörü indükleyerek, IL-1 ve TNF- α üretimini inhibe edebilme yeteneğine sahiptir. Böylece IL-6, bu sitokinlerin proenflamatuvar etkilerinin dengelenmesinde önemli rol oynamaktadır.¹⁰⁶ Artmış IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin periodontitiste periodontal patojenler tarafından yükseldiği ve kemik kaybıyla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁰⁷

2.6.3. Tümör Nekroz Faktör Alfa

TNF- α ; enfeksiyonu frenlemeye yardım eden lokal enflamatuvar cevabın uyarandır, ancak aynı zamanda zararlı olabilecek sistemik etkilere de neden olabilir. Proenflamatuvar sitokin grubunda yer alan bu protein; enflamatuvar lökositlerin aktivasyonu, damar geçirgenliğinin değişmesi ve kemik rezorpsiyonundan sorumludur. IL- β ile beraber IL-6'nın temel uyarandır.¹⁰⁸ Fibroblastlardan kollajenaz salınımını, kıkırdak ve kemik yıkımını indükleyerek periodontitisteki doku yıkımında rol oynar.¹⁰⁹ TNF- α , makrofajlardan IL-1 ve PGE2 sentezini indükler. Bunun sonucunda osteoklastlar aktive olur ve kemik yıkımı indüklenir.¹¹⁰ Yapılan çalışmalarda TNF- α seviyesinin, hastalıklı periodontal dokularda ve DOS'ta yüksek seviyelerde bulunduğu ve MMP ve RANKL ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur.^{7, 12, 111}

2.7. Nükleer Faktör Kappa B ve Aktivasyon Mekanizması

NF- κ B, DNA transkripsiyonunu kontrol eden bir protein kompleksidir ve hemen hemen tüm hayvan hücre tiplerinde bulunur.¹¹² NF- κ B aktivitesi inhibitör kappa B (I κ B) ailesi üyeleriyle direk ilişkilerle düzenlenir. Uyarılmamış hücrelerin sitoplazmasında, I κ B inhibitör proteinleri non-kovalent etkileşimler yoluyla NF- κ B alt ünitelerini ayrı ayrı halde tutar ve böylece NF- κ B'nin sitoplazmada inaktif olarak kalmasını ve çekirdeğe geçmesini engeller.¹¹³ RANKL, stres, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole ışın, okside LDL ve bakteriyel ya da viral antijenler gibi uyarılara karşı oluşacak cevapta hızlı bir şekilde aktive olur ve çekirdeğe geçer. Hücre içi aktivasyonunu takiben DNA'da kendisine özel sahalara bağlanan NF- κ B başta TNF α ve IL-1 β gibi sitokinler olmak üzere, büyüme faktörlerini, kemokinleri, MMP gibi proteinazları veya hücrel reseptörleri kodlayan pek çok genin ekspresyonunu düzenler ve böylece uyarılara karşı hücrel cevabı modüle eder. Ayrıca enfeksiyona karşı immün cevabın düzenlenmesinde anahtar rol oynayan NF- κ B, özellikle pro-enflamatuar sitokinlerin primer uyarıcısı olarak kabul edilir.^{66, 114}

2.8. RANK/RANKL/OPG' nin Alveoler Kemik Yıkımındaki Rolü

2.8.1. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B

RANK, 616 aminoasitten oluşan bir transmembran proteinidir. Osteoklastik öncü hücreler, B ve T hücreleri, dendritik hücreler ve fibroblastların da dahil olduğu monosit/makrofaj sisteminde bulunur.¹¹⁵ RANK esas olarak iskelet kaslarında, timüste, karaciğerde, kolonda, ince bağırsakta, adrenal bezde, osteoklastlarda, meme bezi epitelyal hücrelerinde, prostatta ve pankreasta eksprese edilir. Enfeksiyona karşı immün cevabı düzenlemede anahtar rol oynayan NF- κ B'nin aktivasyonu en çok RANKL aracılığıyla olur ancak RANK'ın aşırı ekspresyonu NF- κ B yolağını aktive etmek için yeterli bir uyarandır.¹¹⁶ RANK, osteoklastogenezis ve kalsiyum metabolizmasını

kontrol eder ve preosteoklastlara RANKL'ın bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. RANKL ve RANK reseptörü arasındaki bu bağlanma, osteoklast formasyonu ve aktivasyonunu indüklemektedir.¹⁴

2.8.2. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand

Kemik kütlesi osteoblast ve osteoklastların birlikte çalışması ile belirlenir. Osteoblastlarda bunu belirleyen temel iki yolak ise RANKL/RANK ve Wnt/ β -katenin sistemidir.¹¹⁷ Normal ve patolojik durumlarda kemik yıkımının anahtar mediyatörü olan RANKL, TNF ligand ailesinin bir üyesidir. RANKL, osteoblastik, stromal, aktive olmuş B ve Thücreleri tarafından üretilir.^{118, 119} RANKL; osteoklast formasyonu, füzyonu, aktivasyonu ve sürekliliği için temel faktördür, bu da kemik rezorpsiyonu ve kaybına sebep olur.¹²⁰ RANKL, osteoklastlar ve dentritik hücrelere lokalize olmuş reseptörü olan RANK'ı ve sinyal zincirini aktive eder.¹⁴ Etkileri bir tuzak reseptörü olan OPG ile engellenmektedir.¹²¹

Alternatif yapıştırmayla çözünür iki izoformu oluşur: 1) Tip II membran proteini (mRANKL) 2) Sitoplazmik ve transmembran yapısından yoksun salgı molekülü (sRANKL). Her iki form da bioaktif olmasına rağmen mRANKL bağlantısı homeostatik gibi görünürken, sRANKL sinyal üretimi patolojik ya da nonfizyolojiktir.¹²² Ayrıca RANKL osteoblastik hücreler tarafından üretilirse mRANKL, aktive olmuş T hücreler tarafından üretilirse sRANKL oluşur.¹²³

RANKL sentezi hormonlar (1,25-dihidroksi vitamin D3 gibi), büyüme faktörleri ve peptidler (TGF- β 1, fibroblast büyüme faktörü-2 ve PTH ilişkili protein), sitokinler (IL-1 β , IL-6, IL-11 ve TNF α) ve glukokortikoidler gibi pek çok faktör tarafından düzenlenir. Ayrıca osteoblast/stromal hücrelerde RANKL sentezi, osteoklast oluşumu ve aktivasyonunu uyaran faktörler ile de uyarılır.^{116, 123, 124}

2.8.3. Osteoprotegerin

1997 yılında iki farklı araştırma grubu tarafından, kemik yıkımını engelleyen ve OPG olarak isimlendirilen yeni bir protein bulunmuştur. TNF reseptör ailesinin bir üyesi olan OPG, osteoblastlar ve kemik iliği hücreleri tarafından salgılanan bir glikoproteindir.^{84, 115}

OPG, RANKL'a yüksek afinite ile bağlanabilen bir tuzak reseptörü olarak görev yapar. Çözünebilir bir moleküldür ve RANKL'ın RANK a bağlanmasına engel olur. Böylece osteoklast diferansiyasyonu ve kemik rezorpsiyonunu engeller.¹²⁵ Yani hipokalsemik ve antiresorptif etkilidir. OPG, osteoblastlar dışında kardiyovasküler sistem (kalp, arter ve venler) dahil, böbrek, karaciğer, dalak, beyin, akciğer ve kemik iliği gibi pek çok doku, hematopoetik ve bağışıklık sistemi hücreleri tarafından sentezlenir.^{123, 124, 126, 127}

Osteoprotegerinin kemik dokudaki etkilerinin haricinde, immünolojik yanıtın düzenlenmesinde de rolü vardır. OPG, dentritik hücreler ve T hücreleri arasındaki RANK-RANKL bağlantısında rol oynayarak, dentritik hücrelerin immünostimülatör kapasitelerinin ve T hücre proliferasyonunun artmasını sağlar.¹²⁸ OPG, etkili antikor yanıtın oluşmasında ve B hücrelerin olgunlaşmasında da önemli role sahiptir.¹²⁹ OPG sentezi lokal ya da sistemik olarak hormonlar, bakteriyel ve enflamatuar ürünler tarafından düzenlenir.¹³⁰

Kemik iliği hücrelerinin sentezlediği OPG'nin yaşla azaldığı görülmüştür.¹³¹ Tüm bu bilgiler ışığında kemik remodelasyonunun RANK-RANKL bağlantısı ve osteoprotegerin arasındaki denge tarafından kontrol edildiğini söylemek mümkündür.

2.9. Kemik Dokusu ve Metabolizması

2.9.1. Normal Kemik Dokusu

Kemik dokusu ekstraselüler matriks ve hücrelerden oluşan dinamik bir yapıdır. Histolojik olarak incelendiğinde önemli ölçüde damarlanmaya ve innervasyona sahip, mineralize kollajen çatısı olan özelleşmiş bir bağ dokusudur.¹³²

Kemik dokusunun görevleri; bedensel hareketleri ve normal postürü sağlamak, beyin ve spinal kord gibi önemli yapıları korumak, başta kalsiyum ve fosfor olmak üzere birçok mineral için depo görevi görmek, hematopoezde ve immün sistem fonksiyonlarında görev almaktır.¹³³

Kemik dokusunun %35'i organik %65'i de inorganik moleküllerden oluşur. Organik matrikste tip I kollajen baskındır (%90) ve az miktarda da osteokalsin, glikoprotein ve proteoglikan gibi kollajenöz yapıda olmayan proteinler bulunur. %2'sini de kemik hücreleri oluşturur. Organik matriks kemiğin mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin belirleyicisidir. Büyüme faktörleri, sitokinler, osteopontin, osteokalsin, osteonektin, kemik sialoprotein, proteoglikan gibi ekstraselüler matriks proteinleri, fosfoproteinler ve fosfolipidler total kemik volumünün çok az bir kısmını oluşturmalarına rağmen, kemiğin biyolojik fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır.¹³⁴ İnorganik yapı temel olarak kalsiyum, fosfat, az miktarda bikarbonat, magnezyum, sitrat, potasyum ve sodyum içerir. İnorganik kalsiyum ve fosfat, organik matriksin mineralizasyonunu sağlayan hidroksiapatit kristallerini meydana getirir. Kalsiyum hidroksiapatit kristalleri $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ inorganik yapının %95'ini oluşturur. Hidroksiapatit kristalleri tip I kollajen boyunca belli bir düzende yerleşmiştir. Vücudun en sert ve sağlam dokularından biri olan kemiğe bu özelliğini, hidroksiapatit kristalleri ile kollajen doku arasındaki bu ilişki sağlar.¹³⁵

Makroskopik olarak kemiğin dış kısmına kortikal veya kompakt kemik, iç kısmına ise trabeküler, spongiyöz veya kansellöz kemik denir. İskeletin %80'ini kortikal kemik, %20'sini ise trabeküler kemik oluşturur. Kortikal kemik mekanik ve koruyucu bir fonksiyon sağlarken, trabeküler kemik metabolik fonksiyondan sorumludur.¹³³

2.9.2. Kemik Remodelasyonu

Kemik remodelasyonu hayat boyu devam eden, olgunlaşmış kemiğin yerini yeni oluşan kemiğin aldığı bir döngüdür. Remodelasyon olayı kemik matriksinin osteoklastlar tarafından yıkıldığı ve yerine yeni dokunun osteoblastlar tarafından yapıldığı iki olay tarafından yönetilir. Sağlıklı bireylerde rezorpsiyon ve formasyon olayı bir denge içerisinde. Eğer denge rezorpsiyon lehine bozulursa yıkıcı kemik patolojileri gözlemlenir.¹³⁰ Alveoler kemikte de vücudun diğer kemik dokularında görüldüğü gibi bir remodelasyon olayı gözlenir. Alveoler kemikte remodelasyon olayı; oklüzal kuvvetler, diş erüpsiyonu ve ortodontik müdahaleler gibi fizyolojik durumlarda ya da periodontitis ve periapikal hastalıklar gibi patolojik durumlarda gözlenir. Bakteriyel ürünler ve enflamatuvar sitokinler tarafından oluşturulan osteoklast ve osteoblast aktivitesi arasındaki dengenin bozulması, enflamasyon kaynaklı alveolar kemik yıkımının temel sebebidir.¹⁶ Kompleks enflamatuvar sinyaller ve sitokin ağları; RANKL, IL-1 β , IL-6, TNF- α ve PGE2 yollarıyla osteoklastogenezisi düzenler.¹³⁶

Önceleri osteoklast formasyonunun osteoblastlar ve kemik iliği hücreleri tarafından oluşturulduğu düşünülürken, günümüzde yapılan son çalışmalara göre kemik yapım-yıkımının kontrolünde TNF ailesine bağlı RANKL, reseptörü RANK ve OPG tanımlanmıştır.^{137, 138}

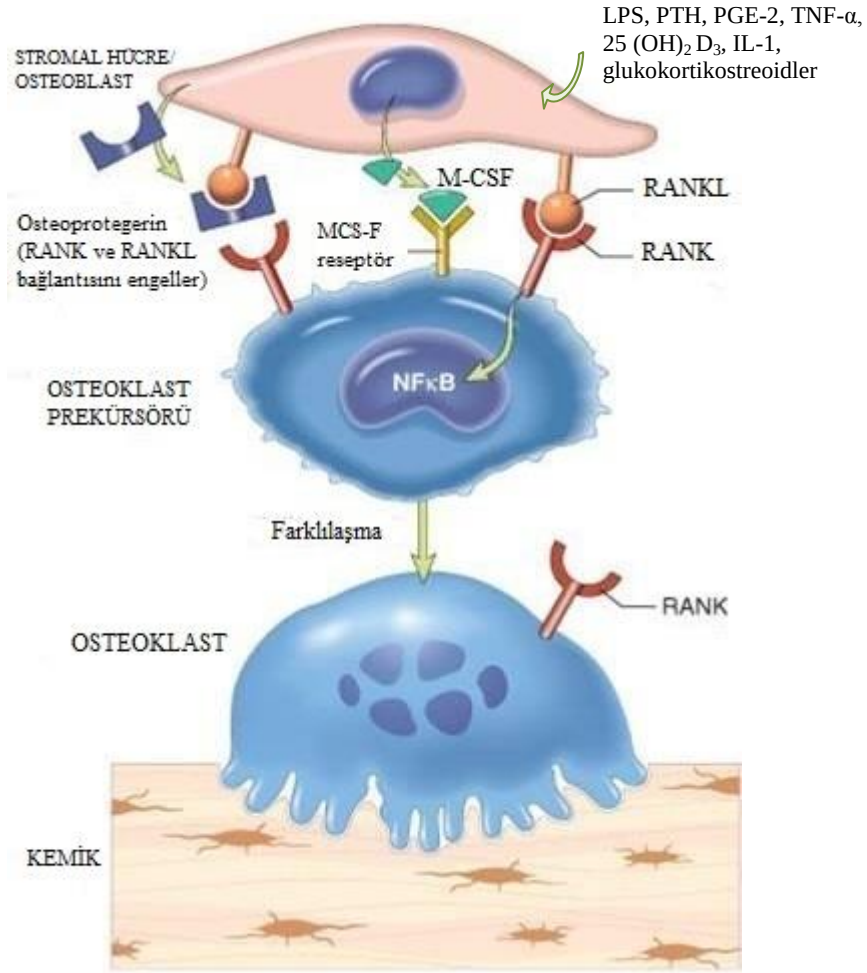
Kemik yapım-yıkımının bozulduğu patolojilerde OPG-RANKL dengesizliği görülmektedir.^{15, 121, 139} Son çalışmalarda ise OPG/RANK/RANKL üçlüsünün immün ve vasküler sistemin kontrolünde önemli olduğu ortaya çıkmıştır.^{139, 140}

Kemik remodelasyonunun, mekanik yüke göre kemik kütlesini ayarlama ve hasar olan yeri onarma gibi iki önemli fonksiyonu vardır. Mineralize doku içerisinde hasara duyarlı osteositler, bu bilgiyi osteoblastik döşeyici hücrelere ulaştırırlar ve bu hücrelerden sitokinler salgılanır. Bu sitokinlerin etkisiyle osteoblastik öncü hücrelerin yüzeyinde RANKL oluşur. RANKL, RANK ile birleştiğinde osteoblast öncü hücrelerinden salgılanan makrofaj koloni uyarıcı faktörün (M-CSF) de aracılığıyla preosteoklastlarda farklılaşma ve aktivasyon sonucu olgun osteoklastlara dönüşüm sağlanır.¹⁴¹ Olgun osteoklastlar oluşunca kemik yüzeyindeki integrinlere bağlanarak kemik yıkımı başlar.

Osteoklast uyarılması ile eş zamanlı olarak osteoblast öncü hücrelerinden OPG salgılanır ve RANKL'a bağlanmak için RANK ile yarışır. Bu yarışma sonucunda OPG RANKL'a bağlanırsa RANKL'ın neden olduğu osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu engellenmiş olur.¹²⁵

Kemik yıkım aşaması 3 hafta sürer ve kemik lakünaları tamamlandığında olgun osteoklastlar ya apoptozise giderler ya da başka bir remodelasyon alanına göç ederler. Formasyon fazı ise 3-4 ay sürer.^{134, 142} Kemik formasyonu ilkel mezenşimal hücrelerin osteoblast prekürsör hücrelere farklılaşması, osteoblast maturasyonu, matriks formasyonu ve nihayetinde de mineralizasyonu içeren çok sayıda olaylar zinciriyle sonuçlanır. Osteoblastlar rezorpsiyon kavitesiyle birleşerek, 13 gün sonra günde 1µm olacak şekilde osteoid oluşturmaya başlar. Rezorpsiyon boşluğu dolana kadar da osteoblastlar mineralize osteoid oluşturmaya devam eder.¹⁴³ Kemik remodelasyon oranı mekanik stres, sistemik hormonlar, lokal faktörler (sitokin ve büyüme faktörleri) gibi

durumlardan etkilenir. Kemik yapım ve yıkım markırları da remodelasyonun farklı safhalarındaki bu değişikliklerden etkilenir ve remodelasyon süreci hakkında bilgi verir.¹³⁵



Şekil 2.2. Öncül osteoklastın olgun osteoklasta farklılaşmasında OPG, RANK ve RANKL'in rolü ve kemik yıkımı.

*LPS'ler gibi kemik yıkımını stimüle eden faktörler, osteoblastlar üzerindeki membran ilişkili bir faktör olan RANKL'in salınımını indükler. Osteoblastlar yapısal olarak makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) üretirler. Osteoklast öncüleri ise RANK ve M-CSF reseptörlerini açığa çıkarır. Öncü hücreler osteoblastlarla olan hücre-hücre etkileşimi aracılığıyla RANKL'ı tanır ve M-CSF varlığında osteoklastlara farklılaşırlar. Olgun osteoklastlar ise RANK açığa çıkarırlar ve RANKL ile olan etkileşim direkt olarak osteoklastların kemik rezorbe edici aktivitesini indükler. OPG ise RANKL'ın RANK'a bağlanmasını engelleyerek kemik rezorpsiyonuna engel olur.¹⁴⁴

2.9.3. Kemik Turnover Markırları

Biyokimyasal markırlar; kemiğin yeniden şekillenmesindeki karmaşık süreç ışık tutarak, metabolik kemik hastalıklarının teşhis ve tedavisinde yönlendirici rollere sahiptir. Kemik markırları yapım ve yıkım markırları olmak üzere iki gruba ayrılır. Bazı markırlar ise her iki aktiviteyi göstermede kullanılır. Kemik yapım markırları osteoblastik hücreler tarafından üretilir ve prokollajen metabolizmasından köken alır. Yıkım markırları ise osteoklastların ya da kollajenin yıkım ürünleridir.¹⁹ İdeal bir kemik markırının ise; kemik dokusuna özgün olması, analiz edilebilmesi için kesin ve açık bir laboratuvar metoda sahip olması gereklidir.¹³⁵

2.9.3.1. Kemik Yapım Markırları

1.Prokollajen Tip I

a) Prokollajen I-C Terminal (PICP)

b) Prokollajen I-N Terminal (PINP)

2. Total alkalen fosfataz

3. Kemik spesifik alkalen fosfataz (BALP)

4. Osteoklasın

5. Kemik sialoprotein

6. Osteonektin

2.9.3.2. Kemik Rezorpsiyonunu Gösteren Markırlar

1. Kollajen kaynaklı

- Hidroksiprolin
- Hidroksilizin-glikozidleri
- Pridinolin
- Deoksipridinolin
- Tip I kollajen karboksiterminal crosslinked telopeptit (CTX)

- Tip I kollajen aminoterminal crosslinked telopeptit (NTx)
- Kollajen I alfa I helikoidal peptit

2. Non-kollajen proteinler

- Kemik sialoprotein
- Osteokalsin fragmanları

3. Osteoklast enzimleri

- Tartarat rezistan asit fosfataz
- Katepsin K
- RANK

Kemik Alkalen Fosfataz (KALP)

Alkalen fosfataz (ALP) hücrelerin plazma membranlarıyla ilişkilidir. Bu enzimin görevi tam olarak bilinmese de genel bir doku dağılımına sahiptir. Hücre membranından maddelerin intraselüler bölümden ekstraselüler bölüme geçmesini sağlar. Kemikte ALP, pirofosfatın yıkımında yer alır ayrıca ekstraselüler seviyede kalsiyum fosfatın güçlü bir inhibitörüdür.¹⁴⁵ Enzim mekanik olarak membranda kırılarak dolaşıma salınır. ALP'nin dolaşımda intestinal, plasental, germ hücreleri ve nonspesifik formu olmak üzere 4 adet izoformu bulunur. Doku non-spesifik ALP geni, ALP'nin böbrek, karaciğer ve kemik izoformlarını kodlar. Bu izoformlar aynı gen tarafından kodlanmasına rağmen posttranslasyonel modifikasyon nedeniyle izoenzimler arasında farklılıkların oluşmasına sebep olur.^{146, 147} Çocukluk ve adolesan dönemde KALP izoenzimi baskınken, yetişkinlik döneminde karaciğer izoenzimi baskındır.¹⁴⁸ Total alkalen fosfataz (TALP) kemik hastalıklarını takip etmek için kullanılmasına rağmen, bu enzimin diğer kaynakları klinik yorumlamalarda karışıklıklara sebep olabilir bu yüzden KALP 'nin TALP'den ayrılarak değerlendirilmesi gerekir.¹⁴⁹

KALP osteoblastlar tarafından üretilir ve matriks veziküllerinde hücre membranından kaynaklanan tomurcuklar şeklinde birikir. Bu depozitlerin kemik formasyonu sürecinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. KALP, kemik döğüsünün yapım safhasında oldukça yüksek miktarlarda üretilir bu yüzden de kemik yapım aktivitesi açısından mükemmel bir indikatör olarak kabul edilir.^{17, 18} Klinik olarak KALP değerleri kemiğin metabolik aktivitesini yansıttığı için tedavi gören hastaların takip edilmesinde işe yarar ölçümlerdir,^{17, 18, 150-152} ayrıca kemik yapımının değerlendirilmesinde kullanılan KALP tahlilleri genelde TALP'ye göre daha hassas ve daha spesifik tahlillerdir.^{153, 154}

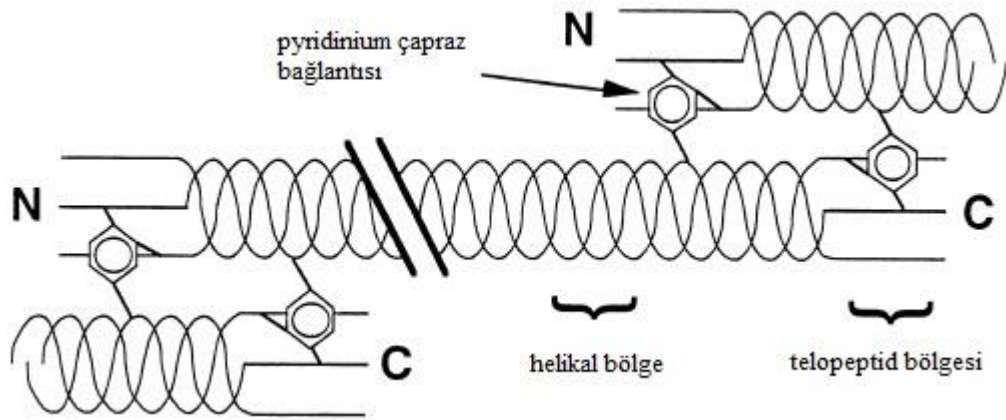
Tip I Kollajenin Çapraz Bağlanmış Telopektitleri

Organik kemik matriksinin %90'ından fazlası kemik içinde sentezlenen tip I

kollajenden oluşur. Kemikte temel yapının düzenlenmiş anabolizması ve katabolizması vardır. Normal kemik metabolizması sırasında, olgun tip I kollajen parçalanır ve küçük fragmanları seruma geçip idrar ile atılır. Fizyolojik veya patolojik olarak artmış kemik rezorpsiyonunda tip I kollajende meydana gelen parçalanma kanda kollajen fragmanlarının seviyesinde orantılı bir artışa sebep olur.¹⁵⁵

Tip 1 kollajenin telopeptitleri kemik rezorbsiyon markırları içerisinde en çok çalışılan ve kullanılan markırlardan biridir. Kollajen molekülünün amino terminal ve karboksil terminal uçlarında, helikal olmayan, sırasıyla N-telopektit (NTx) ve C-telopektit (CTx) olarak adlandırılan bölgeler bulunur ve bu bölgelerin her biri, komşu molekülün helikal bölgesine piridinium çapraz bağları ile bağlanmaktadır

Rezorpsiyon aşamasında osteoklastların kemiği parçalamasıyla, tip I kollajenin N-telopektitler ve C-telopektitlerini de içeren farklı uzunluktaki fragmanlar, metabolize edilmek veya idrarla atılmak üzere ortama verilirler.



Şekil 2.3. Kollajen fibrillerin komşu fibrillerin helikal bölgelerine pyridinium çapraz bağlantılarla bağlanan helikal olmayan karboksiterminal ve aminoterminal uçları ¹⁹

Tip I Kollajenin C-Terminal Ucu Telopektidi

CTx fragmanları kemik yıkımı sürecinde tip 1 kollajenin osteoklastlar tarafından yıkılması sonucu dolaşıma salınır. Bu fragmanlar kemik için oldukça spesifikdir çünkü osteoklastlar deri gibi tip-1 kollajen içeren diğer dokularda aktif değildir.¹⁹ CTx, katepsin K aktivitesi tarafından meydana getirilir.²⁰ C- terminal telopektidlerde bulunan α -aspartik asit kemik yaşlandıkça aspartik asidin β -formuna (β -CTx) dönüşür. CTx rasemizasyon ve izomerizasyon olarak adlandırılan post-translasyonel değişimlere maruz kalır. Bu süreçler CTx in 4 izomerinin oluşmasına sebep olur. Bunlardan biri doğal (α -L) formudur. Yaşa bağlı diğer üç formu ise izomerize form ($\hat{\alpha}$ -L), rasemize form ($\hat{\alpha}$ -D) ve izomerize/rasemize ($\hat{\alpha}$ -D) formudur. Bu izomerlerin oranı kemik turnover hakkında bilgi vericidir. Artmış α CTx/ $\hat{\alpha}$ CTx oranı hızlandırılmış kemik turnoverıyla ilişkilidir. Bu durum özellikle Paget's hastalığına sahip kişilerde, hızlı kemik yıkımı olan postmenopozal kadınlarda ya da kemik metastazlarında tanımlanmıştır.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Yapılan çalışmalarda CTx' in kemik metastazı olan hastaların teşhisinde,¹⁵⁹ osteoporoz ¹⁶⁰ ve postmenopozal kadınlarda osteoporotik kırık riskinin belirlenmesinde,

¹⁶¹ osteoporoz ve Paget's hastalarına uygulanan biofosfonat tedavisinin etkinliğinin incelenmesinde ¹⁶² kullanıldığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan bazı insan ve hayvan çalışmalarında CTx, periodontitiste alveoler kemik rezorpsiyonunun değerlendirilmesinde yıkım markırı olarak kullanılmıştır.¹⁶³⁻¹⁶⁹

CTx in değerlendirilmesinde kullanılan geçerli analitik metodlar Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), radio immün test ve elektrokemilüminesans tahlilleridir.¹³⁵ CTx ölçümü, 24 saat toplanan ve sabahın erken saatlerinde verilen idrar örneklerinde ayrıca da serumda yapılabilir. Zamanlama örneklerin toplanması açısından oldukça önemlidir çünkü CTx' te dikkat çekici sirkadyan değişimler saptanmıştır. Daha önceki çalışmalar aç karnına yapılan tahlillerin bu değişimleri azalttığını göstermiştir. Bu yüzden klinik kullanımda, sabah saatlerinde aç karnına tahlil verilmesi uygundur.¹⁷⁰

171

2.10. Periodontal Tedavide Konak Modülasyonu

Gingival enflamasyonun başlaması ve sonrasında gelişen periodontal doku yıkımında MDP'nin varlığı önemli olmakla birlikte, MDP'nin tek başına hastalık oluşturma üzerine etkisi oldukça azdır (%20).¹ Bakteriyel hasara karşı gelişen konak cevabında açığa çıkan sitokin, lipit ve MMP gibi enflamatuar mediyatörler periodontal hastalıkla ilişkili yumuşak ve sert doku yıkımının esas sebebi olarak kabul edilmektedir.^{1, 4}

Enflamasyon boyunca periodontal dokularda bu mediyatörlerin, lipitlerin ve enzimlerin konsantrasyonları patolojik derecede artış gösterir. Sağlıklı dokuda, bu enflamatuar mediyatörlerin etkileri IL-1Ra gibi antienflamatuar mediyatörler ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri tarafından dengede tutulur. Duyarlı konağa sahip bireylerde bu denge proenflamatuar mediyatörlerin aşırı miktarda üretilmesiyle ve doku hasarıyla sonuçlanır.

Konak modülasyonu tedavisinin amacı; koruyucu mediyatörleri artırıcı yönde , yıkıcı mediyatörleri de azaltıcı yönde düzenleyerek pro-enflamatuar ve antienflamatuar mediyatörler arasındaki dengeyi düzeltmektir. Periodontal doku yıkımından sorumlu pek çok yolun engellenmesinde çeşitli konak modulator ajanları geliştirilmiş ve önerilmiştir. Periodontal hastalık patogenezinde yer alan immün enflamatuar cevaplar, aşırı MMP ve araşidonik asit metabolitlerin üretimi, oksidatif stres ve kemik metabolizmasının düzenlenmesini kapsayan çalışmalar, konak modülasyonunun geliştirilmesi için yapılan araştırmaların hedefini oluşturmaktadır.^{21, 172}

Enflamasyonda önemli bir mediyatör olan prostaglandin sentezinin, non- steroid antienflamatuar ilaçlar tarafından inhibisyonu alveoler kemik rezorpsiyonunun engellenmesini sağlar.^{1, 173} Bu amaçla kullanılan aspirin ve aspirin benzeri ilaçların, sindirim sistemi üzerine önemli yan etkileri vardır. Doza bağımlı olarak gastrointestinal hemoraji ve ülserasyona sebep olabilen ¹⁷⁴ bu ilaçların uzun süre kullanımları renal yetmezliğe yol açabilir.¹⁷⁵ Bu ilaçların ciddi yan etkilere sahip olması periodontal tedavide kullanımlarını engellemektedir.¹

MMP'ler ekstraselüler matriks ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir.^{176,} ¹⁷⁷ Romatoid artirit, tümör hücre metastazı ve periodontal hastalıklarda MMP aktivitesinde bozukluklar görülür.¹⁷⁸ Tetrasiklinler ve doksisisiklin ise MMP aktivitesini inhibe eden ilaçlardır.¹⁷⁷ Günümüzde FDA tarafından onaylanmış tek konak modülasyon ajanı subantimikrobiyal doz doksisisiklidir (SDD). Periodontitis hastalarında SDD uygulaması doksisisikline dirençli mikroorganizmaların oluşumuna neden olmaksızın, kollajenaz aktivitesini azaltıcı yönde düzenler. SDD uygulaması 20 mg doksisisiklin hıklat'ın günde 2 kez 3-9 aylık süreyle mekanik temizlikle birlikte

kullanılması şeklindedir. SDD uygulamasının klinik yararlar sağladığı ve minimal yan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.¹

Lipoksinler endojen olarak üretilen ve prorezolving etkileri bulunan eikozanoidlerdir.¹⁷⁹ Lipoksinler ya da daha kararlı formu olan aspirinin tetiklediği lipoksinler akut enflamasyon fazının çözünmesinde ve lezyonun iyileşmesinde agonist olarak görev yapar.¹⁸⁰ Omega-3 yağ asitlerinden kaynaklanan rezolvin ve protektin gibi prorezolvinler enflamasyonun çözülmesinde lipoksinler gibi agonist etki gösterirler.¹⁸¹ Yeni tanımlanan bu lipit mediatörleri yan etki oluşturmaksızın enflamasyonun çözülmesini sağlar.¹⁸²

NF-κB, DNA transkripsiyonunu kontrol eden bir protein kompleksidir. NF-κB aktivasyonu, IκB ve IκB kinase tarafından düzenlenir. Proteasome inhibitörleri IκB proteinlerinin yıkımını engelleyerek NF-κB aktivasyonuna engel olur. Bu inhibitörlerden biri olan bortezomibin multiple myelome hastalarında oldukça etkili olduğu gösterilmiştir ancak bortezomibin periodontal tedavide kullanımını destekleyecek yeterli çalışma bulunmamaktadır.¹⁸³ Yapılan in vitro çalışmalar resveratrolün¹⁸⁴ ve sıvı ozonun¹⁸⁵ NF-κB aktivasyonunu engellediğini göstermektedir.

Nitrik oksit (NO) pek çok biyolojik süreçte yer alan kısa ömürlü bir moleküldür. NO, proenflamatuar uyaranlara karşı uyarılabilir NO sentaz (NOS) enzimi ile yüksek ve artan konsantrasyonlarda üretilir. Yüksek konsantrasyonlarda NO ve peroksinitrit bakteri, mantar, protozoa ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterir ancak bu reaktif türler DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, protein hasarı ve enflamatuar sitokin salınımı gibi zararlı etkilere de sebep olabilir. Aşırı NO ve peroksinitrit formasyonun artirit, ülseratif kolit ve ileit gibi pek çok enflamatuar hastalıkta yer aldığı gösterilmiştir.¹ Ligatüre bağlı periodontitis oluşturulan ratlarda, periodontitis sonucu NO konsantrasyonunun yükseldiği, merkaptoalkylguanidine'in intraperitoneal

uygulamasının ise alveoler kemik rezorpsiyonu ve NO konsantrasyonlarını düşürdüğü gösterilmiştir.¹⁸⁶ Bu yüzden NOS inhibitörlerinin periodontitis sonucu gelişen doku yıkımında modulator ajan olarak kullanılabileceği ortaya konmuş ancak yan etkileri ve terapötik etkilerinin insanlar üzerine olan etkilerini değerlendirmek amacıyla daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği bildirilmiştir.¹⁸⁷

Serbest radikallerin; kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma ve diğer kronik hastalıklar üzerine olan etkilerinin bulunmasından sonra, antioksidanlar üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır.¹⁸⁸ Antioksidanların periodontitiste konak modülasyonu üzerine olan etkilerini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur.¹⁸⁹⁻¹⁹²

Osteoblast ve osteoklast aktivitesini düzenleyen faktörler, kemik formasyon ve rezorpsiyon oranını modüle etmek için geliştirilen farmakolojik ve klinik stratejilerin önemli hedefi haline gelmiştir.¹⁹³⁻¹⁹⁶ Son zamanlarda IgG2 monoklonal antikoru olan Denosumab üzerine yapılan çalışmalarda, denosumabın RANKL yüzeyine bağlanarak, reseptörü olan RANK'ın aktivasyonunu engellediği ve buna bağlı olarak ta kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.¹⁸⁷

Bifosfonatlar osteoklastik kemik rezorpsiyonunu inhibe eden pirofosfat analoglarıdır. Hidroksiapatit kristallerine bağlanarak bu kristellerin çözünmesini engeller ayrıca osteoblastik farklılaşmayı artırarak osteoklast aktivitesini azaltır.¹⁹⁷ FDA, Paget's hastalığında, osteoproziste ve kemik metastazlarında bu ilaçların kullanımını onaylamaktadır.¹⁹⁸ Kemik koruyucu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda bifosfonatların periodontal hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir ancak böbrek yetmezliği, özafagal ve gastrointestinal ve çenelerin osteonekrozu gibi ciddi yan etkileri klinik kullanımlarını kısıtlamaktadır.¹⁹⁹

Ayrıca sitokin reseptör antagonistleri, hücre sinyalizasyon yollarının bozulması, rekombinant antisitokin uygulaması, antiintegrinler, probiotikler, beslenme, periodontal aşılarda, histamin reseptör antagonisti, hipoklorik asit ve taurine-N-monokloramine, cerrahi tedaviye yardımcı olarak kullanılan mine matriks proteinleri, kemik morfogenetik proteinleri ve platelet kaynaklı growth faktörleri de konak modülasyonu tedavisi üzerinde etkinliği araştırılmış farmakolojik ajanlardır.²⁰⁰

2.11. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler

İnsanlık tarihi boyunca pek çok hastalık bitkiler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmıştır. Günümüzde ise tedavi amacıyla, dünya nüfusunun %80'i direkt ya da indirekt olarak bitkilerden üretilen ilaçları kullanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde reçete edilen ilaçların yaklaşık % 25'inin bitkisel kökenli (vimbilastin, rezerpin, kinin, aspirin vb.) olduğu göz önünde bulundurulduğunda bitkilerle tedavi uygulamalarının geleneksellikten bilimsellik aşamasına ulaştığı göz ardı edilemez bir gerçektir.^{22, 201}

Dünya genelinde çok sayıda şifalı bitkilere dayalı tedavi yaklaşımı bulunmaktadır. Rasyonel fitoterapi ise bilimsel ve kanıta dayalı bir tedavi yöntemi olması ile diğer geleneksel bitkisel tedavi konseptlerinden farklılık göstermektedir. Ayrıca tıbbi bitkilerden elde edilen ilaçlar kalite, etkinlik ve güvenlik açısından bilimsel metodlarla değerlendirildiğinden, geleneksel uygulamalardan ayrılmaktadır.²⁰¹

DSÖ tarafından hazırlanan bir çalışmaya göre, dünya genelinde tedavi amacıyla kullanılan yaklaşık 20.000 adet bitki türünün bulunduğu gösterilmiştir.²⁰² Son yıllarda, tıbbi ve aromatik bitkiler ile bunlardan elde edilen aktif maddelere gösterilen ilginin artması bu bitkiler üzerine yapılan çalışmaların sayısında artışa sebep olmuştur.

Bitki, baharat ve uçucu yağları içeren doğal kaynaklar oksidatif hasarı engeller, antienflamatuar özellik gösterir, yaşlanmaya karşı etkilidir ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılır.^{203, 204} Doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasının

yaklaşık 1/3'ü uçucu yağ içermektedir. Bu familyalardan ayrı bir öneme sahip olan ve Labiatae familyasında bulunan; Thymus, Lavandula, Melissa, Mentha türleri ve diğer bazı bitkiler değerli uçucu yağ kaynaklarıdır.²⁰⁵ Adı geçen familyadaki bir çok bitki anti-enflamatuvar, sedatif, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, sindirimi düzenleyen, antikarsinojenik, antimikotik, antiparaziter ve sitotoksik etkilere sahip bitkilerdir.^{23, 24} Özellikle ülkemizde yetişen biberiye, adaçayı, sumak, kekik, mercanköşk ve zahter gibi aromatik bitkiler terapötik etkilere sahip bitkilerdir.²⁰⁵

2.12. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar aromatik bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen ve güçlü bir koku ile karakterize doğal kompleks bileşiklerdir. Uçucu yağlar gerçek yağ değildir ve lipit içeriği yoktur. Farklı oranlardaki 20-60 bileşenden oluşur ve oldukça uçucu özellik gösterirler.²⁵ Bu bileşenler terpenler, terpenoidler, aromatik ve alifatik bileşenlerdir.²⁰⁶ Sıvı, berrak (nadiren renkli), genellikle sudan daha düşük yoğunluğa sahip, lipit veya organik çözücüler içerisinde çözünebilen karışımlardır. Akdeniz ve tropikal ülkeler gibi sıcak iklime sahip bölgelerde yetişen bitkilerden elde edilirler. Bu yağlar bütün bitki organlarından (çiçek, tomurcuk, tohum, meyve, yaprak, dal, kök, ağaç kabuğu ve ağaç) sentezlenebilir ve salgı hücreleri, salgı kanalları, boşluklar ve epidermal hücrelerde depolanır.²⁰⁶

Günümüzde kimyasal olarak tanımlanmış yaklaşık 3000 tane uçucu yağ bilinmektedir ve bunların 300 tanesi özellikle ilaç, parfüm, kozmetik, sağlık, gıda ve tarım endüstrisi için önem taşımaktadır. Uçucu yağlar ve bu yağların bazı bileşenleri kozmetik ve sağlık endüstrisinde, diş hekimliğinde, gıda koruyucusu ya da katkı maddesi olarak gıda endüstrisinde ve doğal ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca uçucu yağlar aromaterapide masaj yağı olarak da kullanılmaktadır. Bazı uçucu yağların ise

tıbbi özellikleri dolayısıyla bir organ disfonksiyonu ve sistemik düzensizliğin tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir.²⁰⁶

Uçucu yağların anti-enflamatuar, sedatif, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, sindirimi düzenleyen, antikarsinojenik, antimikotik, antiparaziter ve sitotoksik etkileri vardır.^{23, 24} Bu nedenle uçucu yağlar bilim dünyasının oldukça ilgisini çeken yağlardır. Bu yağların yararlı olmalarını sağlayan kimyasal ve yapısal farklılıkları nedeniyle gelecekte geliştirilecek yeni ilaç bileşiklerinde özel bir grubu temsil edeceği düşünülmektedir.²⁵

2.13. Karvakrol

Karvakrol (KAR) (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol), Ballıbabagiller (Labiata=Lamiaceae) ailesine ait bitki türlerinin (Origanum, Satujera, Tyhmbra, Thymus ve Corydothymus) uçucu yağlarında bulunan fenolik ve bir oksijenli monoterpendir.^{26, 27}

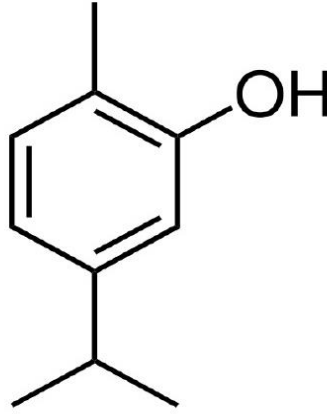
KAR doğada özellikle kekik adıyla bilinen çeşitli bitkilerde bulunur. KAR, kekik olarak adlandırılan bitki türlerinde çiçeklenme döneminin sonunda en yüksek miktarda bulunur.²⁸ Bu bitkilerin ortak özelliği timol ve karvakrol gibi karakteristik tat ve koku veren bileşenlere sahip olmasıdır. Bu bileşikler uçucu yağların %72-82'sini oluşturmaktadır.^{26, 205}

Kekikten elde edilen uçucu yağda bulunan KAR'ın kekiğin biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir.²⁰⁷ Kekik uçucu yağında karvakrolden başka (%60-92), timol (%1-14) ve diğer uçucu yağ bileşenleri (p-simen, linalool, borneol, beta-phellandren, transsabinenhyd, cis-sabinenhidrat, alfa-gama terpinen) de bulunmaktadır.

KAR (C₁₀H₁₄O) kimyasal yapısında, 150.21 g/mol molekül ağırlığında, şeffaftan soluk sarıya kadar değişebilen renkte uçucu bir yağ özelliğindedir. Alkol, eter ve çok az olarak da suda çözünebilir. Kaynama noktası 237-238°C, pH'ı 3.9'dur.

KAR oldukça küçük ve lipofilik yapıdadır. Bu özelliğinden dolayı hücre membranının kolaylıkla geçer.²⁹ Oral alımı takiben kan, gayta ve idrarda 2 saatten yaklaşık 48 saate dek ölçülebilen 7 metaboliti mevcuttur ve bu metabolitler oral alımdan 72 saat sonra tamamen vücuttan temizlenmektedir.²⁰⁸

KAR çeşitli etkilerinin yanı sıra kimyasal yapısındaki hidroksilden (OH-) dolayı antioksidan olarak da değerlendirilebilir.³¹



Şekil 2.4. Karvakrolün açık kimyasal formülü ²⁰⁷

KAR, lipopolisakkarit salgılayan gram (-) bakterilerin dış membranını parçalayarak ve sitoplazmik membranın ATP' ye olan geçirgenliğini artırarak antibakteriyel etki gösterir.²⁰⁹ Antibakteriyel etkilerinin yanı sıra antienflamatuar, antifungal, analjezik, antikanserojen, antiplatelet,³⁰ antioksidan,³¹ anti-apoptotik,³² antidepresan,³³ anti-ülser³⁴ ve rejenerasyon gibi pek çok etkiye sahiptir.

Bu bilgiler ışığında deneysel periodontitis modelinde KAR'ın sistemik tedavisinin periodontal dokular üzerine olan immünomodülatör etkilerinin biyokimyasal, histolojik ve radyolojik açıdan incelenmesi araştırmamızın amacını oluşturmaktadır.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma protokolü Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunuldu ve 18.12.2013 tarih ve 7/149 nolu karar ile onaylandı. (Ek 2).

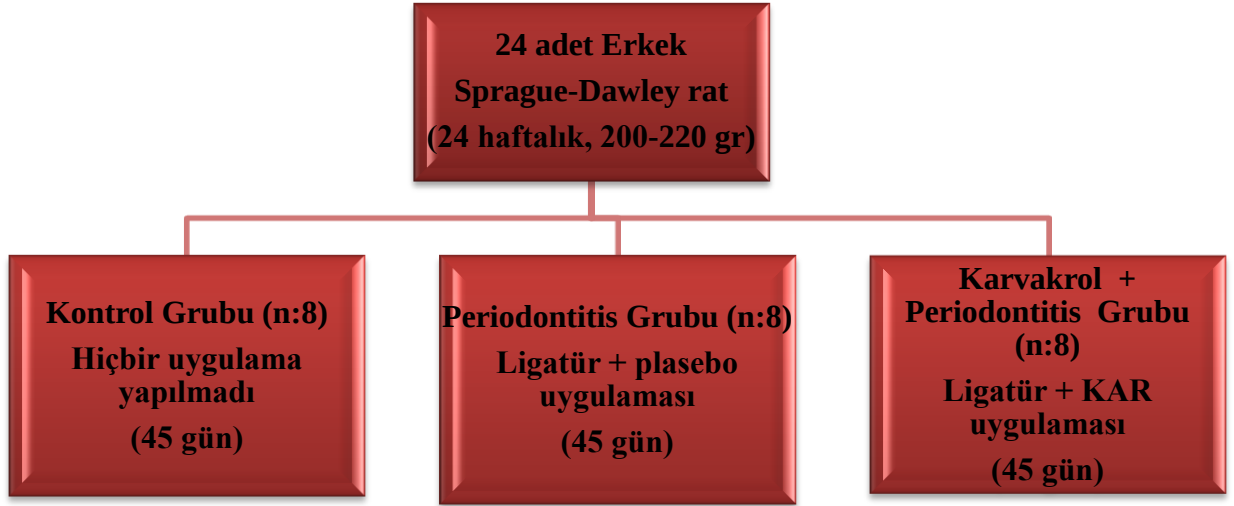
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden üretilen 24 adet erkek Sprague-Dawley rat kullanılarak gerçekleştirildi. Deney hayvanları (ratlar); 24 haftalık, ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen, daha önce herhangi bir araştırmada kullanılmamış ve sistemik olarak herhangi bir hastalığı bulunmayan ratlar arasından seçildi. Ratlar, plastik kafeslere 2'şerli yerleştirilip lokal hayvan barınağı şartları altında ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$, $55\pm 10\%$ nem, 12 saat gündüz-gece döngüsü) suya ve standart besine serbestçe ulaşacak şekilde barındırıldı.

24 adet rat rastgele yapılan seçimle 8'erli 3 gruba ayrılarak deney protokolüne başlandı.

Grup 1: Kontrol Grubu: Bu ratlara herhangi bir işlem uygulanmadı.

Grup 2: Periodontitis Grubu (PED grubu): Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla bağlanan ligatürün (30 günlük period sonunda) alınmasını takiben oral gavaj yöntemi ile mısır yağı (plasebo uygulaması) 15 gün boyunca verilerek elde edildi.

Grup 3: Karvakrol-Periodontitis Grubu (KAR-PED grubu): Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla bağlanan ligatürün (30 günlük period sonunda) alınmasını takiben KAR (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 50 mg/kg/gün dozda oral olarak gavaj yöntemiyle 15 gün boyunca verilerek elde edildi.



Şekil 3.1. Deneysel periodontitis çalışma grupları ve uygulamaları

3.2. Deneysel Periodontitis Modeli

Periodontitis oluşturmak için çalışmamızda kullanılan 2. ve 3. grup ratlara 10 mg/kg Xylazine (Rompun[®], Bayer, Topkapı, Turkey) ve 40 mg/kg ketamin (Ketalar, Pfizer, Istanbul, Turkey) anestezisi yapıldı. Anesteziye giren ratların sağ alt birinci molar dişlerine submarjinal olarak 3/0 ipek suture (Orhan Boz AS, Ankara, Turkey) materyali geçirilerek vestibülde düğümlendi. Suturen bağlanmasını takiben 30. günde derin anestezi yapılan tüm ratların sutureları alınarak KAR ve plasebo uygulamasına başlandı. 15 günlük KAR ve plasebo uygulamasının ardından tüm ratlar derin anestezi altında kurban edilerek ratlardan kan ve doku örnekleri alındı. Alınan örneklerin biyokimyasal, histolojik ve radyolojik analizleri deney gruplarından habersiz birbirinden bağımsız ve alanında uzman kişiler tarafından tek kör yöntemle gerçekleştirildi.

3.3. KAR Hazırlanışı ve Uygulaması

KAR lipofilik bir bileşik olmasından dolayı, çözeltiler mısır yağı kullanılarak ve günlük olarak hazırlanmıştır. 1ml mısır yağında 50 mg/kg dozda KAR çözülerek oral gavaj yoluyla 15 gün boyunca KAR-PED grubuna uygulanmıştır.

**DENEYSEL PERİODONTİTİSTE LİGATÜRLEME VE KARVAKROL
UYGULAMASI PROTOKOLÜ**



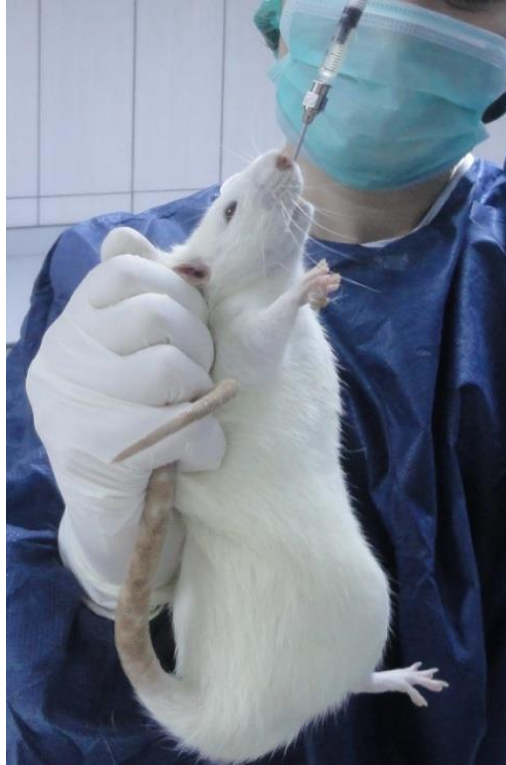
Şekil 3.2. Ligatürün Bağlanması (1.gün)



Şekil 3.3. Ligatürün alınmadan önceki ağız içi görüntüsü (30.gün)



Şekil 3.4. Ligatür alındıktan sonraki periodontal yıkımı gösteren ağız içi görüntüsü (30.gün)



Şekil 3.5. Oral KAR/Plasebo Uygulaması Başlangıcı (30.gün)



Şekil 3.6. Hayvanların sakrifiye edilmesi (45.gün)

3.4. Doku ve Kan Örneklerinin Alınımı

Derin anestezi altına alınan (Rompun[®], 10 mg/kg ve Ketamine[®] 40 mg/kg, intra musküler) ratlar öncelikle 10 ml’lik enjektörler ile kalplerinden kanları alınarak bu kanların 2 ml’si hemogram tüplerine konuldu, kalan kısım ise serum tüplerine aktarıldı. Alınan kanlar biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere biyokimya laboratuvarına verildi. Kanları alınan ratlar sakrifiye edilerek, mandibulaları çıkarıldı. Tüm gruplardan histolojik analiz için sağ mandibular diş ve dişeti dokuları ile birlikte mandibula örnekleri alındı.

3.5. Biyokimyasal Metotlar

3.5.1. Serum Sitokin Seviyelerinin Ölçümü

Serum IL-1 β , IL-6, TNF- α konsantrasyonlarının belirlenmesi için konsantrasyonlar katı faz sandwich ELISA yöntemiyle; rat IL-1 β Immunoassay Kit (İnvitrogen), rat IL-6 ELISA (eBioscience), rat TNF- α ELISA Kit (İnvitrogen) kitleri kullanılarak üretici firmaların talimatları doğrultusunda serum sitokin seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar pg/ml cinsinden değerlendirildi.

3.5.2. Serum CTx ölçümü

Serum CTx konsantrasyon ölçümü ELISA cihazı (μ -Quant, BioTek Instruments, Winooski, VT) kullanılarak, rat spesifik ELISA CTx Immunoassay kitiyle (Cusabio, China) üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapıldı. Sonuçlar tüm gruplarda (pg/ml) cinsinden değerlendirildi.

3.5.3. Serum KALP Seviyelerinin Ölçümü

KALP, TALP'in ısıya duyarlı bir izoformu olduğu için, serum KALP seviyeleri termoaktivasyon metodu kullanılarak ölçüldü. Serum örneklerinde TALP seviyesi ölçüldü ve serum örnekleri 56°C'de 10 dakika su banyosunda ağzı kapalı bir şekilde inkübasyona uğrattıldı. Inkübasyon ile KALP yapısı bozuldu. Daha sonra aynı serumda tekrar ALP değerleri ölçüldü. TALP değerinden ısıtılan ALP değeri çıkarılarak KALP değerleri hesaplandı. TALP ve ALP seviyelerinin ölçümü ELISA (Beckman Coulter) kitleri kullanılarak otoanalizör cihazında (Beckman Coulter a5800) yapıldı. Sonuçlar u/l cinsinden değerlendirildi.

3.6. Histolojik Analizler

3.6.1. Histopatolojik Analiz

Tüm gruplardan histolojik analiz için alınan sağ mandibular diş ve dişeti dokuları kimyasal tespit için %10'luk nötral formaldehite alındı. 72 saat süreyle %10'luk nötral formaldehitte tespit edildikten sonra, dokuları histolojik incelemeye uygun duruma getirmek amacıyla %6'lık nitrik asit solüsyonu ile dekalsifikasyon işlemi yapıldı. Nitrik asit solüsyonu günlük olarak değiştirildi ve doku dekalsifikasyonu son 3 günde bir iğne yardımıyla kontrol edildi. Yeterli dekalsifikasyonun ardından (15 gün) dokular tekrar 72 saat süreyle %10'luk nötral formalin içine alındı. Daha sonra dokular derecelendirilmiş alkol serilerinde dehidrate edildi. Bu işlemten sonra dokular dehidratasyon ve şeffaflandırma işlemlerine maruz bırakıldı, ardından parafin bloklara gömüldü.

Daha sonra parafin içerisine gömülerek mikrotom (Leica® RM2125RT, Leica Instruments, Nubloch, Germany) yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik analizler için örneklerin bir kısmı Crossman tarafından modifiye edilmiş Mallory'nin üçlü boyaması ile boyandı. Kesitlerden ışık mikroskobuna bağlı fotoğraf makinesi aparatıyla (Nikon Eclipse i50, Japan) fotoğraf örnekleri alındı.

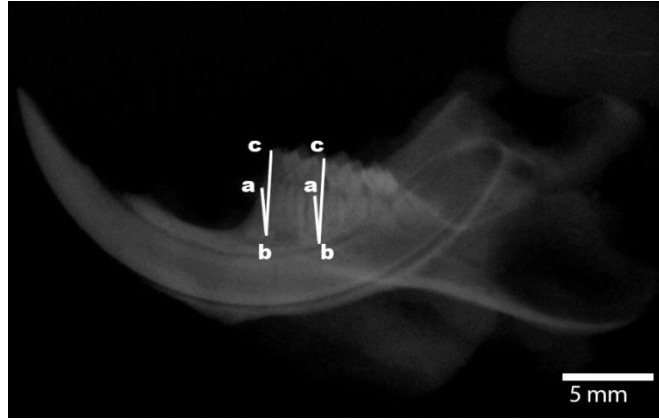
3.6.2. İmmüno-histokimyasal Analiz

İmmüno-histokimyasal analizler için kesitler anti-RANKL ve anti-OPG (dilution: 1/50, Santa Cruz) boyasıyla üretici firmanın talimatları doğrultusunda boyandı. Rat alveolar kemiğinde immüno-pozitif hücre yoğunluğunun hesaplanması için kontrol, PED ve KAR-PED gruplarının kesitleri paralel bir şekilde değerlendirildi. Boyanma yoğunluğu her rat alveolar kemiğinin 10 kesitinde “Stereologic optical fractionator” metodu kullanılarak, ardından da “Microbrightfield Stereo-Investigator software v. 9.0” programıyla “Microbrightfield, Williston, VT” yöntemiyle ölçüldü. Antikor bağlantısı yüksek güçte ışık mikroskobu (Nikon Eclipse i50, Japan) altında görüntülendi.

3.7. Radyolojik Analizler

Çalışmanın sonunda kurban edilen ratlardan alınan sağ mandibula örnekleri %10 luk formalin içerisine alındı. Daha sonra lingual yüzden doz ayarlamasının yapılması için pilot bir çekimin ardından çekim dozu 70 kvp olarak belirlendi. Radyografik filmler üzerinde yapılacak olan rezorpsiyon ölçümlerinde kalibrasyonu sağlamak amacıyla 5mm uzunluğunda ortodontik tel parafin mum içerisinde sensöre sabit bir şekilde yerleştirildi. 0.50 sn sürede uzun kon tekniği kullanılarak, konun yeri değiştirilmeden belirlenen dozda radyografik çekimler gerçekleştirildi (Planmeca RVG). Elde edilen dijital görüntüler Romexis bilgisayar programı kullanılarak, mezial ve distal kemik yüzdesi olarak hesaplandı. Programın kalibrasyonunda röntgen üzerinde

bulunan ortodontik tellerin ölçümleri referans alındı. Radyografik görüntülerde 3 bölgenin ölçümleri esas alındı. Bunlar; distal/mezial kökün apeksi (b), alveoler krestin distal/mezial yüzeyi (a) ve distal/mezial cusp'un en üstü (c). AB ve BC noktaları arasındaki lineer uzunluk ölçülerek kökün etrafındaki periodontal kemik desteği $AB/BC \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı. Radyografik ölçümler deney gruplarından habersiz tek bir kişi tarafından değerlendirildi. Çalışmamızda kullanılan ölçüm yöntemi ise Souza ve ark.¹²¹⁰ tarafından yapılan çalışma referans alınarak yapıldı.



Şekil 3.7. Mezial ve distal kemik yüzdelерinin gösterimi: $AB/BC \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı.

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) programı ile yapıldı. Gruplardan elde edilen değerler ortalama±standart sapma ya da standart hata (Ort.±S.D./S.E.M.) olarak ifade edildi.

Serum sitokin seviyelerinin (IL-1 β , IL-6, TNF- α), CTx, KALP ve dokuların immunohistokimyasal ve radyografi verilerinin değerlendirilmesinde One-Way ANOVA, Duncan Post Hoc testi uygulandı. Bu değerlerin istatistiksel analizlerinde $p<0.05$ 'in altındaki farklılıklar anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Serum Sitokin Seviyesi Bulguları

Araştırmamızda oluşturulan gruplara ait serum sitokin seviyeleri ve istatistiksel karşılaştırmaları tablo 4.1.'de görülmektedir.

Biyokimyasal serum sitokin seviyeleri analizinde; IL-1 β seviyesi diğer gruplar arasında PED grubunda en yüksek seviyede, kontrol grubunda ise en düşük seviyede bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PED grubunda IL-1 β seviyesindeki yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). KAR-PED grubunda ise serum IL-1 β seviyesinin PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

IL-6 seviyesi, PED grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). KAR-PED grubunda ise IL-6 seviyesinin PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

TNF- α seviyesi, PED grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). KAR-PED grubunda ise TNF- α seviyesinin PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p<0.05$).

Tablo 4.1. Tüm gruplara ait serum sitokin seviyeleri ve gruplar arası karşılaştırmaları

Gruplar	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Kontrol	3.86 $\pm$ 1.36 ^a	69.96 $\pm$ 11.98 ^a	3.56 $\pm$ 1.61 ^a
PED	5.76 $\pm$ 1.63 ^a	79.60 $\pm$ 12.27 ^b	5.66 $\pm$ 0.72 ^b
KAR-PED	3.72 $\pm$ 0.94 ^b	70.59 $\pm$ 10.88 ^a	4.15 $\pm$ 2.15 ^a

Tüm değerler Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki ^{ab} harfleri gruplar arası istatistiksel anlamlılığı göstermektedir $p<0.05$.

4.2. Serum CTx ve KALP Seviyesi Bulguları

Araştırmamızda oluşturulan gruplara ait serum CTx ve KALP seviyeleri ve istatistiksel karşılaştırmaları tablo 4.2.'de görülmektedir.

CTx seviyesi, kontrol grubunda en düşük seviyede ölçülürken, PED grubunda en yüksek seviyede ölçüldü. KAR-PED grubunda CTx seviyesinin PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. ($p<0.05$).

KALP seviyesi, PED grubunda diğer gruplar arasında en düşük seviyede ölçüldü KALP seviyesinin, PED grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu ($p<0.05$), KAR-PED grubunda ise PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Tablo 4.2. Tüm gruplara ait serum CTx ve KALP seviyeleri ve gruplar arası karşılaştırmaları

Gruplar	CTx (pg/ml)	KALP (u/l)
Kontrol	276.25±59.15 ^a	172.75±12.95 ^a
PED	777.88±39.87 ^b	152.25±28.12 ^b
KAR-PED	338.92±37.15 ^a	175.60±27.07 ^a

Tüm değerler Ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki ^{ab} harfleri gruplar arası istatistiksel anlamlılığı göstermektedir $p<0.05$.

4.3. Histolojik Sonuçlar

4.3.1. Histopatolojik Analiz

Araştırmamızda oluşturulan gruplara ait histopatolojik analiz skorları tablo 4.3.'te gösterilmiştir.

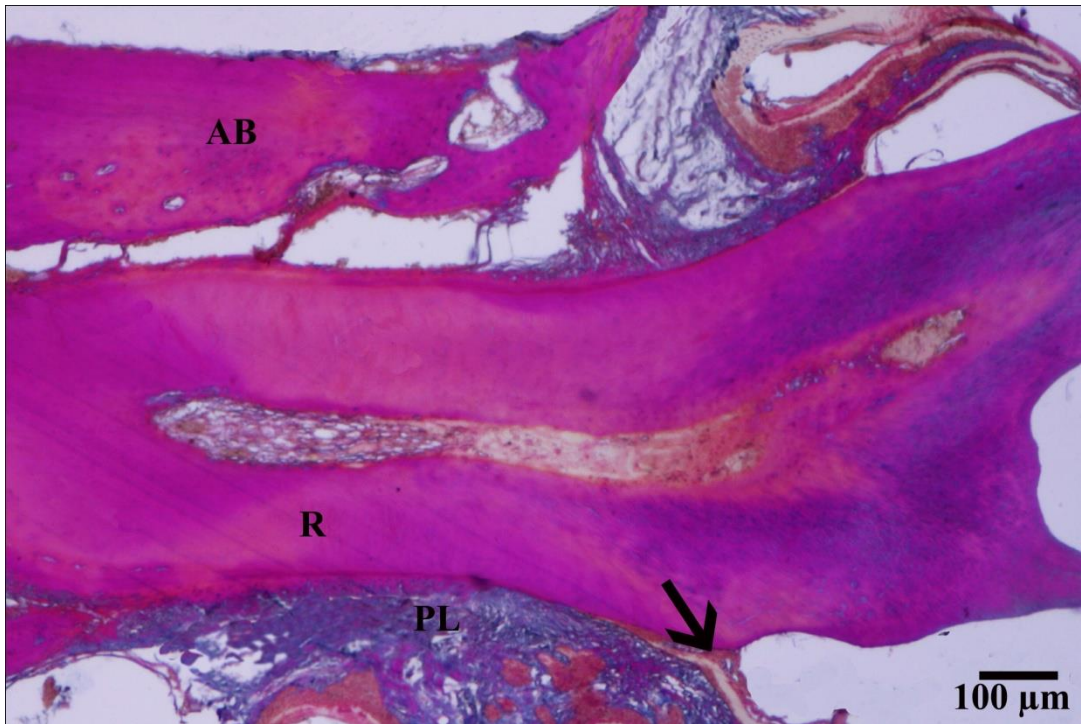
Doku kesitlerinin histopatolojik incelemesinde, kontrol grubunda periodontal ligament, birleşim epiteli ve alveolar kemikte herhangi bir patolojik yıkımın olmadığı ve bu yapıların normal olarak izlendiği görüldü (Şekil 4.1.). Diğer taraftan PED grubu

kesitlerinin histopatolojik incelemesinde epitelyal ataçmada, periodontal ligamentlerde ve alveoler kemikte şiddetli yıkımların olduğu, bağ dokuda enflamatuar hücre infiltrasyonunun görüldüğü belirlendi (Şekil 4.2.). KAR-PED grubunda ise, PED grubuna göre epitelyal ataçman kaybının, periodontal ligamentlerdeki düzensizliğin, bağ dokudaki enflamatuar hücre infiltrasyonunun ve alveolar kemik rezorbsiyonun daha az olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.).

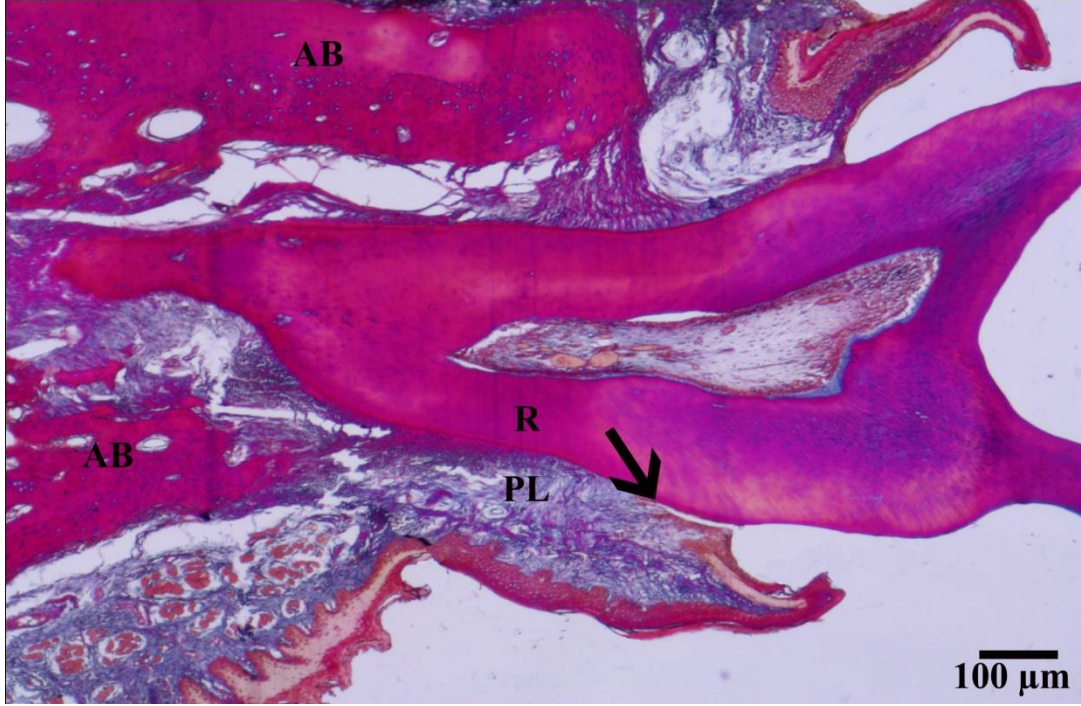
Tablo 4.3. Tüm gruplara ait doku kesitlerinin histopatolojik analizi skorları

Gruplar	Ataşman yıkımı	Enflamatuar hücre infiltrasyonu	Alveolar rezorbsiyon
Kontrol	-	+	-
PED	+++	+++	+++
KAR-PED	+	+	++

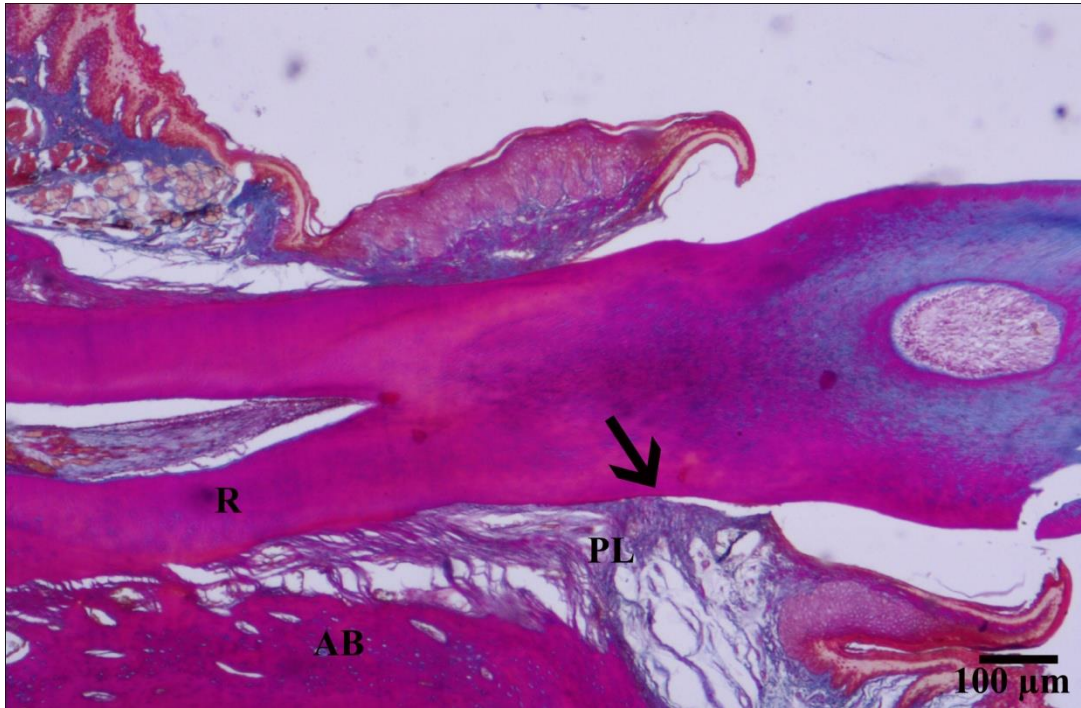
Skor değerleri: -, yok, +; az, ++: çok, +++; şiddetli



Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait histopatolojik görünüm; AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, R: Diş kökü, ok başı: semento-enamel bağlantı bölgesi, Crossman'ın üçlü boyası.



Şekil 4.2. PED grubuna ait histopatolojik görünüm; AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, R: Diş kökü, ok başı: semento-enamel bağlantı bölgesi, Crossman'nın üçlü boyası



Şekil 4.3. KAR-PED grubuna ait histopatolojik görünüm; AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, R: Diş kökü, ok başı: semento-enamel bağlantı bölgesi, Crossman'nın üçlü boyası

4.4. İmmuno-histokimyasal Bulgular

Tüm gruplara ait anti-RANKL ve anti-OPG pozitif hücre yoğunluğunun stereolojik analiz değerleri tablo 4.4.'de görülmektedir.

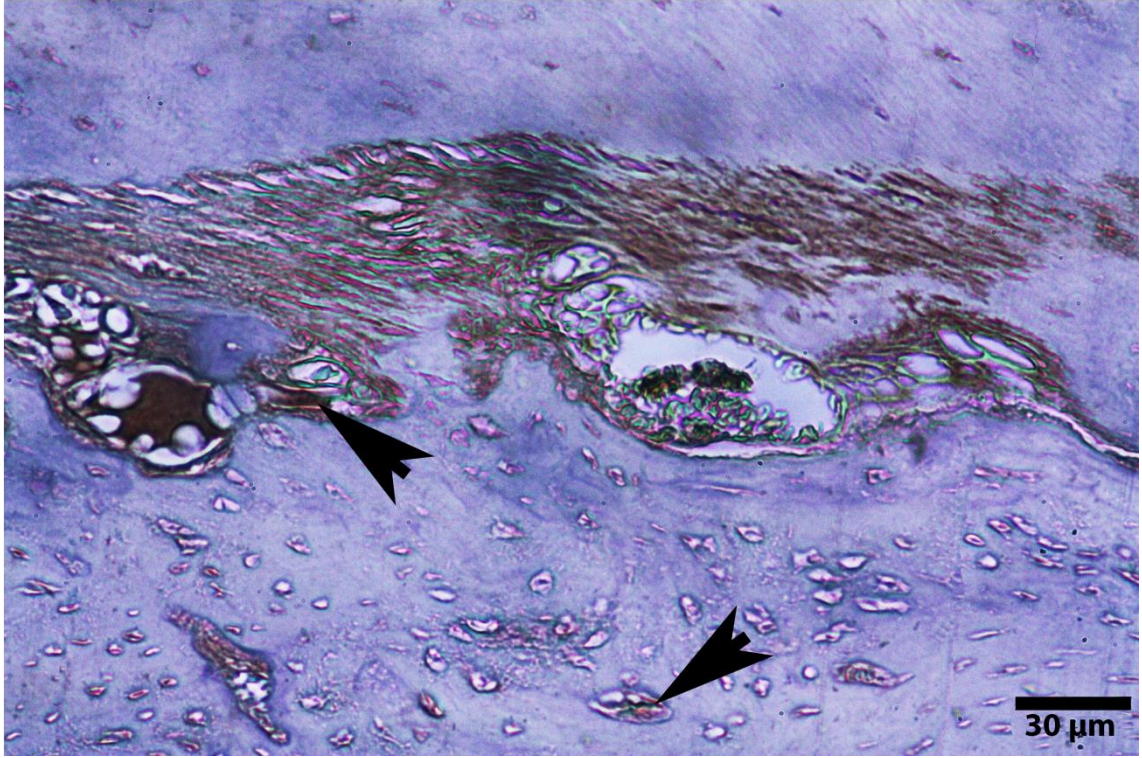
İmmuno-histokimyasal anti-RANKL pozitif hücre yoğunluğunun stereolojik analizinde, kontrol grubunun alveolar kemik boşluklarının oldukça az olduğu görülürken, kontrol grubunda çok az sayıda anti-RANKL pozitif hücreye rastlandı.(Şekil 4.4.) En fazla RANKL-pozitif hücre yoğunluğunun PED grubuna ait kesitlerin stereolojik analizinde olduğu görüldü ve anti- RANKL pozitif hücre yoğunluğundaki bu yüksekliğin diğer grup değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. ($p<0.05$). (Şekil 4.5.) Ayrıca KAR-PED grup kesitlerinde anti-RANKL-pozitif hücre yoğunluğunun PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). (Şekil 4.6.)

Anti-OPG pozitif hücre sterolojik analizinde, en yüksek değer kontrol grubunda olduğu belirlenirken (Şekil 4.7.), bu değer PED grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). (Şekil 4.8.) KAR-PED grubunda ise anti-OPG pozitif hücre yoğunluğunun PED grubuna göre kemik yapımı lehinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). (Şekil 4.9.)

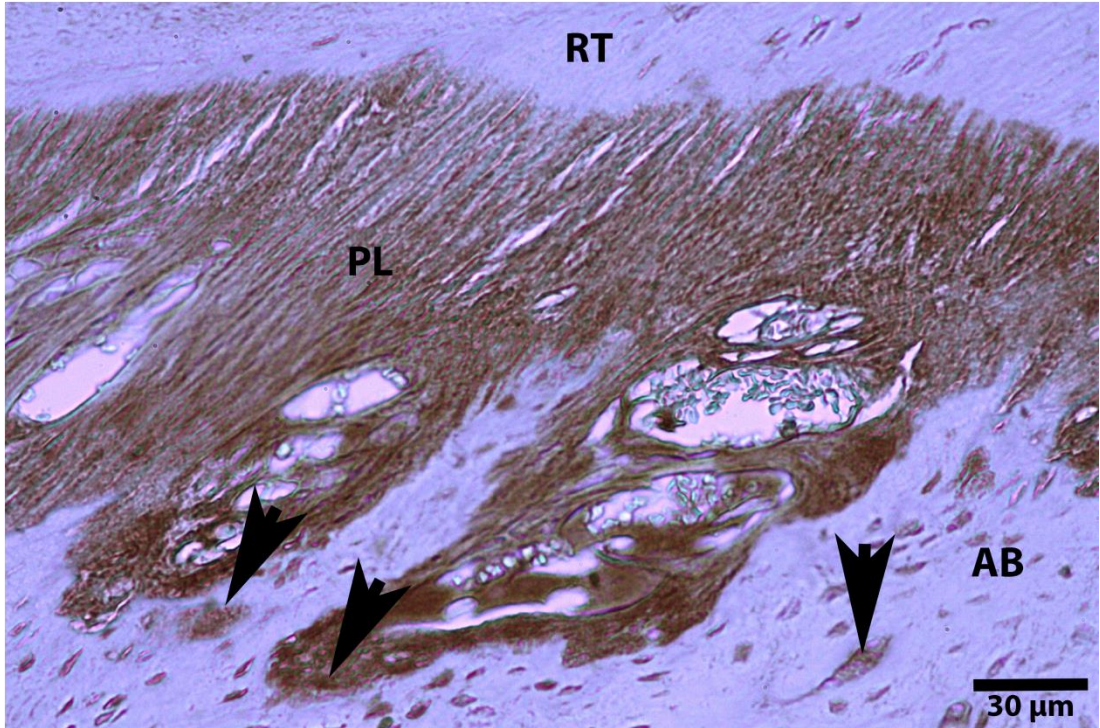
Tablo 4.4. Tüm gruplara ait anti-OPG ve anti-RANKL pozitif hücrelerin Stereolojik analizi

Gruplar	Anti-RANKL pozitif hücre yoğunluğu ($n/1000 \mu m^2$)	Anti-OPG pozitif hücre yoğunluğu ($n/1000 \mu m^2$)
Kontrol	0.341 ± 0.062^a	0.0518 ± 0.0048^a
PED	0.595 ± 0.069^b	0.0248 ± 0.0027^b
KAR-PED	0.402 ± 0.030^a	0.0467 ± 0.0061^a

Tüm değerler Ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki ^{ab} harfleri gruplar arası istatistiksel anlamlılığı göstermektedir $p<0.05$.

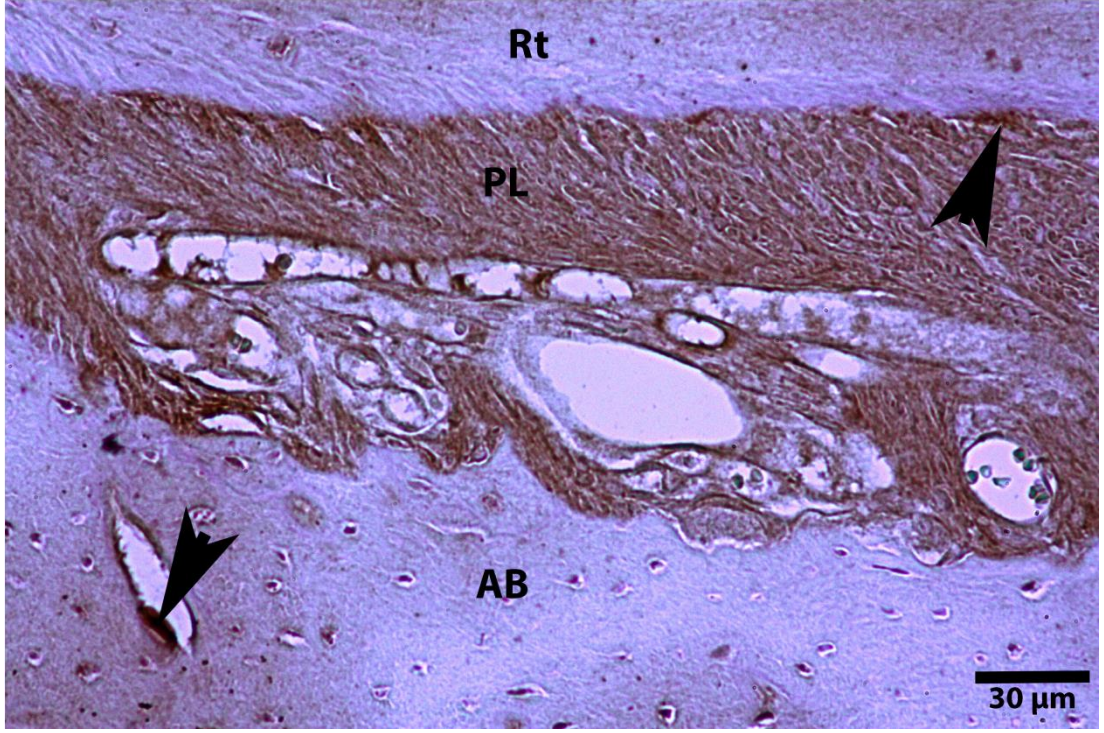


Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerin anti-RANKL ile immuno-histokimyasal boyaması, AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, RT: Diş kökü, ok başı: anti-RANKL pozitif hücre (osteoklast), Streptovidin-peroksidaz boyaması

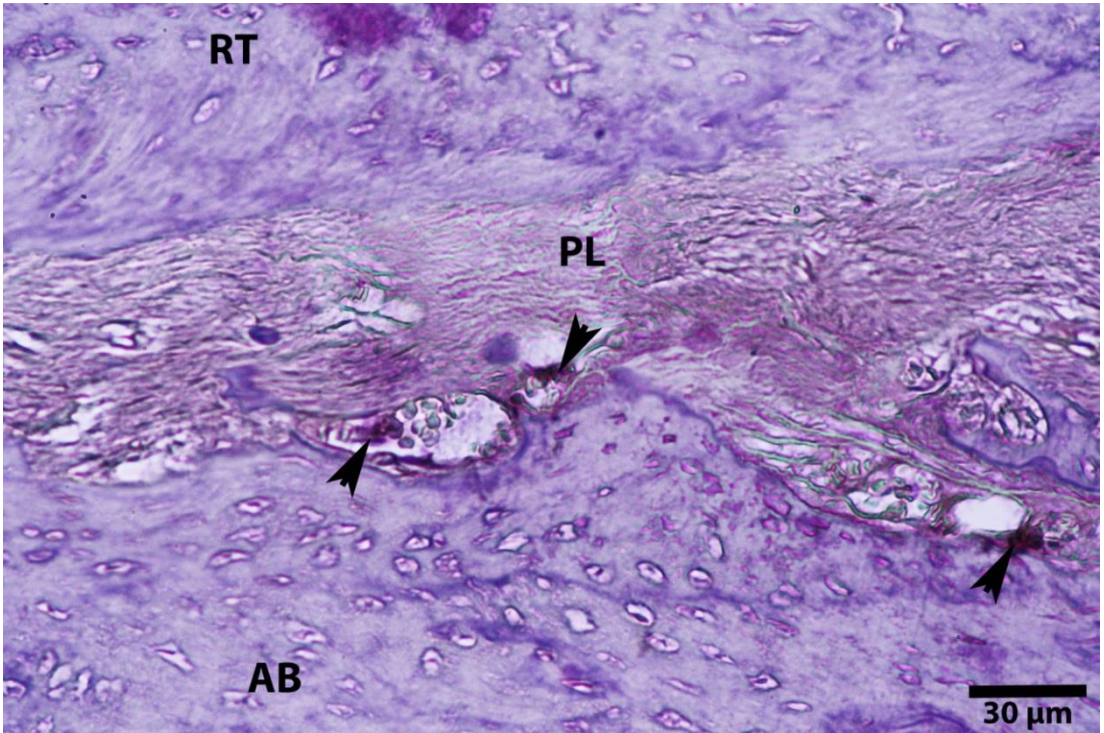


Şekil 4.5. PED grubuna ait histolojik kesitlerin anti-RANKL ile immuno-histokimyasal

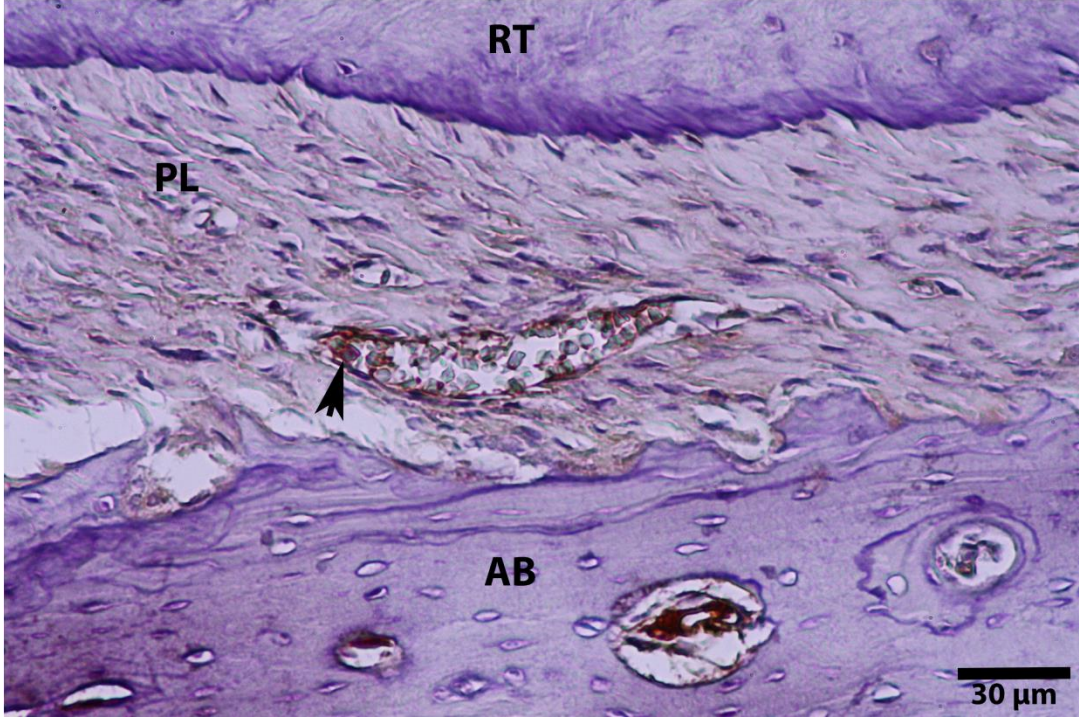
boyaması, AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, RT: Diş kökü, ok başı: anti-RANKL pozitif hücre (osteoklast), Streptovidin-peroksidaz boyaması



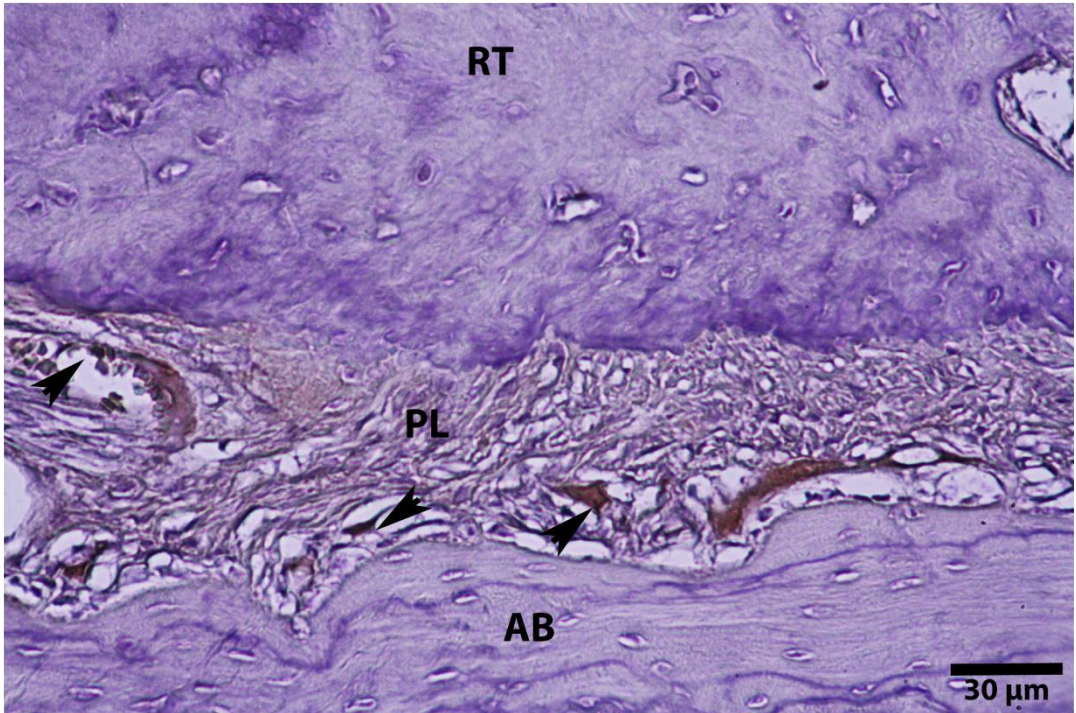
Şekil 4.6. KAR-PED grubuna ait histolojik kesitlerin anti-RANKL ile immuno-histokimyasal boyaması, AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, RT: Diş kökü, ok başı: anti-RANKL pozitif hücre (osteoklast), Streptovidin-peroksidaz boyaması



Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerin anti-OPG ile immuno-histokimyasal boyaması, AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, RT: Diş kökü, ok başı: anti OPG pozitif hücre (osteoblast) , Streptovidin-peroksidaz boyaması



Şekil 4.8. PED grubuna ait histolojik kesitlerin anti-OPG ile immuno-histokimyasal boyaması, AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, RT: Diş kökü, ok başı: anti-OPG pozitif hücre (osteoblast), Streptovidin-peroksidaz boyaması



Şekil 4.9. KAR-PED grubuna ait histolojik kesitlerin anti-OPG ile immuno-histokimyasal boyaması, AB: alveolar kemik, PL: periodontal ligament, RT: Diş kökü, ok başı: anti-OPG pozitif hücre (osteoblast), Streptavidin-peroksidaz boyaması

4.5. Radyografi Sonuçları

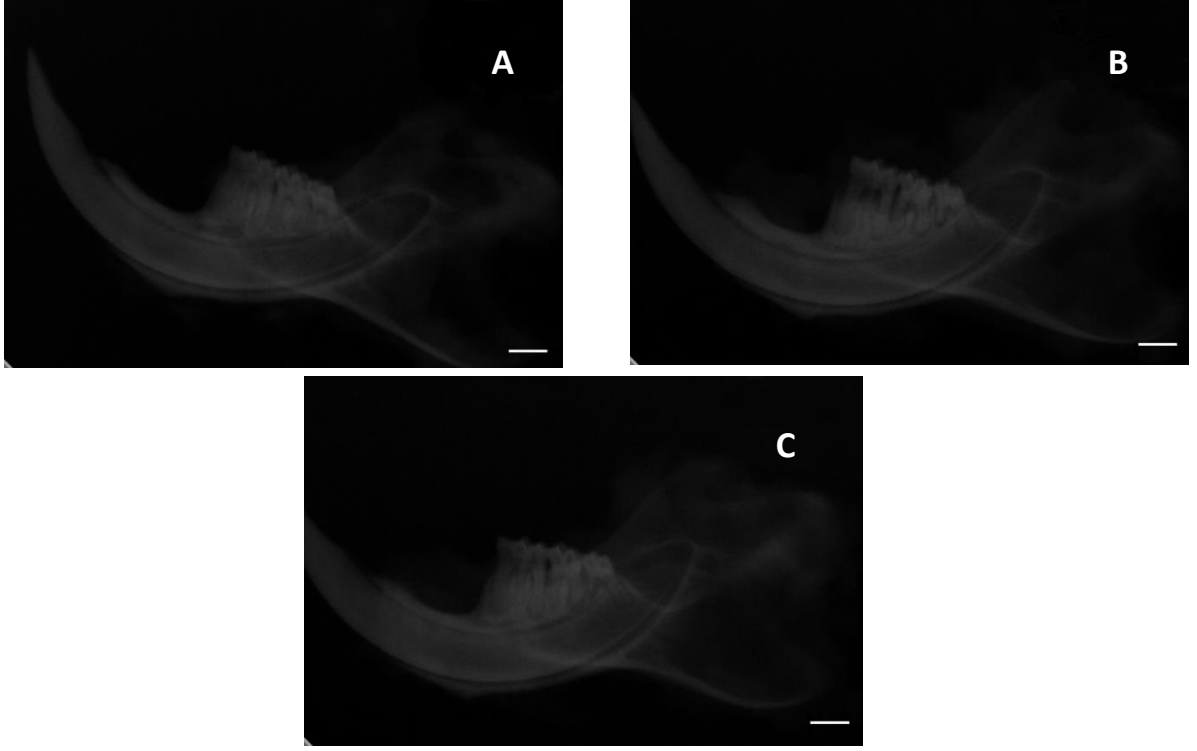
Gruplarda yer alan rat mandibulalarının mesial ve distal kemik seviyeleri ve karşılaştırmaları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Dijital radyografilerin analizinde; PED grubunda mezial ve distal kemik seviyesinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, kontrol grubunda ise diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). KAR-PED grubunda PED grubuna göre mezial ve distal kemik seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Tablo 4.5. Tüm gruplara ait mezial-distal kemik yüzdelerinin radyografik ölçümü değerleri

Gruplar	MKS (%)	DKS (%)
Kontrol	62.06±4.12 ^a	63.98±5.21 ^a
PED	45.40±5.57 ^b	43.62±4.19 ^b
KAR-PED	56.20±3.55 ^a	57.07±6.43 ^a

Tüm değerler Ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir. Aynı sütundaki ^{ab} harfleri gruplar arası istatistiksel anlamlılığı göstermektedir $p<0.05$.



Şekil 4.10. Gruplara ait mandibula örneklerinden sakrifikasyon işleminden sonra alınmış radyografi görüntüleri; A; kontrol grubu, B; Periodontitis grubu, C; KAR-PED grubu

5.TARTIŞMA

Dünya popülasyonunun %10-15'ini etkileyen periodontal hastalıklar,³⁹ yetişkinlerde görülen diş kaybının en önemli sebeplerinden biridir.⁴⁰ DSÖ'nün yayınladığı rapora göre ağız sağlığı düzeyindeki tüm gelişmelere rağmen periodontal hastalıklar, dünya genelinde görülen oral hastalıkların önemli bir kısmını oluşturmaktadır.³⁹ En önemli periodontal hastalıklardan biri olan kronik periodontitis ise yavaş ilerleyen, ataşman ve kemik kaybı ile karakterize kronik enflamatuvar bir hastalıktır.²¹¹

Periodontal doku yıkımında MDP primer etiyolojik ajan olarak kabul edilmesine rağmen, periodontal hastalıkla ilişkili yumuşak ve sert doku yıkımının temel sebebi olarak bakteriyel uyarıya karşı konağın verdiği immün-enflamatuvar cevap gösterilmektedir.²¹²

Konak kaynaklı faktörlerin doku hasarındaki rolünün anlaşılması ile birlikte, konak cevabını değiştirmek üzere periodontitise neden olan yıkıcı mekanizmaların engellenmesine yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi araştırmacıların ilgisini çeken bir konu haline gelmiştir.¹⁷² Bu nedenle periodontal doku yıkımından sorumlu pek çok yolun engellenmesinde çeşitli konak modulator ajanları geliştirilmiş ve önerilmiştir.²¹

Ayrıca periodontopatojenlerin ortadan kaldırılmasında altın standart olarak kabul edilen konvansiyonel mekanik tedavi ile konak modulatorlerinin birlikte kullanımının daha iyi klinik sonuçlar meydana getireceği vurgulanmıştır.^{172, 187, 213}

Aromatik bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen uçucu yağlar; anti-enflamatuvar, sedatif, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, sindirimi düzenleyen, antikarsinogenik, antimikotik, antiparaziter ve sitotoksik etkileri sebebiyle^{23, 24} bilim dünyasının oldukça ilgisini çeken doğal ürünlerdir. Bu yağların yararlı olmalarını

sağlayan kimyasal ve yapısal farklılıkları nedeniyle gelecekte geliştirilecek yeni ilaç bileşiklerinde özel bir grubu temsil edeceği düşünülmektedir.²⁵

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda Ballıbabagiller (Labiata=Lamiaceae) ailesine ait bitki türlerinin (Origanum, Satujera, Tyhmbra, Thymus ve Corydothymus) uçucu yağlarında bulunan fenolik ve bir oksijenli monoterpen olan KAR kullanılmıştır.^{26, 27}

Çalışmamız; KAR'ın sistemik uygulamasının periodontal dokular üzerine olan etkilerini biyokimyasal, histolojik ve radyolojik olarak değerlendiren ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

Botelho ve ark.nın³⁵ deneysel periodontitis oluşturduğu ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada, KAR ve kalkon içeren topikal jel uygulamasının alveoler kemik kaybı üzerine olan etkileri araştırılmış ve topikal jel uygulamasının alveoler kemik rezorpsiyonunu azalttığı gösterilmiştir. Yine aynı araştırmacı ve ark.nın³⁶ yaptığı bir başka hayvan çalışması modelinde, KAR içeren topikal jel uygulamasının alveoler kemik kaybı üzerine olan etkilerinin histolojik, mikrobiyolojik ve atomik kuvvet mikroskobu incelemesinde; KAR'ın alveoler kemik kaybını önlediği, periodontal mikroorganizma sayısı ve gingival dokuda myeloperoksidaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada KAR'ın ağız sağlığı programlarında kullanımının etkili ve ucuz bir ajan olabileceği vurgulanmıştır.

Literatürde Shahab ve ark.nın³⁷ kronik periodontitisli hastalar üzerinde yaptığı tek çalışmada ise; başlangıç tedavisini takiben 0.02% KAR içeren Dentol ve 0.2% klorheksidinin subgingival irrigasyon tedavisi sonrası hastalardan alınan subgingival plak ve DOS örneklerinde; subgingival aerobik bakteri sayısının ve IL-1 β seviyelerinin Dentol grubunda klorheksidin grubuna göre azaldığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları 0.02% KAR içeren Dentolün subgingival irrigasyonunun 0.2%'lik

klorheksidin irrigasyonu kadar etkili olduğunu, hatta klinik ve immünolojik indeksleri azaltmada klorheksidine göre daha üstün olduğu gösterilmiştir.

Yine DNA mikroarray yöntemiyle kronik periodontitiste apoptozisle ilişkili gen ekspresyonlarının profilinin çıkarıldığı in vitro bir çalışmada; epitelyal keratinosit hücrelerinde KAR uygulamasının antiapoptotik etki gösterdiği ortaya konmuştur.³²

Yukarıda bahsedilen ve literatürde KAR'ın periodontitis üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği az sayıdaki in vivo ve invitro çalışma örneklerinde, in vivo çalışmalarda KAR tedavisi topikal jel ya da irrigasyon solüsyonu şeklinde uygulanmıştır.³⁵⁻³⁷ Yapılan in vivo çalışmalarda, KAR'ın alveoler kemik rezorpsiyonu üzerine olan etkileri makroskobik ya da mikroskobik olarak değerlendirilmiş ve mikroorganizma sayısı üzerine olan etkileri incelenmiştir.³⁵⁻³⁷ Yapılan in vitro çalışmalarda ise KAR'ın antiapoptotik etkileri üzerinde durulmuştur.³² Bizim çalışmamızda ise herhangi bir sitotoksik etkisi bulunmayan ve pek çok etkiye sahip KAR, deneysel periodontitis oluşturulan ratlara sistemik olarak uygulanmış ve KAR'ın enflamasyon sonucu gelişen alveoler kemik rezorbsiyonu ve rezorbsiyona sebep olan konak kaynaklı faktörler üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir.

Osteoporozis ve periodontitis gibi kemik hastalıklarının tedavisine ve korunmasına yönelik ilaç uygulamalarında hayvan modellerinin kullanımı gitgide artmaktadır.^{214, 215} Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla ligatür bağlanması, farklı tedavi stratejilerini ve periodontal hastalığın ilerleyişini değerlendirmede çeşitli deney hayvanlarında yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.²¹⁵ Ligatürün bağlanması dişin çevresindeki periodontal dokularda mekanik irritasyon meydana getirmekte ve ligatür çevresinde plak oluşumunu hızlandırarak bakteri sayısında artışa sebep olmaktadır.²¹⁶ Bu nedenle çalışmamızda ipek sütür plak birikimini arttırmak amacıyla ligatür olarak kullanılmış ve ratlar yumuşak diyetle beslenmiştir.

Deneyisel periodontitis çalışmalarında at,²¹⁷ köpek, non- human primat,²¹⁶ tavşan,²¹⁸ hamster, fare ve rat²¹⁶ gibi çeşitli hayvan türleri kullanılmaktadır. Periodontal hastalık modellerinde her bir türün kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. İnsanlarla karşılaştırıldığında non-human primatlar, dentisyonlarındaki bazı varyasyonlara rağmen, dental ve periodontal anatomi açısından insanlarla büyük benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu hayvanlarda gingivitis ve periodontitis gibi hastalıkları gözlemlemek mümkündür. Ancak teminlerinin ve bakımlarının zor olması sebebiyle çok fazla tercih edilmemektedir.²¹⁶ Fareler ve ratlar periodontitis modelinde sıkça kullanılan hayvanlardır. Bakımlarının kolay olması, kolay temin edilmeleri ve ucuz olmaları sebebiyle daha çok tercih edilmektedir. Ancak bu hayvanların dental anatomik yapıları insanlardan farklıdır ve periodontal hastalığın insanlardaki ilerleme şekliyle çok fazla benzerlik göstermemektedir.²¹⁹ Fakat ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde de insanlarda olduğu gibi enflamatuar hücrelerin, proenflamatuar sitokinlerin, osteolitik enzimlerin salınımı ve osteoklastların aktivasyonu gerçekleşir. Bunun sonucunda da alveoler kemik ve periodontal ataçman kaybına yol açan periodontitis oluşur. Bu nedenle konak ilişkilerini ve tedavi çalışmalarını değerlendirmek üzere ratlar sıklıkla kullanılmaktadır.²¹⁵ Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda deney hayvanı olarak Sprague-Dawley türü ratlar kullanılmıştır.

Karvakrol antibakteriyel, antienflamatuar, antifungal, analjezik, antikanserojen, antiplatelet,³⁰ antioksidan,³¹ anti-apoptotik,³² antidepresan, anti-ülser³⁴ ve rejenerasyon gibi pek çok özelliğe sahip uçucu bir yağdır. Karvakrolün tüketimi genel olarak güvenilir kabul edilmektedir ve Avrupa Konseyi tarafından 2 ppm seviyesinde içkilerde ve 25 ppm de şekerlerde kullanılmak üzere kimyasal tatlandırıcılar listesine alınmıştır.²²⁰ Ratlardaki lethal dozu (LD₅₀) oral gavaj yoluyla uygulandığında 810

mg/kg olarak rapor edilmiştir.²²¹ Litreatürlerde rat çalışmalarında KAR uygulamalarının geniş bir doz aralığında (12.5-100mg/kg) uygulandığı görülmektedir.^{33, 222, 223}

Nafees ve ark. nın ²²² yapmış oldukları bir çalışmada ratlarda tiyoasetamid (TAA) indüklü karaciğer hasarına karşı KAR'ın terapötik etkileri 14 gün boyunca, 25 ve 50 mg/kg iki farklı doz uygulaması yapılarak oksidatif stres, enflamasyon ve apoptozis açısından incelenmiştir. Ayrıca KAR'ın herhangi bir hepatotoksik etkisinin olup olmadığını incelemek üzere bir gruba sadece 50 mg/kg KAR verilmiş ve hayvanların genel durumunda bozukluk ve herhangi bir toksik etki oluşturmadığı görülmüştür. TAA indüklü ratlarda 50 mg/kg KAR uygulamasının antioksidan enzim seviyelerini diğer doza göre daha fazla arttırdığı gösterilmiş, histolojik ve immünohistokimyasal incelemelerde karaciğer hasarı görülen hücrelerde belirgin bir iyileşme sağladığı ve bu hücrelerde NF- κ B sayısında önemli bir düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Normal karaciğer hücresi ile karşılaştırıldığında sağlıklı ratlarda 50 mg/kg KAR'ın karaciğer hücrelerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir.

Guimarães ve ark.nın ²²⁴ farelerde oluşturduğu karrageenan indüklü mekanik hipernosisepsiyon modelinde KAR'ın antinosiseptif ve antienflamatuar etkileri araştırılmış ve KAR'ın sistemik ön tedavisinin (50 ve 100 mg/kg; ip) karrageenanın oluşturduğu hipernosisepsiyonu ve TNF- α düzeyini azalttığı görülmüştür.

Uçucu yağlar ve komponentlerinin yerine göre ve uygun dozda kullanılması pek çok terapötik etki gösterirken, yanlış kullanımı toksik etkilere sebep olabilmektedir.²²⁵ Bu nedenle tüm bu bilgiler ışığında, yukarıda bahsedilen çalışmalarda ve daha pek çok çalışmada etkinliği gösterilmiş doz olan 50 mg/kg KAR'ın intra gastrik dozu araştırmamızda tedavi dozu olarak belirlenmiş ve uygulanmıştır.

Sitokinler enflamasyonu başlatan ve devam ettiren düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Sitokinlerin çeşitli hücrelerden salınımı genellikle NF- κ B nükleer

proteinin transkripsiyon aktivasyonuna bağlıdır.²²⁶ Mikrobiyal tanımadan sonra, doğal bağışıklık sisteminin sitokinleri olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 periodontal patogeneizde ilk olarak salgılanan sitokinlerdir.⁷ Bu sitokinler hem in vitro hem de in vivo'da kemik rezorpsiyonunu stimüle etme, kemik yapımını da inhibe etme, ayrıca fibroblast ve osteoblast gibi pek çok hücre tarafından prostoglandin sentezi ve proteaz üretimini uyarma özelliğine sahiptir.²²⁷

In vitro çalışmalarda, IL-1 β 'in fibroblast proliferasyonuna ve fibroblastlardan proteoglikan, kollajenaz ve prostoglandin sentezlenmesine sebep olduğu gösterilmiştir. 1982 yılında Charon ve ark.ı, ²²⁸ gingivitisli hastaların enflame bölgelerinden alınan DOS örneklerinde, artmış IL-1 β aktivitesini ilk kez gösteren araştırmacılar. Stashenko ve ark. nın ⁹⁰ kronik periodontitisli hastalarda yaptığı bir çalışmada, IL-1 β seviyelerinin hastalığın aktif olduğu bölgelerde, inaktif ve sağlıklı bölgelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Erişkin periodontitisli hastaların DOS örneklerinde IL-1 β seviyelerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, örnek alınan bölgelerin %69'unda IL-1 β seviyelerinin arttığı ancak IL-1 β seviyeleri ile plak indeksi, kanama indeksi ve sondalama derinliği arasında bir ilişkinin bulunmadığı gösterilmiştir.²²⁹ Daha sonra yapılan çalışmalar da IL-1 β seviyesinin enflamasyon bölgesinde ve sondalama derinliği fazla olan bölgelerde arttığını göstermiştir.²³⁰⁻²³² Bu çalışmaların aksine, Figueredo ve ark.nın ²³³ aynı hastanın derin ve sığ ceplerinden aldığı dişeti oluğu sıvısı örneklerinde IL-1 β seviyelerinde anlamlı bir farklılığın olmadığı gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise periodontitisli ve sağlıklı hastaların gingival dokularında IL-1 β ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.²³⁴ İlk çalışmalar IL-1 β seviyelerinin enflamasyon bölgesinde sağlıklı bölgelere göre arttığını gösterse de daha sonra yapılan çalışmalar farklı yapıdaki cevapları akla getirmiş ve IL-1 β miktarının dokunun yalnızca enflamatuvar durumunu yansıtmadığını ve kişiye özgü olduğunu

göstermiştir.²³³ Faizuddin ve ark.ı; ²³⁵ eğer IL-1 β enflamatuvar periodontal hastalık markırı olarak kullanılacaksa, IL-1 genotipinin de incelenmesi gerektiğini savunmuşlardır.

Düşük konsantrasyonlarda lokal enflamasyon mediatörü olarak görev yapan IL-1'in, ancak yüksek miktarlarda salgılandığında kan dolaşımına girdiği ve endokrin etki gösterdiği düşünülmektedir.²³⁶ Orozco ve ark. nın ²³⁷ gingivitis ve kronik periodontitis hastalarında yapmış olduğu bir çalışmada serum IL-1 β seviyeleri sıfır olarak ölçülmüş ve bu durum hastaların sistemik olarak sağlıklı olması ve son 6 ay içerisinde herhangi bir antibiyotik, immünomodulator ve antienflamatuvar ilaç kullanmamasıyla ilişkilendirilmiştir.

Bizim çalışmamızda da deneysel periodontitis oluşturulan ratlarda IL-1 β seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Yukarıdaki çalışmaları genel olarak değerlendirdiğimizde kronik periodontitiste IL-1 β seviyelerinin arttığıyla ilgili çelişkili sonuçların olduğu görülmektedir ancak yapılan çok sayıdaki deneysel periodontitis çalışmasında ^{189, 238-240} IL-1 β seviyesinin deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu hayvan çalışmalarının aksine bizim çalışmamızda PED grubunda IL-1 β seviyesindeki anlamlı olmayan bu yükselme grup içerisinde ratlarda görülebilecek IL-1 genotip farklılıklarıyla ilişkilendirilmiştir.

IL-6 ve TNF- α enflamasyon indüklü osteoklast farklılaşması ve alveoler kemik rezorpsiyonundan sorumlu sitokinlerdir.⁹⁷ Kronik periodontitisli ve sağlıklı bireylerin DOS örneklerinde IL-6 seviyelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, IL-6 seviyesi şiddetli periodontitis hastalarında sağlıklı gruba göre 3 kat yüksek bulunmuştur.²⁴¹ Yine Brezilyalı bireyler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, periodontal hastalık şiddeti ile IL-6 ekspresyonu ve gen polimorfizmi arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve

periodontitisli bireylerin klinik ataçman seviyesi ile IL-6 ekspresyon yoğunluğu açısından pozitif bir ilişkinin olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada şiddetli periodontitise sahip bireylerin orta şiddetli periodontitise sahip bireylere göre daha yoğun IL-6 ekspresyonuna sahip olduğu ortaya konmuştur.²⁴²

Literatürde kronik periodontitisli hastaların TNF- α seviyelerini değerlendiren çalışma sonuçları arasında ise farklılıklar görülmektedir. Gorska ve ark. nın²⁴³ kronik periodontitis hastalarının serum ve dişeti dokusunda TNF- α seviyelerini değerlendirdiği bir çalışmada, TNF- α seviyelerinin kronik periodontitisli bireylerde sağlıklı bireylere göre oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Andrukhov ve ark. nın²⁴⁴ kronik periodontitisli bireylerde bakteriyel yük ile ilgili sitokin seviyelerini değerlendirdiği bir başka çalışmada ise TNF- α seviyeleri Gorska ve ark.nı destekler şekilde yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmaların aksine Yamazaki ve ark.1,²⁴⁵ kronik periodontitisli ve sağlıklı bireylerin serum TNF- α seviyeleri arasında herhangi bir farkın bulunmadığını göstermişlerdir.

Literatürde ise deneysel periodontitis oluşturulan ratların serum IL-6 ve TNF- α seviyelerindeki artışı gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur.^{238, 239, 246} Bizim çalışmamızda da PED grubundaki hayvanlarda IL-6 ve TNF- α seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bakımdan çalışmamız, IL-6 ve TNF- α seviyeleri açısından yapılan hayvan çalışmalarıyla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda; IL-1 β , TNF- α ve IL-6 sitokin seviyelerinin KAR tedavisi sonrası KAR-PED grubunda PED grubuna göre daha düşük olduğu görülmektedir.

Komple Freund Adjuvanı (KFA) enjeksiyonuyla farelerin sağ arka patilerinde oluşturulan enflamasyon modelinde, enjeksiyondan 40 dakika önce farklı dozlarda KAR tedavisinin i.p. olarak uygulamasının; ödem miktarını anlamlı derecede azalttığı, IL-1 β

seviyesini düşürdüğü ancak TNF- α seviyeleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.²⁴⁷

KAR tedavisinin farelerde lipopolisakkarit indüklü oluşturulan endotoksemi ve akut akciğer hasarı üzerine antienflamatuar etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, lipopolisakkarit indüksiyonundan 1 saat önce farklı dozlarda uygulanan KAR tedavisinin; TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerini akciğer hasarı oluşan gruba göre önemli derecede azalttığı ve histolojik olarak daha iyi bir iyileşmenin olduğu gösterilmiştir.²⁴⁸

Ocaña ve Regleron,²⁴⁹ KAR ihtiva eden Thyme ekstraktı yağları ile inkübe edilen oksidize LDL ile aktive edilmiş THP-1 insan makrofaj örneklerinde; TNF- α , IL-1 β ve IL-6 üretimini ve gen ekspresyonunu in vitro olarak incelemişler ve kekik ekstraktlarının TNF- α , IL-1 β ve IL-6 üretimini ve gen ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir.

Üç farklı konsantrasyondaki thyme ve oregano esansiyel yağlarının 6 günlük kombine tedavisinin, trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS)-indüklü kolitise sahip fareler üzerindeki antienflamatuar etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, bu yağlarla tedavi edilen farelerin kolonlarından elde edilen total RNA'nın PCR analizlerinde IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir.²⁵⁰

Yukarıdaki çalışmaları genel olarak değerlendirdiğimizde, KAR'ın enflamatuar sitokin seviyelerini azaltarak anti-enflamatuar etki gösterdiğini söylemek mümkündür. Bizim çalışmamızın bulguları da bu çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Günümüzde yapılan son araştırmalara göre kemik yapım- yıkımının kontrolünde TNF ailesine bağlı bir dizi sitokin tanımlanmıştır. Şu ana kadar tanımlanabilmiş bu sitokin grubuna ait RANKL, reseptörü RANK ve tuzak reseptörü olan OPG; periodontal hastalık patogenezinin anlaşılmasında, immün sistem ve kemik metabolizması arasındaki etkileşimin incelenmesinde güncel bir konu olarak karşımıza çıkmakta ve

osteoklast biyolojisine ve kemik homeostazisine yeni bir moleküler perspektif kazandırmaktadır.^{15, 251}

Çalışmamız; kronik periodontitisin patojenik mekanizmasında KAR uygulamasının; serum IL-1 β , IL-6 ve TNF- α sitokin seviyelerine olan etkilerinin değerlendirilmesinin yanı sıra, osteoimmünolojik parametreler olan RANKL ve OPG seviyelerine olan etkisini de değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Literatürde KAR'ın kronik periodontitiste sistemik uygulamasının, RANKL ve OPG üzerine olan etkilerini bildiren herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Literatürde periodontal hastalıklı bireylerin dişeti dokuları ve DOS örneklerinde, artmış RANKL ve azalmış OPG seviyelerini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur.²⁵²⁻
²⁵⁶ Ayrıca periodontal doku yıkımının, immünobiyolojik yöntemlerle RANKL üretiminin ya da fonksiyonunun engellenmesiyle düzeltilebileceğini düşünen görüşler mevcuttur.²⁵⁷

Bostancı ve ark.nın,²⁵⁸ kronik ve agresif periodontitisli bireylerin DOS örneklerinde cerrahi olmayan periodontal tedavinin RANKL/OPG oranına olan etkilerini araştırdığı bir çalışmada, cerrahi olmayan tedavi sonrası, kronik ve agresif periodontitisli bireylerde RANKL/OPG oranının değişmediğini ve destekleyici tedavilerin göz önünde bulundurulması gerektiğini savunmuşlardır.

RANKL seviyesindeki artış OPG seviyesindeki azalma ile birliktedir. Enflamasyon sırasında açığa çıkan sitokinler, (IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α , lösemi inhibitör faktör ve onkostatın M) osteoblastları uyarak RANKL sentezinde artışa, OPG sentezinde ise azalmaya sebep olur. Bu durum da osteoklast formasyonunu uyarak kemik rezorpsiyonuyla sonuçlanır.²⁵⁹

İmmünohistokimyasal bulgularımızda; RANKL-pozitif hücre yoğunluğunun PED grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek, OPG- pozitif hücre

yoğunluğunun ise düşük olduğu görülmektedir. KAR-PED grubunda ise RANKL-pozitif hücre yoğunluğunun PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, OPG-pozitif hücre yoğunluğunun ise istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir. Sonuçlarımız, bu parametreler bakımından literatürdeki çalışmalarla uyumludur.

NF- κ B, transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir ve pek çok kronik enflamatuar hastalıkta yer alan genlerin ekspresyonunu düzenlemede anahtar rol oynar.¹¹² Özellikle IL-1, TNF α , and RANKL gibi NF- κ B aktivasyonu ile ilgili sitokin seviyeleri periodontal hastalıkta artmaktadır. Çalışmalar TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi NF- κ B uyaranlarıyla RANKL proteinlerinin sürekli bir tetikleyici döngüde olduğunu göstermektedir. Bu esnada osteoblastlardan salgılanan RANKL ve reseptörü RANK ile bağlantısı RANKL aracılı osteoklastogenezisi meydana getirir. Arabacı ve ark.nın,⁶⁶ kronik periodontitisli ve sağlıklı bireylerin gingiva örneklerinde sitoplazmik ve nükleer NF- κ B aktivasyonunu immünohistokimyasal olarak değerlendirdikleri bir çalışmada, kronik periodontitisli grupta NF- κ B aktivasyonunun sağlıklı gruba göre oldukça yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Banji ve ark.ı;²⁶⁰ artrit indüklenmiş ratlarda, artrit tedavisinde etkinliği kanıtlanmış ancak hepatotoksik etkisi bulunan methotrexatın KAR ile kombine tedavisinde, 32 gün boyunca uygulanan KAR'ın methotrexatın oluşturduğu karaciğer hasarını azalttığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada KAR'ın methotrexatın oluşturduğu karaciğer hasarını TNF- α ve NF- κ B sinyalizasyonuna engel olarak azalttığı gösterilmiştir.

D-galaktozamin indüklü hepatotoksik ratlarda KAR'ın antienflamatuar mekanizmasını aydınlatmak üzere yapılan bir başka hayvan çalışmasında; 6 günlük

KAR tedavisinin NF- κ B ekspresyonunu azalttığı bunun sonucunda da sitokin gen ekspresyonunu baskıladığı ve karaciğer hasarını azalttığı ortaya konmuştur.²⁶¹

Daha önce de bahsedilen Feng ve ark.nın²⁴⁸ akut akciğer hasarı oluşturulmuş ratlar üzerinde KAR'ın antienflamatuar etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, KAR'ın NF- κ B ve MAPKs sinyalizasyonunu inhibe ederek sitokin üretimini baskıladığı ve bu yolla antienflamatuar etki gösterebileceği öne sürülmüştür.

Literatürler ve çalışmamızın bulguları ışığında PED grubunda enflamasyona bağlı artan sitokin seviyelerinin NF- κ B aktivasyonuna sebep olduğu ve RANKL ekspresyonunu arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır. NF- κ B aktivasyonunun ise hücre içerisinde kısır bir döngü meydana getirerek RANKL ve sitokin ekspresyonunu arttırdığını söylemek mümkündür. RANKL pozitif hücre yoğunluğundaki bu artışın ise OPG-pozitif hücre yoğunluğunda azalmaya yol açarak, RANKL aracılı osteoklastogenezise ve alveoler kemik rezorbsiyonunda artışa neden olduğu düşünülmektedir. KAR uygulaması ise bu sitokinlerin salınımını azaltarak RANKL, OPG ekspresyonunu pozitif yönde düzenlemiş ve daha az alveoler kemik yıkımıyla sonuçlanmıştır. Bu yüzden bu çalışmada KAR ın, NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek enflamasyona bağlı alveoler kemik yıkımını azaltmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Dentisyonun desteği olan alveoler kemiğin yıkımı da periodontal hastalıkta oldukça önemlidir. Bakteriyel ürünler ve enflamatuar sitokinler tarafından oluşturulan osteoklast ve osteoblast aktivitesi arasındaki dengenin bozulması, enflamasyon kaynaklı alveolar kemik yıkımının temel sebebidir.¹⁶ Kemik remodelasyonunu gösteren biyokimyasal markırlar ise iskelette meydana gelen dinamik değişiklikleri anlamamıza yardımcı olur.²⁶²

CTx, kemik rezorbsiyonunu ölçmede kullanılan tip 1 kollajen ile ilgili yıkım markıdır.¹⁹ Son dönemlerde yapılan çalışmalar, kemik rezorbsiyonunun değerlendirilmesinde CTx'in diğer markırlardan daha iyi olduğunu göstermiştir.²⁰ Serum CTx seviyelerini değerlendirdiğimiz bu çalışmada; alveoler kemik rezorbsiyonu gözlenen PED grubunda serum CTx seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, KAR-PED grubunda ise PED grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Literatürde alveolar kemik yıkımının ve bu yıkımı azaltmak üzere uygulanan çeşitli tedavi stratejilerinin değerlendirildiği az sayıda çalışmada CTx in yıkım markırı olarak incelendiği anlaşılmaktadır.^{168,263}

Yapılan çalışmalar CTx seviyelerinin kronik periodontitisli hastaların tükürük örneklerinde yükseldiğini ortaya koymuştur.^{166,169} Ayrıca osteoporozisli kadınlar üzerinde yapılan bir çalışmada serum CTx seviyelerinin, aktif ve geçmişte periodontitis öyküsü bulunan osteoporozisli kadınlarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuş ve bu seviyenin aktif periodontal hastalığı bulunan osteoporozlu kadınlarda daha yüksek olduğu görülmüştür.²⁵⁷

Rodrigues ve ark.ı,²⁶³ düşük doz propranolol uygulamasının enflamasyon ve osteoklast farklılaşması üzerine olan etkilerini değerlendirdiği bir hayvan çalışmasında, ligatür bağlı periodontal hastalıklı grubun dişeti dokularında CTx seviyelerinin sağlıklı gruba göre anlamlı derecede arttığını göstermiştir.

Foureaux ve ark.nın¹⁶⁸ hareket kısıtlılığına bağlı stres ve deneysel periodontitis oluşturduğu ratlarda probiyotik tedavisinin metabolik ve enflamatuvar parametreler üzerine olan etkilerini araştırdığı bir başka hayvan çalışmasında ise deneysel periodontitisli ve stres+periodontitisli rat gruplarında alveoler kemik rezorbsiyonu ve serum CTx seviyelerinin arttığı, probiyotik tedavisinin ise bu gruplarda rezorbsiyonu ve CTx seviyesini azalttığını göstermiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular literatür

bilgileri ile uyumluluk göstermektedir. Kontrol grubuna göre PED grubundaki CTx seviyesindeki yükseklik, enflamasyona bağılı artan RANKL ve sitokin seviyelerinin osteoklastik aktiviteyi artırmasıyla ilişkilendirilebilir. KAR uygulamasının ise enflamatuvar sitokinleri ve RANKL aracılı osteoklastogenezisi engelleyerek kemik rezorbsiyonunu baskıladığı söylenebilir. PED grubuna göre KAR-PED grubundaki düşük CTx seviyesi de bunun göstergesidir.

Kemik remodelasyonu teorik olarak, rezorbsiyon ve formasyon esnasında salınan kimyasal yapıların miktarlarının karşılaştırılmasıyla değerlendirilebilir. KALP, kemik remodelasyonunun formasyon fazında yüksek miktarda üretilen, bu yüzden de kemik yapım aktivitesini gösteren mükemmel bir indikatör olarak kabul edilmektedir.¹⁹ Literatürde KAR uygulamasının, önemli bir kemik yapım markırı olan KALP seviyeleri üzerine olan etkilerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz serum KALP seviyelerinin; PED grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük, KAR-PED grubunda ise PED grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir. Periodontoloji alanında KALP seviyelerinin değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen, çeşitli ilaç uygulamalarının alveolar kemik rezorbsiyonu üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği hayvan çalışmalarının tümünde KALP seviyelerinin ligatüre bağılı periodontitis sonucunda düştüğü görülmüştür.^{214, 264-266} Bizim çalışmamızın sonuçları da bu çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

Bakteriyel plağa karşı gelişen enflamatuvar cevapta konak hücreleri tarafından salgılanan proteinazlar, sitokinler ve PGE'ler yumuşak ve sert dokuda hasara ya da yıkıma sebep olurlar.²¹² Çalışmamızın sonuçlarını histopatolojik olarak değerlendirdiğimizde ise; PED grubunda ligatüre bağılı gelişen kronik enflamasyon sonucu gingivada epitel kaybı ve PMNL hücre infiltrasyonun yoğun olduğu

görülmektedir. Ayrıca bağ dokuda kollajen yıkımının meydana geldiği, yer yer nekrotik alanların olduğu ve birleşim epitelinin apikale doğru yer değiştirdiği histolojik kesitlerde görülmektedir. Bu değişikliklerin ise KAR uygulaması ile önemli bir oranda azaldığı histopatolojik olarak gösterilmektedir. Bu da bakteriyel plâga karşı gelişen enflamatuvar cevabın KAR tarafından module edildiği ve meydana gelen doku hasarını azalttığı şeklinde yorumlanmıştır.

Dental radyografiler periodontal hastalıkların değerlendirilmesinde tamamlayıcı bir rol oynar. Uygun radyografi olmaksızın yapılan periodontal muayene eksik bir muayenedir.²⁶⁷ Bu bilgiden yola çıkarak dijital radyografi örneklerinin analizinde PED grubunda mezial ve distal alveoler kemik yüzdelerinin diğer druplara göre anlamlı derecede düşük olduğu, KAR tedavisi uygulanan KAR-PED grubunda ise PED grubuna göre bu yüzdenin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Ligatürün oluşturduğu mekanik travma ve plak birikimindeki artışın periodontal dokuda enflamasyon meydana getirdiği ve bu enflamasyonun osteoklast aktivitesindeki artış sonucu alveoler kemik rezorpsiyonuyla sonuçlandığını gösteren çok sayıda hayvan çalışması bulunmaktadır.^{266, 268, 269} PED grubundaki alveoler kemik kaybı bu çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermektedir. Ancak KAR'ın sistemik uygulamasının deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda alveoler kemik rezorpsiyonu üzerine olan etkilerini radyografik olarak değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın radyografik sonuçları KAR'ın alveoler kemik rezorpsiyonunu azalttığı yönündedir.

İmmün ve enflamatuvar yanıtın periodontal hastalık patogenezindeki rolünün anlaşılması ile birlikte, konak cevabını değiştirmek üzere yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi araştırmacıların ilgisini çeken bir konu haline gelmiştir. Bu da çeşitli

konak modulator ajanlarının geliştirilmesini sağlamış ve günümüzde halen yeni ajanların keşfine yönelik araştırmaların devam etmesine ön ayak olmuştur.^{21, 172}

Özetle çalışmamız KAR'ın sistemik uygulamasının, periodontal hastalık patogenezinde önemli rol oynayan enflamatuvar sitokinler, osteoimmünolojik parametreler ve karmaşık kemik remodelasyonu sürecine ışık tutan kemik yapım/yıkım markırları üzerine olan etkilerini incelenmiştir. Bulgularımız KAR uygulamasının enflamatuvar sitokin seviyeleri ve osteo-immünolojik parametreler üzerine pozitif yönde etki gösterdiğini, bunun sonucunda da alveoler kemik rezorpsiyonunu azalttığını göstermektedir. Alveoler kemik rezorpsiyonundaki bu azalma da çalışmamızda kullanılan kemik yapım/yıkım markırları ve radyografik ölçümler tarafından desteklenmektedir.

Sonuç olarak çalışmamız KAR tedavisinin periodontitis sonucu oluşan alveoler kemik yıkımını azalttığını ve konak modülasyonu tedavisinde kullanılabilecek immünomodulator bir ajan olabileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamız, KAR'ın sistemik uygulamasının periodontal dokular üzerine olan etkilerini değerlendiren ilk çalışma olması nedeniyle konuyla ilgili yapılabilecek diğer çalışmalara öncü nitelik taşımaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde;

1. Serum örneklerinde IL-6 ve TNF- α seviyelerinin PED grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü.
2. Serum IL-1 β seviyesinin PED grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu ancak bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.
3. Serum IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinin, KAR-PED grubunda PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi.
4. Anti-RANKL pozitif hücre yoğunluğunun PED grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü.
5. KAR-PED grubunda anti-RANKL pozitif hücre yoğunluğunun PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi.
6. Anti-OPG pozitif hücre yoğunluğunun PED grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi.
7. KAR-PED grubunda anti-OPG pozitif hücre yoğunluğunun PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü.
8. Serum CTx seviyesinin en yüksek PED grubunda, en düşük kontrol grubunda olduğu belirlendi.
9. Serum CTx seviyesinin KAR-PED grubunda PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi.
10. Serum KALP seviyelerinin PED grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, KAR-PED grubunda ise PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi.
11. Yapılan histopatolojik değerlendirmelerde, PED grubunda kontrol grubuna göre şiddetli periodontal ataşman kaybının, enflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve

alveoler kemik rezorpsiyonunun olduğu görüldü. KAR-PED grubunda ise PED grubuna göre ataçman kaybının, enflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve alveoler kemik rezorpsiyonunun daha az olduğu gösterildi.

12.Radyografik ölçümlerin değerlendirilmesinde, PED grubunda MKS ve DKS'nin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, KAR-PED grubunda ise PED grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü.

13.Bu çalışmadan elde edilen bulgular KAR'ın sistemik uygulamasının enflamatuvar sitokin seviyelerini azaltarak RANKL aracılı osteoklastogenezisi inhibe ettiğini ve bunun sonucunda da alveoler kemik rezorpsiyonunu azalttığını göstermektedir. Çalışmamız KAR'ın periodontitis tedavisinde kullanılabilecek immünomodulator bir ajan olabileceğini göstermektedir ancak bunun için ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 2005, 32 Suppl 6: 108-129.
2. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Modulation of cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* in a macrophage and epithelial cell co-culture model. *Microbes and Infection*, 2005, 7: 448-456.
3. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *Journal of Periodontology* , 2008, 79: 1560-1568.
4. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology*, 1994, 65: 260-267.
5. Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, Furusawa K, Kurihara S, Wang PL. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 2009, 44: 21-27.
6. Sezgin N, Sezgin AT, Güllü H, Karabulut A, Özyalın F, Topal E, Gözükar EM. Sitokin, nitrik oksit ve süperoksit dismutaz düzeylerinin miyokard fonksiyonu üzerine etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2004, 29: 178-182.
7. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 2010, 89: 1349-1363.
8. Fonseca JE, Santos MJ, Canhao H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity Reviews*, 2009, 8: 538-542.

9. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 2008, 35: 89-105.
10. Sandberg GE, Sundberg HE, Fjellstrom CA, Wikblad KF. Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2000, 50: 27-34.
11. Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 2004, 31: 671-679.
12. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 2008, 79: 1569-1576.
13. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1143: 123-150.
14. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Mochizuki SI, Tsuda E, Morinaga T, Udagawa N, Takahashi N, Suda T, Higashio K. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone*, 1999, 25 (1): 109-113.
15. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2004, 15: 457-475.
16. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000*, 2010, 52: 163-206.
17. Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. *Endocrine Reviews*, 1988, 9: 437-449.

18. Whyte MP. Alkaline phosphatase and the measurement of bone formation in clinical disorders of bone and mineral metabolism. In: Frame C, Potts JT, Jr (eds). *Clinical Disorders of Bone and Mineral Metabolism*, Amsterdam, Excerpta Medica, 1983: 120-125.
19. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Biochemistry*, 1997, 30: 573-593.
20. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chimica Acta*, 2001, 313: 95-105.
21. Oringer RJ. Modulation of the host response in periodontal therapy. *Journal of Periodontology* , 2002, 73: 460-470.
22. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 1985, 63: 965-981.
23. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94: 223-253.
24. Jo JR, Park JS, Park YK, Chae YZ, Lee GH, Park GY, Jang BC. Pinus densiflora leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. *International Journal of Oncology*, 2012, 40: 1238-1245.
25. Yap PS, Yiap BC, Ping HC, Lim SH. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 2014, 8: 6-14.
26. Başer KHC. Her Derde Deva Kekik. *Bilim ve Teknik Dergisi*, 2001, Mayıs:74-77.
27. T. Baytop, *Türkiye’de Tıbbi Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*, İlaveli 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 1999: 480.
28. Baydar H. Yayla kekiği (*Origanum minutiflorum*)' nde farklı toplama zamanlarının uçucu yağ içeriği ve uçucu yağ bileşenleri üzerine etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2005, 18: 175-178.

29. Yu H, Zhang ZL, Chen J, Pei A, Hua F, Qian X, He J, Liu CF, Xu X. Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *PLoS One*, 2012, 7: 33584.
30. Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MD, Lima FC, Lahlou S, Magalhaes PJ, Ceccatto VM, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2010, 24: 341-350.
31. Kulisic T, Krisko A, Dragovic-Uzelac V, Milos M, Pifat G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2007, 58: 87-93.
32. Zeidan-Chulia F, Gursoy M, de Oliveira BH, Gelain DP, Kononen E, Gursoy UK, Moreira JC, Uitto VJ. Focussed microarray analysis of apoptosis in periodontitis and its potential pharmacological targeting by carvacrol. *Archives of Oral Biology*, 2014, 59: 461-469.
33. Melo FH, Moura BA, de Sousa DP, de Vasconcelos SM, Macedo DS, Fonteles MM, Viana GS, de Sousa FC. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2011, 25: 362-367.
34. Silva FV, Guimaraes AG, Silva ER, Sousa-Neto BP, Machado FD, Quintans-Junior LJ, Arcanjo DD, Oliveira FA, Oliveira RC. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15: 984-991.

35. Botelho MA, Rao VS, Montenegro D, Bandeira MA, Fonseca SG, Nogueira NA, Ribeiro RA, Brito GA. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phytotherapy Research*, 2008, 22: 442-449.
36. Botelho MA, Martins JG, Ruela RS, I R, Santos JA, Soares JB, Franca MC, Montenegro D, Ruela WS, Barros LP, Queiroz DB, Araujo RS, Sampoio FC. Protective effect of locally applied carvacrol gel on ligature-induced periodontitis in rats: a tapping mode AFM study. *Phytotherapy Research*, 2009, 23: 1439-1448.
37. Shahab A, Haghighati F, Baeeri M, Jamalifar H, Abdollahi M. A clinical, microbiological and immunological comparison between subgingival irrigation with Dentol and chlorhexidine in advanced periodontitis. *Archives of Medical Science*, 2011, 7: 154-160.
38. Williams RC. Periodontal disease. *The New England Journal of Medicine*, 1990, 322: 373-382.
39. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *Journal of Periodontology*, 2005, 76: 2187-2193.
40. Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of Periodontology*, 2005, 76: 2089-2100.
41. Listgarten MA. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *Journal of Periodontal Research*, 1987, 22: 172-178.
42. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008, 454: 428-435.

43. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology 2000*, 2014, 64: 139-153.
44. Zare Javid A, Seal CJ, Heasman P, Moynihan PJ. Impact of a customised dietary intervention on antioxidant status, dietary intakes and periodontal indices in patients with adult periodontitis. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2013, Dec 6. doi: 10.1111/jhn.12184
45. Armitage GC. Classifying periodontal diseases--a long-standing dilemma. *Periodontology 2000*, 2002, 30: 9-23.
46. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Chronic Periodontitis. In: Novak MJ, Novak KF (eds). *Carranza's Clinical Periodontology*, 11th ed. St. Louis, Missouri, Elsevier Saunders, 2012: 160-164.
47. Lindhe J, Okamoto H, Yoneyama T, Haffajee A, Socransky SS. Longitudinal changes in periodontal disease in untreated subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 1989, 16: 662.
48. Lang NP, Schatzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. . *Journal of Clinical Periodontology*, 2009, 36: 3-8.
49. Lindhe J, Okamoto H, Yoneyama T, Haffajee A, Socransky SS. Periodontal loser sites in untreated adult subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 1989, 16: 671-678.
50. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 2004, 34: 9-21.
51. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Periodontal Microbiology. In: Teughels W, Quirynen M, Jakubovics N (eds). *Carranza's*

- Clinical Periodontology*, 11th ed. St. Louis, Missouri, Elsevier Saunders, 2012: 241.
52. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology 2000*, 2005, 38: 9-12.
53. Tanner AC, Kent JR, Kanasi E, Lu SC, Paster BJ, Sonis ST, Murray LA, Van Dyke TE. Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. *Journal of Clinical Periodontology*, 2007, 34: 917-930.
54. Wolf HF, Rateitschak EM, Rateitschak KH, Parodontologie. Çeviri: Hatipoğlu, H. *Periodontoloji*, 3. Baskı. Ankara, Palme Yayınları, 2007: 95-118.
55. Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontology 2000*, 2002, 29: 31-69.
56. Hyman JJ, Reid BC. Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. *Journal of Clinical Periodontology*, 2003, 30: 230-237.
57. Sandberg GE, Sundberg HE, Fjellstrom CA, Wikblad KF. Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Research and Clinical Practice*., 2000, 50: 27-34.
58. Ronderos M, Ryder MI. Risk assessment in clinical practice. *Periodontology 2000*, 2004, 34: 120-135.
59. Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology 2000*, 2003, 32: 82-104.
60. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*, 2005, 366: 1809-2180.
61. Ritchie CS, Kinane DF. Nutrition, inflammation, and periodontal disease. *Nutrition*, 2003, 19: 475-476.

62. Reddy MS. Osteoporosis and periodontitis: discussion, conclusions, and recommendations. *Annals of Periodontology*, 2001, 6: 214-217.
63. Wactawski-Wende J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Annals Periodontology*, 2001, 6: 197-208.
64. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *Journal of Periodontology*, 2001, 72: 368-373.
65. Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Annals Periodontology*, 1999, 4: 54-64.
66. Arabacı T. Plağa Bağlı Gingivitis, Kronik Periodontitis ve Agresif Periodontitisli Bireylerde Dişeti Dokusunda Nükleer Faktör-kappa B (NF-κB) ve İnhibitör kappa B (İkB) Seviyelerinin İmmunohistokimyasal ve Stereolojik Olarak İncelenmesi ve Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2009.
67. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, 1997, 14: 9-11.
68. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 2008, 79: 1585-1591.
69. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 2001, 25: 8-20.
70. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, 1976, 34: 235-249.
71. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 2014, 64: 57-80.

72. Çetinkaya B. Romatoid Artrit ve Kronik Periodontitis Hastalarında Proenflamatuar (TNF- α , IL-1 β) Ve Anti-enflamatuar (IL-10, IL-4) Sitokin Düzeylerinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Anabilim Dalı, Ankara: Başkent Üniversitesi, 2009.
73. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontology 2000*, 2009, 50: 90-126.
74. Van Dyke TE, Kornman KS. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *Journal of Periodontology*, 2008, 79: 1503-1507.
75. Kinane DF, Podmore M, Murray MC, Hodge PJ, Ebersole J. Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontology 2000*, 2001, 26: 54-91.
76. Newman MG, Takei HH, Klokavold PR. Microbial Interactions with the Host in Periodontal Diseases. In: Nisengard RJ, Haake SK, Newman MG, Miyasaki KT (eds). *Carranza's Clinical Periodontology*, 10th ed. Philadelphia London New York St. Louis Sydney Toronto, W.B Saunders Company, 2006: 234-235
77. Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontology 2000*, 1999, 20: 239-288.
78. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scientific American*, 1992, 267: 54-61.
79. Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Garlet TP, Cestari TM, Lima HR, Ramos ES, de Souza Malaspina TS, Santos CF, Garlet GP, da Silva JS, Campanelli AP. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontology*, 2009, 80: 2010-2019.

80. Haffajee AD, Dibart S, Kent RL, Jr., Socransky SS. Factors associated with different responses to periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 1995, 22: 628-636.
81. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000*, 1997, 14: 216-248.
82. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 1989, 7: 145-173.
83. Billack B. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *The American Journal of Pharmaceutical Education*, 2006, 70: 102.
84. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
85. Bingham Iii CO. Round 34: Periodontal Disease and Rheumatoid Arthritis. <http://www.hopkinsarthritis.org/physician-corner/rheumatology-rounds/round-34-periodontal-disease-and-rheumatoid-arthritis/>. 9 Temmuz 2010.
86. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontal Research*, 1996, 31: 489-495.

87. Fisman EZ, Motro M, Tenenbaum A. Cardiovascular diabetology in the core of a novel interleukins classification: the bad, the good and the aloof. *Cardiovascular Diabetology*, 2003, 2: 11.
88. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1998, 9: 248-266.
89. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *Journal of Clinical Periodontology*, 2003, 30: 145-153.
90. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 1991, 18: 548-554.
91. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison AC. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 1993, 20: 225-231.
92. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 2011, 117: 3720-3732.
93. Ebersole JL, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology 2000*, 2000, 23: 19-49. 95.
94. Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *Journal of Periodontology*, 1993, 64: 416-431.
95. Gemmell E, Seymour GJ. Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor-beta production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Periodontal Research*, 1993, 28: 122-129.

96. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 1996, 87: 2095-2147.
97. Souza PP, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunological investigations*, 2013, 42: 555-622.
98. Ma T, Miyanishi K, Suen A, Epstein NJ, Tomita T, Smith RL, Goodman SB. Human interleukin-1-induced murine osteoclastogenesis is dependent on RANKL, but independent of TNF-alpha. *Cytokine*, 2004, 26: 138-144.
99. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*, 2010, 140: 821-832.
100. Jimi E, Shuto T, Koga T. Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology*, 1995, 136: 808-811.
101. Tobon-Arroyave SI, Jaramillo-Gonzalez PE, Isaza-Guzman DM. Correlation between salivary IL-1beta levels and periodontal clinical status. *Archives of Oral Biology*, 2008, 53: 346-352.
102. Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Epplen JT. The polymorphism at position -174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2001, 13: 45-47.
103. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology Today*, 1990, 11: 443-449.
104. Taylor JJ. Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, 2010, 54: 160-194.
105. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 18138-18144.

106. Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 2004, 75: 30-36.
107. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *Journal of Periodontology*, 2002, 73: 1377-1391.
108. Otenio CC, Fonseca I, Martins MF, Ribeiro LC, Assis NM, Ferreira AP, Ribeiro RA. Expression of IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, and iNOS in pregnant women with periodontal disease. *Genetics and molecular research*, 2012, 11: 4468-4478.
109. Chaudhary LR, Spelsberg TC, Riggs BL. Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha: lack of regulation by 17 beta-estradiol. *Endocrinology*, 1992, 130: 2528-2534.
110. Van der Pluijm G, Most W, van der Wee-Pals L, de Groot H, Papapoulos S, Lowik C. Two distinct effects of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on osteoclast development and subsequent resorption of mineralized matrix. *Endocrinology*, 1991, 129: 1596-1604.
111. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 2003, 74: 391-401.
112. Abu-Amer Y. NF-kappaB signaling and bone resorption. *Osteoporosis International*, 2013, 24: 2377-2386.
113. Li Q, Verma IM. NF-κB regulation in the immun system. *Nature Reviews*, 2002, 2: 725-735.

114. Arabaci T, Kose O, Kizildag A, Albayrak M, Cicek Y, Kara A. Role of nuclear factor kappa-B in phenytoin-induced gingival overgrowth. *Oral Diseases*, 2014, 20: 294-300.
115. Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 234: 137-142.
116. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997, 390: 175-179.
117. Boyce BF, Xing L, Chen D. Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metabolism*, 2005, 2: 344-345.
118. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*, 1999, 25: 517-523.
119. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *American Journal of Pathology*, 2006, 169: 987-998.
120. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor

- necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews*, 1999, 20: 345-357.
121. Blair JM, Zhou H, Seibel MJ, Dunstan CR. Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2006, 3: 41-49.
 122. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275 (3): 768-765
 123. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002, 22: 549-553.
 124. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*, 2007, 9 Suppl. 1: 1.
 125. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/ RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2004, 15: 457-475.
 126. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 2001, 142: 5050-5055
 127. Stejskal D, Bartek J, Pastorkova R, Ruzicka V, Oral I, Horalik D. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 2001, 145: 61-64.

128. Walsh MC, Choi Y. Biology of the TRANCE axis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003, 14: 251-263.
129. Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A, Rafferty KL, Marshall AJ, Moon JJ, Ewings ME, Mohaupt M, S.W. H, Clark EA. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *Journal of Immunology*, 2001, 166: 1482-1491.
130. Lerner UH. New Molecules in the Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Superfamilies with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2004, 15: 64-81.
131. Makhluף HA, Mueller SM, Mizuno S, Glowacki J. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 268: 669-672.
132. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2006, 11: 47-51.
133. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, 2008, 61: 577-587.
134. Seino Y. Cytokines and growth factors which regulate bone cell function. *Acta Astronautica* , 1994, 33: 131-136.
135. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2014, 51: 189-202.

136. Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 29-55.
137. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends in Molecular Medicine*, 2005, 11: 76-81.
138. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—a hypothesis. *Calcified Tissue International*, 1981, 33: 349-351.
139. Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, 90: 6323-6331.
140. Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2006, 4: 801-811.
141. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93: 165-176.
142. Teitelbaum SL. Bone remodeling and the osteoclast. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1993, 8 Suppl. 2: 523-525.
143. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. *Bone*, 1986, 7: 213-221.
144. Gina F. Relationship b/w RANKL and Osteoprotegerin (OPG).
<http://www.studyblue.com/notes/n/pathology-mini-ii/deck/2160398>. 15 Şubat 2012.

145. Risteli L, Risteli J. Biochemical markers of bone metabolism. *Annals of Medicine*, 1993, 25: 385-393.
146. Burtis CA, Ashwood EA, Burns DE. *Teitz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Bask1. St Louis: Elsevier, 2006.
147. Christenson RH, Panigrahi K, Chapman JC, Silverman LM. Isoenzymes and isoforms. In: Kaplan LA, Pesce AJ (eds). *Clinical Chemistry Theory, Analysis, Correlation*, 3rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1996: 1077-1085.
148. Schiele F, Henny J, Hitz J, Petitclerc C, Gueguen R, Siest G. Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma: biological variations and reference limits. *Clinical Chemistry*, 1983, 29: 634-641.
149. Hill CS, Wolfert RL. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. *Clinical Chemistry*, 1989, 186: 315-320.
150. Van Straalen JP, Sanders R, Prummel MF, Sanders GTB. Bone alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clinica Chimica Acta*, 1991, 201: 27-33.
151. Delmas P. Biochemical markers of bone turnover: methodology and clinical use in osteoporosis. *American Journal of Medicine*, 1991, 91 (5B): 59-63.
152. Duda RJ, Jr., O'Brien JF, Katzmann JA, Peterson JM, Mann KG, Riggs BL. Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1988, 66: 951-957.
153. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1993, 77: 1046-1053.

154. Woitge HW, Seibel MJ, Ziegler R. Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorder or metabolic bone diseases. *Clinical Chemistry*, 1996, 42: 1796-1804.
155. Banzragch M. Multiple Miyelom Tanılı Hastalarda Serum CTX Düzeyi ve Kullanılan Biofosfanat Tedavisi Sonrası Oluşan Çene Nekrozu İnsidansı İle Serum CTX Düzeyinin İlişkisi. İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul: T.C. İstanbul Üniversitesi, 2010.
156. Garnero P, Cloos P, Sornay-Rendu E, Qvist P, Delmas PD. Type I collagen racemization and isomerization and the risk of fracture in postmenopausal women: the OFELY prospective study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17: 826-833.
157. Garnero P, Buchs N, Zekri J, Rizzoli R, Coleman RE, Delmas PD. Markers of bone turnover for the management of patients with bone metastases from prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 2000, 82: 858-864.
158. Peris P, Alvarez L, Vidal S, Kasper D, Leeming DJ, Monegal A, Angeles Martinez M, Pons F, Guanabens N. Biochemical response to bisphosphonate therapy in pagetic patients with skull involvement. *Calcified Tissue International* , 2006, 79: 22-26.
159. Plebani M, Bernardi D, Zaninotto M, De Paoli M, Secchiero S, Sciacovelli L. New and traditional serum markers of bone metabolism in the detection of skeletal metastasis *Clinical Biochemistry*, 1996, 29: 67-72.
160. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy M-C, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1996, 11: 337-349.

161. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, Cormier C, Breart G, Meunier PJ, Delmas PD. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1996, 11: 1531-1538.
162. Garnero P, Gineyts E, Arbault P, Christiansen C, Delmas PD. Different effects of bisphosphonate and estrogen therapy on free and peptide-bound bone cross-links excretion. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1995, 10: 641-649.
163. Coles RB, Ranney RR, Freer RJ, Carchman RA. Thermal regulation of FMLP receptors on human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 1989, 45: 529-537.
164. DeNardin E, DeLuca C, Levine MJ, Genco RJ. Antibodies directed to the chemotactic factor receptor detect differences between chemotactically normal and defective neutrophils from LJP patients. *Journal of Periodontology*, 1990, 10: 609-617.
165. Astemborski JA, Boughman JA, Myrick PO, Goodman SB, Wooten RK, Agarwal S, Vincent JW, Suzuki JB. Clinical and laboratory characterization of early onset periodontitis. *Journal of Periodontology*, 1989, 60: 557-563.
166. Gursoy UK, Kononen E, Huumonen S, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen AL, Sorsa T. Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 2013, 40: 18-25.
167. Mackler BF, Altman LC, Wahl S, Rosenstreich DL, Oppenheim JJ, Mergenhagen SE. Blastogenesis and lymphokine synthesis by T and B lymphocytes from patients with periodontal disease. *Infection and Immunity*, 1974, 10: 844-850.
168. Foureaux RD, Messori MR, de Oliveira LF, Napimoga MH, Pereira AN, Ferreira MS, Pereira LJ. Effects of Probiotic Therapy on Metabolic and Inflammatory

- Parameters of Rats With Ligature-Induced Periodontitis Associated With Restraint Stress. *Journal of Periodontology*, 2014, 85(7): 975-983
169. Miricescu D, Totan A, Calenic B, Mocanu B, Didilescu A, Mohora M, Spinu T, Greabu M. Salivary biomarkers: relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2014, 72: 42-47.
 170. Wheeler G, Elshahaly M, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *Journal of Translational Medicine*, 2013, 11: 201.
 171. Ju HS, Leung S, Brown B, Stringer MA, Leigh S, Scherrer C, Shepard K, Jenkins D, Knudsen J, Cannon R. Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. *Clinical Chemistry*, 1997, 43: 1570-1576.
 172. Kornman KS. Host modulation as a therapeutic strategy in the treatment of periodontal disease. *Clinical Infectious Diseases*, 1999, 28: 520-526.
 173. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *The New England Journal of Medicine*, 2001, 345: 433-442.
 174. Heasman PA, Hughes FJ. Drugs, medications and periodontal disease. *British Dental Journal*, 2014, 217: 411-419.
 175. Lindsley CB, Warady BA. Nonsteroidal antiinflammatory drugs. Renal toxicity. Review of pediatric issues. *Clinical Pediatrics*, 1990, 29: 10-13.
 176. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1993, 4: 197-250.
 177. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontology 2000*, 2000, 24: 226-238.

178. Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 2003, 36: 128-137.
179. Borgeson E, Lonn J, Bergstrom I, Brodin VP, Ramstrom S, Nayeri F, Sarndahl E, Bengtsson T. Lipoxin A(4) inhibits porphyromonas gingivalis-induced aggregation and reactive oxygen species production by modulating neutrophil-platelet interaction and CD11b expression. *Infection and Immunity*, 2011, 79: 1489-1497.
180. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 2008, 79: 1601-1608.
181. Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153 Suppl. 1: 200-215.
182. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, Van Dyke TE. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *The Journal of Immunology*, 2007, 179: 7021-7029.
183. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 2007, 43: 294-315.
184. Park HJ, Jeong SK, Kim SR, Bae SK, Kim WS, Jin SD, Koo TH, Jang HO, Yun I, Kim KW, Bae MK. Resveratrol inhibits Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced endothelial adhesion molecule expression by suppressing NF-kappaB activation. *Archives of Pharmacal Research*, 2009, 32: 583-591.

185. Huth KC, Saugel B, Jakob FM, Cappello C, Quirling M, Paschos E, Ern K, Hickel R, Brand K. Effect of aqueous ozone on the NF-kappaB system. *Journal of Dental Research*, 2007, 86: 451-456.
186. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 1998, 123: 353-360.
187. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *British Dental Journal*, 2013, 214: 467-741.
188. Chapple IL. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *Clinical Molecular Pathology*, 1996, 49: 247-255.
189. Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozoglu U, Kalkan Y, Canakci CF, Tozoglu S. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 2013, 55: 21-26.
190. Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. *Journal of Periodontal Research*, 2002, 37: 433-438.
191. Rizzo A, Bevilacqua N, Guida L, Annunziata M, Romano Carratelli C, Paolillo R. Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. *Cytokine*, 2012, 60: 197-204.
192. Toker H, Ozdemir H, Balci H, Ozer H. N-acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Periodontal Research*, 2012, 47: 793-799.

193. Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, Ellen RP, Penninger JM. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000, 106: 59-67.
194. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zheng MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *International Journal of Molecular Medicine*, 2003, 11: 17-21.
195. Valverde P, Kawai T, Taubman MA. Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004, 19: 155-164.
196. Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y, Chen C, Kalfas S, Lerner UH. The cytolethal distending toxin induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *Infection and Immunity*, 2005, 73: 342-351.
197. Shinoda H, Takeyama S, Suzuki K, Murakami S, Yamada S. Pharmacological topics of bone metabolism: a novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2008, 106: 555-558.
198. Shoji K, Horiuchi H, Shinoda H. Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, 1995, 30: 277-284.
199. Ozdemir SP, Kurtis B, Tuter G, Bozkurt S, Gultekin SE, Sengucen B, Watanabe K, Aydin S. Effects of low-dose doxycycline and bisphosphonate clodronate on alveolar bone loss and gingival levels of matrix metalloproteinase-9 and

- interleukin-1beta in rats with diabetes: a histomorphometric and immunohistochemical study. *Journal of Periodontology*, 2012, 83: 1172-1182.
200. Gulati M, Anand V, Govila V, Jain N. Host modulation therapy: An indispensable part of perioceutics. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2014, 18: 282-288.
 201. Bhattaram VA, Graefe U, Kohlert C, Veit M, Derendorf H. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomedicine*, 2002, 9 Suppl 3: 1-33.
 202. Yaldiz G. Some Antimicrobial Activity Plants Growing in Rize Region Used in Alternative Medicine *Journal of Life Sciences*, 2012, 6: 624-631.
 203. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Journal of Clinical Interventions in Aging*, 2007, 2: 377-387.
 204. D. K, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current Opinion in Pharmacology*, 2007, 3: 344-351.
 205. Soycan Önenç S, Açıkgöz Z. Aromatik Bitkilerin Hayvansal Ürünlerde Antioksidan Etkileri. *Hayvansal Üretim*, 2005, 46: 51-55.
 206. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46: 446-475.
 207. Baser KH. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design*, 2008, 14: 3106-3119.
 208. Austgulen LT, Solheim E, Scheline RR. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. *Pharmacology and Toxicology*, 1987, 61: 98-102.

209. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94: 223-253.
210. Souza DM, Rosa LP, Ricardo LH, Moraes LC, Rocha RF. Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. *Ciencia Odontologica Brasileira*, 2005, 8: 77-84.
211. Flemmig TF. Periodontitis. *Annals Periodontology*, 1999, 4: 32-38.
212. Dawson DR, 3rd, Branch-Mays G, Gonzalez OA, Ebersole JL. Dietary modulation of the inflammatory cascade. *Periodontology 2000*, 2014, 64: 161-197.
213. Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *Journal of Clinical Periodontology*, 2004, 31: 697-707.
214. de Menezes AM, de Souza GF, Gomes AS, de Carvalho Leitao RF, Ribeiro Rde A, de Oliveira MG, de Castro Brito GA. S-nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology* , 2012, 83: 514-521.
215. Dalcico R, de Menezes AM, Deocleciano OB, Oria RB, Vale ML, Ribeiro RA, Brito GA. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *Journal of Periodontology* , 2013, 84: 1145-57.
216. Schou S, Holmstrup P, Kornman KS. Non-human primates used in studies of periodontal disease pathogenesis: a review of the literature. *Journal of Periodontology* , 1993, 64: 497-508.
217. Anthony J, Waldner C, Grier C, Laycock AR. A survey of equine oral pathology. *Journal of Veterinary Dentistry*, 2010, 27: 12-15.
218. Zenobia C, Hasturk H, Nguyen D, Van Dyke TE, Kantarci A, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipid A phosphatase activity is critical for colonization and

- increasing the commensal load in the rabbit ligature model. *Infect Immun.*, 2014, 82: 650-659.
219. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 2011: 754857.
 220. De Vincenzi M, Stamatii A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 2004, 75: 801-804.
 221. Hagan EC, Hansen WH, Fitzhugh OG, Jenner PM, Jones WI, Taylor JM, Long EL, Nelson AA, Brouwer JB. Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1967, 5: 141-157.
 222. Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, Rashid S, Ali N, Sultana S. Carvacrol ameliorates thioacetamide-induced hepatotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in liver of Wistar rats. *Human & Experimental Toxicology*, 2013, 32: 1292-1304.
 223. Dagli Gul AS, Fadillioglu E, Karabulut I, Yesilyurt A, Delibasi T. The effects of oral carvacrol treatment against H₂O₂ induced injury on isolated pancreas islet cells of rats. *Islets*, 2013, 5: 149-155.
 224. Guimaraes AG, Xavier MA, de Santana MT, Camargo EA, Santos CA, Brito FA, Barreto EO, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Oliveira RC, Quintans-Junior LJ. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2012, 385: 253-263.
 225. Azırak S. Thymol ve Karvakrol'un in vivo Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Biyoloji Anabilim Dalı. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2007.
 226. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 1996, 14: 649-683.

227. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 1991, 62: 504-509.
228. Charon JA, Luger TA, Mergenhagen SE, Oppenheim JJ. Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infection and Immunity*, 1982, 38: 1190-1195.
229. Wilton JM, Bampton JL, Griffiths GS, Curtis MA, Life JS, Johnson NW, Powell JR, Harrap GJ, Critchley P. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross sectional study. *Journal of Clinical Periodontology*, 1992, 19: 53-57.
230. Hou LT, Liu CM, Rossomando EF. Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology*, 1995, 22: 162-167.
231. Yavuzylmaz E, Yamalik N, Bulut S, Ozen S, Ersoy F, Saatci U. The gingival crevicular fluid interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha levels in patients with rapidly progressive periodontitis. *Australian Dental Journal*, 1995, 40: 46-49.
232. Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T, Shirozu N, Yamagishi E, Ohguchi M, Koide M, Ueda N, Amano K, Noguchi T. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *Journal of Periodontal Research*, 1997, 32: 524-529.
233. Figueredo CM, Ribeiro MS, Fischer RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1beta concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *Journal of Periodontology*, 1999, 70: 1457-1463.

234. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *Journal of Periodontology*, 2001, 72: 590-597.
235. Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 2003, 38: 111-114.
236. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia, PA, Harcourt Brace and Company, 2003.
237. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 2006, 21: 256-260.
238. Bitto A, Oteri G, Pisano M, Polito F, Irrera N, Minutoli L, Squadrito F, Altavilla D. Adenosine receptor stimulation by polynucleotides (PDRN) reduces inflammation in experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 2013, 40: 26-32.
239. Napimoga MH, Benatti BB, Lima FO, Alves PM, Campos AC, Pena-Dos-Santos DR, Severino FP, Cunha FQ, Guimaraes FS. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *International Immunopharmacology*, 2009, 9: 216-222.
240. Ramamurthy NS, Xu JW, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, Watson B, Owen D, Wolff M, Greenwald RA. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 2002, 37: 1-7. 245.

241. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Archives of Oral Biology*, 1999, 44: 535-539.
242. Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, Gollob KJ, Dutra WO. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clinical & Experimental Immunology*, 2007, 148: 119-126.
243. Górski R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*., 2003, 30: 1046-1052.
244. Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen PQ, Matejka M, Rausch-Fan X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *Journal of Periodontology*, 2011, 82: 885-892.
245. Yamazaki K, Honda T, Oda T, Ueki-Maruyama K, Nakajima T, Yoshie H, Seymour GJ. Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 2005, 40: 53-58.
246. Coimbra LS, Rossa C, Jr., Guimaraes MR, Gerlach RF, Muscara MN, Spolidorio DM, Herrera BS, Spolidorio LC. Influence of antiplatelet drugs in the pathogenesis of experimental periodontitis and periodontal repair in rats. *Journal of Periodontology*, 2011, 82: 767-777.
247. Lima Mda S, Quintans-Junior LJ, de Santana WA, Martins Kaneto C, Pereira Soares MB, Villarreal CF. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a

- key role of interleukin-10. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 699: 112-117.
248. Feng X, Jia A. Protective effect of carvacrol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation*, 2014, 37: 1091-1101.
249. Ocana A, Reglero G. Effects of Thyme Extract Oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on Cytokine Production and Gene Expression of oxLDL-Stimulated THP-1-Macrophages. *Journal of Obesity*, 2012, 2012: 104706.
250. Bukovska A, Cikos S, Juhas S, Il'kova G, Rehak P, Koppel J. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators of Inflammation*, 2007, 2007: 23296.
251. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000*, 2010, 53: 55-69.
252. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, Berdeli A, Atilla G, McKay IJ, Hughes FJ, Belibasakis GN. Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, 2007, 42: 287-293.
253. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of Dental Research*, 2004, 83: 166-169.
254. Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontology*, 2004, 75: 1586-1591.

255. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 2006, 41: 354-360.
256. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *Journal of Clinical Periodontology*, 2007, 34: 370-376.
257. Jabbar S, Drury J, Fordham J, Datta HK, Francis RM, Tuck SP. Plasma vitamin D and cytokines in periodontal disease and postmenopausal osteoporosis. *Journal of Periodontal Research*, 2011, 46: 97-104.
258. Bostanci N, Saygan B, Emingil G, Atilla G, Belibasakis GN. Effect of periodontal treatment on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin levels and relative ratio in gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology*, 2011, 38: 428-433.
259. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research*, 2006, 85: 596-607.
260. Banji OJ, Banji D, Soumya N, Chilipi KK, Kalpana CH, Kranthi Kumar CH, Annamalai AR. Combination of carvacrol with methotrexate suppresses Complete Freund's Adjuvant induced synovial inflammation with reduced hepatotoxicity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 723: 91-98.
261. Aristatile B, Al-Assaf AH, Pugalendi KV. Carvacrol suppresses the expression of inflammatory marker genes in D-galactosamine-hepatotoxic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2013, 6: 205-211.

262. Fleisher KE, Welch G, Kottal S, Craig RG, Saxena D, Glickman RS. Predicting risk for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: CTX versus radiographic markers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 2010, 110: 509-516.
263. Rodrigues WF, Madeira MF, da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-da-Silva VJ, Barbosa-Neto O, Lopes AH, Napimoga MH. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *British Journal of Pharmacology.*, 2012, 165: 2140-2151.
264. Goes P, Melo IM, Dutra CS, Lima AP, Lima V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Archives of Oral Biology*, 2012, 57: 1537-1544.
265. Goes P, Melo IM, Silva LM, Benevides NM, Alencar NM, Ribeiro RA, Lima V. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research*, 2014, 49: 45-54.
266. Akman S, Canakci V, Kara A, Tozoglu U, Arabaci T, Dagsuyu IM. Therapeutic effects of alpha lipoic acid and vitamin C on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical, histochemical, and stereologic study. *Journal of Periodontology*, 2013, 84: 666-674.
267. Vijay G, Raghavan V. Radiology in Periodontics. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, 2013, 25: 24-29.
268. Herrera BS, Martins-Porto R, Campi P, Holzhausen M, Teixeira SA, Mendes GD, Costa SK, Gyurko R, Van Dyke TE, Spolidorio LC, Muscara MN. Local and cardiorenal effects of periodontitis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *Archives of Oral Biology*, 2011, 56: 41-47.

269. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG.
Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced
periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 2007, 78: 566-575.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Eda KERMEN
Doğum tarihi: 02.01.1986
Doğum yeri: TURGUTLU
Medeni hali: Bekar
Uyruğu: T.C.
Adres: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM
Tel: 0442 231 19 02
Faks:
E-mail: eda_kermenn@hotmail.com
Eğitim
Lise: Turgutlu Anadolu Lisesi (2004)
Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2004-2009)
Yüksek lisans:
Doktora: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji. Anabilim Dalı (2010-2014)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede (ÜDS 71.25, Eylül 2013)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



Sayı : 36643897-180

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
Kayıt No : 2227
Tarih : 20.12.2013
Dosya No : 20.12.2013 02
ERZURUM

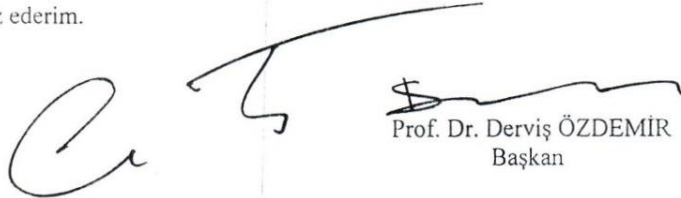
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 20.11.2013 tarih ve 25330273.02/1578 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Periodontoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Recep ORBAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Diagnoz ve Radyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında ve Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Deneysel Periodontitis Oluşturulmuş Ratlarda Carvacrol Uygulamasının Periodontal Dokular Üzerine Olan Etkilerinin Biyokimyasal, Histolojik ve Radyolojik Olarak İncelenmesi”** başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 18.12.2013 tarih ve 7 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 149 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

Toplantı Tarihi : 18.12.2013

Toplantı Sayısı : 7

KARAR NO : 149- Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı, Periodontoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Recep ORBAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Diagnoz ve Radyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında ve Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Deneysel Periodontitis Oluşturulmuş Ratlarda Carvacrol Uygulamasının Periodontal Dokular Üzerine Olan Etkilerinin Biyokimyasal, Histolojik ve Radyolojik Olarak İncelenmesi”** başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığının 20.11.2013 tarih ve 25330273.02/1578 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-236 08 80 Fax : 0-442-236 08 81 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr